Neue Serummarker bei urologischen Malignomen mit dem Schwerpunkt Prostatakarzinom und Anwendung von Proteinase-Inhibitoren in der Therapie des Prostatakarzinoms

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach
Urologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dr. med. Michael Torsten Lein

geboren am 27.01.1966 in Hoyerswerda

Präsident: Prof. Dr. Dr. h.c. H. Meyer

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. R. Felix

Eingereicht am:

Gutachter:
1.
2.
3.

Gliederung

		Seite
1.	**Vorbemerkungen**	4-5
2.	**Prostataspezifisches Antigen**	
2.1.	Diagnostik des Prostatakarzinoms – Stellenwert des PSA	6-10
2.2.	Eigene Untersuchungen	
	2.2.1. Schnellteste für die Bestimmung des PSA	10-12
	2.2.2. Einschätzung der Diskriminationsfähigkeit des prozentualen freien PSA	12-16
	2.2.3. Diagnostische Validität des gebundenen PSA	16-18
3.	**Adhäsionsproteine (CD44)**	
3.1.	Bedeutung der Adhäsionsproteine	18-19
3.2.	Eigene Ergebnisse - Adhäsionsproteine (CD44) als Tumormarker bei urologischen Malignomen	20
4.	**Matrix-Metalloproteinasen und deren Inhibitoren**	
4.1.	Bedeutung der Matrix-Metalloproteinasen	21-24
4.2.	Eigene Untersuchungen	
	4.2.1. Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und deren Inhibitoren als Marker bei urologischen Tumoren	24-27
	4.2.2 Tierexperimentelle Untersuchungen zu MMPs beim Prostatakarzinom	27-28
	4.2.3. Einsatz von synthetischen Inhibitoren zur Blockierung der MMP-Aktivität beim Prostatakarzinom	28-31
5.	**Literatur**	
5.1.	Eigene Artikel als Erstautor	32-33
5.2.	Eigene Artikel als Koautor	33-34
5.3.	Literatur	34-37
6.	**Zusammenfassung**	38-39
7.	**Danksagung und eidesstattliche Erklärung**	40

Verwendete Abkürzungen

PCa	Prostatakarzinom
BPH	benigne Prostatahyperplasie
PSA	prostataspezifisches Antigen
t-PSA	totales PSA (Gesamt-PSA)
f-PSA	freies PSA
f-PSA%	prozentuales freies PSA
ACT	α_1-Antichymotrypsin
ACT-PSA	α_1-Antichymotrypsin-PSA
cPSA	komplexiertes PSA
MMPs	Matrix-Metalloproteinasen
TIMP	Gewebsinhibitor der MMP (Tissue Inhibitor of Matrix-metalloproteinase)
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

1. Vorbemerkungen

Die vorgestellten Ergebnisse dieser Habilitationsschrift basieren auf Untersuchungen, die ich an der Klinik für Urologie am Universitätsklinikum Charité der Humboldt-Universität zu Berlin gemeinsam mit Doktoranden und Mitarbeitern der Klinik durchgeführt habe. An den Untersuchungen waren insgesamt fünf Doktoranden beteiligt, von denen zum gegenwärtigen Zeitpunkt vier ihre Dissertation mit Erfolg abgeschlossen haben. Weiterhin arbeiteten an den Untersuchungen technische Mitarbeiter der Forschungsabteilung der Klinik mit. Ohne die großzügige Förderung durch den Direktor der Klinik, Herrn Prof. Dr. Stefan A. Loening, und seinen Stellvertreter, Herrn Prof. Dr. Dietmar Schnorr, wären die durchgeführten Untersuchungen nicht möglich gewesen. Die tierexperimentellen Voraussetzungen wurden während meines Forschungsaufenthaltes an der *Harvard Medical School* (Boston, USA) geschaffen und an der Charité fortgeführt. Es steht damit ein etabliertes Prostatakarzinom-Tiermodell zur Verfügung, mit dem neue Therapiemethoden auch über den Rahmen der vorliegenden Arbeit hinaus erarbeitet und überprüft werden können.

Im Mittelpunkt meiner Forschungsarbeiten steht die Validierung von neuen Markern bei urologischen Tumoren mit dem Schwerpunkt des Prostatakarzinoms und die Erarbeitung neuer Therapiestrategien beim Prostatakarzinom.

Die hier vorgestellten Ergebnisse wurden in den letzten Jahren in *peer reviewed* Zeitschriften publiziert und auf internationalen Kongressen vorgetragen. Auf Grund der Publikationstätigkeit auf dem Gebiet des prostataspezifischen Antigens (PSA) wurde mir von den Herausgebern des „Urologen A“, der wissenschaftlichen Zeitschrift der Deutschen Gesellschaft für Urologie, der Auftrag erteilt, einen Übersichtsartikel zu den Isoformen des PSA und deren diagnostische Aussagekraft zu erarbeiten (Artikel Nr. E8).

Ich habe mich entschieden, 14 Artikel zu der Thematik als wesentlichen Bestandteil in diese Habilitationsschrift aufzunehmen. Diese Arbeiten habe ich als Erstautor in den Jahren 1996 bis 2000 publiziert bzw. zur Publikation eingereicht. Im folgenden sind diese Arbeiten als Literaturzitate E1 bis E14 aufgeführt und vollständig in die Habilitationsschrift eingefügt. Gleichzeitig habe ich zusätzlich weitere 14 Artikel aufgeführt, bei denen ich als Koautor verzeichnet bin. Diese Arbeiten sind als K1 bis K14 gekennzeichnet.

Die Artikel sind unter den drei Kapiteln „Prostataspezifisches Antigen“, „Adhäsionsproteine (CD44)“ und „Matrix-Metalloproteinasen und deren Inhibitoren“ zusammengefaßt. Diese Kapitel bestehen jeweils aus einem einleitenden Abschnitt und einer

Beschreibung der eigenen Publikationen (E1 bis E14). In der Einleitung der jeweiligen Kapitel werden die Grundlagen kurz erläutert und der aktuelle Kenntnisstand zum entsprechenden Thema dargestellt. Dabei wird nur auf die wesentlichen Veröffentlichungen Bezug genommen, die entsprechenden Literaturangaben werden am Ende aufgeführt. Im Anschluß an die Einleitung erfolgt die Darlegung der Ergebnisse der eigenen Arbeiten (Erstautorenschaft; E1 bis E14), die wesentlicher Bestandteil dieser Habilitationsschrift sind. Diese werden in entsprechenden separaten Gliederungspunkten abgehandelt.

Bewußt habe ich darauf verzichtet, Grundlagen, Methodik und Diskussion der Einzelergebnisse noch einmal detailliert darzustellen. Dazu möchte ich auf die entsprechenden Publikationen verweisen. In der vorliegenden Schrift werden die Ergebnisse lediglich kurz skizziert. Besonderer Wert wird hingegen auf die entscheidenden Aussagen gelegt.

Die experimentellen Untersuchungen zu neuen synthetischen Inhibitoren von Matrix-Metalloproteinasen in der Tierstudie werden ausführlicher beschrieben, da diese wegen vertraglicher Vereinbarungen mit *Roche Diagnostics GmbH* erst jetzt veröffentlicht werden können.

2. Prostataspezifisches Antigen

2.1. Diagnostik des Prostatakarzinoms – Stellenwert des PSA

Das Prostatakarzinom (PCa) ist der am häufigsten vorkommende bösartige Tumor des Mannes und weist nach dem Bronchialkarzinom die höchste Mortalitätsrate auf. Im Jahr 2000 werden in den USA 180400 Erstdiagnosen an PCa erwartet, die mit einer geschätzten Mortalität von 31900 Patienten einhergehen.[1] Diese Situation bedeutet eine enorme medizinisch-ethische sowie wirtschaftliche Herausforderung hinsichtlich Diagnostik, Therapiewahl und Verlaufskontrolle. Die Bedeutung dieser Krebserkrankung des Mannes spiegelt sich auch in den Bemühungen weltweiter Gesundheitsorganisationen zur Optimierung der Diagnostik wider. Voraussetzung für ein kuratives Therapiekonzept des einzelnen Patienten ist die rechtzeitige Diagnosestellung mit einer lokalisierten und nicht metastasierten Tumorerkrankung.[2] Weiterhin muß berücksichtigt werden, daß präventive Maßnahmen bisher nicht effektiv sind.

Zur Früherkennung des PCa sind verschiedene Methoden etabliert. Die häufigste Lokalisation des PCa ist im dorsalen Anteil der Prostata festzustellen. Deshalb kann durch regelmäßige digitale rektale Palpation ein Teil der Karzinome frühzeitig erfaßt werden. Die zweite wesentliche Kenngröße in der Frühdiagnostik des PCa ist die Bestimmung des t-PSA.[3] Das PSA-Gen gehört zur Familie der humanen Kallikreine.[4] PSA ist ein Glykoprotein von ca. 30 kDa. Es wird primär in den Prostataepithelzellen synthetisiert und in das Seminalplasma sezerniert. Dort liegt es in einer sehr hohen Konzentration (ca. 0,5–3 g/l) vor. Im Serum von gesunden Männern ist es dagegen mit ca. 10^6-fach geringerer Konzentration (ca. 4 µg/l) nachweisbar.

Bereits in den sechziger Jahren wurde über Antikörper gegen ein spezielles prostatisches Antigen berichtet.[5] Später konnten im Rahmen forensischer Untersuchungen verschiedene prostatische Antigene nachgewiesen werden. Die erste definitive Charakterisierung erfolgte im Jahre 1979.[6] Nach der Identifizierung dieses nunmehr als „prostataspezifisches Antigen“ bezeichneten Proteins wurden zuerst Radioimmunoassays, später ELISA-Tests entwickelt. Die in den USA auch für Genehmigungen von Testsystemen zuständige Gesundheitsbehörde (*Food and Drug Administration*) hat das PSA als einzigen Tumormarker 1986 zur Therapieüberwachung und 1994 zur Früherkennung des PCa gemeinsam mit der rektalen Palpation zugelassen.

Die Einführung von Testsystemen für die Routinebestimmung des t-PSA hat die Diagnostik und Therapiekontrolle beim PCa nachhaltig verändert.[7] In der Kontrolle nach radikaler Prostatektomie, Bestrahlung oder antiandrogener Therapie ist das t-PSA ein unverzichtbarer Parameter, da die Serumkonzentration des t-PSA mit der aktuellen Tumorsituation korreliert.[7] Die Anwendung des t-PSA in der Vorsorgeuntersuchung ermöglichte zunehmend die Erfassung von PCa in frühen, potentiell kurablen Tumorstadien.[8] In den USA hat sich durch die Einführung der t-PSA-Bestimmung die Inzidenz von lokalisierten PCa signifikant erhöht, während sich der Anteil an fortgeschrittenen Erkrankungen kontinuierlich verringert hat.[9] Etwa die Hälfte der diagnostizierten PCa sind lokalisiert und können einer kurablen lokalen Therapie zugeführt werden.[10]

In früheren Untersuchungen konnte das volle diagnostische Potential des t-PSA für die Unterscheidung zwischen PCa und BPH wegen ungenügender Sensitivität des Testes nicht klar gezeigt werden. Neuere Studien haben die klinische Zuverlässigkeit des t-PSA in der Diagnostik des PCa untermauert. In den neunziger Jahren wurde in mindestens fünf umfangreichen Studien gezeigt, daß durch die alleinige Bestimmung des t-PSA das organbegrenzte PCa früher nachgewiesen wird als mit der traditionellen digitalen rektalen Palpation.[8,11-14] Der positive prädiktive Wert des t-PSA stieg von ca. 10% bei Männern mit einem t-PSA < 4 µg/l auf über 80% bei einem t-PSA > 20 µg/l. Die Inzidenz des PCa und die Inzidenz des fortgeschrittenen PCa korrelieren mit steigender t-PSA-Konzentration. Mehr als die Hälfte der Patienten mit einer t-PSA-Konzentration > 10 µg/l hatte bereits eine fortgeschrittene Tumorerkrankung. Deshalb erfordert eine Erfassung von frühen Tumorstadien einen niedrigen t-PSA-Grenzwert. Es ist daher sinnvoll und notwendig, auf eine breite Anwendung des t-PSA zur Krebsvorsorge und auf eine Optimierung der diagnostischen Aussagekraft dieses Parameters zu orientieren.

Diese Untersuchungen verdeutlichen aber auch die begrenzte Aussagekraft des t-PSA als Marker für ein PCa. Basierend auf dem allgemein akzeptierten t-PSA-Grenzwert von 4 µg/l werden bis zu 65% falsch-positive Ergebnisse beobachtet.[15] Andererseits weisen ca. 20% der Patienten mit einem gesicherten PCa zum Zeitpunkt der Diagnose einen „unauffälligen“ t-PSA-Wert von < 4 µg/l auf.[11] PSA ist weitgehend organ-, nicht jedoch tumorspezifisch. Erhöhte t-PSA-Konzentrationen werden auch bei gutartigen Prostataerkrankungen wie bei der BPH oder bei Entzündungen sowie nach diagnostischen und therapeutischen Maßnahmen gefunden. Der Überlappungsbereich zwischen gutartigen und bösartigen Prostataerkrankungen schränkt die Diskriminationsfähigkeit des Parameters erheblich ein.

Die relativ häufigen falsch-positiven und falsch-negativen Ergebnisse der PSA-Bestimmungen können durch Berechnung des PSA-Prostatavolumenquotienten, der PSA-Anstiegsgeschwindigkeit sowie durch Anwendung altersspezifischer PSA-Referenzgrenzen reduziert werden.[16,17] Diese Konzepte haben jedoch nur teilweise die an sie gestellten Erwartungen erfüllt.[18] Weitere erfolgversprechende Möglichkeiten, die Diskriminationsfähigkeit des Tumormarkers PSA zu verbessern, eröffnen sich durch die Bestimmung der PSA-Isoformen.

PSA zirkuliert im Serum als an Proteinaseinhibitoren gebundenes und nicht-gebundenes, freies PSA.[19] Etwa 70-90% des PSA ist an α_1-Antichymotrypsin (ACT) und ein deutlich kleinerer Teil an α_1-Antitrypsin, Inter-α-Trypsin-Inhibitor, Antithrombin oder an Protein C gebunden. Das verbleibende f-PSA mit etwa 10-30% des t-PSA ist im Serum nicht an Proteine gebunden. Eine weitere Fraktion des t-PSA wird vom α_2-Makroglobulin vollständig umschlossen und kann derzeit von kommerziell erhältlichen Testsystemen nicht erfaßt werden.[20] In zahlreichen, auch multizentrischen Untersuchungen konnte belegt werden, daß Patienten mit einem PCa einen signifikant geringeren Anteil an f-PSA aufweisen als Patienten mit einer BPH bzw. gesunde Männer. [21-23] Die Wahrscheinlichkeit, daß ein PCa vorliegt, steigt mit sinkendem Anteil an f-PSA. In verschiedenen retrospektiven Untersuchungen wurde gezeigt, daß zwischen 19% und 64% negative Biopsiebefunde durch die Bestimmung des f-PSA% hätten vermieden werden können.[22,24,25]

Wie beim t-PSA, bestimmen auch beim f-PSA% die angewendeten Entscheidungsgrenzen über die diagnostische Sensitivität bzw. Spezifität. Die Festlegung dieser Grenzwerte ist deshalb von enormer klinischer Bedeutung und war auch Gegenstand meiner Untersuchungen.

Die molekularen Ursachen für das unterschiedliche Verhalten der PSA-Isoformen im Serum von PCa- und BPH-Patienten sind bisher nicht sicher geklärt. Es wurden verschiedene Hypothesen postuliert. Auf zellulärer Ebene könnte eine veränderte Synthese von ACT in den Tumorzellen verantwortlich sein.[26] Dadurch würden sich im Vergleich zu gesunden oder BPH-Zellen vermehrt ACT-PSA-Komplexe in den Tumorzellen bilden, bevor diese in die Blutzirkulation abgegeben werden. Eine weitere Möglichkeit besteht in der unterschiedlichen Freisetzung von enzymatisch inaktivem PSA.[27] Dieses inaktive PSA zeigt ein verändertes Reaktionsmuster mit den Proteinase-Inhibitoren des Serums. Das inaktive PSA, auch als „nicked PSA“ bezeichnet, ist nicht in der Lage ACT zu binden. Es wird angenommen, daß diese Modifikation im Extrazellulärraum des Gewebes stattfindet und bei Gesunden oder BPH-Patienten in größerem Umfang erfolgt als im Prostatakarzinomgewebe. Zusätzlich

könnte auf Grund der veränderten Gewebsarchitektur beim Karzinom PSA direkt in die Zirkulation abgegeben werden, ohne sich im Extrazellulärraum anzureichern. Auch eine abweichende Glykosilierungsrate des PSA in den Tumorzellen könnte zu charakteristischen Veränderungen der Eliminationskinetik der entsprechenden PSA-Isoformen führen und somit die Unterschiede erklären.[28]

Auch der gebundene Anteil des PSA als die größte t-PSA-Fraktion im Serum unterscheidet sich zwischen PCa- und BPH-Patienten.[29] Eine verbesserte Differenzierung zwischen BPH und PCa wurde durch Bestimmung des ACT-PSA postuliert.[30] Für die direkte ACT-PSA-Bestimmung bestehen grundsätzlich zwei Möglichkeiten. Einmal durch Bindung des t-PSA der Probe an einen t-PSA-Antikörper, der an eine Festphase gekoppelt ist, und die anschließende Erfassung des ACT-PSA-Anteils mit ACT-Antikörpern. Zum anderen kann ACT-PSA durch Antikörper gegen ACT an eine Festphase fixiert und danach mit Hilfe von t-PSA-Antikörpern bestimmt werden. Für die Bestimmung der größten PSA-Fraktion sprechen sowohl analytische als auch klinische Gründe.[29] So ermöglichen die im Vergleich zum f-PSA höheren ACT-PSA Konzentrationen eine bessere Detektion im Serum. Die exakte Bestimmung von ACT-PSA im Serum wurde bisher durch analytische bzw. technische Probleme verhindert.[31] Beispielgebend sei an dieser Stelle auf Interferenzen mit dem ACT-Cathepsin-G-Komplex hingewiesen.[32] Diese Schwierigkeiten konnten in jüngster Zeit weitestgehend beseitigt werden.[32]

In der Literatur wird die Diskriminationsfähigkeit des ACT-PSA kontrovers diskutiert.[31,33,34,35] Der größte Teil dieser Studien wurde an relativ kleinen Probandengruppen mit ungenügend standardisierten Testsystemen durchgeführt. Von einigen Untersuchern wird ein Vorteil der Bestimmung von ACT-PSA bzw. des Quotienten ACT-PSA/t-PSA beschrieben, da im Vergleich zum f-PSA% eine bessere Differenzierung zwischen PCa und BPH möglich sein soll.[19,31,34]

Die potentiellen Möglichkeiten und die teilweise erfolgversprechenden Ergebnisse waren für uns Anlaß, eine Multizenterstudie zum ACT-PSA durchzuführen. Im Rahmen dieser Entwicklungen muß auf ein neues, inzwischen kommerziell erhältliches Testsystem hingewiesen werden, mit dem sogenanntes cPSA im Serum bestimmt werden kann.[36,37] Es basiert darauf, daß der zum Nachweis von t-PSA verwendete Antikörper seine Bindungsfähigkeit zum f-PSA in Anwesenheit eines zweiten, für f-PSA spezifischen Antikörpers verliert. Hierdurch wird nicht nur das ACT-PSA, sondern es werden auch andere PSA-Inhibitoren-Komplexe erfaßt. Diesem Prinzip liegt die cPSA-Bestimmung zugrunde, wie

sie die Firma *Bayer* als Test am *Immunoanalyzer 1* anbietet.[37] Diese Methode soll bei alleiniger Bestimmung des cPSA im Vergleich zum f-PSA% eine bessere Diskrimination zwischen PCa und BPH ermöglichen.[36,37] Auch dieses Verfahren war für uns von besonderem Interesse, so daß Untersuchungen zur diagnostischen Aussagekraft im Vergleich zu den etablierten Markern durchgeführt wurden.

2.2. Eigene Untersuchungen

2.2.1. Schnellteste für die Bestimmung des PSA

Wie im einführenden Teil erklärt, liegt der besondere Stellenwert des t-PSA in der Früherkennung von organbegrenzten, potentiell kurablen Karzinomen. Damit ist eine Grundvoraussetzung erfüllt, PSA zu Screeningzwecken einzusetzen. Zu den Anforderungen an ein Screening-Verfahren gehört außerdem eine einfache, kostengünstige Durchführbarkeit des Tests, wobei eine gute analytische Zuverlässigkeit gewährleistet sein muß. Im allgemeinen wird t-PSA mit Radioimmuno- oder Enzymimmuno-Testsystemen bestimmt. Das sind inzwischen Routinemethoden. Sie erfordern jedoch eine entsprechende kostenintensive Ausrüstung. Der Einsatz von Schnelltesten zur Erfassung erhöhter t-PSA-Konzentrationen, ähnlich den Schwangerschaftstesten, würde dem Vorhaben einer populationsorientierten, effektiven Vorsorgeuntersuchung entsprechen. Jeder niedergelassene Urologe bzw. Praktiker könnte diesen Test durchführen, das Ergebnis unmittelbar mit dem Patienten besprechen und eventuell weitere notwendige Maßnahmen einleiten. Die Einschätzung und Beurteilung solcher neuen Testverfahren mit schneller Verfügbarkeit und Verbreitung sind aus urologischer Sicht von hoher Relevanz.

Bereits 1996 wurde ein erster kommerziell verfügbarer Streifen-Schnelltest zur Erfassung von t-PSA-Konzentrationen > 4 µg/l untersucht (Artikel Nr. E1). Zur Beurteilung dieses Streifentestes erfolgte die Bestimmung von Serumproben parallel mit dem Streifentest und drei quantitativen, etablierten t-PSA-Bestimmungsmethoden. Analytische Rahmenbedingungen, wie *intra-* und *inter-observer variation*, wurden ermittelt. Es konnte eingeschätzt werden, daß die Anforderungen an ein solches Testsystem bezüglich der Praktikabilität erfüllt waren. Dieser Streifentest ist ein einfaches, kostengünstiges Verfahren, das in jeder Praxis innerhalb kurzer Zeit durchgeführt werden kann und keine besondere Ausbildung erfordert. Die hohe Rate an falsch-negativen Ergebnissen vor allem im sensiblen t-PSA-Bereich zwischen 4 und 8 µg/l entspricht jedoch nicht den notwendigen klinischen

Erfordernissen, da möglicherweise ein organbegrenztes PCa nicht frühzeitig erkannt wird. Die Diagnose PCa verzögert sich und macht eine kurative Therapie wegen einsetzender Metastasierung nicht mehr möglich. Auf Grund unserer Ergebnisse mußte der Test in der bestehenden Form als Bestandteil der Vorsorgeuntersuchung abgelehnt werden.

Weiterhin muß darauf hingewiesen werden, daß auch bei analytisch sicherer Erfassung von Serumkonzentrationen > oder < 4 µg/l t-PSA mit einem solchen Test die Differenzierung der Patienten mit systematischen Problemen behaftet ist. Zeigen Teststreifen PSA-Konzentrationen > 4 µg/l an, sollten sich quantitative Bestimmungen anschließen, bevor weitere diagnostische Maßnahmen (Biopsien) eingeleitet werden. Bis zu 20% der Männer mit einem „normalen“ t-PSA zwischen 2,6 und 4 µg/l entwickeln nach 3 bis 5 Jahren ein klinisch erfaßbares Karzinom.[38]

In den letzten Jahren wurden die PSA-Schnellteste weiterentwickelt. In einer Untersuchung unserer Arbeitsgruppe erfolgte die Beurteilung von vier neuen Testsystemen zur Erfassung von t-PSA-Konzentrationen > 4 µg/l.[K1] Technische Verbesserungen haben dazu geführt, daß zwei der vier untersuchten Testsysteme als zuverlässig beurteilt wurden. Methodische Optimierungen, wie die Erfassung verschiedener t-PSA-Bereiche (z.B. 0-2, 3-4, 4-6, 7-10 µg/l) wurden aber auch mit diesen Testen nicht erzielt.

Um den Anforderungen in der Praxis und den Erwartungen der Patienten zu entsprechen, müßten diese Testsysteme noch weiter verbessert und auf eine einfache, schnelle und vor allem quantitative Bestimmung des t-PSA einschließlich des f-PSA% orientieren. Im Rahmen des *„Fifth Framework Program, Quality of Life & Management of Living Resources“* der Europäischen Union ist unsere Arbeitsgruppe gemeinsam mit Institutionen aus 9 Ländern Antragsteller des Projektes *„Development of a dual analyte immunosensor for the detection of free and total prostate specific antigen as a tool for screening of prostate cancer“*. Das Ziel ist die Entwicklung und Evaluierung eines Immunsensors für t-PSA und f-PSA. Dieses Testsystem bestimmt simultan in einem Blutstropfen die Konzentrationen von t-PSA, f-PSA und errechnet den f-PSA%-Wert. Der transportable *„Labtop-Analyzer“* könnte in Zukunft die Anforderungen an einen Schnelltest für die zuverlässige Bestimmung dieser Tumormarker erfüllen.

<u>Artikel (Erstautorenschaft):</u>

E1 Lein M, Jung K, Schnorr D, Henke W, et al.: Strip test for the quick detection of increased concentrations of prostate-specific antigen in blood. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1996; 34: 511-514.

Weitere Artikel mit Koautorenschaft (nicht in der Habiliationsschrift enthalten):

K1 Jung K, Zachow J, Lein M, Brux B, et al.: Rapid detection of elevated prostate-specific antigen levels in blood: performance of various membrane strip test compared. Urology 1999; 53: 155-160.

2.2.2. Einschätzung der Diskriminationsfähigkeit des prozentualen freien PSA

Die Bestimmung der PSA-Isoformen zur Verbesserung der Diskriminationsfähigkeit der PSA-Bestimmung zwischen PCa und BPH wurden im einführenden Teil beschrieben. Auch unsere Arbeitsgruppe hat umfangreiche Untersuchungen zur diagnostischen Aussagekraft des f-PSA durchgeführt.

Für die Differenzierung zwischen Patienten mit PCa und BPH wird zunehmend der f-PSA%-Wert als zusätzliches Entscheidungskriterium zur Durchführung einer Stanzbiopsie der Prostata eingesetzt. Für diese Kenngröße weichen die durch verschiedene Autoren empfohlenen Diskriminationsgrenzen zum Teil erheblich voneinander ab. Dies erschwert die Vergleichbarkeit und exakte Interpretation der Daten. In einer zusammenfassenden Arbeit habe ich diese Entscheidungskriterien bereits publizierter Studien aufgelistet (Artikel Nr. E2). Eigene Daten zum f-PSA% und die daraus abgeleiteten Empfehlungen für eine Stanzbiopsie der Prostata wurden den Literaturangaben kritisch gegenübergestellt. Obwohl seit Publikation der Arbeit inzwischen zwei Jahre vergangen sind, besteht dieses grundsätzliche Problem weiterhin.

Die Ursachen für die unterschiedlichen f-PSA%-Referenzgrenzen sind im wesentlichen auf verschiedene Faktorenkomplexe zurückzuführen. Die Bestimmung von f-PSA und t-PSA ist methodenabhängig. Die Verwendung unterschiedlicher Antikörper, die Anwendung verschiedener Techniken sowie der Einsatz unterschiedlicher Kalibratoren sind einige Ursachen. Die Methodenabhängigkeit der t-PSA-Bestimmung ist bereits vielfach diskutiert worden. Ähnliche Probleme ergeben sich auch für die Bestimmung des f-PSA. Daraus leitet sich die Forderung ab, f-PSA- und t-PSA-Bestimmungen im Serum mit Systemen vom gleichen Hersteller durchzuführen. Eine Kombination nichtfirmengleicher Testkombinationen würde die Streubreite der f-PSA%-Werte deutlich erhöhen. Meßwerte von einem Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten, die mit unterschiedlichen Testsystemen erstellt worden sind, können so nicht miteinander verglichen werden. Fehlinterpretationen wären die Folge. Diese Situation führt zu einer deutlichen Einschränkung der Praktikabilität der PSA-Bestimmungen, da die Vergleichbarkeit von Befunden beeinträchtigt ist.

Eine weitere Ursache der unterschiedlichen f-PSA%-Referenzgrenzen ist das diagnostische Kriterium, nach der die Entscheidungsgrenze festgelegt wird. In der erwähnten Arbeit (Artikel Nr. E2) sind die Daten von verschiedenen Arbeitsgruppen als Übersicht zusammengefaßt. Der Diskriminationspunkt für die f-PSA%-Referenzgrenzen wurde sowohl auf Basis der diagnostischen Sensitivität als auch der Spezifität und Effizienz festgelegt.

Während der Einfluß verschiedener physiologischer und pathologischer Faktoren auf die t-PSA-Konzentration im Serum gut bekannt ist, ist der Effekt solcher Variablen auf die f-PSA-Konzentration und den f-PSA%-Wert bisher nur ungenügend beachtet worden. Und dies, obwohl deren Kenntnis von großer praktischer Bedeutung ist.

Altersabhängige Referenzgrenzen für t-PSA werden bereits auf der Grundlage von umfangreichen Untersuchungen empfohlen.[39] Bei Prostata-Gesunden steigt die 90. bzw. 95. Perzentile des t-PSA mit dem Alter der Referenzgruppe. Im Rahmen der Multizenterstudie „*International Study PSA free 1996*“ wurden von uns 1160 gesunde Probanden ausgewertet, bei denen t-PSA und f-PSA bestimmt wurden (Artikel Nr. E3). Die t-PSA- und f-PSA-Konzentrationen im Serum waren signifikant unterschiedlich zwischen den einzelnen Altersdekaden und korrelierten positiv mit dem Alter der Probanden. Im Gegensatz dazu konnte ein Alterseffekt auf die f-PSA%-Werte für den gesamten Bereich der klinisch relevanten Altersgruppen nicht nachgewiesen werden. Diese Beobachtung ist von direkter praktischer Bedeutung und vereinfacht die Anwendung der Kenngröße f-PSA%. Bei der Interpretation des errechneten f-PSA%-Wertes muß der Untersucher deshalb nicht das Alter des Patienten bei der Indikationsstellung zur Stanzbiopsie der Prostata berücksichtigen. Eine endgültige Bewertung der Altersabhängigkeit dieses Parameters kann zum jetzigen Zeitpunkt jedoch noch nicht ausgesprochen werden, da es auch einige gegenteilige Befunde gibt.[40]

In weiterführenden Untersuchungen wurde der Einfluß des Prostatavolumens und verschiedener Prostataerkrankungen auf die Sensitivität und Spezifität des Parameters f-PSA% evaluiert.[K2,K3,K4] In einer Untersuchung an insgesamt 80 Männern erwies sich das Prostatavolumen als eine wesentliche Einflußgröße des f-PSA%. Bei Drüsen mit einem Volumen > 40 ml kommt es zu einem vollständigen Verlust der Differenzierungsfähigkeit des f-PSA%.[K2]

Bei Patienten mit histologisch gesicherter chronischer Prostatitis wurde ein vergleichbares Verhalten des f-PSA% festgestellt, wie dies beim PCa beobachtet wird.[K3] Diese nichtmaligne Erkrankung der Prostata führt ähnlich wie das PCa zu einem Abfall des f-PSA%-Wertes. Die daraus resultierenden möglichen falsch-positiven Ergebnisse beim

PCa-Screening mit dem Parameter f-PSA% müssen vom behandelnden Arzt bei der Entscheidung über die Durchführung einer Stanzbiopsie der Prostata berücksichtigt werden.

In einer Untersuchung unserer Arbeitsgruppe an insgesamt 760 Probanden wurde der Einfluß der Art der Prostataerkrankung, des Tumorstadiums, des Patientenalters und spezieller Behandlungsformen herausgearbeitet. Die Ergebnisse von Voruntersuchungen (z.B. Effekt des Prostatavolumens) wurden bestätigt.[K4] Eine Beziehung zwischen dem f-PSA-Wert und dem Tumorstadium sowie ein Einfluß der unterschiedlichen Therapieformen war nicht nachweisbar.

Für ein besseres Verständnis des PSA-Metabolismus und für die Anwendung der Kenngröße f-PSA% als Prognosefaktor nach radikaler Prostatektomie ist die Kenntnis der Eliminationskinetik von t-PSA und f-PSA von Bedeutung. Erst in den späten 80er Jahren wurden Untersuchungen zur Eliminationskinetik des PSA mit einer Halbwertzeit von 2 bis 3 Tagen veröffentlicht.[41] Nach der Entdeckung der verschiedenen Isoformen des PSA erfolgte der Nachweis der Eliminierung des f-PSA anhand von biphasischen Modellen.[42] Über die exakten Eliminations-Mechanismen der einzelnen Isoformen ist nur wenig bekannt. Die Leber ist wahrscheinlich verantwortlich für den größten Teil der PSA-Metabolisierung.[43,44] F-PSA wird möglicherweise nach glomerulärer Filtration und tubulärer Reabsorption in der Niere abgebaut. ACT-PSA und das an α_2-Makroglobulin gebundene PSA kommt wegen der Proteingröße für eine glomeruläre Filtration nicht in Frage.

In einer ersten eigenen Untersuchung wurden bei Patienten mit organbegrenztem PCa die Konzentrationen von t-PSA und f-PSA nach radikaler Prostatektomie in kurzen Abständen bestimmt (Artikel Nr. E4). Das gewählte Verfahren gestattete Aussagen zur Elimimationskinetik beider Parameter. In dieser Studie wurde auch ein biphasisches Verhalten beider Komponenten dokumentiert. Die Konzentrationen beider Formen verringerten sich im Serum nach der Operation rapide. Für f-PSA war diese Elimination jedoch wesentlich schneller. Das sehr schnelle Verschwinden des f-PSA in der frühen Eliminationsphase könnte durch die Bindung an ACT oder an andere Proteinasen-Inhibitoren erklärt werden. Zusammenfassend wurde festgestellt, daß beide Komponenten biphasisch aus dem Serum eliminiert werden und t-PSA wesentlich später im Serum nach der Prostatektomie verschwindet als f-PSA. Von wichtiger praktischer Bedeutung ist die Dokumentation der erforderlichen Zeit bis zur vollständigen Elimination des t-PSA. Nach diagnostischen Manipulationen an der Prostata, wie z.B. der rektalen Palpation oder Stanzbiopsie, sollten drei

Wochen vor der nächsten PSA-Serumbestimmung abgewartet werden. Erst dann kann die optimale diagnostische Aussagekraft des t-PSA und des f-PSA% genutzt werden.

In einer fortführenden Untersuchung erfolgte die Evaluierung der Eliminationskinetik des gebundenen PSA.[K5] Diese Arbeiten wurden durchgeführt, um den PSA-Metabolismus besser zu charakterisieren. Im Gegensatz zum t-PSA und f-PSA blieben die Konzentrationen von ACT-PSA und cPSA nach radikaler Prostatektomie über 6 Stunden nahezu konstant. Eine rasche Elimination des f-PSA und ein etwas weniger ausgeprägter Abfall von t-PSA war zu beobachten. In der anschließenden Phase kam es zu einem konstanten Abfall von ACT-PSA, cPSA und t-PSA. F-PSA wurde auch jetzt deutlich schneller eliminiert. Dieses Ergebnis bekräftigt die Hypothese, daß die rapide Abnahme von f-PSA unmittelbar nach der Prostatektomie durch Komplexierung des f-PSA mit ACT bzw. anderen Proteinase-Inhibitoren zustande kommen könnte.

Basierend auf unseren Auswertungen, die auf den *IMMULITE* PSA-Testen der Firma *DPC Biermann* beruhen, habe ich Empfehlungen zur Nutzung des Parameters f-PSA% als Entscheidungskriterium für eine Stanzbiopsie der Prostata abgeleitet (Artikel Nr. E2). Bei tumorsuspektem Tastbefund der Prostata muß immer eine Stanzbiopsie (Sextanten- oder Oktantenbiopsie) der Prostata durchgeführt werden. Bei unauffälligem Tastbefund, einem Prostatavolumen < 40 ml und einem t-PSA zwischen 2 und 4 µg/l sollte bei einem f-PSA%-Wert < 9% eine Stanzbiopsie durchgeführt werden, um organbegrenzte PCa zu erfassen. Im t-PSA-Bereich von 4 bis 10 µg/l empfehlen wir als Diskriminationspunkt für das f-PSA% 15%. Diese Entscheidungsgrenze ergibt die höchste Effizienz.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die zielgerichtete Anwendung der Kenngröße f-PSA% eine Optimierung der Stanzbiopsie bzw. Wiederholungsbiopsie in der PCa-Diagnostik ermöglicht.

<u>Artikel (Erstautorenschaft):</u>

E2 Lein M, Stephan C, Jung K, Schnorr D, et al.: Relation of free PSA/total PSA in serum for differentiating between patients with prostatic cancer and benign hyperplasia of the prostate: which cutoff should be used? Cancer Invest 1998; 16: 45-49.

E3 Lein M, Koenig F, Jung K, McGovern FJ, et al.: The percentage of free prostate specific antigen is an age-independent tumour marker for prostate cancer: establishment of reference ranges in a large population of healthy men. Br J Urol 1998; 82: 231-236.

E4 Lein M, Brux B, Jung K, Henke W, et al.: Elimination of serum free and total prostate-specific antigen after radical retropubic prostatectomy. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1997; 35: 591-595.

Weitere Artikel mit Koautorenschaft (nicht in der Habiliationsschrift enthalten):

K2 Stephan C, Lein M, Jung J, Schnorr D, et al.: The influence of prostate volume on the ratio of free to total prostate specific antigen in serum of patients with prostate carcinoma and benign prostate hyperplasia. Cancer 1997; 79: 104-109.

K3 Jung K, Meyer A, Lein M, Rudolph B, et al.: Ratio of free to total prostate specific antigen in serum can not distinguish patients with prostate cancer from those with chronic inflammation of the prostate. J Urol 1998; 159: 1595-1598.

K4 Meyer A, Jung K, Lein M, Schnorr D, et al.: Factors influencing the ratio of free to total prostate specific antigen in serum. Int J Cancer 1997; 74: 630-636.

K5 Stephan C, Jung K, Brux B, Lein M, et al.: ACT-PSA and complexed PSA elimination kinetics in serum after radical retropubic prostatectomy: proof of new complex forming of PSA after release into circulation. Urology 2000; 55: 560-563.

2.2.3. Diagnostische Validität des gebundenen PSA

Wie im einführenden Teil zum PSA erläutert, existieren widersprüchliche Ergebnisse über die diagnostische Validität der ACT-PSA-Bestimmung. Wir haben hierzu selbst Untersuchungen vorgenommen. In einer ersten Pilotstudie zum gebundenen PSA unter Verwendung eines Prototyp-Testsystems für die ACT-PSA-Bestimmung wurde die Diskriminationsfähigkeit an 165 Patienten eingeschätzt (Artikel Nr. E5).[K6] Nach Auswertung der Daten konnte ein Vorteil der alleinigen ACT-PSA-Bestimmung nicht gezeigt werden. Auch die Berechnung der entsprechenden Quotienten ACT-PSA/t-PSA führte im Vergleich zum f-PSA% zu keiner verbesserten Differenzierung zwischen BPH und PCa. Nach Verfügbarkeit der cPSA-Testsysteme konnte auch die diagnostische Aussagekraft dieses Verfahrens eingeschätzt werden.[K7] Auch hier widersprachen die Ergebnisse einer klinischen Indikation zur alleinigen Bestimmung des cPSA. Es wurde jedoch festgestellt, daß der Quotient cPSA zu t-PSA ähnlich dem f-PSA% die Differenzierung zwischen PCa und BPH verbessert. In beiden Untersuchungen wurden unterschiedliche Patientenkollektive untersucht. Zur Objektivierung der diagnostischen Aussagekraft des gebundenen PSA wurden die Parameter t-PSA, f-PSA, ACT-PSA und cPSA bzw. deren Quotienten in einer neuen Studie an gleichen Patientengruppen bestimmt und vergleichend eingeschätzt (Artikel Nr. E6). Wie auch in den vorangegangenen Arbeiten wurde die diagnostische Aussagekraft mit Hilfe von *receiver*

operating characteristic (*ROC*) Kurven bewertet. Basierend auf den Daten dieses Patientenkollektivs konnte auch hier kein diagnostischer Vorteil der alleinigen Bestimmung des gebundenen PSA belegt werden. Es kann aber geschlußfolgert werden, daß der Quotient cPSA/t-PSA eine mögliche Alternative zum f-PSA%-Kriterium darstellt. Diese Daten und Ergebnisse wurden inzwischen auch von anderen Autoren bestätigt.[45,46]

Alle bisher publizierten Untersuchungen, auch die eigenen, wurden an relativ begrenzten Probandenzahlen durchgeführt. Das war Anlaß, gemeinsam mit der Firma *Roche Diagnostics* eine Multizenterstudie durchzuführen (Artikel Nr. E7). Hierfür wurde ein verbesserter ACT-PSA-Test eingesetzt. Diese Studie an insgesamt 657 Patienten aus 6 universitären Zentren mit t-PSA-Werten zwischen 2 und 20 µg/l ist derzeit die umfangreichste Untersuchung zur Diskriminationsfähigkeit des ACT-PSA. Das wesentliche Ergebnis dieser Evaluierung ist, daß ein diagnostischer Vorteil der ACT-PSA-Bestimmung bzw. der entsprechenden Quotienten im Vergleich zum f-PSA% nicht besteht. Auch im Rahmen dieser Multizenterstudie hat sich die klinische Validität des Parameters f-PSA% in Ergänzung zum t-PSA bestätigt. Nach meiner Meinung ist es nicht sinnvoll, weitere Forschungs- und Entwicklungsarbeiten für einen ACT-PSA-Test vorzusehen. Die vorliegenden Daten und Interpretationen haben die Firma veranlaßt, die weitere Entwicklung des ACT-PSA-Tests einzustellen.

Auf Grund der Publikationen und Untersuchungen wurde ich von den Herausgebern der Fachzeitschrift „Der Urologe A“ aufgefordert, einen Übersichtsartikel zu den molekularen Formen des PSA zu schreiben (Artikel Nr. E8). In dieser Übersicht ist der aktuelle Stand der molekularen Formen des PSA und des humanen Kallikreins 2 in der PCa-Diagnostik ausführlich dargestellt.

Prinzipiell eröffnet die Bestimmung der PSA-Isoformen die Möglichkeit einer verbesserten Prädiktion des PCa. Das ist mit einer Optimierung der Indikation zur Prostatastanzbiopsie gleichzusetzen. Die Kenngröße f-PSA% kann damit zur Zeit als das günstigste Kriterium angesehen werden, das auf nichtinvasivem Weg eine verbesserte Vorhersage über das Vorliegen eines PCa ermöglicht. In Zukunft sollte mit Hilfe des f-PSA%-Wertes und anderer entscheidender Variablen (z.B. t-PSA, Prostatavolumen, Patientenalter) die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines PCa errechnet und die Vorhersage optimiert werden. Eine multivariate Analyse könnte die Erfassung von organbegrenzten Karzinomen weiter verbessern.

Artikel (Erstautorenschaft):

E5 Lein M, Jung K, Brux B, Knäbich A, et al.: Re: Free and complexed prostate specific antigen in the differentiation of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: studies in serum and plasma samples. J Urol 1999; 162: 502-503.

E6 Lein M, Jung K, Elgeti U, Petras T, et al: Comparison of the clinical validity of free-prostate specific antigen, alpha-1-antichymotrypsin-prostate specific antigen and complexed-prostate specific antigen in prostate cancer diagnosis. Eur Urol; eingereicht 12/99.

E7 Lein M, Jung K, Hammerer P, Graefen M, et al.: A multicenter clinical trial on the use of $alpha_1$-antichymotrypsin-prostate specific antigen for the differentiation between biopsy-positive and biopsy-negative men. Urology; eingereicht 5/2000.

E8 Lein M, Stephan C, Jung K, Schnorr D, et al.: Molekulare Formen des prostataspezifischen Antigens und des humanen Kallikreins 2 als mögliche Indikatoren in der Prostatakarzinomdiagnostik (Review). Urologe A 2000; 39: 313-323.

Weitere Artikel mit Koautorenschaft (nicht in Habilitationsschrift enthalten):

K6 Jung K, Brux B, Lein M, Knäbich A, et al.: Determination of $alpha_1$-antichymotrypsin-PSA complex in serum does not improve the differentiation between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer compared with total PSA and percent free PSA. Urology 1999; 53: 1160-1168.

K7 Jung K, Elgeti U, Lein M, Brux B, et al.: Ratio of free or complexed prostate-specific antigen (PSA) to total PSA: which ratio improves differentiation between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer? Clin Chem 2000; 46: 55-62.

3. Adhäsionsproteine (CD44)

3.1. Bedeutung der Adhäsionsproteine

Adhäsionsmoleküle wirken sowohl als positive als auch negative Modulatoren bei der Tumorinvasion und Metastasierung.[47,48] Zur Gruppe der Adhäsionsmoleküle, die auch von Tumorzellen freigesetzt werden, gehören die CD44-Proteine. CD44-Proteine sind Transmembranglykoproteine, die als Zelloberflächenrezeptoren auf mesenchymalen und epithelialen Zellen exprimiert werden. Sie haben große Bedeutung für Kontakte zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix.[49] CD44-Proteine gehören zu einer sehr heterogenen Proteinfamilie, die durch ein Gen mit 19 Exons kodiert wird.[50,51] Im gesunden Gewebe ist der Spleißmechanismus streng reguliert.

Prinzipiell werden zwei CD44-Gruppen unterschieden.[52] Die CD44-Standardform (CD44std) ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 80 bis 90 kDa. Es wird durch die ersten und letzten fünf Exons kodiert und auf der Oberfläche von hämatopoetischen, glandulären und fibroblastoiden Zellen nachgewiesen. Die zweite Gruppe besteht aus den größeren CD44-Varianten (CD44var) mit einem Molekulargewicht von mehr als 110 kDa. Diese Varianten sind bedingt durch posttranslationale Modifizierung und alternative Spleißmechanismen der insgesamt neun varianten Exons. Sie bestehen aus den gleichen N-terminalen Sequenzen sowie transmembranösen und zytoplasmatischen Anteilen wie die Standardform, weisen aber zusätzliche Aminosäuresequenzen auf.[52] In normalen Zellen werden diese Varianten nur in geringem Umfang exprimiert. Im Gegensatz dazu wurde in Tumorzellen eine Überproduktion dieser großen CD44var-Proteine durch verstärkte Transkription von alternativen Spleißvarianten mRNA nachgewiesen.[53] Die Tumorprogression und Metastasierung scheint mit der Expression dieser Varianten zu korrelieren. Dieses Verhalten wurde bei verschiedenen menschlichen Malignomen, wie z.B. bei Zervix-, Mamma- oder Kolonkarzinomen beobachtet.[54-57]

Einige Arbeitsgruppen berichten, daß sich diese Veränderungen an den Zelloberflächen bei Patienten mit Magen- und Kolonkarzinomen im Serum widerspiegeln.[58] Erhöhte Konzentrationen korrelieren mit dem Progreß der Tumorerkrankung. Die Bestimmung dieser Komponenten im Serum könnte als ein einfaches, nichtinvasives Instrument der Tumordiagnostik und Therapieüberwachung genutzt werden. Die Firma *Bender MedSystems* (Wien, Österreich) bietet inzwischen ELISA-Testsysteme für CD44std, CD44var5 und CD44var6 an, die eine einfache und zuverlässige Bestimmung ermöglichen.

Informationen über veränderte Expressionen dieser Proteine bei urologischen Tumoren liegen nur in sehr beschränktem Umfang vor. In PCa- und Urothelkarzinom-Zellkulturen wurden veränderte Expressionsmuster beobachtet.[59,60] Für das Nierenzellkarzinom und das Blasenkarzinom sind zuverlässige Tumormarker weder für die Früherkennung noch für die Therapiekontrolle bekannt.[61,62] Es besteht daher ein enormes Interesse an der Entwicklung solcher nichtinvasiver Parameter.

Im Rahmen der Evaluierung neuer Marker bei urologischen Tumoren wurde in unserer Arbeitsgruppe das diagnostische Potential der Bestimmung dieser Parameter eingeschätzt.

3.2. Eigene Ergebnisse - Adhäsionsproteine (CD44) als Tumormarker bei urologischen Tumoren

Zielstellung der Untersuchungen war die Erfassung der CD44-Expressionsmuster im Serum von Patienten mit urologischen Karzinomen. Die potentiellen Eigenschaften der CD44-Proteine als Tumormarker wurden eingeschätzt.

In einer ersten Untersuchung sollten Unterschiede zwischen metastasierten und nichtmetastasierten Patienten mit PCa und BPH-Patienten bzw. Gesunden ermittelt werden.[K8] Diese Evaluierung wurde dann auf weitere urologische Malignome ausgedehnt. Im Serum von etwa 200 Patienten wurden die Standardform (CD44std) und die Spleißvarianten CD44var5 und CD44var6 bestimmt (Artikel Nr. E9).[K9] Die Analysen erfolgten bei Patienten mit Nierenzellkarzinom, Blasenkarzinom, PCa bzw. BPH und wurden den Werten von gesunden Männern und Frauen gegenübergestellt. Erhöhte Konzentrationen der CD44-Varianten und der Standardform im Serum der Patienten im Vergleich zu der Kontrollgruppe wurden nicht beobachtet. Auch bei Patienten mit metastasiertem PCa wurden keine erhöhten Konzentrationen gemessen.

Im Gegensatz zu anderen Karzinomen ließen sich bei urologischen Tumoren (Prostata, Niere, Blase) keine Konzentrationsänderungen im Serum nachweisen. Als Ursache dafür könnte die ausbleibende Expression dieser Proteine an der Oberfläche von urologischen Tumorzellen verantwortlich sein. Über die Expressionsmuster von CD44-Proteinen liegen bisher keine weiteren Daten vor. Zusammenfassend muß festgestellt werden, daß die vorliegenden Ergebnisse gegen eine Anwendung dieser Proteingruppe in der Diagnostik von urologischen Malignomen sprechen.

<u>Artikel (Erstautorenschaft):</u>

E9 Lein M, Jung K, Weiss S, Schnorr D, et al.: Soluble CD44 variants in the serum of patients with urological malignancies. Oncology 1997; 54: 226-230.

<u>Weitere Artikel mit Koautorenschaft (nicht in der Habiliationsschrift enthalten):</u>

K8 Jung K, Lein M, Weiss S, Schnorr D, et al.: Soluble CD44 molecules in serum of patients with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. Eur J Cancer 1996; 32: 627-630.

K9 Lein M, Weiss S, Jung K, Schnorr D, et al.: Soluble CD44 variants in serum of patients with prostate cancer and other urological malignancies. Prostate 1996; 29: 334-335.

4. Matrix-Metalloproteinasen und deren Inhibitoren

4.1. Bedeutung von Matrix-Metalloproteinasen

Matrix-Metalloproteinasen als Tumormarker

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind endogene Proteinasen mit der Fähigkeit, extrazelluläre Matrix einschließlich der Basalmembran aufzuspalten.[63,64] MMPs gehören zu einer Gruppe von Enzymen, die an einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt sind und zum Um- und Abbau von Gewebe führen.[65] Bei physiologischen Prozessen, wie bei der Gewebsneubildung und dem Wachstum einschließlich Zellabbau bzw. Zellerneuerung ist die Funktion dieser Enzyme von wesentlicher Bedeutung für den Organismus. Aber auch bei pathologischen Veränderungen spielen die katalytischen Aktivitäten der MMPs und deren Regulierung eine wichtige Rolle. Solche Veränderungen wurden bei der rheumatoiden Arthritis, Leberzirrhose und bei Wundheilungsstörungen nachgewiesen.[65,66]

Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurde auf die Bedeutung der MMPs und ihrer spezifischen Inhibitoren (tissue inhibitors of metalloproteinases=TIMP) bei malignen Erkrankungen hingewiesen.[67-70] Im Mittelpunkt vielfacher Untersuchungen steht das Verhalten von MMPs und TIMPs bei den Mechanismen der Tumorprogression. Erhöhte bzw. veränderte Expressionsmuster wurden bei verschiedenen menschlichen Tumoren beobachtet. MMPs gelten als die wesentlichen Enzyme des Abbaus von Abgrenzungsbarrieren wie z.B. Basalmembranen, die einer lokalen Tumorzellausbreitung und -verschleppung bzw. -neuansiedlung entgegenstehen.[71]

MMPs bilden eine Gruppe von zinkhaltigen Endopeptidasen. Die MMPs umfassen 15 Enzyme, die entsprechend ihrer bevorzugten Substratspezifität und Struktur in Subklassen eingeteilt werden.[63,65] Dies sind die Kollagenasen (MMP1, MMP8, MMP13), Gelatinasen (MMP2, MMP9), Stromelysine (MMP3, MMP10) und eine Subgruppe, die Matrylysin, Stromelysin und die membrangebundenen MMPs umfaßt. Es werden ständig neue MMPs beschrieben.[70] Die katalytische Aktivität der MMPs ist normalerweise durch spezifische und unspezifische Mechanismen streng reguliert:

- Freisetzung der MMPs als Zymogene und extrazelluläre Aktivierung,
- Beeinflussung der MMP-Synthese (Transkription),
- Hemmung der Aktivität durch TIMPs.[65,72]

Eine enge Beziehung von MMPs und TIMPs zu allen Prozessen der Tumorprogression läßt sich mit großer Wahrscheinlichkeit aus den bisherigen Literaturdaten schlußfolgern.[63,69,70,73] So wurden erhöhte Expressionen von MMPs bei fortgeschrittenen Tumoren *in vivo* und bei transformierten Zellen *in vitro* beobachtet. Weiterhin konnte der Einfluß von MMPs bei *in vivo* Modellen auf die Tumorinvasion und Metastasierung sowie Hemmung der Tumorprogression durch Inhibitoren der MMPs dokumentiert werden. Normale invasive Zellen (z.B. Trophoblasten) werden offensichtlich über Regelmechanismen gesteuert und dadurch das invasive Potential limitiert.[74] Bei malignen Zellen scheinen diese Steuermechanismen gestört bzw. außer Kraft gesetzt zu sein.[75]

Umfangreiche *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen haben gezeigt, daß die Aktivität und Konzentration von MMPs mit dem invasiven und metastatischen Potential von menschlichen Tumoren assoziiert ist.[63,73] Das ist der Fall bei Mamma-, Kolon- und Lungenkarzinomen.[67-70,76] Die Bedeutung der MMPs bei den einzelnen Tumorentitäten ist jedoch verschieden und bisher noch nicht umfassend geklärt. Derzeit ist davon auszugehen, daß der MMP2 und der MMP9 eine besondere Bedeutung zukommt, da sie direkt an der Degradation der Basalmembran beteiligt sind.[77] Die Penetration bzw. die Aufhebung der Integrität dieser Membran durch Tumorzellverbände ist der Beweis für das Vorliegen eines invasiven Karzinoms. In jüngsten Untersuchungen wurde die Bedeutung der Balance von MMPs und TIMPs im Gewebe als positiver und negativer Modulator der Tumorprogression hervorgehoben.[65,73]

Die Veränderungen der MMP-Expression im Gewebe können sich teilweise in biologischen Flüssigkeiten widerspiegeln.[71] Daraus resultiert die Möglichkeit, diese Komponenten mit einfachen, nichtinvasiven Methoden bei Patienten zu bestimmen. Informationen über das Verhalten der MMPs könnten dann möglicherweise in der Diagnostik und Verlaufskontrolle von Malignomen eingesetzt werden. So berichtet eine Arbeitsgruppe von erhöhten Konzentrationen des Komplexes MMP9/TIMP im Plasma von Patienten mit gastrointestinalen Karzinomen.[71]

Die Bestimmungen der MMPs wurden in der Vergangenheit meist nach elektrophoretischer Trennung der Proteine im gelatinehaltigen Gel (Zymographie) durchgeführt.[78] Diese Verfahren sind arbeitsintensiv, nicht automatisierbar und weisen erhebliche Ungenauigkeiten auf. Erst seit einigen Jahren stehen kommerzielle ELISA-Testsysteme für MMPs und TIMPs zur Verfügung, die eine breite Anwendung und Einschätzung dieser Kenngrößen überhaupt erst ermöglichen. Dies darf aber nicht darüber

hinweg täuschen, daß wichtige präanalytische (z.B. Probenvorbereitung) und analytische Fragen bisher nicht gelöst sind.[71,78]

Für die Übertragung und Verwendung von Untersuchungsergebnissen und deren Vergleichbarkeit mit Daten anderer Autoren ist die Angleichung und Standardisierung der analytischen und präanalytischen Bedingungen erforderlich. Diese Voraussetzungen sind häufig besonders bei der Erfassung von neuen Markern nicht realisiert. Es war deshalb ein besonderes Anliegen bei unseren Untersuchungen der MMPs und TIMPs, auf diese Problematik der Analytik aufmerksam zu machen. Diese Situation könnte einen Teil von kontroversen Studienergebnissen erklären.

Über die biologische Rolle von MMPs und deren mögliche diagnostische Bedeutung bei urologischen Malignomen ist wenig bekannt.[79-84] Zielstellung unserer Untersuchungen war es deshalb, Veränderungen dieser Komponenten im Tumorgewebe bzw. im Blut bei urologischen Tumoren nachzuweisen. Im Mittelpunkt meines Interesses stand dabei das Prostatakarzinom, es wurden aber auch Untersuchungen zum Nierenzellkarzinom durchgeführt.

Hemmung der Matrix-Metalloproteinasen-Aktivität

Nur die rechtzeitige Erfassung des Patienten mit einem lokalisierten, nichtmetastasierten PCa ermöglicht den Einsatz einer kurativen Therapie.[2] Das Standardverfahren ist hierbei die radikale Prostatektomie. Bei fortgeschrittenen Karzinomen oder beim Auftreten eines Tumorrezidivs wird im allgemeinen die antiandrogene Hormontherapie angewendet. Obwohl diese Therapieform für eine begrenzte Zeit wirksam ist, kommt es zum weiteren Progreß des Tumors und die Patienten versterben. Auch ein verlängertes Überleben konnte bisher durch die Hormontherapie nicht sicher nachgewiesen werden. Diese Faktoren erklären das enorme Interesse an neuen wirksamen Therapieverfahren beim PCa.

Im Rahmen der Evaluierung der Bedeutung von MMPs bei der Progression des PCa wurde ein Standardtiermodell in die Untersuchung einbezogen.[85] Dieses Tiermodell ermöglicht die Beurteilung von Therapieansätzen und -strategien, die aus den Untersuchungen mit den MMPs geschlußfolgert wurden.

Eine erfolgversprechende Strategie könnte der Einsatz von synthetischen Inhibitoren der MMPs darstellen.[86,87] Die Bedeutung der MMPs bei den essentiellen Prozessen der Invasion und Metastasierung von Tumoren ist in verschiedenen Untersuchungen gezeigt worden, obwohl die unmittelbaren Mechanismen bisher nur unzureichend bekannt sind. Es liegt daher nahe, die physiologischen Inhibitoren dieser Proteinasen und deren Funktion zu

kopieren. Vor wenigen Jahren wurden die ersten synthetischen Inhibitoren entwickelt.[88] Eine solche Substanz ist das *Batimastat*. Es wird derzeit als Standard und Vergleich für Neuentwicklungen allgemein akzeptiert.[89-92]

Batimastat ist ein relativ unspezifischer Breitspektrum-Inhibitor verschiedener MMPs, der über einen kompetitiven und reversiblen Hemmungsmechanismus funktioniert. In menschlichen Tumorzellinien, in tierexperimentellen Untersuchungen und auch in Studien am Menschen konnte eine Beeinflussung der Tumorprogression im Sinne eines Therapieeffektes belegt werden.[89-92] Untersuchungen zur Wirksamkeit von synthetischen Inhibitoren bei urologischen Karzinomen liegen nur in sehr begrenztem Umfang vor.[89,93] Es war daher ein wesentliches Anliegen meiner Arbeit, eine mögliche Wirksamkeit dieser Substanzgruppe an einem Standardtiermodell des PCa zu evaluieren. Gleichzeitig sollten in enger Zusammenarbeit mit der Industrie (Firma *Roche*) neue, selektiver wirkende synthetische Inhibitoren erprobt werden. Der *Dunning*-Tumor (*MatLyLu*, R3327) der Ratte wurde von mir bewußt gewählt.[85,94,95] Auf Grund seiner vergleichbaren Morphologie und des funktionellen Verhaltens bezüglich Chemo-, Strahlen- und Hormontherapie wird er international als ein Standardtiermodell des PCa angesehen.

4.2. Eigene Untersuchungen

4.2.1. Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und deren Inhibitoren als Marker bei urologischen Tumoren

Aus den Ergebnissen verschiedener Arbeitsguppen über das veränderte Expressionsverhalten der MMPs und TIMPs bei Malignomen leiten sich diagnostische Strategien ab. Die Reflexion der Gewebsveränderungen im Blut eröffnet die Möglichkeit der einfachen, nichtinvasiven Bestimmung dieser Komponenten im Plasma. MMPs und TIMPs könnten sich zu interessanten Werkzeugen in der Diagnostik und Therapiekontrolle bei urologischen Tumoren entwickeln. Seit einigen Jahren stehen kommerzielle Testsysteme zur Verfügung. Die in der Literatur veröffentlichten Ergebnisse basieren häufig auf unterschiedlichen diagnostischen Ausgangsbedingungen. Dies schränkt die Vergleichbarkeit der Daten erheblich ein.

Um Fehlinterpretationen zu vermeiden, wurden in ersten Untersuchungen die präanalytischen und analytischen Bedingungen für MMP-Bestimmungen evaluiert (Artikel Nr. E10).[K10,K11,K12] Es wurden verschiedene MMPs mit neu entwickelten ELISA-Testsystemen bestimmt. Die verwendeten Teste können insgesamt als analytisch zuverlässig

eingeschätzt werden. Von besonderer Bedeutung waren jedoch die beobachteten Konzentrationsunterschiede der MMPs und TIMPs in Abhängigkeit von der Art des Untersuchungsmaterials. Im Serum wurden dabei zum Teil höhere Werte als im EDTA- und Heparinplasma ermittelt. Da dies möglicherweise auf unspezifische Erhöhungen durch Freisetzung von MMPs bei der Blutgerinnung zurückzuführen ist, wurde empfohlen, die Bestimmung der MMPs und TIMPs einheitlich im Plasma durchzuführen. Da außerdem die eingesetzte Probenverdünnung das Meßergebnis beeinflußt, sollten in Abhängigkeit vom verwendeten Test nur definierte Plasmaverdünnungen untersucht werden.

Durch diese Experimente wurden wichtige präanalytische und analytische Bedingungen für die Bestimmung der MMPs und TIMPs ermittelt. Diese analytischen Einschätzungen der Testsysteme waren notwendig, um die Ergebnisse eigener fortführender Untersuchungen zu objektivieren und Fehlinterpretationen in Zukunft zu vermeiden.

Da für die Diagnostik und Therapiekontrolle des Nierenzellkarzinoms, wie bereits bei den Adhäsionsproteinen betont, keine geeigneten Marker zur Verfügung stehen, begründet sich aus urologischer Sicht das besondere Interesse für die Bestimmung der MMPs und TIMPs.

Die Bestimmungen von MMP2 und MMP9 sowie der TIMP1 und TIMP2 erfolgte sowohl im Nierengewebe als auch im Plasma, um eine mögliche Reflexion der Gewebsveränderungen im Blut nachweisen zu können (Artikel E11). Dies wäre eine wesentliche Voraussetzung für die Nutzung der Parameter in der Diagnostik des Nierenzellkarzinoms. Nach histologischer Sicherung wurden MMP2, MMP9, TIMP1 und TIMP2 im malignen Tumorgewebe und normalen Nierengewebe derselben Niere sowie im Plasma von Patienten mit Nierenzellkarzinom untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, daß die Konzentrationen von MMP9 im Tumorgewebe und im Blut signifikant erhöht waren. Diese Beobachtung untermauert die Hypothese einer möglichen Bedeutung von bestimmten MMPs bei der Entstehung und Progression von malignen Tumoren. Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die vermehrte MMP9-Expression im Tumorgewebe auch im Blut nachweisbar ist. Die errechnete geringe diagnostische Sensitivität der MMP9-Bestimmung im Plasma zur Erfassung des Nierenzellkarzinoms spricht gegen eine Anwendung dieses Parameters als diagnostischen Marker. Da auch bei diesem urologischen Tumor ein verändertes, für ein Karzinom typisches Expressionverhalten von MMPs festzustellen ist, nehme ich an, daß durch die gezielte Hemmung der MMP9 das Tumorwachstum und die Progression im Sinne eines therapeutischen Effektes beeinflußt werden könnte.

Wegen der Bedeutung des PCa in der Urologie standen Untersuchungen zum Expressionsverhalten der MMPs und TIMPs im Mittelpunkt. Der Nachweis eines veränderten Expressionsverhalten im PCa-Gewebe ist sowohl von diagnostischem als auch von therapeutischem Interesse. Zusätzliche Informationen durch eine MMP-Plasmabestimmung wären von unmittelbar klinischer Bedeutung. Der Nachweis eines veränderten Expressionsmusters der MMPs erlaubt ein besseres Verständnis über die ablaufenden Prozesse im PCa-Gewebe. Gleichzeitig resultiert bei entsprechenden Veränderungen die theoretische Rechtfertigung für den Einsatz von synthetischen Inhibitoren der MMPs.

Auch diese Untersuchungen wurden im Plasma und im Gewebe von PCa-Patienten durchgeführt (Artikel Nr. E12). Die gemessenen Konzentrationen von verschiedenen MMPs und TIMPs im Plasma bei PCa-Patienten ohne und mit gesicherter Metastasierung wurden den Plasma-Konzentrationen von gesunden Probanden und Patienten mit BPH gegenübergestellt. Im Gewebe erfolgte der Nachweis von veränderter MMP-Expression durch den Vergleich der Konzentrationen im histologisch gesicherten malignen Anteil und im normalen Gewebe ein und derselben Prostata. Im Plasma von Patienten mit metastasiertem PCa wurde eine erhöhte MMP3- und TIMP1-Konzentration nachgewiesen. Die vorliegenden Daten lassen TIMP1 als einen zusätzlichen Marker für eine fortgeschrittene Erkrankung brauchbar erscheinen. Im Gewebe wird der erniedrigte Quotient aus MMP und TIMP als eine tumorspezifische Veränderung interpretiert, so daß diese proteolytische Dysbalance durch synthetische Inhibitoren gezielt beeinflußt werden könnte.

Zusammenfassend kann eingeschätzt werden, daß auch beim PCa veränderte MMP- und TIMP-Expressionen wichtige Bestandteile bei der Tumorprogression sind.[K13,K14]

<u>Artikel (Erstautorenschaft):</u>

E10 Lein M, Nowak L, Jung K, Koenig F, et al.: Analytical aspects regarding the measurement of metalloproteinases and their inhibitors in blood. Clin Biochem 1997; 30: 491-496.

E11 Lein M, Jung K, Laube C, Hübner T, et al.: Matrix-metalloproteinases and their inhibitors in plasma and tumor tissue of patients with renal cell carcinoma. Int J Cancer 2000; 85: 801-804.

E12 Lein M, Nowak L, Jung K, Laube C, et al.: Metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix-metalloproteinases in plasma of patients with prostate cancer and in prostate cancer tissue. Ann NY Acad Sci 1999; 878: 544-546.

Weitere Artikel mit Koautorenschaft (nicht in der Habiliationsschrift enthalten):

K10 Lein M, Jung K, Nowak L, Schnorr D, et al.: Analytical aspects regarding the measurement of metalloproteinases. Ann NY Acad Sci 1999; 878: 491-493.

K11 Jung K, Laube C, Lein M, Lichtinghagen R, et al.: Kind of sample as preanalytical determinant of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 in blood. Clin Chem 1998; 44: 1060-1062.

K12 Jung K, Nowak L, Lein M, Henke W, et al.: What kind of specimen should be selected for determining tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in blood? Clin Chim Acta 1996; 254: 97-100.

K13 Jung K, Nowak L, Lein M, Priem F, et al.: Matrix metalloproteinases 1 and 3, tissue inhibitor of metalloproteinase 1 and the complex of metalloproteinase 1/tissue inhibitor in plasma of patients with prostate cancer. Int J Cancer (Pred Oncol) 1997; 74: 220-223.

K14 Jung K, Lein M, Ulbrich N, Rudolph B, et al.: Quantification of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinase in prostatic tissue: analytical aspects. Prostate 1998; 34: 130-136.

4.2.2. Tierexperimentelle Untersuchungen zu MMPs beim Prostatakarzinom

Der *Dunning*-Tumor der *Copenhagen* Ratte ist ein etabliertes Tiermodell für das menschliche PCa.[85,94] Auf Grund seines Verhaltens gegenüber verschiedenen Therapieformen wird er für die Überprüfung neuer Therapiestrategien beim PCa primär empfohlen.[85] Die verschiedenen Subformen dieses Tumors zeigen deutlich voneinander abweichende Eigenschaften. Es existieren hormonsensitive und hormonrefraktäre Zellinien, die sich auch durch ihr Metastasierungsverhalten und durch die Metastasierungslokalisation unterscheiden. Für unsere Untersuchungen wählten wir den sehr aggressiven hormonrefraktären *MatLyLu* R3327-Tumor der sowohl in die Lungen als auch in die Lymphknoten metastasiert. Die notwendigen Techniken habe ich während eines einjährigen Forschungsaufenthaltes in den USA (*Harvard University*, Boston) erlernt. Die in diesem Abschnitt vorgestellten Untersuchungen wurden von mir dort durchgeführt.

Bei allen Experimenten erfolgte die Induktion des *Dunning*-Tumors bei der männlichen *Copenhagen* Ratte durch subkutane oder orthotope (ventraler Prostatalappen) Injektion von 100000 Tumorzellen (Artikel Nr. E13). Die subkutanen und orthotopen Tumore unterschieden sich deutlich in ihrem Metastasierungsverhalten und Wachstum. Ein Teil der Ratten wurde einer lokalen Hyperthermie-Behandlung unterzogen. Die Hyperthermie wurde mit einem Nd-YAG-Laser induziert und in verschiedenen Dosierungen verabreicht. Diese Behandlung führte zu einer effektiven und dosisabhängigen Hemmung des lokalen Tumorwachstums. Eine wichtige Beobachtung war die nachweisbare Zunahme der Lungenmetastasierung bei den Tieren mit längerer Hyperthermie-Behandlung.

Basierend auf einer Literaturrecherche bin ich davon ausgegangen, daß MMP9 ein wichtiger Bestandteil bei der Tumorprogression ist und daher auch bei diesen Untersuchungen bestimmt werden sollte. Die Konzentrationen von MMP9 wurden 12 Tage nach der Tumorzellinjektion im Plasma von gesunden und tumortragenden Ratten gemessen. Außerdem erfolgte der MMP9-Nachweis und die Quantifizierung im normalen Prostatagewebe sowie im *Dunning*-Tumor. Im normalen Prostatagewebe und im Plasma von gesunden Ratten war MMP9 nicht nachweisbar. Im Gewebe von allen subkutanen und orthotopen Tumoren war eine MMP9-Expression sicher nachweisbar. Bei etwa 70% der Ratten mit *Dunning*-Tumoren wurde auch MMP9 im Plasma gefunden. Die MMP9-Plasmakonzentrationen korrelierten mit der lokalen Tumorkontrolle durch Hyperthermie, jedoch nicht mit der Lungenmetastasierung. Die MMP9-Expression war bei gutem lokalen Therapieeffekt bzw. kleinen Tumoren signifikant reduziert.

Die Untersuchungen erlauben die Schlußfolgerung, daß MMP9 eine wichtige Bedeutung beim Wachstum auch dieses Standardtumors des menschlichen PCa zukommt, und daß sich die Gewebsveränderungen im Plasma widerspiegeln. Damit ist der Einsatz von synthetischen MMP-Inhibitoren in tierexperimentellen Untersuchungen als eine therapeutische Option beim PCa gerechtfertigt.

Artikel (Erstautorenschaft):

E13 Lein M, Koenig F, Misdraji J, McDougal WS, et al.: Laser-induced hyperthermia in rat prostate cancer: role of site of tumor implantation. Urology 2000; 56: 167-172.

4.2.3. Einsatz von synthetischen Inhibitoren zur Blockierung der MMP-Aktivität beim Prostatakarzinom

Seit einigen Jahren stehen synthetische Inhibitoren von MMPs zur Verfügung. *Batimastat* der Firma *British Biotech* hat sich als Referenzsubstanz der synthetischen Inhibitoren der MMPs etabliert. *Batimastat* ist aufgrund der sehr schlechten Löslichkeit nur eingeschränkt einsetzbar. Aber auch Daten zum *Marimastat*, dem Nachfolgeprodukt mit verbesserten Lösungseigenschaften, liegen in Verbindung mit urologischen Malignomen nur wenige Informationen vor. Es war deshalb das Anliegen der fortführenden Experimente, eine mögliche Wirksamkeit dieser Substanz beim PCa als dem häufigsten Tumor des Mannes zu evaluieren (Artikel Nr. E14).

Nach orthotoper Injektion der *MatLyLu*-Tumorzellen in den ventralen Prostatalappen erhielten ein Teil der Tiere täglich *Batimastat*. Die intraperitoneale Applikation des Medikaments wurde gut toleriert. Unter *Batimastat* reduzierte sich das lokale Tumorwachstum um etwa 50%. Dieses Ergebnis beweist die Bedeutung der MMPs beim PCa-Tumorwachstum und die allgemeine Wirkung von synthetischen Inhibitoren auf die Tumorprogression.

Diese ermutigenden Daten haben mich dazu bewogen, neue, selektivere Inhibitoren der MMPs in diesem Modell zu untersuchen. Diese Experimente wurden in Kooperation mit der Firma *Roche* durchgeführt. Ziel der Untersuchung war es, die Grundlagen für die mögliche Anwendung dieser Substanz beim Menschen zu erarbeiten. Es wurden umfangreiche tierexperimentelle Studien mit einem neuentwickelten, hochselektiven Inhibitor der MMPs veranlaßt. Die Genehmigung zur Publikation der Untersuchungsergebnisse erteilte uns die Firma *Roche* dem Kooperationsvertrag zufolge erst vor kurzem, so daß in Abweichung von der bisherigen Darstellung der eigenen Ergebnisse nicht auf bereits publizierte Daten zurückgegriffen wird.

Die getestete Substanz wird als *Icol* (RO 28 2653) bezeichnet. Der Versuchsablauf entspricht den bereits vorgestellten Untersuchungen zum *Batimastat* (orthotope Tumorinduktion; 100000 *MatLyLu*-Zellen). Die neue Substanz wird oral verabreicht und reduziert das lokale orthotope Tumorwachstum um bis zu 90% (Abbildung 1). Die Experimente wurden unter gleichen Bedingungen wiederholt und waren reproduzierbar. Die Tumorgewichte und -volumina innerhalb der Behandlungs- und Kontrollgruppen zeigten eine erstaunlich geringe Streuung. *Icol* ist damit dem *Batimastat* an Wirksamkeit auf das lokale Tumorwachstum deutlich überlegen. Weiterhin konnte eine Dosis-Wirkung-Korrelation nachgewiesen werden (Abbildung 1 und 2). Um diese tierexperimentelle Studie an klinische Bedingungen anzugleichen, erfolgte die Applikation der Substanz auch mehrere Tage nach Tumorzellinjektion (Abbildung 2). Auch auf den bereits etablierten Tumor (6 Tage nach Tumorzellinjektion) konnte ein ausgeprägter Effekt beobachtet werden.

Bei einem möglichen Einsatz von MMP-Inhibitoren bei PCa-Patienten wäre eine Kombination mit anderen Therapieformen zur Induktion eines synergistischen Effektes vorteilhaft. Daher wurde diese Substanz mit einem etablierten Chemotherapeutikum (*Etoposid*) kombiniert. Diese Chemotherapie hat, wenn nur eine Substanz eingesetzt wird (Monosubstanz), beim PCa eine eingeschränkte Wirksamkeit. Die vorliegenden tierexperimentellen Ergebnisse zeigen jedoch, daß eine Kombination mit *Icol* eine sinnvolle

Maßnahme zur Verstärkung des Therapieeffektes ist. (Abbildung 3). In dieser Versuchsserie erfolgte die Applikation der Substanzen ab dem 6. Tag nach Tumorzellinjektion bis zum 17. Tag. Am 18. Tag wurden die Tumorgewichte und -volumina bestimmt.

Die vorliegenden Ergebnisse sowie Daten anderer Arbeitsgruppen der Firma *Roche* an anderen Tiermodellen (hier nicht gezeigt) haben die Firma dazu veranlaßt, klinische Verträglichkeits- und Toxizitätsstudien durchzuführen. Sollten diese Untersuchungen erfolgreich verlaufen, ist der klinische Einsatz von *Icol* vorgesehen. In diesem Fall wird die Urologische Klinik Studien im Rahmen von Kombinationstherapien bei PCa-Patienten nach Genehmigung durch die Ethikkommission durchführen.

Artikel (Erstautorenschaft):

E14 Lein M, Jung K, Le DK, Hasan T, et al.: Synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases (*Batimastat*) reduces the prostate cancer growth in an orthotopic rat model. Prostate 2000; 43: 77-82.

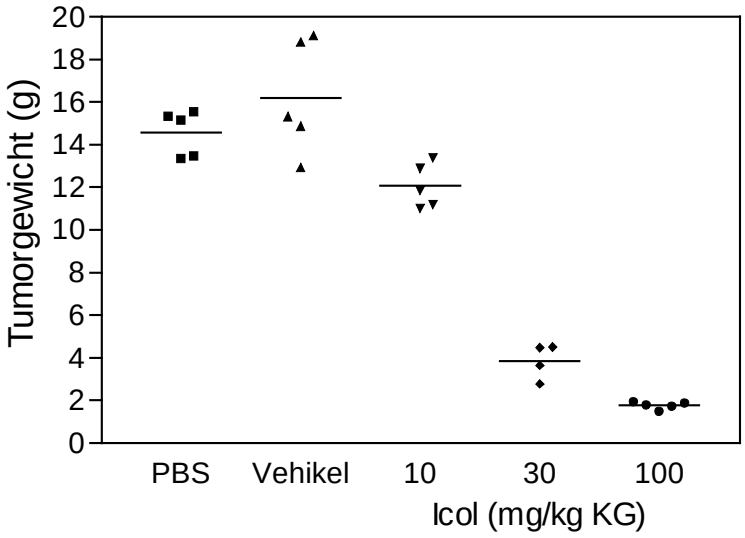

Abbildung 1: Prostatatumorgewichte 20 Tage nach Tumorzellinjektion in den ventralen Prostatalappen. PBS (phosphate buffer saline) und Vehikel wurden einmal am Tag oral verabreicht. Der synthetische Inhibitor (*Icol*) wurde einmal am Tag oral *vom 1. Tag* nach Zellinjektion bis zum 20.Tag appliziert. Die Tumorgewichte der Behandlungsgruppen mit 30 mg bzw. 100 mg *Icol*/kg Körpergewicht unterscheiden sich signifikant von den PBS- und Vehikelkontrollen ($p<0,05$). Kennzeichnung der Mittelwerte.

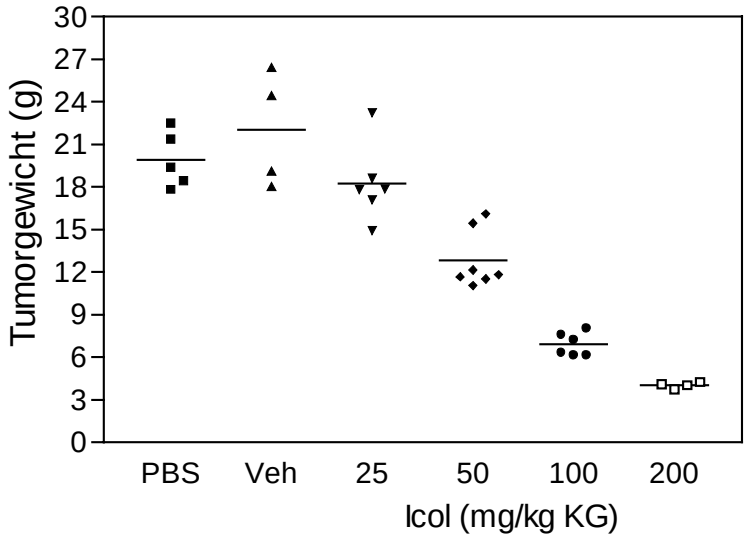

Abbildung 2: Prostatatumorgewichte 20 Tage nach Tumorzellinjektion in den ventralen Prostatalappen. PBS (phosphate buffer saline) und Vehikel wurden einmal am Tag oral verabreicht. Der synthetische Inhibitor (*Icol*) wurde einmal am Tag oral *vom 6. Tag* nach Zellinjektion bis zum 20.Tag appliziert. Die Tumorgewichte der Behandlungsgruppen mit 50 mg, 100 mg bzw. 200 mg *Icol*/kg Körpergewicht unterscheiden sich signifikant von den PBS- und Vehikelkontrollen ($p<0,05$). Kennzeichnung der Mittelwerte.

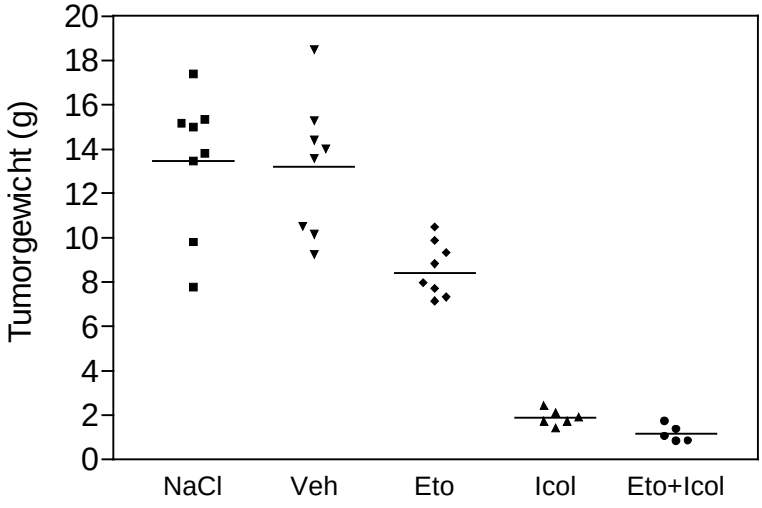

Abbildung 3: Prostatatumorgewichte 18 Tage nach Tumorzellinjektion in den ventralen Prostatalappen. Behandlungsbeginn *am 6. Tag* nach Tumorzellinjektion, einmal am Tag orale und intraperitoneale (i.p.) Gabe bis zum 17. Tag. Symbole: NaCl: oral NaCl-Lsg. und i.p. NaCl-Lsg.; Veh: oral Vehikel Icol und i.p. Vehikel Etoposid; Eto: oral Vehikel Icol und i.p. Etoposid (30 mg/kg KG); Icol: oral Icol (100 mg/kg KG) und i.p. Vehikel Etoposid; Eto+Icol: oral Icol (100 mg/kg KG) und i.p. Etoposid (30 mg/kg KG). Kennzeichnung der Mittelwerte.

5. Literatur

5.1. Eigene Artikel als Erstautor

E1 Lein M, Jung K, Schnorr D, Henke W, Loening SA. Strip test for the quick detection of increased concentrations of prostate-specific antigen in blood. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1996; 34: 511-514.

E2 Lein M, Stephan C, Jung K, Schnorr D, Loening SA. Relation of free PSA/total PSA in serum for differentiating between patients with prostatic cancer and benign hyperplasia of the prostate: which cutoff should be used? Cancer Invest 1998; 16: 45-49.

E3 Lein M, Koenig F, Jung K, McGovern FJ, Skates SJ, Schnorr D, Loening SA. The percentage of free prostate specific antigen is an age-independent tumour marker for prostate cancer: establishment of reference ranges in a large population of healthy men. Br J Urol 1998; 82: 231-236.

E4 Lein M, Brux B, Jung K, Henke W, Koenig F, Stephan C, Schnorr D, Loening SA. Elimination of serum free and total prostate-specific antigen after radical retropubic prostatectomy. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1997; 35: 591-595.

E5 Lein M, Jung K, Brux B, Knäbich A, Sinha P, Schnorr D, Loening SA. Re: Free and complexed prostate specific antigen in the differentiation of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: studies in serum and plasma samples. J Urol 1999; 162: 502-503.

E6 Lein M, Jung K, Elgeti U, Petras T, Stephan C, Brux B, Sinha P, Winkelmann B, Schnorr D, Loening SA. Comparison of the clinical validity of free-prostate specific antigen, alpha-1-antichymotrypsin-prostate specific antigen and complexed-prostate specific antigen in prostate cancer diagnosis. Eur Urol, eingereicht 12/99.

E7 Lein M, Jung K, Hammerer P, Graefen M, Semjonow A, Stieber P, Ossendorf M, Luboldt HJ, Brux B, Stephan C, Schnorr D, Loening SA. A multicenter clinical trial on the use of alpha-1-antichymotrypsin-prostate-specific antigen in prostate cancer diagnosis. Prostate 2001; 47: 77-84.

E8 Lein M, Stephan C, Jung K, Schnorr D, Loening SA. Molekulare Formen des prostataspezifischen Antigens und des humanen Kallikreins 2 als mögliche Indikatoren in der Prostatakarzinomdiagnostik. Urol A 2000; 39: 313-323.

E9 Lein M, Jung K, Weiß S, Schnorr D, Loening SA. Soluble CD44 variants in serum of patients with urological malignancies. Oncology 1997; 54: 226-230.

E10 Lein M, Nowak L, Jung K, Koenig F, Lichtinghagen R, Schnorr D, Loening SA. Analytical aspects regarding the measurement of metalloproteinases and their inhibitors in blood. Clin Biochem 1997; 30: 491-496.

E11 Lein M, Jung K, Laube Ch, Hübner T, Winkelmann B, Stephan C, Hauptmann S, Rudolph B, Schnorr D, Loening SA. Matrix-Metalloproteinases and their inhibitors in plasma and tumor tissue of patients with renal cell carcinoma. Int J Cancer 2000; 85: 801-804.

E12 Lein M, Nowak L, Jung K, Laube Ch, Ulbricht N, Schnorr D, Loening SA. Metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix-metalloproteinases in plasma of patients with prostate cancer and in prostate cancer tissue. Ann NY Acad Sci 1999; 878: 544-546.

E13 Lein M, Koenig F, Misdraji J, McDougal WS, Jung K, Loening SA, Hasan T, Ortel B. Laser-induced hyperthermia in rat prostate cancer: role of site of tumor implantation. Urology 2000; 56: 167-172.

E14 Lein M, Jung K, Le DK, Hasan T, Ortel B, Borchert D, Winkelmann B, Schnorr D, Loening SA. Synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases (Batimastat) reduces the prostate cancer growth in an orthotopic rat model. Prostate 2000; 43: 77-82.

5.2. Eigene Artikel als Koautor

K1 Jung K, Zachow J, Lein M, Brux B, et al.: Rapid detection of elevated prostate-specific antigen levels in blood: performance of various membrane strip test compared. Urology 1999; 53: 155-160.

K2 Stephan C, Lein M, Jung J, Schnorr D, et al.: The influence of prostate volume on the ratio of free to total prostate specific antigen in serum of patients with prostate carcinoma and benign prostate hyperplasia. Cancer 1997; 79: 104-109.

K3 Jung K, Meyer A, Lein M, Rudolph B, et al.: Ratio of free to total prostate specific antigen in serum can not distinguish patients with prostate cancer from those with chronic inflammation of the prostate. J Urol 1998; 159: 1595-1598.

K4 Meyer A, Jung K, Lein M, Schnorr D, et al.: Factors influencing the ratio of free to total prostate specific antigen in serum. Int J Cancer 1997; 74: 630-636.

K5 Stephan C, Jung K, Brux B, Lein M, et al.: ACT-PSA and complexed PSA elimination kinetics in serum after radical retropubic prostatectomy: proof of new complex forming of PSA after release into circulation. Urology 2000; 55: 560-563.

K6 Jung K, Brux B, Lein M, Knäbich A, et al.: Determination of alpha1-antichymotrypsin-PSA complex in serum does not improve the differentiation between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer compared with total PSA and percent free PSA. Urology 1999; 53: 1160-1168.

K7 Jung K, Elgeti U, Lein M, Brux B, et al.: Ratio of free or complexed prostate-specific antigen (PSA) to total PSA: which ratio improves differentiation between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer? Clin Chem 2000; 46: 55-62.

K8 Jung K, Lein M, Weiss S, Schnorr D, et al.: Soluble CD44 molecules in serum of patients with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. Eur J Cancer 1996; 32: 627-630.

K9 Lein M, Weiss S, Jung K, Schnorr D, et al.: Soluble CD44 variants in serum of patients with prostate cancer and other urological malignancies. Prostate 1996; 29: 334-335.

K10 Lein M, Jung K, Nowak L, Schnorr D, et al.: Analytical aspects regarding the measurement of metalloproteinases. Ann NY Acad Sci 1999; 878: 491-493.

K11 Jung K, Laube C, Lein M, Lichtinghagen R, et al.: Kind of sample as preanalytical determinant of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 in blood. Clin Chem 1998; 44: 1060-1062.

K12 Jung K, Nowak L, Lein M, Henke W, et al.: What kind of specimen should be selected for determining tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in blood? Clin Chim Acta 1996; 254: 97-100.

K13 Jung K, Nowak L, Lein M, Priem F, et al.: Matrix metalloproteinases 1 and 3, tissue inhibitor of metalloproteinase 1 and the complex of metalloproteinase 1/tissue inhibitor in plasma of patients with prostate cancer. Int J Cancer (Pred Oncol) 1997; 74: 220-223.

K14 Jung K, Lein M, Ulbrich N, Rudolph B, et al.: Quantification of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinase in prostatic tissue: analytical aspects. Prostate 1998; 34: 130-136.

5.3. Literatur

1. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA: Cancer statistics, 2000. CA Cancer J Clin 2000; 50: 7-33.
2. Gee WF, Holtgrewe L, Albertsen PC, et al.: Practice trends in the diagnosis and management of prostate cancer of prostate cancer. J Urol 1995; 154: 207-208.
3. Polascik TJ, Oesterling JE, Partin AW: Prostate specific antigen: a decade of discovery-what we have learned and where we are going. J Urol 1999; 162: 293-306.
4. Lilja H: Seminal vesicle-secreted proteins and their reactions during gelation and liquefaction of human semen. J Clin Invest 1987; 80: 281-285.
5. Armbruster DA: Prostate-specific antigen: biochemistry, analytical methods, and clinical application. Clin Chem 1993; 39: 181-195.
6. Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM: Purification of a human prostate specific antigen. Invest Urol 1979; 17: 159-163.
7. Stenman UH, Leinonen J, Zhang WM, Finne P: Prostate-specific antigen. Semin Cancer Biol 1999; 9: 83-93.
8. Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, Basler JW: Detection of organ-confined prostate cancer is increased through prostate-specific antigen-based screening. JAMA 1993; 270: 948-954.
9. Mettlin CJ, Murphy GP, Ho R, Menck HR: The National Cancer Database report on longitudinal observations on prostate cancer. Cancer 1996; 77: 2162-2166.
10. Epstein JI, Walsh PC, Carmichael M, Brendler CB: Pathologic and clinical findings to predict tumor extent of non-palpable (stage T1c) prostate cancer. JAMA 1994; 271: 368-374.
11. Brawer MK, Chetner MP, Beatie J, et al.: Screening for prostatic carcinoma with prostate specific antigen. J Urol 1992; 147: 841-845.

12. Catalona WJ, Richie JP, Ahmann FR, et al.: Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. J Urol 1994; 151: 1283-1290.
13. Cooner WH, Mosley BR, Rutherford CL, Jr., et al.: Prostate cancer detection in a clinical urological practice by ultrasonography, digital rectal examination and prostate specific antigen. J Urol 1990; 143: 1146-1152.
14. Labrie F, Dupont A, Suburu R, et al.: Serum prostate specific antigen as pre-screening test for prostate cancer. J Urol 1992; 147: 846-851.
15. Bunting PS: A guide to the interpretation of serum prostate specific antigen levels. Clin Biochem 1995; 28: 221-241.
16. Brawer MK: Prostate-specific antigen. Semin Surg Oncol 2000; 18: 3-9.
17. Nixon RG, Brawer MK: Enhancing the specificity of prostate-specific antigen (PSA): an overview of PSA density, velocity and age-specific reference ranges. Br J Urol 1997; 79(Suppl 1): 61-67.
18. Ukimura O, Durrani O, Babaian RJ: Role of PSA and its indices in determining the need for repeat prostate biopsies. Urology 1997; 50: 66-72.
19. Stenman UH, Leinonen J, Alfthan H, et al.: A complex between prostate-specific antigen and alpha 1-antichymotrypsin is the major form of prostate-specific antigen in serum of patients with prostatic cancer: assay of the complex improves clinical sensitivity for cancer. Cancer Res 1991; 51: 222-226.
20. Leinonen J, Zhang WM, Stenman UH: Complex formation between PSA isoenzymes and protease inhibitors. J Urol 1996; 155: 1099-1103.
21. Catalona WJ, Partin AW, Slawin KM, et al.: Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: a prospective multicenter clinical trial. JAMA 1998; 279: 1542-1547.
22. Chen YT, Luderer AA, Thiel RP, et al.: Using proportions of free to total prostate-specific antigen, age, and total prostate-specific antigen to predict the probability of prostate cancer. Urology 1996; 47: 518-524.
23. Bangma CH, Kranse R, Blijenberg BG, Schroder FH: The free-to-total serum prostate specific antigen ratio for staging prostate carcinoma. J Urol 1997; 157: 544-547.
24. Van Cangh PJ, De Nayer P, De Vischer L, et al.: Free to total prostate-specific antigen (PSA) ratio improves the discrimination between prostate cancer and benign prostatic hyperplasia (BPH) in the diagnostic gray zone of 1.8 to 10 ng/mL total PSA. Urology 1996; 48: 67-70.
25. Woodrum DL, Brawer MK, Partin AW, et al.: Interpretation of free prostate specific antigen clinical research studies for the detection of prostate cancer. J Urol 1998; 159: 5-12.
26. Björk T, Bjartell A, Abrahamsson PA, et al.: Alpha 1-antichymotrypsin production in PSA-producing cells is common in prostate cancer but rare in benign prostatic hyperplasia. Urology 1994; 43: 427-434.
27. Stenman UH: Prostate-specific antigen, clinical use and staging: an overview. Br J Urol 1997; 79(Suppl 1): 53-60.
28. Huber PR, Schmid HP, Mattarelli G, et al.: Serum free prostate specific antigen: isoenzymes in benign hyperplasia and cancer of the prostate. Prostate 1995; 27: 212-219.
29. Wu JT, Wilson L, Zhang P, et al.: Correlation of serum concentrations of PSA-ACT complex with total PSA in random and serial specimens from patients with BPH and prostate cancer. J Clin Lab Anal 1995; 9: 15-24.
30. Espana F, Royo M, Martinez M, et al.: Free and complexed prostate specific antigen in the differentiation of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: studies in serum and plasma samples. J Urol 1998; 160: 2081-2088.
31. Wu JT, Zhang P, Liu GH, Wilson L: Development of an immunoassay specific for the PSA-ACT complex without the problem of high background. J Clin Lab Anal 1998; 12: 14-19.
32. Heidtmann HH, Havemann K: Assay of complexed alpha 1-antichymotrypsin in plasma. Clin Chem 1993; 39: 869-874.
33. Björk T, Piironen T, Pettersson K, et al.: Comparison of analysis of the different prostate-specific antigen forms in serum for detection of clinically localized prostate cancer. Urology 1996; 48: 882-888.
34. Christensson A, Bjork T, Nilsson O, et al.: Serum prostate specific antigen complexed to alpha 1-antichymotrypsin as an indicator of prostate cancer. J Urol 1993; 150: 100-105.
35. Partin AW, Brawer MK, Subong ENP, et al.: Prospective evaluation of percent free-PSA and complexed-PSA for early detection of prostate cancer. Prostate Cancer Prostatic Diseases 1998; 1: 197-203.
36. Brawer MK, Meyer GE, Letran JL, et al.: Measurement of complexed PSA improves specificity for early detection of prostate cancer. Urology 1998; 52: 372-378.
37. Allard WJ, Zhou Z, Yeung KK: Novel immunoassay for the measurement of complexed prostate-specific antigen in serum. Clin Chem 1998; 44: 1216-1223.
38. Gann PH, Hennekens CH, Stampfer MJ: A prospective evaluation of plasma prostate-specific antigen for detection of prostatic cancer. JAMA 1995; 273: 289-294.
39. Oesterling JE, Jacobsen SJ, Chute CG, et al.: Serum prostate-specific antigen in a community-based population of healthy men. Establishment of age-specific reference ranges. JAMA 1993; 270: 860-864.

40. Partin AW, Catalona WJ, Southwick PC, et al.: Analysis of percent free prostate-specific antigen (PSA) for prostate cancer detection: influence of total PSA, prostate volume, and age. Urology 1996; 48: 55-61.
41. Richardson TG, Wojno KJ, Liang LW, et al.: Half-life determination of serum free prostate-specific antigen following radical retropubic prostatectomy. Urology 1996; 48: 40-44.
42. Partin AW, Piantadosi S, Subong ENP, et al.: Clearence rate of serum-free and total PSA following radical retropubic prostatectomy. Prostate 1996; 7(suppl): 35-39.
43. Agha AH, Schechter E, Roy JB, Culkin DJ: Prostate specific antigen is metabolized in the liver. J Urol 1996; 155: 1332-1335.
44. Kilic S, Yalcinkaya S, Guntekin E, et al.: Determination of the site of metabolism of total, free, and complexed prostata-specific. Urology 1998; 52: 470-473.
45. Filella X, Alcover J, Molina R, et al.: Measurement of complexed PSA in the differential diagnosis between prostate cancer and benign prostate hyperplasia. Prostate 2000; 42: 181-185.
46. Wang TJ, Linton HJ, Payne J, et al.: Generation of PSA-ACT-specific monoclonal antibodies and their application in a sandwich immunoassay. Hybridoma 1999; 18: 535-541.
47. Albelda SM: Biology of disease. Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. Lab Invest 1993; 68: 4-17.
48. Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA: Tumor cell interactions with extracellular matrix during invasion and metastasis. Ann Rev Cell Biol 1993; 9: 541-573.
49. Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, et al.: CD44 is the principal surface receptor for hyaluronate. Cell 1990; 61: 1303-1313.
50. Screaton GR, Bell MV, Bell JI, Jackson DG: The identification of a new alternative exon with highly restricted tissue expression in transcripts encoding the mouse Pgp-1 (CD44) homing receptor. Comparison of all 10 variable exons between mouse, human and rat. J Biol Chem 1993; 268: 12235-12238.
51. Tölg C, Hofmann M, Herrlich P, Ponta H: Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability. Nucleic Acids Res 1993; 21: 1225-1229.
52. Stamenkovic I, Aruffo A, Aminot M, Seed B: The hematopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potential for hyaluronate bearing cells. EMBO J 1991; 10: 343-348.
53. Ponta H, Sleeman J, Herrlich P: Tumor metastasis formation: cell-surface proteins confer metastasis-promoting or –supressing properties. Biochim Biophys Acta 1994; 1198: 1-10.
54. Heider KH, Hofmann M, Hors E, et al.: A human homologue of the rat metastatic-associated variant of CD44 is expressed in colorectal carcinomas and adenomatous polyps. J Cell Biol 1993; 120: 227-233.
55. Dall P, Heider KH, Hekele A, et al.: Surface protein expression and messenger RNA-splicing analysis of CD44 in uterine cervical cancer and normal cervical epithelium. Cancer Res 1994; 54: 3337-3341.
56. Wielenga VJM, Heider KH, Johan G, et al.: Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. Cancer Res 1993; 53: 4754-4759.
57. Hofmann M, Rudy W, Zöller M, et al.: CD44 splice variants confer metastatic behavior in rats: homologous sequences are expressed in human tumor cell lines. Cancer Res 1993; 51: 5292-5297.
58. Guo YJ, Liu G, Wang X, et al.: Potential use of soluble CD44 in serum as indicator of tumor burden and metastasis in patients with gastric or colon cancer. Cancer Res 1994; 54: 422-426.
59. Liu AY: Expression of CD44 in prostate cancer cells. Cancer Lett 1994; 76: 63-69.
60. Hong RL, Pu YS, Chu JS, et al.: Correlation of expression of CD44 isoforms and E-cadherin with differentiation in human urothelial cell lines and transitional cell carcinoma. Cancer Lett 1995; 89: 81-87.
61. Burchardt M, Burchardt T, Shabsigh A, et al.: Current concepts in biomarker technology for bladder cancer. Clin Chem 2000; 46: 595-605.
62. Gelb AB: Renal cell carcinoma: current prognostic factors. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). Cancer 1997; 80: 981-986.
63. Liotta LA, Stetler-Stevenson WG: Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. Cancer Res 1991; 51(Suppl): 5054-5059.
64. Twining SS: Regulation of proteolytic activity in tissues. Crit Rev Biochem Mol Biol 1994; 29: 315-383.
65. Crawford HC, Matrisian LM: Tumor and stromal expression of matrix metalloproteinases and their role in tumor progression. Invasion Metastasis 1995; 14: 234-245.
66. Gibbons RP, Cole BS, Richardson RG, et al.: Regulation of proteolytic activity in tissues. Crit Rev Biochem Mol Biol 1994; 29: 315-383.
67. Anderson IC, Sugarbaker DJ, Ganju RK, et al.: Stromelysin-3 is overexpressed by stromal elements in primary non-small cell lung cancers and regulated by retinoic acid in pulmonary fibroblasts. Cancer Res 1995; 55: 4120-4126.
68. Murray GI, Duncan ME, O'Neil P, et al.: Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in colorectal cancer. Nat Med 1996; 2: 461-462.
69. Davies B, Miles DW, Happerfield LC, et al.: Activity of type IV collagenases in benign and malignant breast disease. Brit J Cancer 1993; 67: 1126-1131.

70. Powell W, Matrisian L: Complex roles of matrix metalloproteinases in tumor progression. In: Gunthert U, Birchmeier W, eds. Attempts to understand metastasis formation I: metastasis related molecules. New York: Springer-Verlag, 1996: 1-21.
71. Zucker S, Lysik RM, DiMassimo BI, et al.: Plasma assay of gelatinase B: tissue inhibitor of metalloproteinase complexes in cancer. Cancer 1995; 76: 700-708.
72. Stetler-Stevenson WG, Krutzch HC, Liotta LA: Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. J Biol Chem 1989; 264: 17374-17378.
73. Zeng ZS, Huang Y, Cohen AM, Guillem JG: Prediction of colorectal cancer relapse and survival via tissue RNA levels of matrix metalloproteinase 9. J Clin Oncol 1996; 14: 3133-3140.
74. Brown PD, Giavazzi R: Matrix metalloproteinase inhibition: a review of anti-tumor activity. Ann Oncol 1995; 6: 967-974.
75. Nagase H: Matrix metalloproteinases. Contrib Nephrol 1994; 107: 85-93.
76. Tamakoshi K, Kikkawa F, Nawa A, et al.: Characterization of extracellular matrix-degrading proteinase and its inhibitor in gynecologic cancer tissues with clinically different metastatic form. Cancer 1995; 76: 2565-2571.
77. Stetler Stevenson WG, Hewitt R, Corcoran M: Matrix metalloproteinases and tumor invasion: from correlation and causality to the clinic. Semin Cancer Biol 1996; 7: 147-154.
78. Zucker S, Mancuso P, DiMassimo B, et al.: Comparison of techniques for measurement of gelatinases/type IV collagenases: enzyme-linked immunoassays versus substrate degradation assays. Clin Exp Metastasis 1994; 12: 13-22.
79. Stearns M, Stearns ME: Evidence for increased activated metalloproteinase 2 (MMP-2a) expression associated with human prostate cancer progression. Oncol Res 1996; 8: 69-75.
80. Hamdy FC, Fadlon EJ, Cottam D, et al.: Matrix metalloproteinase 9 expression in primary prostatic adenocarcinoma and benign prostatic hyperplasia. Br J Cancer 1994; 69: 177-182.
81. Pajouh MS, Nagle RB, Breathnach R, et al.: Expression of metalloproteinase genes in human prostate cancer. J Cancer Res Clin Oncol 1991; 117: 144-150.
82. Knox JD, Wolf C, McDaniel K, et al.: Matrilysin expression in human prostate carcinoma. Mol Carcinog 1996; 15: 57-63.
83. Kugler A, Hemmerlein B, Thelen P, et al.: Expression of metalloproteinase 2 and 9 and their inhibitors in renal cell carcinoma. J Urol 1998; 160: 1914-1918.
84. Powell WC, Knox JD, Navre M, et al.: Expression of the metalloproteinase matrilysin in DU 145 cells increases their invasive potential in severe combined immunodeficient mice. Cancer Res 1993; 3: 417-422.
85. Lucia MS, Bostwick DG, Bosland M, et al.: Workgroup I: rodent models of prostate cancer. Prostate 1998; 36: 49-55.
86. Brown PD, Giavazzi R: Matrix metalloproteinase inhibition: a review of anti-tumor activity. Ann Oncol 1995; 6: 967-974.
87. Lokeshwar BL, Selzer MG, Block NL, Gunja-Smith Z: Secretion of matrix metalloproteinases and their inhibitors (tissue inhibitors of metalloproteinases) by human prostate explant cultures: reduced tissue inhibitor of metalloproteinase secretion by malignant tissues. Cancer Res 1993; 53: 4493-4498.
88. Rasmussen HS, McCann PP: Matrix metalloproteinase inhibition as a novel anticancer strategy: a review with special focus on batimastat and marimastat. Pharmacol Ther 1997; 75: 69-75.
89. Knox JD, Bretton L, Lynch T, et al.: Synthetic matrix metalloproteinase inhibitor, BB-94, inhibits the invasion of neoplastic human prostate cells in a mouse model. Prostate 1998; 35: 248-254.
90. Wang X, Brown PD, Crimmin MJ, Hoffmann RM: Matrix metalloproteinase inhibitor BB-94 (batimastat) inhibits human colon tumor growth and spread in a patient-like orthotopic model in nude mice. Cancer Res 1994; 54: 4726-4728.
91. Botos I, Scapozza L, Zhang D, et al.: Batimastat, a potent matrix metalloproteinase inhibitor, exhibits an unexpected mode of binding. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 2749-2754.
92. Eccles SA, Box GM, Court WJ, et al.: Control of lymphatic and hematogenous metastasis of a rat mammary carcinoma by the matrix metalloproteinase inhibitor batimastat (BB-94). Cancer Res 1996; 56: 2815-2822.
93. Boasberg P, Harbaugh B, Roth B, et al.: Marimastat, a novel matrix metalloproteinase inhibitor in patients with hormone-refractory prostate cancer. In: Proceedings of ASCO Thirty-Second Annual Meeting 1996; 15: 258.
94. Kager M, Spruss T, Schneider MR, von Angerer E: Dunning R3327-G prostate carcinoma of the rat: an appropriate model for drug evaluation. J Cancer Res Clin Oncol 1992; 118: 334-338.
95. Wilson MJ, Kapoor S, Vogel MM, Sinha AA: Characterization of gelatin degrading metalloproteinase activities of the Dunning rat prostate tumor grown in nude mice. Prostate 1991; 19: 237-250.

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Habilitationsschrift „Neue Serummarker bei urologischen Malignomen mit dem Schwerpunkt Prostatakarzinom und Anwendung von Proteinase-Inhibitoren in der Therapie des Prostatakarzinoms“ faßt Ergebnisse zusammen, die ich in den Jahren von 1996 bis 2000 als Erstautor in wissenschaftlichen Artikeln von *peer reviewed* Zeitschriften veröffentlicht habe. Zusätzlich werden 14 Arbeiten mit ihren Aussagen eingeschlossen, bei denen ich als Koautor beteiligt war.

Gegenstand der Habilitationsschrift sind Untersuchungen zur diagnostischen Optimierung des Tumormarkers Prostataspezifisches Antigen (PSA) und zum Expressionsverhalten von CD44-Proteinen bzw. Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) als potentielle, neue Marker bei urologischen Karzinomen. Die nachgewiesene Bedeutung der MMPs bei der Tumorprogression und -metastasierung hat mich dazu veranlaßt, tierexperimentelle Studien zur Hemmung der MMP-Aktivität mit synthetischen Inhibitoren in meine Arbeit aufzunehmen. Zielstellung war hierbei die Evaluierung neuer Therapieoptionen beim fortgeschrittenen Tumor. Im Mittelpunkt der Untersuchungen steht das Prostatakarzinom (PCa) als häufigster maligner Tumor des Mannes.

1. Das PSA ist ohne Zweifel der beste Tumormarker in der Diagnostik des PCa. Der Optimierung dieses Markers wird große Bedeutung zugemessen. Dabei werden verschiedene Konzepte verfolgt, wobei die Bestimmung der Isoformen des PSA die zur Zeit erfolgreichste Richtung zu sein scheint. Die Ergebnisse meiner u.a. im Rahmen von Multizenterstudien durchgeführten Untersuchungen belegen den diagnostischen Nutzen der zusätzlichen Bestimmung des f-PSA%, um PCa-Patienten früher zu erkennen und besser gegenüber Patienten mit benigner Prostatahyperplasie (BPH) abgrenzen zu können. Ein weiteres Ergebnis der Untersuchungen zur diagnostischen Validität anderer PSA-Isoformen ist die Feststellung, daß die Bestimmung des gebundenen PSA keinen Vorteil gegenüber dem f-PSA% hat. Widersprüchliche Angaben in der Literatur konnten damit ausgeräumt werden. Diese Ergebnisse veranlaßten die Firma *Roche* als Kooperationspartner, die Weiterentwicklung eines ACT-PSA Prototyp-Testsystems einzustellen.

Die Ergebnisse meiner Untersuchungen zu den PSA-Isoformen haben inzwischen Eingang in den klinischen Alltag gefunden und werden in der Urologischen Klinik der Charité genutzt. Es wurden Entscheidungsgrenzen für den f-PSA%-Wert zur Indikationsstellung von Stanzbiopsien der Prostata als Klinikstandard erarbeitet.

2. Bei verschiedenen urologischen Tumoren wurde das Expressionsverhalten von CD44-Proteinen und MMPs bzw. deren Inhibitoren bestimmt, um eine mögliche Bedeutung bei der Tumorprogression zu erfassen. Diese Untersuchungen sind gleichzeitig Voraussetzung für eine mögliche Anwendung der Komponenten in der Diagnostik und Therapiekontrolle bei diesen Tumorentitäten.

Im Gegensatz zu anderen menschlichen Tumoren konnten bei den untersuchten urologischen Tumoren keine veränderten Serumkonzentrationen der CD44-Proteine einschließlich der Varianten nachgewiesen werden. Daher habe ich weiterführende Studien zu den CD44-Proteinen nicht durchgeführt.

3. Im Tumorgewebe sowie im Plasma von Patienten mit PCa und Nierenzellkarzinom konnte ich signifikante Veränderungen von MMPs und deren Inhibitoren nachweisen. Die Situation im Gewebe spiegelt sich zum Teil im Blut der Patienten wider. Diese Beobachtungen beweisen die Bedeutung der MMPs bei der Tumorprogression und –metastasierung. Prinzipiell kann die Bestimmung einzelner MMPs bzw. TIMPs in der Diagnostik von urologischen Tumoren genutzt werden. Die niedrige Sensitivität in der individuellen Erfassung des einzelnen Tumorpatienten schränkt jedoch die praktische Anwendung ein.

4. Die veränderte MMP-Expression bzw. die Dysbalance zwischen MMPs und TIMPs hat mich veranlaßt, synthetische Inhibitoren zur Blockierung der MMP-Aktivität in einem Standardtiermodell des menschlichen PCa einzusetzen. In einer ersten Untersuchung am *Dunning*-Tumor der Ratte wurde nachgewiesen, daß dieser Tumor MMP9 exprimiert und die Serumkonzentration mit der Tumorgröße korreliert. In weiteren tierexperimentellen Untersuchungen wurde der Einfluß von *Batimastat*, einem Breitspektrum-Inhibitor der MMPs und einem neuentwickelten, selektiveren Inhibitor (*Icol*) auf das orthotope Tumorwachstum ermittelt. Beide Substanzen führten zu einer Hemmung des lokalen Tumorwachstums. Durch Applikation von *Icol* wurde eine Reduzierung des Tumorgewichtes um 90% im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren erreicht. Diese Beobachtungen haben eine doppelte Bedeutung. Zum einen beweist die Hemmwirkung von synthetischen MMP-Inhibitoren im Tiermodell die Funktion der MMPs bei der lokalen Tumorprogression. Zum anderen werden durch diese erfolgreichen tierexperimentellen Studien mit neuen Substanzen Voraussetzungen für die klinische Anwendung bei Patienten mit hormonrefraktärem PCa geschaffen.

7. Danksagung und eidesstattliche Erklärung

Herrn Prof. Dr. S.A. Loening bin ich für seine Unterstützung und sein stetes Interesse bei der Durchführung der Arbeiten zu großem Dank verpflichtet. Herrn Prof. Dr. D. Schnorr verdanke ich meine Begeisterung für die Urologie und die Wissenschaft. Seine ständige Unterstützung war Voraussetzung, die Experimente durchzuführen.
Herrn Prof. Dr. K. Jung schulde ich für seine Unterstützung großen Dank. Ohne seine geduldige Hilfe wäre die Durchführung der Studien nicht möglich gewesen. Ich danke ihm sehr für das mir entgegengebrachte Vertrauen.
Weiterhin gilt mein besonderer Dank allen Mitarbeitern der Forschungsabteilung unserer Klinik.
Ich möchte meinen Kollegen in der Klinik für die Unterstützung und das Verständnis danken.
Ich danke allen Koautoren der publizierten Arbeiten. Die Zusammenarbeit spiegelt den Kooperationscharakter der Arbeiten wider.

Erklärung
(gemäß Habilitationsordnung der Charité)

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß

- mir keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt wurde,
- die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den 21.07.2000 Dr. Michael Lein