

Aus der Klinik für Urologie
der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

"Der Einfluß von Batimastat auf Prostatakarzinom Zelllinien und den
Dunning Tumor der Ratte"

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -
Universitätsmedizin Berlin

von

Herrn Dietmar Borchert

aus Freiburg im Breisgau

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. PD Dr. med. M. Lein
2. Prof. Dr. med. D. Fahlenkamp
3. PD Dr. med. A. Semjonow

Datum der Promotion:..10.12.2004.....

Teile dieser Dissertationsschrift wurden in folgenden Arbeiten publiziert:

1. Lein M, Jung K, Le DK, Hasan T, Ortel B, Borchert D, Winkelmann B, Schnorr D and Loening SA. Synthetic Inhibitor of Matrix Metalloproteinases (Batimastat) Reduces Prostate Cancer Growth in an Orthotopic Rat Model. *Prostate* 2000; 43: 77 - 82
2. Borchert D, Lein M, Jung K, Schnorr D, Loening SA. Effect of inhibitors of matrix metalloproteinases on prostate carcinoma cell lines and Dunning tumor in rats. *European Students Conference* 1999, Abstract U 03.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Epidemiologie des Prostatakarzinoms.....	1
1.2	Prostatakarzinom.....	1
1.2.1	Diagnostik des Prostatakarzinoms.....	1
1.2.2	Therapieprinzipien.....	2
1.2.3	Therapie des lokalen Prostatakarzinoms.....	3
1.2.4	Therapie des metastasierten Prostatakarzinoms.....	4
1.2.5	Therapie des hormonrefraktären Prostatakarzinoms.....	5
1.3	Matrix - Metalloproteinasen (MMP).....	6
1.3.1	Systematik und Funktion.....	6
1.3.2	Biochemie, Physiologie und Regulation der MMP.....	8
1.3.3	Physiologische Inhibitoren der MMP.....	10
1.4	Befunde zur veränderten Expression und Aktivität der MMP und deren spezifische Inhibitoren.....	11
1.4.1	Zelle.....	11
1.4.2	Gewebeverband.....	12
1.4.3	Tiermodelle.....	13
1.4.4	Mensch.....	14
1.5	Befunde über den Einsatz von synthetischen Inhibitoren der MMP.....	15
1.5.1	Synthetische Inhibitoren im Tiermodell.....	15
1.5.2	Synthetische MMPI in klinischen Studien.....	15
1.6	Batimastat.....	16
1.6.1	Funktion und Biochemie.....	16
1.6.2	Struktur von Batimastat.....	17
1.6.3	Einsatz von Batimastat in klinischen Studien.....	18
1.7	Tumorzelllinien und Tumormodell.....	19
1.7.1	PCa-Zelllinien.....	19
1.7.2	MATLyLu-Zelllinie und Tiermodell.....	21
1.7.3	Der MTT-Test.....	22

2	Zielstellung der Arbeit.....	24
3	Material und Methoden.....	25
3.1	Konzeption der Untersuchungen.....	25
3.2	Verwendete Tumorzelllinien.....	25
3.3	Zellkultur.....	25
3.4	<i>In vitro</i> Versuch.....	26
3.5	MTT Test.....	26
3.6	Tiermodell.....	26
3.7	Statistische Analyse.....	28
4	Ergebnisse.....	29
4.1	Konzentration, Linearität und Zeitabhängigkeit der MTT Messung.....	29
4.2	Wirkung von Batimastat auf Prostatakarzinomzelllinien <i>in vitro</i>	33
4.3	Wirkung von Batimastat im Tiermodell.....	42
5	Diskussion.....	45
5.1	Bewertung des MTT - Test.....	45
5.2	Batimastat unter <i>in vitro</i> Bedingungen.....	46
5.3	Reduktion des Tumorwachstum im Tiermodell.....	48
5.3.1	Tierexperimentelle und klinische Ergebnisse im Vergleich.....	50
5.4	MMP und TIMP bei Malignomen.....	52
5.4.1	Korrelation von MMP und TIMP bei Malignomen.....	53
5.4.2	Maligne Transformation durch MMP und TIMP.....	55
5.4.3	Einfluß auf die Tumorinvasion durch MMP und TIMP.....	56
5.4.4	Gefäßneubildung durch MMP und TIMP.....	58
5.4.5	Wirkung von MMP und TIMP auf die Tumorprogression.....	59
5.4.6	Zusammenfassung.....	62

Abkürzungsverzeichnis

Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid (Lösungsmittel)
DRU	Digitale rektale Untersuchung
EZM	Extrazelluläre Matrix
h	Stunde
IGFBP-3	Insulin-ähnliches Wachstumsfaktor-bindendes Protein 3
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
KG	Körpergewicht
LH-RH	Luteinisierendes Hormon Releasing Hormon
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MT-MMP	Membran Typ - Matrixmetalloproteinasen
MMPI	(synthetischer) Matrixmetalloproteinasen Inhibitor
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-3-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazolium- Bromid-Formazan
MW	Mittelwert
NAD-H/-PH	Nikotin-Amid-Dinukleotid/-Phosphat
OD	Extinktionswert des Fotometers
PBS	Phosphate buffered saline (Lösungsmittel)
PCa	Prostatakarzinom
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
SD	Standardabweichung
TIMP	Tissue Inhibitor of Matrixmetalloproteinasen
TGF- β 1	Transformierender Wachstumsfaktor Beta 1

TNF- α	Tumor Nekrose Faktor Alpha
TRUS	Transrektaler Ultraschall
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonooleat (Lösungsmittel)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie des Prostatakarzinoms

Das Prostatakarzinom ist der häufigste maligne Tumor des Mannes. Er ist ein Tumor des "alten Mannes" und wurde von P.Boyle als "epidemic of unknown origin" bezeichnet. Das heisst, dass das PCa eine Erkrankung mit epidemischem Ausmass ist, Ätiologie und Pathogenese aber weitgehend unbekannt sind [1]. Für Deutschland wird die Zahl der am PCa erkrankenden Männer auf 31600 jährlich geschätzt [2]. In den USA werden 230110 Neuerkrankungen und eine Mortalität durch das PCa von 29900 in 2004 erwartet [3]. Die Therapie des PCa richtet sich nach dem Tumorstadium und der individuellen Situation des Patienten. Beim lokalen Prostatakarzinom ohne Metastasen sind die radikale Prostatektomie bzw. die Strahlentherapie die Methoden der Wahl. In fortgeschrittenen Tumorstadien stellt die Testosteronblockade eine etablierte, aber begrenzte Therapie zur Hemmung der Tumorprogression dar. Die Hormontherapie ist eine nichtkurative Behandlung und die Patienten versterben an der fortschreitenden Tumorerkrankung im hormonrefraktären Stadium. Dieser Umstand erklärt das Interesse zur Erforschung neuer und zusätzlicher Therapiemöglichkeiten des fortgeschrittenen PCa. Eine dieser neuen Therapiemöglichkeiten könnte der Einsatz von synthetischen Inhibitoren der Matrixmetalloproteinasen (MMPI) bei Patienten mit fortgeschrittenem PCa sein.

1.2 Prostatakarzinom

1.2.1 Diagnostik des Prostatakarzinoms

Der Verdacht auf das Vorliegen eines PCa kann prinzipiell durch die DRU, durch die Bestimmung des PSA im Serum und durch den TRUS erhoben werden. Bis in die 80er Jahre war die DRU das einzige traditionelle und akzeptierte Verfahren zur Früherkennung des PCa. Die Entdeckung und Einführung des

prostataspezifischen Antigen (PSA) im Jahr 1986 hat die Inzidenz, die Stadienentwicklung bei Erstdiagnose und auch die Mortalität nachhaltig verändert. Aufgrund der eingeschränkten Detektionsfähigkeit des TRUS wird die DRU und das PSA als Früherkennungsverfahren ab dem 50. Lebensjahr empfohlen. Bis zu 86% der neu diagnostizierten Fälle werden bereits im lokalen oder regionalen Stadium diagnostiziert. Die PSA-Bestimmung hat an dieser Entwicklung einen großen Anteil [3,4]. Besteht der Verdacht auf ein PCa, wird eine Biopsie durchgeführt. Zum Ausschluss oder Nachweis von Lymphknotenmetastasen wird die offene oder laparoskopische Lymphadenektomie durchgeführt. In der Diagnostik der Knochenmetastasen kommt die 99m Technetium-Diphosphonat-Knochenszintigraphie zum Einsatz [5]. Bei unklaren Ergebnissen der Knochenszintigraphie werden Röntgenzielaufnahmen und CT- bzw. MRT-Aufnahmen ergänzend eingesetzt. Durch die Vorsorgeuntersuchungen kann ein großer Teil der PCa in einem frühen Stadium erkannt und die Patienten einer potentiell kurativen Therapie zugeführt werden. Die Sterblichkeit dieser Tumorentität ist in den USA seit dem Jahr 1994 um 4,0 % gesunken. Gleichzeitig ist die Gesamtmortalität der Männer in den USA seit 1992 um ca. 1,5 % jährlich gesunken. Der Effekt wird dem PSA zugeschrieben [3].

1.2.2 Therapieprinzipien

Die Therapie des PCa wird in erster Linie durch das Tumorstadium bestimmt. Der Ausschluß einer Metastasierung ist Voraussetzung für die lokale, potentiell kurative Therapie. Bei einer allgemeinen Lebenserwartung dieser Patienten von mindestens 10 Jahren und organbegrenztem PCa sowie unter Berücksichtigung der gesamten Komorbidität sind lokale Therapieverfahren indiziert. Hierzu gehören die radikale Prostatektomie und die Strahlentherapie. Patienten mit einem metastasierten PCa bzw. Patienten mit einem systemischen Progreß nach lokaler Therapie werden mit einer antiandrogenen Hormontherapie behandelt. Die kontrase sexuelle, antiandrogene Hormontherapie hemmt das Tumorwachstum. Für

die Therapie des progredienten Tumors unter antiandrogener Therapie gibt es nur eingeschränkte Therapieoptionen.

1.2.3 Therapie des lokalen Prostatakarzinoms

Durch das PSA ist die Früherkennung des PCa nachhaltig verändert worden. Die Mehrzahl der PCa sind seit der Einführung des PSA bei Erstdiagnose lokal begrenzt [6]. Hieraus resultiert die Möglichkeit einer kurativen Therapie. Dies sind die radikale Prostatektomie bzw. Strahlentherapie [7]. Vor einer operativen bzw. Strahlentherapie erfolgt in den meisten Fällen die pelvine Lymphadenektomie zum Ausschluß von Lymphknotenmetastasen. Die radikale Prostatektomie kann über einen perinealen oder retropubischen bzw. laparoskopischen Zugang erfolgen. Bei gut differenzierten Tumoren mit einer geringen Progressionswahrscheinlichkeit kann die Verlaufsbeobachtung in bestimmten Fällen als Alternative angesehen werden [8]. Für das lokale, organbegrenzte PCa ohne Kapselinfiltration (pT2) liegen die progressionsfreien 10-Jahres-Überlebensraten nach radikaler Prostatektomie zwischen 80 und 90 % [9]. Alternativ und insbesondere bei Vorliegen von Risikofaktoren kommt die konformale Strahlentherapie mit dreidimensionaler Bestrahlungsplanung zum Einsatz. Beim lokal fortgeschrittenen PCa wird sowohl die radikale Prostatektomie als auch die Strahlentherapie eingesetzt [10]. Liegt ein kapselinfiltrierendes Karzinom (pT3) vor, so sinkt die 10-Jahres-Überlebensrate auf 37-56 %. Gleichzeitig zeigen sich 30-50 % der klinisch als lokal begrenzt diagnostizierten Tumore (pT2) nach Begutachtung des Operationspräparates als lokal fortgeschrittene Tumore (pT3) [11]. Die Patienten mit einem Progreß nach radikaler Prostatektomie oder Strahlentherapie werden mit einer Hormontherapie behandelt. Auch hier könnten MMPI in Zukunft von Nutzen sein.

1.2.4 Therapie des metastasierten Prostatakarzinoms

Grundsätzlich gilt das metastasierte PCa bis heute als nicht heilbar. Die Tumorprogression und vor allem deren Symptome können jedoch für einen längeren Zeitraum durch eine hormonelle Therapie beeinflusst werden. Die Stimulation des Tumorwachstums durch Androgene kann durch eine Androgendeprivation gehemmt werden. Diese Androgendeprivation kann prinzipiell durch Androgenentzug und/oder Androgenblockade erreicht werden. Zum Androgenentzug gehört die chirurgische (bilaterale Orchiektomie) und die medikamentöse Kastration. Die therapeutischen Ergebnisse der chirurgischen und medikamentösen Kastration sind vergleichbar.

Bei der medikamentösen Kastration wird die Androgenblockierung durch steroidale und nichtsteroidale Antiandrogene erreicht. Die Therapie bei androgensensiblen PCa zielt auf die komplette Hemmung der Androgensynthese und Blockade der Androgenwirkung. Die Hemmung der Androgensynthese (Androgenentzug) erfolgt durch LH-RH-Analoga sowie natürliche und synthetische Östrogene (medikamentöse Kastration). Die Ausschaltung der testikulären Androgenproduktion durch die bilaterale subkapsuläre Entfernung der Hoden war die erste Form der Hormontherapie. Aufgrund der nachvollziehbaren Störung der körperlichen Integrität wird die medikamentöse Kastration häufiger vorgezogen. Durch die Gabe von LH-RH-Analoga wird der Testosteronspiegel innerhalb weniger Tage in den Kastrationsbereich gesenkt. Durch den therapiebedingten initialen Testosteronanstieg, müssen in den ersten Tagen nach Beginn mit LH-RH-Analoga zusätzlich Antiandrogene gegeben werden.

Die Antiandrogene unterdrücken die androgenbedingte Proliferationsstimulation der Prostataepithelzellen und konkurrieren mit Androgenen um die Bindung an die Rezeptoren. Man unterscheidet spezifische und unspezifische Antiandrogene. Sie werden als Monotherapie, aber häufiger in Kombinationstherapien eingesetzt. Von den Patienten mit metastasiertem PCa entwickeln 80% einen

androgenunabhängigen und damit therapierefraktären Tumor. Diese Tumoren zeigen nach unterschiedlich langen Zeiträumen dann ein Androgen-unabhängiges Wachstum.

1.2.5 Therapie des hormonrefraktären Prostatakarzinoms

Kommt es trotz einer antiandrogenen Hormonbehandlung zur Progression der Erkrankung, spricht man von einem hormonrefraktären PCa. Bei diesen Patienten findet man innerhalb von 1,5-3 Jahren Knochenmetastasen [12].

Das PCa kann aus hormonabhängigen und hormonunabhängigen Zellklonen bestehen. Unter der Hormontherapie entwickelt sich wahrscheinlich die Fraktion der hormonunabhängigen Zellklone stärker oder es kommt zu einer Mutation und Alteration des Androgenrezeptors an den hormonabhängigen Zellklonen. Hieraus folgen als therapeutische Optionen ein Absetzen der Hormontherapie und Beginn einer sogenannten "second line" Therapie. Als "second line" Therapie werden häufig das Estramustinphosphat und Fosfesterol eingesetzt. Die Wirksamkeit ist bei niedrigen objektiven Ansprechraten relativ gering. Im Vordergrund steht die Erhaltung bzw. Verbesserung der Lebensqualität. Es besteht auch hier kein kurativer Ansatz. Die Chemotherapie hat bis heute aufgrund der geringen Ansprechraten und oft schwierigen Krankheitskonstellation aus Alter, Allgemeinzustand und Tumorbiologie trotz verbesserter perichemotherapeutischer Konzepte zu keiner wesentlichen Verbesserung der Therapie des PCa geführt. Neue Substanzen, z.B. Taxoform werden in klinischen Studien evaluiert. 85-100 % der Patienten, die am PCa sterben, haben Knochenmetastasen [13]. Aus dieser bis heute unbefriedigenden therapeutischen Situation des fortgeschrittenen PCa erklärt sich die Notwendigkeit der Entwicklung neuer Therapiestrategien.

1.3 Matrix - Metalloproteinasen (MMP)

1.3.1 Systematik und Funktion

Proteinasen sind seit über hundert Jahren Gegenstand wissenschaftlicher Forschung. Das bekannteste Beispiel hierfür ist das von W. Kühne 1886 entdeckte Trypsin. 1962 publizierten J. Gross et al. ein Experiment, das heute als Beginn der Metalloproteinasenforschung gilt. Ein frisches Querschnittssegment einer Kaulquappe auf einem Kollagen-Gel löste das Kollagen an dieser Stelle auf (siehe Bild im Anhang). Damit war die Spur zu den Kollagenasen gelegt. Gegenwärtig sind 21 MMP bekannt, sechs davon als membrangebundene Formen (MT-MMP). Die MMP sind als MMP-1 bis MMP-28 numeriert [14,15]. Nach der Nomenklatur der IUBMB sind die MMP unter der Enzymklassifikation (E.C.) Nr. 3.4.24. ff. zusammengefaßt. Nach taxonomischen Gesichtspunkten gehören sie zur Familie M10 A der interstitiellen Kollagenasen (Merops ID:M10.001, Clan MA) [16]. In der Subgruppe der Metalloproteinasen gehören sie zur Superfamilie der Metzincins, deren Konsensussequenz HEXXHXXGXXH (H=Histidine, E=Glutamin, X=beliebige Aminosäure, G=Glycin) ist. Die Verwendung der Begriffe Metalloendopeptidasen, -proteinasen und -proteasen ist weitgehend willkürlich. Gemeint ist mit diesen Begriffen die Fähigkeit, makromolekulare Substanzen zu hydrolysieren. Da diese Begriffe nach A.J. Kenny dasselbe bedeuten, wird im weiteren nur noch von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) gesprochen [17].

Zu den Charakteristika, die allen Karzinomen gemeinsam sind, gehören der veränderte Zellzyklus und die gestörte Interaktion der Zellen mit der Extrazellulären Matrix (EZM). Diese Interaktion wird wesentlich von den MMP beeinflusst. MMP sind für den Auf-, Um- und Abbau der EZM mitverantwortlich. Substrate der Enzyme reichen von fibrillären Kollagenen der Knochen, der Haut und des interstitiellen Bindegewebes, zu den nicht-fibrillären Kollagenen, Laminin und Fibronectin, die Bestandteile von Basalmembranen sind. Zu den Substraten der MMP gehören auch Nicht-Matrixproteine wie Transportproteine und

Wachstumsfaktoren. Über die proteolytische Spaltung von Rezeptoren können sie biologische Signalketten beeinflussen. Zum physiologischen Spektrum der biologischen Funktionen gehören parakrine Wirkungen und durch Proteolyse entstehende bioaktive Spaltprodukte, die Vermittlung der Apoptose, Zellproliferation und Angiogenese. Zu den biologischen Funktionen gehört in pathologischer Hinsicht auch die Modulation der Tumorprogression.

Physiologische Beispiele für die MMP-Eigenschaften sind die Einnistung des embryonalen Throphoblasten in das mütterliche Endometrium, die Wundheilung und die funktionelle, bzw. altersbedingte Involution von Organen [18]. An der Einnistung des Trophoblasten ist ein komplexes und redundantes System aus Enzymen beteiligt. Die genetische Defizienz einzelner Enzyme führt daher selten zu einer fehlenden Implantation. Fehlt allerdings die für die Trophoblasteninvasion wichtige Gelatinase B (MMP-9), so kommt es nicht zur Implantation. Voraussetzungen für die Wundheilung sind die Migrationsfähigkeit der Keratinozyten und die Kontraktion der Wundränder. Die Migration der Keratinozyten ist u.a. von MMP-1 und die Kontraktion der Wundränder von MMP-3 abhängig. Eine genetische Defizienz dieser Gene oder ihre Inhibition führt zu einer verzögerten und gestörten Wundheilung [19,20].

Beispiele für funktionelle Eigenschaften von MMP im Zusammenhang mit pathologischen Veränderungen sind die Metastasierung bzw. Invasivität von Tumoren und entzündliche Erkrankungen, wie Arthritis oder Sepsis. TNF- α bewirkt bei systemischer Freisetzung katastrophale Folgen bei Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis oder septischen Zuständen in Folge bakterieller Infektionen. Mindestens sieben der derzeit bekannten MMP sind in der Lage, das Proenzym des TNF- α in die aktive Form zu überführen. Eine Blockade der MMP mit unspezifischen synthetischen Inhibitoren kann septische Zustände im Tiermodell verhindern [21,22]. MMP werden sowohl von Tumorzellen als auch von Zellen des umgebenden Stroma produziert. So führt die ektope Produktion von MMP-3 zur verstärkten Invasivität von Brustkrebszellen in das umliegende Gewebe und

experimentelle Überexpression verschiedener Metalloproteinasen führt zu verstärkter Invasivität und Metastasierung von Tumorzelllinien [23-26].

1.3.2 Biochemie, Physiologie und Regulation der MMP

Die MMP sind eine Familie sezernierter und membrangebundener, kalzium- und zinkabhängiger Endoproteinasen, d.h. sie katalysieren nicht Prozesse am N- oder C-terminalen Ende von Proteinen (Exoproteinasen), sondern im helikalen Abschnitt einer Proteinstruktur. Die MMP sind in der Lage, die EZM, die u.a. aus Kollagenen, Lamininen, Proteoglycanen und Fibronectin besteht, aufzulösen. Die EZM wird im wesentlichen von Enzymen wie MMP, Plasmin, Thrombin, Gewebe-Plasminogen-Aktivator (tPA) und Urokinase-Plasminogen-Aktivator (uPA) umgebaut [27]. Jedes Mitglied der MMP-Familie hat spezifische Wirkungen auf bestimmte Komponenten der extrazellulären Matrix. Die MMP-Familie schließt die einzigen bekannten Enzyme ein, die in der Lage sind fibrilläres Kollagen aufzulösen. Die fibrillären Kollagene Typ I, II, III, V und XI konstituieren die Hauptbestandteile der EZM. Zu den Nicht-Matrixsubstraten der MMP gehören Wachstumsfaktoren wie das IGFBP-3, die Proformen des "transforming growth factor- β " (Pro-TGF- β), des Interleukin 1- β (Pro-IL 1- β), des TNF- α (Pro-TNF- α), des Interleukin-2 α Rezeptors (Pro-IL-2R α) und Plasminogen. Grundsätzlich bestehen die MMPs aus:

1. einem N-terminalen Präpeptid oder Signalsequenz
2. einem Propeptid
3. einer katalytischen Domäne mit Konsensussequenz und Zinkmotiv
4. einer C-terminalen Domäne, die an der Substratidentifizierung beteiligt ist.

Mehrere strukturelle Eigenschaften unterscheiden die MMP von anderen Metalloproteinasen. Die MMPs enthalten zwei Zinkatome und mehrere Kalziumatome. Eines der Zinkatome und die Kalziumatome sind integrale Bestandteile der Faltblattstruktur der MMP. Das zweite Zinkatom stellt das katalytische Zentrum dar. Ausserdem enthalten alle MMP eine charakteristische „Methionin–Schleife“ und den sog. „Cystein-switch“. Die MMP sind wie alle Enzyme in ihrer Funktion abhängig vom pH–Wert in der Reaktionsumgebung. Die pH–Abhängigkeit der MMP–Katalyse wird durch eine breite glockenförmige Kurve von pH 4,5–9,5 beschrieben. Diese pH–Abhängigkeit ist für synthetische Inhibitoren vom Typ der Hydroxamsäureinhibitoren zu beachten [28].

Die Aktivität der MMP ist aufgrund ihres starken proteolytischen Potentials streng reguliert. Außer der Kontrolle der Genexpression und posttranskriptionellen Phase durch Wachstumsfaktoren und Hormone werden die MMP in Form latenter Proenzyme an der Zelloberfläche sezerniert. Die MMP können aber auch intrazellulär aktiviert und dort proteolytisch wirksam werden. Propeptide koordinieren die Zinkatome in der Zymogenform und konservieren die Enzyme so im präaktiven Zustand [29]. Erst nach Modifizierung oder Entfernung der aminoterminalen Domäne (Propeptid) und Dissoziation einer definierten Aminosäure (Cystein 73) vom katalytischen Zinkatom (sog. "Cystein-switch"), entwickeln sie enzymatische Aktivität [30]. Wie bei der Thrombolyse oder im Gerinnungssystem wird auch der Kollagenabbau, bzw. das System der MMP-Aktivierung, kaskadenförmig reguliert. Dies erfolgt unter Einbeziehung von freien und membranständigen Proteasen der gleichen und anderer Enzymfamilien [31,32]. Das Propeptid kann im Experiment durch proteolytische Enzyme, quecksilberhaltige Agentien oder Hitze entfernt werden. Insbesondere im aktivierten Zustand, aber auch bei der Aktivierung selbst, wird die MMP-Aktivierungskaskade von spezifischen (TIMP) und unspezifischen Inhibitoren auf enzymatischem Weg sowie durch Wiederaufnahme in die Zelle kontrolliert (MMP-Clearance).

1.3.3 Physiologische Inhibitoren der MMP

Zur Inhibitions-kaskade der proteolytisch wirkenden MMP gehört ein System spezifischer und unspezifischer physiologischer Inhibitoren. Zu den unspezifischen Inhibitoren der MMP gehören der α_1 -Proteinase Inhibitor und das α_2 -Makroglobulin. Sie machen mehr als 95 % der Antikollagenaseaktivität im Plasma aus [33]. Weitere unspezifische Inhibitoren der MMP sind u.a. Thrombospondin-1 und Thrombospondin-2.

Zu den spezifischen Inhibitoren gehören die "Tissue Inhibitors of Matrixmetalloproteinases". Die wesentliche physiologische Funktion der TIMP liegt wahrscheinlich in der Limitierung der proteolytischen Wirkung der MMP, wie sie bei der Involution, der embryonalen Implantation und der Wundheilung vorgefunden wird. Diese Fähigkeit ist auch eine der zentralen Eigenschaften der TIMP bei der Tumorinvasion, der Metastasierung und der Angiogenese [34]. Es gilt als gesichert, dass die Veränderung im stöchiometrischen Verhältnis inhibitorischer, antiproteolytischer TIMP und proteolytischer MMP eine entscheidende Rolle für das invasive Verhalten eines Tumors spielt [35,36,37]. TIMP bilden einen festen, aber reversiblen 1:1-Komplex mit MMP. Bis heute sind sechs Proteine dieser Familie bekannt (TIMP 1-6). Die biologische Rolle der TIMP ist nicht abschließend geklärt und ihre Bezeichnung möglicherweise irreführend. TIMP zeigten in verschiedenen Experimenten neben ihrer antiproteolytischen Wirkung auch proliferationsfördernde und signaltransduzierende Eigenschaften [38]. So wurde TIMP-1 initial als ein Protein gefunden, daß die Erythropoese stimuliert [37,39]. Stimulierende Eigenschaften der TIMP können mit dem Konzept der Enzymhemmung kollidieren. Dies ist von Bedeutung, da die Versuche mit synthetischen Enzyminhibitoren auf dem Konzept der pharmakologischen Enzymhemmung aufbauen. Dieses Konzept stützt sich auf Experimente, die zeigen, dass sowohl Überexpression von TIMP als auch deren pharmakologische Applikation die experimentelle Metastasierung vermindert [40].

Das einfache Konzept der proteolytisch bedingten Invasivität von Tumorzellen stützte sich Anfang der 90er Jahre auf den vermehrten Nachweis von MMP in humanen Tumoren. Als weitere Bestätigung dieser Vorstellung gilt die verstärkte Invasivität bei experimenteller Überexpression von MMP in Zelllinien und das verminderte Tumorstadium bei "MMP-knockout" Tieren [41]. Auf gleiche Weise konnte man bei "TIMP-knockout" Tieren ein vermehrtes Tumorstadium, eine stärkere maligne Transformation von Tumoren und eine ausgeprägte Invasivität zeigen. Korrespondierend hierzu zeigten Tiere, in denen TIMP experimentell überexprimiert wurden, ein vermindertes Tumorstadium, eine geringere maligne Transformation und weniger Invasivität der Tumoren [42,43]. Dabei scheinen TIMP weniger Einfluß auf Metastasierung und Invasivität zu haben, als vielmehr auf das Tumorstadium [44]. Die beobachtete physiologische, inhibitorische Wirkung der TIMP legte einen therapeutischen Einsatz nahe. Aufgrund ihres hohen Molekulargewichtes von 20-30 KDa und ihrer kurzen biologischen Halbwertszeit eignen sich die physiologischen TIMP nicht für eine pharmakologische Therapie [45].

1.4 Befunde zur veränderten Expression und Aktivität der MMP und deren spezifische Inhibitoren

1.4.1 Zelle

Maligne Zellen können die Basalmembran durchbrechen und sich invasiv in andere Gewebe ausbreiten. Die MMP haben bei der Auflösung der Basalmembran eine entscheidende Bedeutung. Viele Tumorgewebe aus Tiermodellen zeigen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine erhöhte Expression von MMP, die mit dem metastatischen Potential in diesen Modellen korreliert [46-50]. Darüber hinaus beeinflussen die MMP die Zellproliferation, Apoptose und den Abbau der Knochenmatrix [51,52]. Ausserdem haben sie transformierende Eigenschaften bei der Entwicklung von nicht-invasiven zu invasiven Zellformen [24,53]. Bei

Untersuchungen an Zellen muß berücksichtigt werden, daß die Aktivität der MMP eine Folge der Wechselwirkungen zwischen Gewebe und Zellen ist [54]. TIMP sind in der Lage, die Auflösung von Zell-Zell-Kontakten durch MMP zu blockieren [24]. Darüberhinaus kontrollieren TIMP die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und verhindern die autokrine Stimulierung der Zellvermehrung durch MMP [55,56].

1.4.2 Gewebeverband

Bei der immunhistologischen und biochemischen Untersuchung von Tumorgeweben konnte ein Zusammenhang zwischen Expression und Aktivität der MMP und der Tumorprogression, dem Malignitätsgrad und dem Krankheitsstadium beim Menschen gezeigt werden [43,57-63]. Artificielle Versuchsanordnungen demonstrierten Mechanismen der Tumoretablierung und Progression durch MMP. Zu diesen Versuchen zählen die Neovaskularisations- und Invasionsversuche. Durch genetische Überexpression, genetische Ausschaltung ("knock-out") oder gezielte Hemmung von MMP kann die Penetration von Tumorzellen in künstliche Gewebe erreicht oder verhindert werden. Mit derartigen Experimenten demonstrierten z.B. Hiraoka et al. (1998), dass MMP die Neovaskularisation in Geweben steuern können [47,64,65]. Bei der Anwendung unterschiedlicher Nachweistechiken, wie Immunhistochemie und *in situ*-Hybridisierung kam es jedoch wiederholt zu widersprüchlichen Ergebnissen. Ein Hauptgegenstand der Interpretationen war, dass die MMP nicht von den Tumorepithelien exprimiert würden, sondern von den umgebenden Zellen des Stroma. Die Wechselwirkung zwischen der Expression von MMP durch Stroma- und Epithelzellen wurde insbesondere auch bei Hautwunden untersucht. Die Wundheilung ist bei veränderter MMP und TIMP Expression gestört. In Analogie hierzu gilt für Malignome eine gestörte Interaktion von Stroma- und Tumorzellen durch MMP im Sinne des "Tumors als einer Wunde die nicht heilt" als wahrscheinlich [66]. Weitere Untersuchungen zeigten, daß bei der Auflösung von Geweben zahlreiche Botenstoffe, Enzyme und Mediatoren im Sinne einer

"Speicherentleerung" freigesetzt werden. So kommt es bei der Auflösung von Gewebeverbänden, an der die MMP maßgeblich beteiligt sind, zu einer Vielfalt weiterer biochemischer Prozesse. Dies macht die Einschätzung der Abhängigkeit und Funktion der MMP schwierig. In Tumorgewebe sind MMP unterschiedlich überexprimiert. Ausserdem können Tumore der gleichen Entität unterschiedlich aggressiv wachsen. Dies legt nahe, daß jeder Tumor ein eigenes Profil von überexprimierten MMP haben könnte [67].

1.4.3 Tiermodelle

Im Tierversuch wurden die MMP in prinzipiell zwei unterschiedlichen Modellen untersucht. Diese sind die direkten Tumormodelle durch chemische Induktion, Implantation von Tumorgewebe oder Injektion maligner Zellen und die indirekten Tumorinduktionsmodelle durch gezielte genetische Veränderungen der DNA. In beiden Modellformen konnte in unterschiedlichsten etablierten Tumormodellen die Beteiligung der MMP an der Tumorentstehung und Tumorprogression gezeigt werden. Beim PCa wurde dies auch am Dunning-Tumor nachgewiesen [68-71]. In diesem Modell wurde auch der Zusammenhang zwischen MMP und Knochenmetastasierung demonstriert [72]. Tiermodelle mit gezielter Gendefizienz der MMP-Gene zeigen eine geringere Tumorprogression und Metastasierungsrate. Modelle mit zusätzlicher Aktivierung von MMP-Genen zeigen eine verstärkte Invasivität und Tumorausbreitung. An diesen Tiermodellen läßt sich auch die Tumorentstehung untersuchen [24,41,73,74].

Bei einer Variante der indirekten Tumorinduktion werden den Versuchstieren genetisch veränderte Tumorzellen appliziert. Auch in diesen Experimenten konnte eine Korrelation zwischen MMP und Tumorentwicklung gezeigt werden. So führen Tumorzellen nach Induktion einer MMP-2 Überexprimierung zu einem aggressiveren Tumorverhalten bei Implantation in das Tiermodell, als die etablierte Mutterzelllinie. Synthetische MMP-Inhibitoren konnten diese

Tumorausbreitung reduzieren [75].

1.4.4 Mensch

Im Gewebe von menschlichen Tumoren wurden erhöhte Konzentrationen und Aktivitäten von MMP gefunden. Die Expression der MMP ist in malignen Geweben höher, als bei prämaligen oder benignen Gewebealterationen [76]. Zahlreiche Studien haben eine Korrelation zwischen MMP-Expression und dem Differenzierungsverlust, einem fortgeschrittenen histologischen *grading* und klinischen *staging* [77], Tumorgröße und Invasionsgrad, Lymphknoten- und Fernmetastasen gezeigt [60]. Hier ist der Befund von Hashimoto et al. (1998) bei PCa Patienten hervorzuheben, die bereits eine Hormontherapie erhalten hatten. Bei diesen Patienten wurde eine Erhöhung der Konzentration von MMP-7 im Tumorgewebe nachgewiesen [43]. Untersuchungen zur Beziehung zwischen MMP und dem Überleben oder zwischen MMP und der Wahrscheinlichkeit eines Tumorrezidivs zeigen signifikante Zusammenhänge. In manchen Fällen repräsentieren die MMP unabhängige Prognosefaktoren für das erkrankungsfreie Überleben bzw. das Gesamtüberleben [78]. Die nachgewiesene vermehrte Aktivität der MMP in menschlichem Tumorgewebe unterstützt die Entwicklung pharmakologischer Konzepte zu deren Hemmung. Hier stehen die spezifischen synthetischen Proteasehemmer an erster Stelle.

1.5 Befunde über den Einsatz von synthetischen Inhibitoren der MMP

1.5.1 Synthetische Inhibitoren im Tiermodell

Eine frühe Untersuchung zeigte 1988 die Blockierung der Metastasierung im Tiermodell durch den Kollagenaseinhibitor SC44463 (GD Searle), wie Batimastat vom Typ der Hydroxamsäure-Inhibitoren [79]. Seitdem wurden die hemmenden Eigenschaften verschiedener MMPI auf die Tumorprogression in zahlreichen Tumormodellen beobachtet. In Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Gabe, Dosis und Art des synthetischen MMPI wurden unterschiedliche Ergebnisse im Tiermodell erzielt. Diese reichen von signifikanter Beeinflussung der Tumorprogression bis zur kompletten Wachstumshemmung des Primärtumors. MMPI verminderten die lokale und regionale Tumordinvasion sowie die Metastasenbildung in spezifischen Tiermodellen. In einer Studie wurde eine komplette Reduktion von malignem Aszites und die Tumorabkapselung beobachtet [80]. In einigen Fällen konnte eine Überlegenheit gegenüber Standardchemotherapeutika oder Potenzierung von deren Wirkung gezeigt werden. MMPI verhinderten das Wiederauftreten des Tumors und verlängerten das Gesamtüberleben der Tiere [68,80-88].

1.5.2 Synthetische MMPI in klinischen Studien

Die ersten klinischen Studien mit MMPI wurden Anfang der 90er Jahre bei Patienten mit malignem Aszites und Pleuraergüssen durchgeführt [89,90]. Seither sind im wesentlichen sieben MMPI von ca. 150 patentierten MMPI in klinischen Studien wiederholt und in verschiedenen Phasen getestet worden. Zu diesen MMPI gehören die synthetischen, peptid-imitierenden Substanzen, wie Batimastat (BB-94) und Marimastat (BB-2516) von British Biotech. Weiterhin die synthetischen "Nicht-Peptid"-MMPI wie Tanomastat (BAY 12-9566) von Bayer, Prinomastat (AG 3340) von Agouron und CGS 270023A von Novartis. Eine dritte pharmakologische Kategorie sind biologische MMPI wie Neovastat (AE941) aus

Knorpel von Haien von der Firma Aeterna. Unter den klinisch getesteten MMPI finden sich als vierte Kategorie modifizierte Tetrazykline wie Metastat (COL-3) von CollaGenex. Bisphosphonate, die bereits in der klinischen Anwendung sind, zeigen experimentell eine Hemmung von MMP und können als fünfte Kategorie von MMPI interpretiert werden [91]. Bis heute erhielt keiner dieser synthetischen MMPI eine offizielle Zulassung. Einige Studien mussten aufgrund von muskuloskeletalen Nebenwirkungen abgebrochen werden [92]. Bei Nebenwirkungen und ungenügender Wirksamkeit, scheint auch die Art des synthetischen Inhibitors, die jeweilige Tumorentität und der Zeitpunkt des Einsatzes eine entscheidende Rolle zu spielen. So zeigten sich phototoxische Nebenwirkungen bei MMPI auf Tetrazyklinbasis. In einer Untersuchung mit BAY 12-9566 wurde das Tumorwachstum beim Nichtkleinzelligen Lungekarzinom eher begünstigt [93]. Wichtige Erkenntnisse aus diesen Studien waren, daß nicht alle Ergebnisse aus den Tierversuchen übertragbar sind und die Wirkung der MMPI bei fortgeschrittenen Tumoren und nach multiplen vorhergehenden Therapien eingeschränkt ist. Zudem sind MMPI sehr schnell in die klinische Forschung eingeführt worden [94]. In zukünftigen Studien ist der Einsatz neuer und zunehmend selektiver MMPI sowie deren Kombination mit anderen Medikamenten bei Patienten in früheren Tumorstadien zu erwarten [95,96,97].

1.6 Batimastat

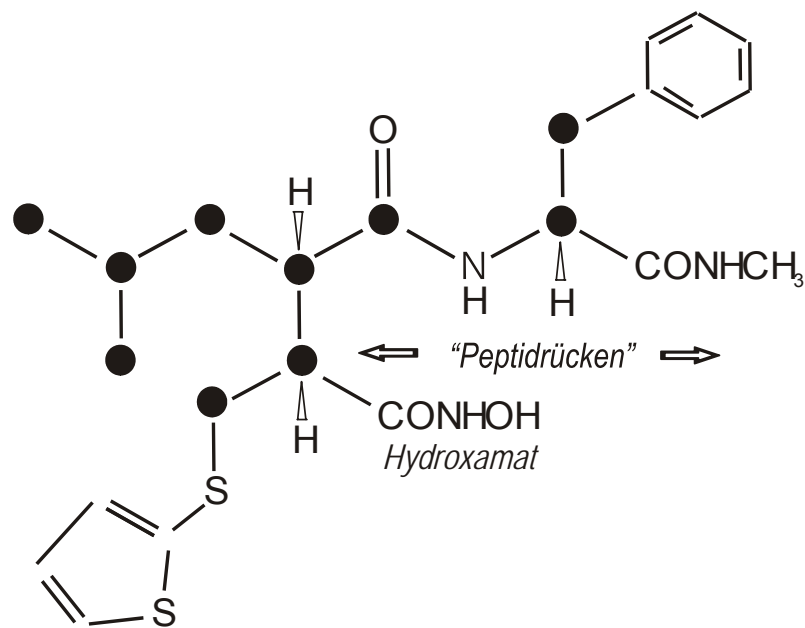
1.6.1 Funktion und Biochemie

Die MMP erkennen eine definierte Schnittstelle an ihren Substraten nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip. Das Batimastat als unspezifischer synthetischer Inhibitor imitiert diese Schnittstelle und führt zu einer reversiblen, kompetitiven Hemmung der MMP. Batimastat ist ein synthetischer Inhibitor vom Typ der Hydroxamsäureinhibitoren, der eine Vielzahl von MMP inhibiert. Die Grundstruktur des Pseudopeptids Batimastat beruht auf der Hydroxamsäure, deren

Grundbaustein N-Hydroxyl-Aminosäure ist. Batimastat inhibiert die MMP im nanomolaren Bereich, gleichzeitig hat es eine geringe Wirkung auf verwandte Enzymfamilien, wie der des "angiotensin converting enzymes". Aufgrund der hochkonservierten DNA-Sequenz der Protein-Enzymschnittstelle bei den MMP konnten durch vergleichende Untersuchungen und Röntgenkristallographie die heutigen MMPI auf rationeller Basis synthetisiert werden. Sie wurden nicht nach dem Zufallsprinzip getestet, sondern durch chemische Modulation der bekannten Enzymschnittstelle angepaßt.

1.6.2 Struktur von Batimastat

In der folgenden Abbildung ist die Struktur von Batimastat dargestellt (Molekulargewicht 477 kDa). Der chemische Name ist [4(N-hydroxyamino)-2R-isobutyl-35-(thienyl-thiomethyl)-succinyl]-L-phenylalanine-N-methylamid [94]. *In vitro* zeigte Batimastat IC₅₀ - Werte (Inhibition von 50 % der Enzymaktivität) von weniger als 10 ng/ml für MMP -1, -2, -3, -7 und -9. Dieses Molekül wird von den MMP als Substrat erkannt. Batimastat simuliert die Proteinstruktur einer der Hauptschnittstellen des Kollagen. Dadurch kann der synthetische MMPI Batimastat reversibel im aktiven Zentrum der Proteinasen binden. Die Hydroxamat Gruppe (-CONHOH) des Batimastat bindet an das Zinkatom im aktiven Zentrum der MMP. Batimastat ist aufgrund seiner schlechten Löslichkeit (6 nMol in Wasser) kaum oral bioverfügbar. Die Lösung erfolgt in Lösungsmitteln mittels Ultraschall und ergibt eine weißliche, kristalline Flüssigkeit. Diese Substanz ist der erste synthetische MMPI, der bei Tumorpatienten im Rahmen kontrollierter Studien erprobt wurde.



Struktur von Batimastat (nach Brown, P. et al. 1995, [94]).

1.6.3 Einsatz von Batimastat in klinischen Studien

Die Vielzahl der von Batimastat inhibierten MMP führte zu der Bezeichnung "Breitspektrum-Inhibitor". Unter einem "Breitspektrum-Inhibitor" der MMP wird auch bei anderen synthetischen MMP-Inhibitoren die Inhibition mehrerer MMP gleichzeitig durch nanomolare Dosen der Proteasenhemmer verstanden. Batimastat gilt als "Goldstandard" in der präklinischen und klinischen Erforschung der Funktion von MMP und der Wirkung von synthetischen MMPI. In einer Auswertung von 15 präklinischen Studien mit unterschiedlichsten Tumormodellen fanden sich bei 10 Arbeitsgruppen *in vitro* keine wachstumshemmenden oder zytotoxischen Effekte von Batimastat [80,83,86,98-104]. Bei den anderen 5 Studien wurde ein konzentrations- oder zeitabhängiger wachstumshemmender Effekt von Batimastat auf Tumorzelllinien und normale Zellen festgestellt [85,104-107]. Diese Hemmung der Zellproliferation wird als reversibel beschrieben. Für Batimastat sind Veränderungen des Zellzyklus, des Zytokinprofils und die Beeinflussung der Sekretion des "angiotensin converting enzymes" beschrieben [105,108].

In klinischen Studien zeigte Batimastat bei therapierefraktärem malignem Aszites und Pleuraerguß klinische Effekte [89,109]. Unter dem Einsatz von Batimastat waren Aszites und Pleuraergüsse rückläufig, so daß auf häufige Abpunktion verzichtet werden konnte. Aufgrund der geringen Bioverfügbarkeit von Batimastat wurde in weiteren klinischen Studien die Nachfolgesubstanz Marimastat eingesetzt. Marimastat ist im Gegensatz zu Batimastat oral bioverfügbar und hat eine Plasmahalbwertszeit von 8-10 h. In einer Studie bei Patienten mit inoperablem Magenkarzinom wurde eine größere progressionsfreie Überlebenszeit für Marimastat gegenüber Placebo gezeigt [110]. Für Tumormodelle des PCa gibt es bisher zwei präklinische Studien mit Batimastat [68,111]. Klinische Studien in unterschiedlichen Phasen bei PCa sind bisher mit Marimastat /BB-2516), Prinomastat (AG3340), Neovastat (AE941) und Metastat (Col-3) mit insgesamt 182 Patienten unternommen worden [92,112-115]. Die vorliegenden Ergebnisse beim PCa rechtfertigen fortführende Untersuchungen.

1.7 Tumorzelllinien und Tumormodell

1.7.1 PCa-Zelllinien

In der Literatur zur Erforschung des PCa finden sich zahlreiche aus menschlichen PCa oder deren Metastasen gewonnene Tumorzelllinien. Diese werden seit vielen Jahren in internationalen Laboren kultiviert und zu Forschungszwecken weitergegeben. Sie stellen standardisierte Referenzobjekte zur Erforschung des PCa dar. Zu diesen Referenzzelllinien gehören u.a. die Zelllinien DU 145, LNCaP, PC-3 und MATLyLu.

DU 145

Die hormonunabhängige Zelllinie DU 145 wurde von K.R. Stone 1977 aus einer Gehirnmastase eines 64 - jährigen PCa – Patienten mit starker Metastasierung isoliert. Die Zelllinie war nicht hormonsensitiv und nur schwach positiv für saure Phosphatase. Ultrastrukturelle Untersuchungen der Zelllinie und des Tumors zeigten Microvilli, Tonofilamente und Desmosomen, außerdem viele Mitochondrien, gut ausgebildete Golgiapparate und heterogene Lysosomen. Der Ploidiegrad im Karyogramm bewegt sich zwischen Hypoploidie und Tetraploidie [116].

LNCaP

Die hormonabhängige Zelllinie LNCaP wurde 1977 von J.S. Horoszewicz aus dem Material einer Nadelbiopsie gewonnen. Die Biopsie wurde aus einem supraklavikulären Lymphknoten eines 50 – jährigen Patienten mit metastasiertem PCa entnommen. Die Zellen produzieren saure Phosphatase, PSA und weisen Androgenrezeptoren auf. Die Zelllinie ist hypotetraploid [117].

PC – 3

Die hormonunabhängige Zelllinie PC–3 stammt aus einem Prostataadenokarzinom eines 62-jährigen Patienten. Die Zellen sind schwach positiv für saure Phosphatase und Testosteron 5– α –Reduktase Aktivität. Der Ploidiegrad ist hypotriploid, in Q–Band Analysen wurden keine normalen Y–Chromosomen entdeckt [118].

1.7.2 MATLyLu-Zelllinie und Tiermodell

Für meine tierexperimentellen Untersuchungen wurde der Dunning Tumor der *Copenhagen* Ratte ausgewählt. 1963 berichtete Fr. Dr. W.F. Dunning zum ersten Mal über einen spontanen Tumor der Rattenprostata in der *Copenhagen* Ratte. Dieser wurde später Dunning Tumor genannt und ist heute als R-3327 System des Rattenprostatakarzinoms in der Literatur bekannt. Der Dunning Tumor gilt als Standardtiermodell für das menschliche PCa. Die *Copenhagen* Ratte ist eine Inzuchtlinie. Der ursprüngliche Tumor war in einem älteren männlichen Tier der *Copenhagen* Ratte gefunden worden und füllte dessen ganzes Abdomen aus. Der Tumor wächst in einer kompakten Form und besitzt eine feste Konsistenz. Dr. Dunning transplantierte diesen Tumor erfolgreich in die Flanke der syngenen *Copenhagen* Ratte und deren F1-Hybriden (*Copenhagen* x *Fischer*). Der Tumor stellte histologisch ein papilläres Adenokarzinom dar. Das drüsenartige Muster des Originaltumors von R-3327 glich dem histologischen Bild eines gut differenzierten menschlichen PCa. Der R-3327 Tumor wuchs sehr langsam und in weiblichen bzw. kastrierten männlichen Tieren langsamer als in intakten männlichen Tieren. Die Metastasen des Tumors waren vor allem in den drainierenden Lymphknoten und der Lunge, aber auch in der Leber und dem Zwerchfell gefunden worden [119].

Aus dem ursprünglichen Tumor entwickelte sich ein System von Tochterzelllinien. Die mit den Tochterzelllinien dieses Tumorsystems induzierbaren Tumoren sind vergleichbar mit den Stadien des menschlichen Pca [120]. Bei den Dunning Tumoren gibt es hormonsensitive und hormoninsensitive Tumore. Diese haben ein vergleichbares Ansprechmuster auf Hormon-, Chemo- und Strahlentherapie, wie sie beim menschlichen PCa gefunden werden [121,122,123]. Wie das menschliche PCa reagiert die Mutterzelllinie AT-1 auf hormonelle Manipulation. Die folgenden Tochterzelllinien, wie MATLyLu, entwickeln hormoninsensitive Tumore [124,125,126]. MATLyLu ist eine hormonunabhängige anaplastische Zelllinie des Dunning-Tumor (R-3327-System) [127].

1974 veröffentlichte Dr. Dunning das System der R-3327 Zelllinien als Modell für das menschliche PCa. 1975 wurde nach serieller *in vivo* Passage des Tumors die schnell wachsende Variante R-3327-H (H für Hopkins) entdeckt und als androgenunabhängiges squamöses Karzinom klassifiziert [119]. Die MATLyLu Zelllinie (in Lymphknoten und Lunge metastasierende AT-Zelllinie) entwickelte sich aus der nichtmetastasierenden AT-1 (Anaplastic Tumor) Zelllinie [128]. MATLyLu ist metabolisch aktiver als andere Zelllinien des R-3327 Systems [123]. MATLyLu produziert höhere Mengen an mRNA von VEGF und dessen Rezeptoren und mehr TGF- β 1 mRNA als die normalen Zellen der Rattenprostata [129,130]. MATLyLu hat eine sehr hohe Metastasierungsrate. Mehr als 75% der inokulierten Tiere entwickeln neben einem lokalen Tumor auch Fernmetastasen [128]. Die Verdopplungszeit des Tumors *in vivo* beträgt 1,5 Tage [127]. Aufgrund dieser Eigenschaften und der breiten Verwendung dieser Zelllinie in der Forschung bietet MATLyLu gute Voraussetzungen für die Ziele meiner Arbeit [131].

1.7.3 Der MTT-Test

Zur Untersuchung der Zelllinien auf Proliferation und Lebensfähigkeit unter dem Einfluß von Batimastat dient der MTT-Test. Der MTT-Test korreliert mit der Stoffwechselrate (Glykolyserate) und NADH-Produktion [132]. MTT ist die Abkürzung für die chemische Verbindung des Tetrazoliumsalses 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazolium-Bromid-Formazan. Bei diesem Test wird das Tetrazoliumsals durch mikrosomale Enzyme in Anwesenheit von NAD-H und NADPH zu farbintensiven, dem Kaliumpermanganat ähnlichen, Formazankristallen reduziert. Er ist somit abhängig von der Atmungskette und der metabolischen Aktivität einer Zelle. Der MTT-Test ist bekannt für seine gute Vergleichbarkeit mit anderen Proliferationstests [133]. Bei hohen Zellzahlen in Mikrotiterplattenversuchen kann allerdings nicht von einer linearen Beziehung zwischen Formazanproduktion der Zellen und Zellzahl ausgegangen werden. Daher limitieren hohe Zellzahlen die Dauer einer Versuchsanordnung mit MTT-

Bestimmung auf wenige Tage. Die Linearität ist für jede Zelllinie individuell zu bestimmen [134]. Der MTT-Test wird in der Literatur für Untersuchungen mit PCa-Zelllinien häufig beschrieben [135]. In der Literatur finden sich verschiedene Angaben zur Durchführung des MTT-Tests. Insbesondere kommen unterschiedliche Konzentrationen der Testsubstanz zur Anwendung [136,137,138]. Es ist daher notwendig, für den MTT-Test die Zellzahl und Konzentration der Testlösung für jede Zelllinie einzeln einzustellen.

2 Zielstellung der Arbeit

Der Stand therapeutischer Optionen beim hormonrefraktären PCa, die vorliegende Evidenz zur Rolle der MMP bei der Tumorprogression und der Metastasierung sowie die bisher geringen Erfahrungen von MMPI im Tiermodell des PCa machen eine weitere Untersuchung auf diesem Gebiet plausibel. In der vorliegenden Arbeit sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Welchen Effekt hat Batimastat auf die Proliferation hormonabhängiger und hormonunabhängiger Tumorzelllinien des Prostatakarzinoms?
2. Welche Wirkung hat Batimastat auf das orthotope Tumorwachstum in einem Standardtiermodell (MatLyLu-Dunning-Tumor) des menschlichen Prostatakarzinoms?

3 Material und Methoden

3.1 Konzeption der Untersuchungen

Zur Beantwortung der in der Zielstellung dargelegten Fragen führte ich eine Zellkulturuntersuchung (Toxizitätsversuch) und einen Tierversuch durch. Im Zellkulturversuch wurden vier PCa-Zelllinien unter der Einwirkung von Batimastat untersucht. Die Messung der *in vitro* Effekte erfolgte durch den MTT-Test. Im Tierversuch wurde der Einfluß von Batimastat auf den Dunning-Tumor der Ratte untersucht. Die Einschätzung des Effektes von Batimastat erfolgte durch Messung von Tumorgewicht und Tumolvolumen.

3.2 Verwendete Tumorzelllinien

In der vorliegenden Untersuchung wurden drei hormonunabhängige PCa-Zelllinien (DU 145, PC-3 und MATLyLu) und eine hormonabhängige PCa-Zelllinie (LNCaP) für die Zellkulturversuche verwendet. MATLyLu diente darüberhinaus zur Etablierung des Dunning-Tumors der Ratte.

3.3 Zellkultur

Die verschiedenen Tumorzellen wurden in Wachstumsmedium bei 37°C in 5% CO₂ kultiviert. Das Medium enthielt Phenolrot, L-Gluthamin, 10% fetales Kälberserum und 1% Penizillin/Streptomycin. Untersuchung auf Mykoplasmen erfolgte regelmäßig mittels eines immunologischen Testsystems. Das Wachstumsmedium wurde alle vier Tage erneuert und die Zellen nach der 30.– 40. Passage in der Logphase bei einer 60-70 % Konfluenz für die Versuche verwendet. Die Zellen wurden alle 8-10 Tage durch Trypsinisierung passiert.

3.4 In vitro Versuch

Nach Bestimmung des Anteils der lebenden Zellen durch Trypanblau und Zählung mit einem Hämozytometer, wurden die Zellen in 96-Loch-Mikrotiterplatten pipetiert und die Adhäsion über 24 Stunden ermöglicht. Im Anschluß an die Adhäsionszeit enthielt das neue Medium jeweils 40, 400 und 4000 ng/ml Batimastat (entsprechend 0,0837 μ M, 0,837 μ M und 8,37 μ M). Die Zellen wurden in diesem Medium über fünf Tage kultiviert. Die Erneuerung des Batimastat-Medium fand im 48-h-Zyklus statt. Batimastat wurde nach entsprechenden Herstellerangaben mit einer Ultraschallsonde in Suspension in PBS/Tween (0,01%) gebracht.

3.5 MTT Test

MTT wird in einer Pufferlösung (PBS) gelöst und steril filtriert. Zur Messung fügt man dem Wachstumsmedium die MTT-Lösung hinzu. Das alte Medium wird aus den Mikrotiterplatten abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit Pufferlösung gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit frischem Wachstumsmedium und MTT bei 37°C bis zu 2 h inkubiert. Nach Entfernung des MTT-Mediums wird 100 μ l DMSO hinzugegeben und die Formazankristalle über 20 Minuten durch Bewegung gelöst. Unter dem Spektrometer erfolgt die Ausmessung des Absorptionsgrades der umgesetzten Farbe in den Mikrotiterplatten mit dem 540 und 620 nm Filter. Ein durchschnittlicher Leerwert (Medium + MTT) von < 20 kann bei Extinktionswerten bis maximal 3500 in der statistischen Auswertung vernachlässigt werden.

3.6 Tiermodell

In der vorliegenden Untersuchung wurden 30 männliche *Copenhagen* Ratten im Alter von 3 Monaten mit einem Gewicht zwischen 180 und 220 g verwendet. Die Haltung richtete sich nach den institutionellen Richtlinien. Die Gewöhnungszeit an

Umgebung und Situation betrug 7 Tage. Wasser und Nahrung wurden *ad libitum* zur Verfügung gestellt. Die Induktion des Tumors erfolgte durch sterile Inokulation von 100000 MATLyLu Zellen in den ventralen Lappen der Rattenprostata über eine suprapubischen Querschnitt des unteren Abdomens. Um eine mögliche Aussaat von Tumorzellen in den Peritonealraum oder den Wundbereich zu verhindern, wird die Inokulationsnadel durch einen mit Kochsalzlösung getränkten Baumwolltupfer in die Rattenprostata eingeführt. Nach Zurückziehen der Nadel wird der Baumwolltupfer noch eine Minute auf die Inokulationsstelle gedrückt. Die Narkose wurde in Pentobarbitalanästhesie durchgeführt. Die verwendeten Tumorzellen wurden entsprechend den *in vitro* Versuchen kultiviert. Um eine Aussage statistisch zu sichern, sind mindestens 10 Tiere pro Behandlungsgruppe notwendig. Diese Zahl ergibt sich aus den Streuungen der Kontrollwerte und der Anforderungen an die Schärfe der Statistik des Untersuchungsergebnisses. Es erfolgte randomisiert folgende Gruppeneinteilung:

1. Gruppe: keine Behandlung
2. Gruppe: Vehikel (PBS/Tween-80 0,01%)
3. Gruppe: mit Batimastat behandelt (30 mg/kg KG).

Die Auflösung von Batimastat in PBS/Tween (0,01%) erfolgte mit Hilfe von Ultraschall. Die tägliche intraperitoneale Gabe von Batimastat begann am Tag der Tumorinduktion. Eine Kontrolle von Gewicht und Zustand der Tiere erfolgte täglich. Die Tiere wurden am 20. Tag nach Inokulation der Tumorzellen durch Injektion von Tötungsmittel K 61 mit 1 mg/kg i.v. getötet, die Tumore exzidiert und auf Größe und Gewicht untersucht. Der Tumor kann aufgrund einer Pseudokapselbildung gut vom umgebenden Gewebe getrennt werden. Die Bestimmung des Tumolvolumen erfolgte unter der Annahme, dass die Tumore Hemiellipsoide sind ($V = \text{Länge} \times \text{Breite} \times \text{Höhe} \times 0,5236$).

3.7 Statistische Analyse

Die deskriptive statistische Auswertung und die Signifikanzberechnung wurde mit dem Statistikprogramm "GraphPad Prism", Version 3.00, GraphPad Software, San Diego, USA, durchgeführt. Als Tests für die *in vivo* Versuche diente die Varianzanalyse (ANOVA) und Tukey's Multivergleichstest. Für die Auswertung der *in vitro* Versuche wurde die ANOVA-Analyse kombiniert mit Dunnett's Multivergleichstest für wiederholte Messungen verwendet. Das Niveau $p < 0,05$ wird als statistisch signifikant angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Konzentration, Linearität und Zeitabhängigkeit der MTT Messung

Zur Einstellung des MTT-Test wurden die Tumorzelllinien mit MTT-Konzentrationen von 0,2-1,2 mg/ml für 2 h, 4 h oder 6 h inkubiert und die Extinktionswerte nach Auflösung mit DMSO im Fotometer ausgelesen. Je Zelllinie und Ansatz erfolgten jeweils sechs Einzelmessungen. In Abbildung 1 sind diese Untersuchungen stellvertretend für die vier Tumorzelllinien (DU 145, LNCaP, PC-3 und MATLyLu) anhand von DU 145 dargestellt. Es zeigt sich, daß mit MTT-Konzentrationen zwischen 0,4-0,8 mg/ml und einer Inkubationszeit von 2 bis 6 h im linearen Anstiegsbereich der Fotometerantwort gemessen werden kann. Eine Inkubationszeit von 5000 Zellen/Versuch stellt sich als ausreichend dar.

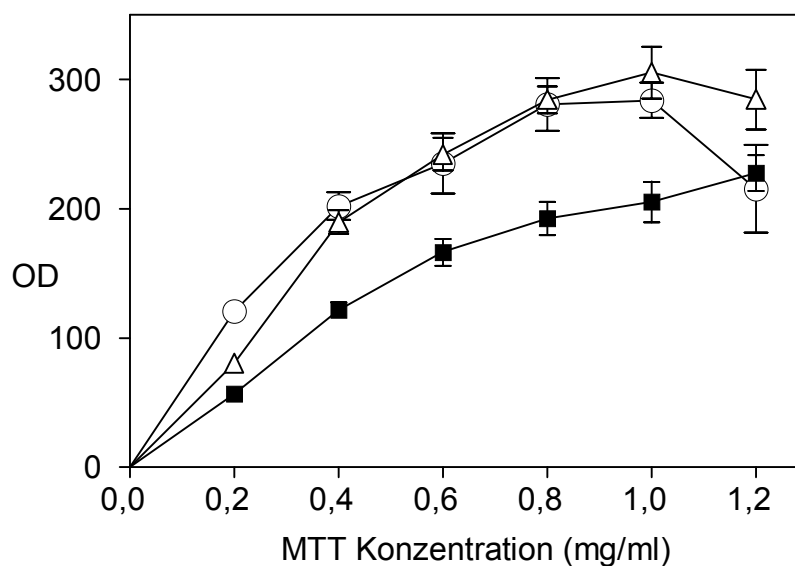


Abb. 1: DU 145, 5000 Zellen/Versuch. MTT-Konzentration in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (O=6 h, Δ =4 h, ■=2 h). Sechs Einzelversuche je Datenpunkt. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung. Erreichter Farbstoffumsatz der Zellen als Extinktionswerte (OD) dargestellt.

Für einen Zellkulturversuch über mehrere Tage ist eine lineare Fotometerantwort notwendig. In Abbildung 2 ist die Linearität der Messung bei einer MTT-Konzentration von 0,4 mg/ml und einer Inkubationszeit von 2 h von niedrigen zu hohen Zellzahlen gezeigt. Dies spiegelt die Situation innerhalb der fünftägigen Wachstumsphase der Toxizitätsversuche wider. Damit kann vorausgesetzt werden, daß sich eine Zu- oder Abnahme der Zellproliferation über einen mehrtägigen Versuch sicher bestimmen läßt.

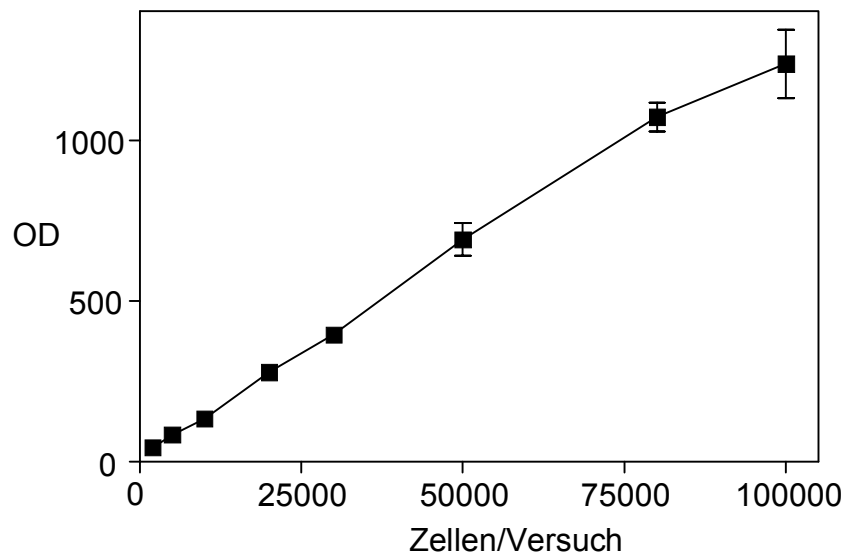


Abb. 2: DU 145, 2000-100000 Zellen. Die MTT-Messung ist auch bei hohen Zellzahlen linear. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils sechs Einzelversuchen pro Datenpunkt. Erreichte Farbstoffumsätze der Zellen sind als Extinktionswerte (OD) dargestellt.

Das Farbstoffprodukt des MTT-Test wird in der Literatur von einigen Autoren als instabil beschrieben. Aus diesem Grund wurde der Intensitätsverlust der Fotometerantwort nach Auflösen der Farbkristalle über einen Zeitraum von 75 Minuten gemessen. In Abbildung 3 ist die Zeitabhängigkeit der Fotometerantwort dargestellt. Hier zeigte sich, dass der von den Zellen zu Formazankristallen umgesetzte Farbstoff innerhalb von 25 Minuten soweit aufgelöst wird, dass danach nur geringe Extinktionsschwankungen zu erwarten sind. Somit wurde die Fotometerantwort in allen folgenden Versuchen standardisiert 25 Minuten nach Auflösung mit DMSO gemessen.

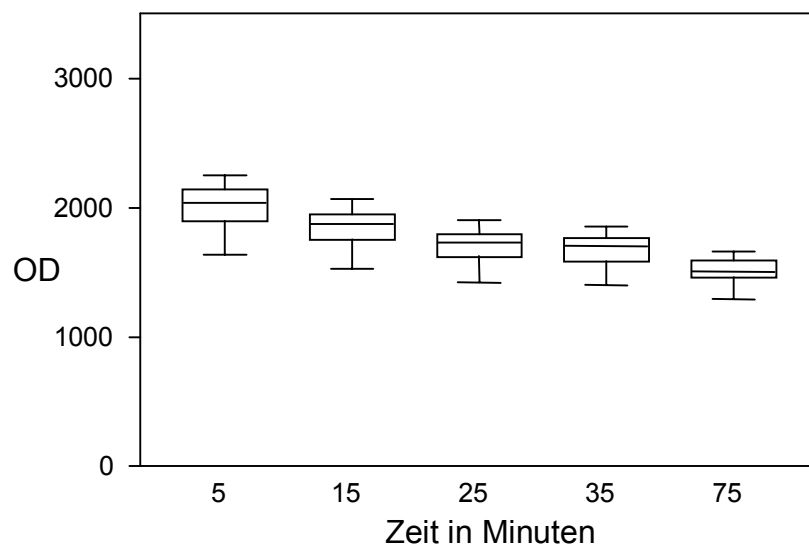


Abb. 3: DU 145, 30000 Zellen/Versuch. Die Mikrotiterplatte wurde über 75 Minuten auf dem Plattenrüttler langsam bewegt und in Intervallen von 10 Minuten mit dem Fotometer gemessen. Nach 25 Minuten bleibt die Extinktionsmessung linear. Sechs Einzelversuche je Boxplott. Dargestellt sind Maximal-, Median- und Minimalwert, sowie 25. und 75. Perzentile. Erreichte Farbstoffumsätze der Zellen sind als Extinktionswerte (OD) dargestellt.

Die Lebensfähigkeit bzw. metabolische Aktivität der Zelllinien wird durch den relativen Unterschied des Farbumsatzes zwischen den Zelllinien abgeschätzt. In Abbildung 4 ist diese unterschiedliche metabolische Aktivität der vier PCa-Zelllinien dargestellt. Es zeigt sich, daß MATLyLu die signifikant höchste metabolische Aktivität hat. LNCaP hat dagegen die signifikant geringste metabolische Aktivität unter den vier getesteten PCa-Zelllinien. Die hormonunabhängigen Tumorzelllinien DU 145, PC-3 und MATLyLu zeigen eine höhere metabolische Aktivität als die hormonabhängige PCa-Zelllinie LNCaP.

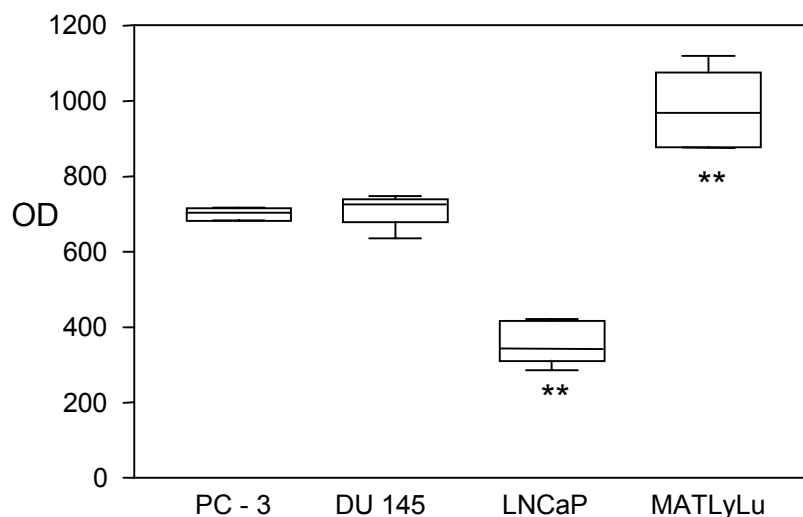


Abb. 4: Metabolische Aktivität der PCa-Zelllinien. Farbstoffumsatz von jeweils 10000 Zellen bei einer Konzentration von 4 mg/ml MTT und einer Inkubationszeit von 2 h. Die Zellen wurden vor der Messung 24 h bei 37°C kultiviert. Signifikante Unterschiede sind im Vergleich zu DU 145 mit $**p < 0,01$ angegeben. Jeweils sechs Einzelversuche pro Zelllinie. Dargestellt sind Maximal-, Median- und Minimalwert, sowie 25. und 75. Perzentile. Erreichte Farbstoffumsätze der Zellen sind als Extinktionswerte (OD) dargestellt.

4.2 Wirkung von Batimastat auf Prostatakarzinomzelllinien *in vitro*

Im Vergleich zum Ausgangsbefund ohne Batimastat (Abb. 4) zeigen die Zelllinien unter hohen Batimastatkonzentrationen (4000 ng/ml) (Abb. 5) kein verändertes Bild der metabolischen Aktivität untereinander. In Abbildung 4 wurden jeweils 10000 Zellen nach 24 h Anheftungszeit mit MTT 2 h inkubiert. In Abbildung 5 wurden jeweils 1000 Zellen über 4 Tage unter Wachstumsmedium mit 4000 ng/ml Batimastat inkubiert. Es wurde ebenfalls ein MTT-Test mit zweistündiger Inkubationszeit durchgeführt. Die Extinktionswerte sind unter hohen Batimastatkonzentration niedriger. Das Verhältnis in der metabolischen Aktivität ist nicht verändert. Hieraus kann geschlossen werden, dass Batimastat keinen Einfluß auf die metabolische Aktivität hat. Die geringeren Extinktionswerte sind auf niedrigere Zellzahlen zum Zeitpunkt der Messung zurückzuführen. Eine zytotoxische Wirkung läßt sich weitgehend ausschließen.

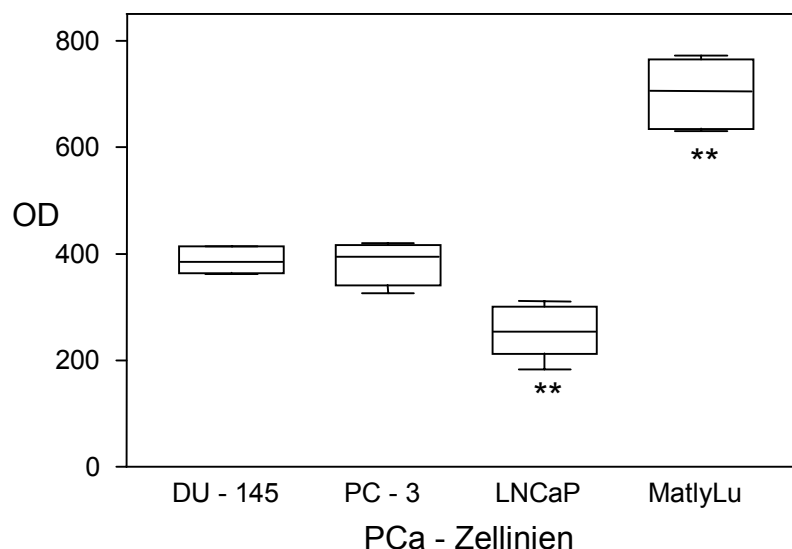


Abb. 5: Metabolische Aktivität der Zelllinien unter 4000 ng/ml Batimastat. Jeweils 1000 Zellen/Versuch (bzw. LNCaP 2000 Zellen/Versuch). MTT Test nach 4 Tagen. Signifikante Unterschiede sind im Vergleich zu DU 145 mit $**p < 0.01$ angegeben. Dargestellt sind Maximal-, Median- und Minimalwert, sowie 25. und 75. Perzentile.

In Abbildung 6 A + B und Abbildung 7 C + D wird der Effekt von Batimastat auf die Prostatakarzinomzelllinien MATLyLu (A), DU 145 (B), PC-3 (C) und LNCaP (D) gezeigt. Die Darstellung in Prozent der Vehikelkontrollen zeigt deutlich, dass Batimastat in hohen Konzentrationen (4000 ng/ml) einen signifikanten hemmenden Effekt auf das Wachstum aller vier Zelllinien hat, jedoch in den verwendeten Konzentrationen nicht zytotoxisch wirkt. Je nach Zelllinie wird trotz der hohen Batimastatkonzentration von 4000 ng/ml noch eine Proliferation zwischen 35 und 55 % der Vehikelkontrolle erreicht. Auch geringe Konzentrationen (40-400 ng/ml) des synthetischen MMPI Batimastat zeigen einen von der Dosis abhängigen signifikanten proliferationshemmenden Effekt.

Die vier PCa-Zelllinien reagieren unterschiedlich auf Batimastat. So kommt es bei MATLyLu (A) ab Tag 4 bei den Konzentrationen 400 und 4000 ng/ml und bei LNCaP (D) ab Tag 3 bei der Konzentration von 400 ng/ml Batimastat zu einer Erholung der Proliferationsfähigkeit. Bei DU 145 und PC-3 (Abb.6 B und 7 C) zeigt sich am Tag 5 für alle Batimastatkonzentrationen eine signifikante ($p < 0,001$) Verminderung der Proliferationsrate. Unter den vier Zelllinien wird die Lebensfähigkeit und Proliferationsfähigkeit der Zelllinie LNCaP durch Batimastat am geringsten beeinflusst. Diese Zelllinie wächst langsamer und ist gleichzeitig metabolisch weniger aktiv als DU 145, PC-3 und MATLyLu (siehe Abb. 4).

Aus diesen Ergebnissen läßt sich eine zytostatische Wirkung von Batimastat bei einer Konzentration von 4000 ng/ml für alle untersuchten PCa-Zelllinien belegen. Bei einer Konzentration von 400 ng/ml zeigt Batimastat auch eine signifikante zytostatische Wirkung auf die Zelllinien DU 145 (Abb. 6 B) und PC-3 (Abb. 7 C).

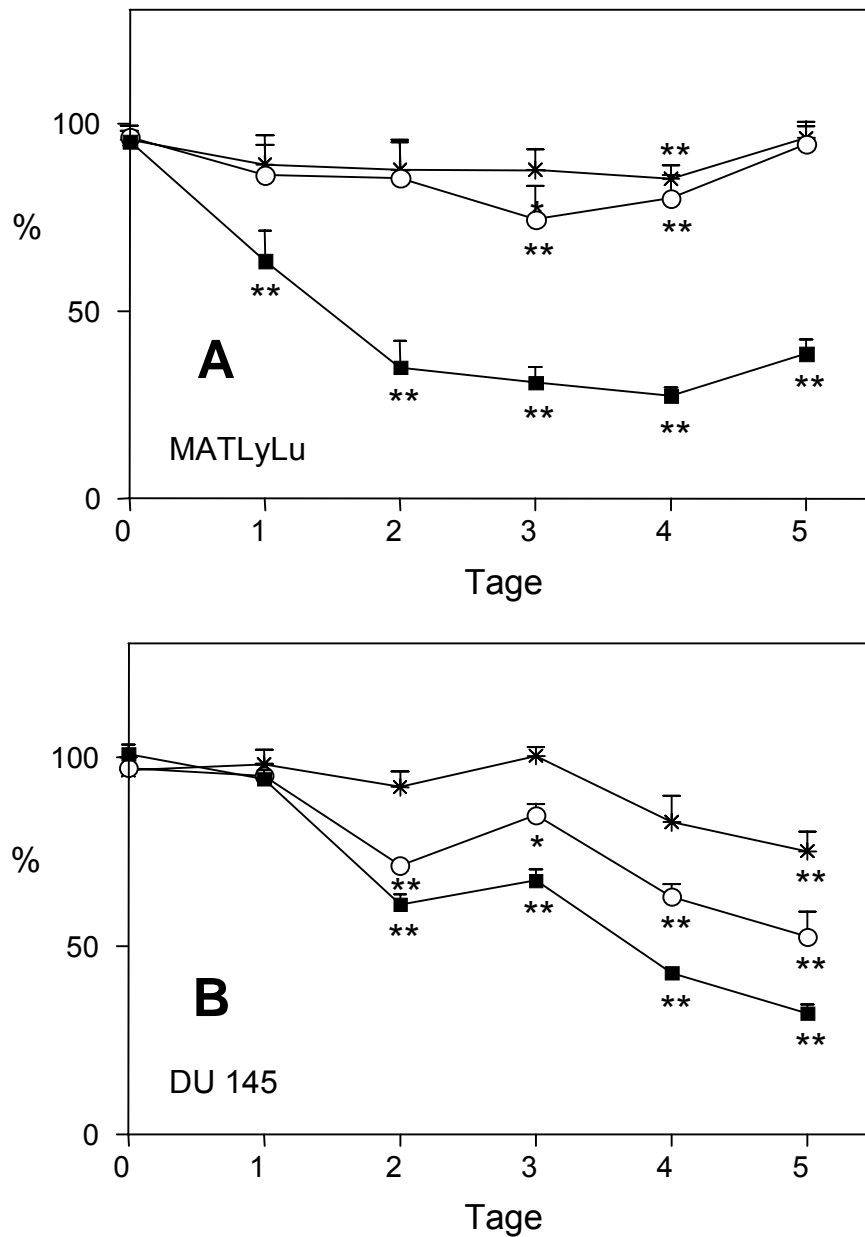


Abb. 6: Effekt von Batimastat auf das Zellwachstum von MATLyLu (A) und DU 145-Zellen (B) in den Konzentrationen: * = 40, O = 400, ■ = 4000 ng/ml. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils sechs unabhängigen Einzelmessungen. Der Effekt von Batimastat ist in Abhängigkeit von der Vehikelkontrolle (=100%) gezeigt. Signifikante Unterschiede von der Vehikelkontrolle sind mit * $p < 0,05$ und ** $p < 0,001$ gekennzeichnet.

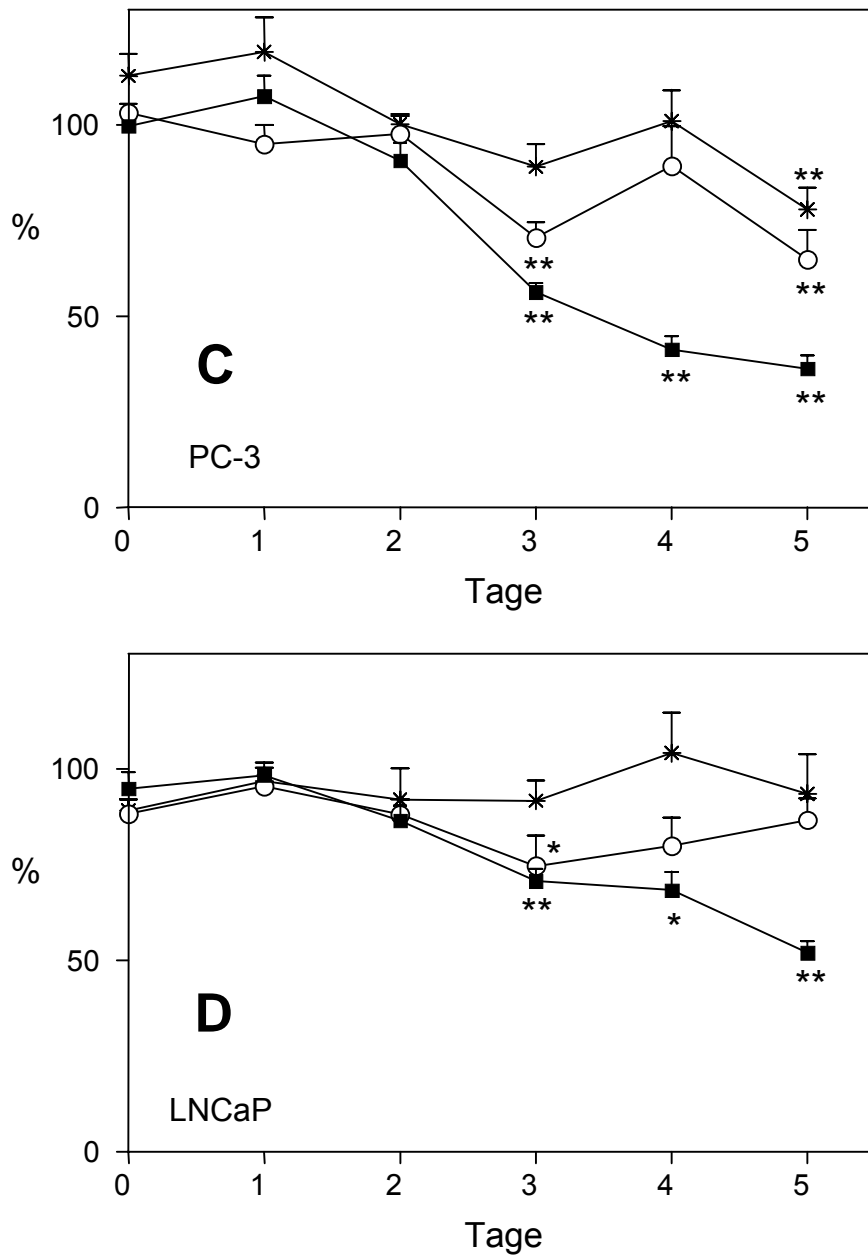


Abb. 7: Effekt von Batimastat auf das Zellwachstum von PC-3 (C) und LNCaP (D) in den Konzentrationen: * = 40, O = 400, ■ = 4000 ng/ml. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils sechs unabhängigen Einzelmessungen. Der Effekt von Batimastat ist in Abhängigkeit von der Vehikelkontrolle (=100%) gezeigt. Signifikante Unterschiede von der Vehikelkontrolle sind mit * $p < 0,05$ und ** $p < 0,001$ gekennzeichnet.

Die in Abbildung 6 und 7 gezeigten Versuche wurden mehrfach wiederholt. Die Rohdaten aus diesen Versuchsreihen werden nach Umrechnung in Prozent vergleichbar. Auf diese Weise kann eine große Zahl von Einzelversuchen miteinander verglichen werden. Diese Methode ist zur Abschätzung zuverlässiger Ergebnisse für den MTT-Test in der Literatur von Sieuwerts et al. beschrieben [139]. Die Wirkung von Batimastat wurde bei DU 145 in vier, bei PC-3 in sechs, bei MATLyLu in neun und bei LNCaP in sieben Versuchsreihen getestet (je sechs unabhängige Werte pro Versuchsreihe; Tab.1 und 2).

Aus Tabelle 1 geht hervor, dass das Wachstum und die metabolische Aktivität der DU 145 Zellen bei einer Batimastatkonzentration von 40 ng/ml in vier Versuchsreihen nie größer war, als das der Vehikelkontrolle. Dies gilt ebenso für PC-3 nach sechs Versuchsreihen. Bei MATLyLu war dagegen nach neun Versuchsreihen, das Wachstum und die metabolische Aktivität der Zellen in zwei Versuchsreihen signifikant größer als das Wachstum der Vehikelkontrolle. Bei LNCaP war dies nach sieben Versuchsreihen einmal ebenfalls in signifikantem Ausmaß zu sehen.

Tab. 1: Übersicht über alle durchgeführten Versuche bei einer Batimastatkonzentration von 40 ng/ml. Angegeben sind die Anzahlen der Versuchsreihen (je Versuch 6 unabhängige Einzelwerte) bei denen unter Batimastat höhere, gleiche oder niedrigere Wachstumsraten im Vergleich zur jeweiligen Vehikelkontrolle gefunden wurden. In Klammern findet sich das Signifikanzniveau aus den einzelnen Versuchsreihen.

Wachstum	DU 145	PC-3	MATLyLu	LNCaP
Batimastatkon.	40 ng/ml	40 ng/ml	40 ng/ml	40 ng/ml
Versuchsreihen insgesamt	4	6	9	7
Höher	0	0	2 (p < 0,01)	1 (p<0,01)
Gleich	1	4	5	6
Niedriger	3 (p<0,05-0,01)	2 (p<0,01)	2 (p < 0,05)	0

Die Tabelle bestätigt die in Abbildung 6 und 7 gezeigten Ergebnisse für eine Batimastatkonzentration von 40 ng/ml. PCa-Zelllinien können unterschiedlich auf niedrige Konzentrationen von Batimastat reagieren. Wachstum und metabolische Aktivität der hormonabhängigen Zelllinie LNCaP werden bei niedrigen Konzentrationen von Batimastat im Vergleich zu den hormonunabhängigen PCa Zelllinien DU 145 und PC-3 weniger beeinflusst. Dieser Unterschied zeigt sich für die hormonunabhängige Zelllinie MATLyLu im Vergleich zu LNCaP nicht.

Die im Zusammenhang mit Tabelle 1 erläuterte unterschiedliche Reaktion der Zelllinien auf niedrige Batimastatkonzentrationen ist graphisch noch einmal in Abbildung 8 gezeigt. Hier wurden alle vorhandenen Werte nach Umrechnung in Prozent zur jeweiligen Vehikelkontrolle (=100 %) dargestellt. Während DU 145 und PC-3 unter bzw. im Bereich der Vehikelkontrolle bleiben, läßt sich ein zytostatischer Einfluß auf das Wachstum von MATLyLu und LNCaP bei einer Konzentration von 40 ng/ml nach einer Versuchsdauer von fünf Tagen ausschließen. Einschränkend auf dieses Ergebnis muß die hohe Standardabweichung bei LNCaP von bis zu 40% gewertet werden.

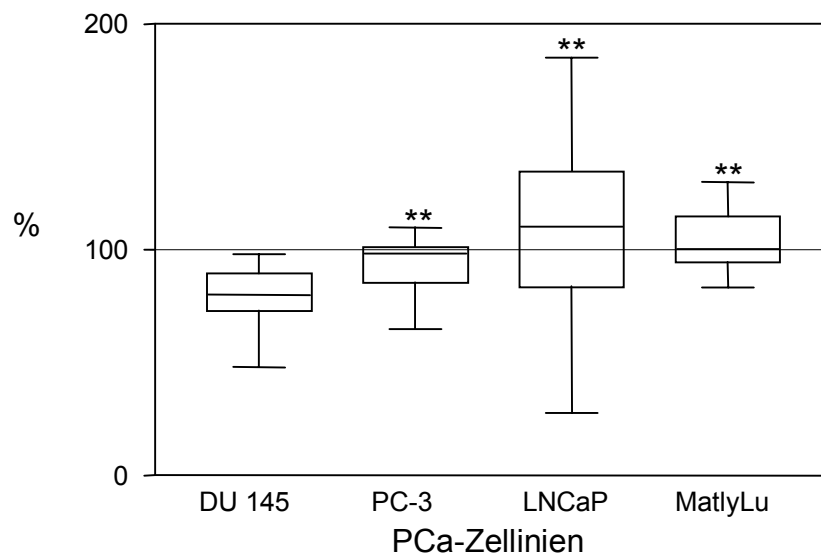


Abb. 8: Analyse von 4-9 Versuchen pro Zelllinie mit n=24-54. Werte von Tag 5 der Zellkultur. Eingesäte Zellzahlen am Tag 0 zwischen 500 und 10000 Zellen je Versuch. Proliferation in Wachstumsmedium und Batimastat (40 ng/ml). Mittelwert der Vehikelkontrolle als 100%. Einzelwerte prozentual zur jeweiligen Vehikelkontrolle. Dargestellt sind Maximal-, Median- und Minimalwert sowie 25. und 75. Perzentile. Signifikante Unterschiede sind im Vergleich zu DU 145 mit $**p < 0,01$ angegeben.

Die unterschiedliche Reaktion der Zelllinien auf die verwendeten Batimastat-Konzentrationen 40, 400 und 4000 ng/ml wird in Tabelle 2 für den 4. und 5. Versuchstag herausgearbeitet. Wie für Tabelle 1 und Abbildung 8 wurden alle Versuchsreihen ausgewertet.

Tab. 2: Proliferationsrate der vier PCa-Zelllinien in Prozent gegenüber der jeweiligen Vehikelkontrolle. Mittelwerte der Prozentzahlen aus der Gesamtanalyse von 4-9 Versuchen mit n=24-54. Batimastatkonzentrationen von 40-4000 ng/ml. Werte von Tag 4 und 5 der Versuche.

	DU - 145			PC - 3			MATLyLu			LNCaP		
ng/ml / %	4000	400	40	4000	400	40	4000	400	40	4000	400	40
Tag 4	57,0	76,1	84,1	47,7	82,4	93,2	66,8	98,8	100,7	60,3	76,7	90,8
Tag 5	53,4	74,2	79,4	44,4	79,3	93,5	72,5	98,0	102,9	68,0	91,9	108,0

Nach fünf Tagen Inkubationszeit und hohen Batimastat-Konzentrationen (4000 ng/ml) erreichen DU 145 und PC-3 durchschnittlich 53,4 %, bzw. 44,4 % der metabolischen Aktivität der Vehikelkontrolle, MATLyLu und LNCaP dagegen, 72,5 % bzw. 68,0 % (Tab. 2). Der unterschiedliche Einfluß von hohen Batimastat-Konzentrationen auf die Zelllinien wird aus Tabelle 2 ersichtlich. Die Zelllinien DU 145 und PC-3 zeigen vom 4. auf den 5. Versuchstag eine konstante Abnahme des Wachstum und der metabolischen Aktivität für 400 und 4000 ng/ml Batimastat. Dies kann als zytostatischer Effekt von Batimastat gewertet werden. Dagegen weisen MATLyLu und LNCaP am letzten Versuchstag eine gegenüber dem Vortag leicht gesteigerte metabolische Aktivität bei einer Konzentration von 4000 ng/ml Batimastat auf. Für LNCaP wurden insgesamt 7 Versuche mit n=42 Einzelversuchen durchgeführt. Tabelle 2 zeigt bei allen Konzentrationen von 40-4000 ng/ml für LNCaP eine Erholung der Proliferationsrate von Tag 4 auf Tag 5. Am Tag 2 und 4 fand generell ein Mediumwechsel statt.

Zelllinien der gleichen Tumorentität zeigen in hohen und niedrigen Konzentrationsbereichen von Batimastat unterschiedliche Wachstumsraten und hierdurch bedingte geringere metabolische Aktivität. Zytostatische Effekte können wie bei LNCaP und MATLyLu innerhalb von 24 h reversibel sein.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die PCa-Zelllinien im vorgestellten Versuchsansatz nicht vergleichbar auf Batimastat reagierten. Batimastat wirkt unterschiedlich zytostatisch auf die untersuchten PCa-Zelllinien *in vitro*. Es unterdrückt das Wachstum auch bei hohen Konzentrationen (4000 ng/ml) nicht vollständig. Die hormonabhängige Zelllinie LNCaP wird in ihrer Proliferationsfähigkeit und metabolischen Aktivität weniger von Batimastat beeinflusst als die hormonunabhängigen Zelllinien DU 145, PC-3. Dagegen läßt sich kein Unterschied hinsichtlich Proliferation und metabolischer Aktivität bei der hormonunabhängigen Zelllinie MATLyLu im Vergleich zu den hormonabhängigen LNCaP Zellen erkennen. Batimastat wirkt in den untersuchten Konzentrationen nicht zytotoxisch auf die PCa-Zelllinien. Bei hohen Batimastat-Konzentrationen kommt es bei allen PCa-Zelllinien zu einer signifikanten Hemmung der Proliferation. Der zytostatische Effekt von hohen Batimastatkonzentrationen kann innerhalb von 24 h reversibel sein.

4.3 Wirkung von Batimastat im Tiermodell

Nach der Tumorzellinjektion in den ventralen Lappen der Rattenprostata entwickelten alle Tiere einen orthotopen Tumor. Bei keinem der Tiere ergaben sich operative oder postoperative Komplikationen. Die OP-Wunden heilten problemlos. Das mittlere Ausgangsgewicht der Ratten in der Kontrollgruppe war 212,5 g, in der Vehikelgruppe 219,3 g und in der Batimastatgruppe 208,9 g. Die Gewichtsentwicklung der Tiere im Beobachtungszeitraum ist in Abbildung 9 dargestellt. In den unbehandelten Versuchsgruppen verminderte sich das Körpergewicht während des Versuches insgesamt um 8,1% in der Kontrollgruppe und um 11,1% in der Vehikelgruppe sowie in der behandelten Gruppe (Batimastat) um 9,0%. Es gab keine signifikanten Unterschiede im Körpergewicht am Ende des Beobachtungszeitraumes. Daher konnte ein Einfluss von Batimastat auf die Gewichtsentwicklung der Tiere nicht nachgewiesen werden.

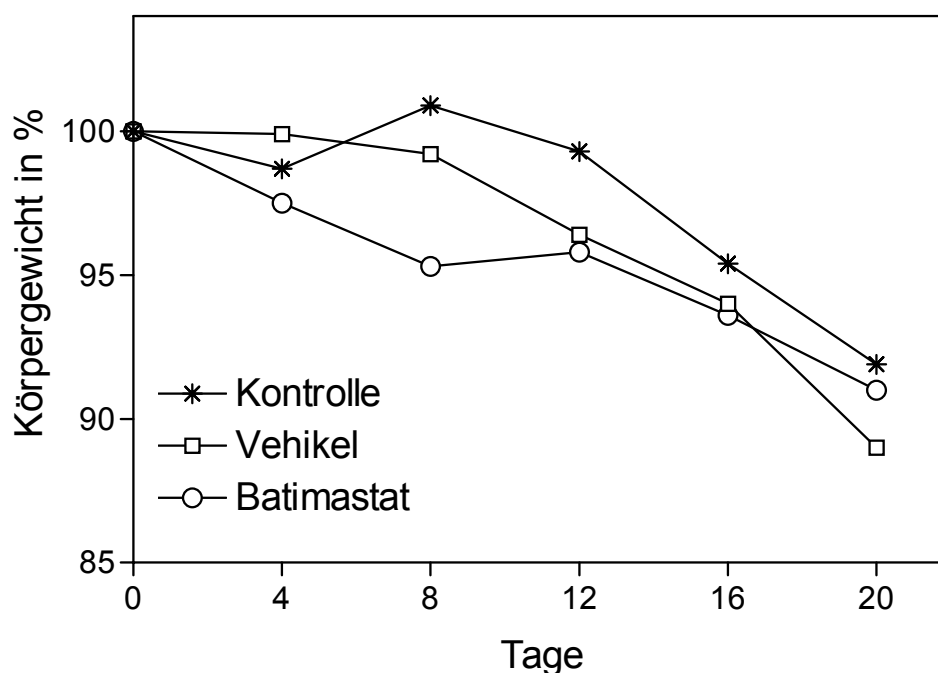


Abb. 9: Körpergewichte der behandelten Tiergruppe (Batimastat), Vehikelgruppe und Kontrollgruppe. Das mittlere Ausgangsgewicht der drei Gruppen wurde als 100% definiert. Die Mittelwerte der Tiergewichte sind in Prozent wiedergegeben.

In der unbehandelten Kontrollgruppe starben drei Tiere zwischen dem 19.-20. Tag. Das Tumorgewicht dieser Tiere war 19,3, 20,4 und 24,9 g. Nach der Tötung aller Tiere am 20. Tag nach Tumorzellinjektion, stellten sich die kleineren Tumoren der behandelten Gruppe makroskopisch als vollständig in Bindegewebe abgekapselt und ohne Infiltration in das umliegende Gewebe dar. Im Gegensatz dazu zeigten die Tumore der Kontroll- und Vehikelgruppe ein größeres Volumen und ein infiltrierendes Wachstum in das Kolon und in die Samenbläschen. In Abbildung 10 ist das Tumorgewicht der unbehandelten und behandelten Tiere am 20. Tag nach Tumorzellinokulation dargestellt. Gezeigt sind die Tumorgewichte der Kontrollgruppe (MW $18,9 \pm 5,4$ g), der Vehikelgruppe (MW $22,3 \pm 4,3$ g) und der Batimastatgruppe (MW $11,1 \pm 2,6$ g) (Abb.10).

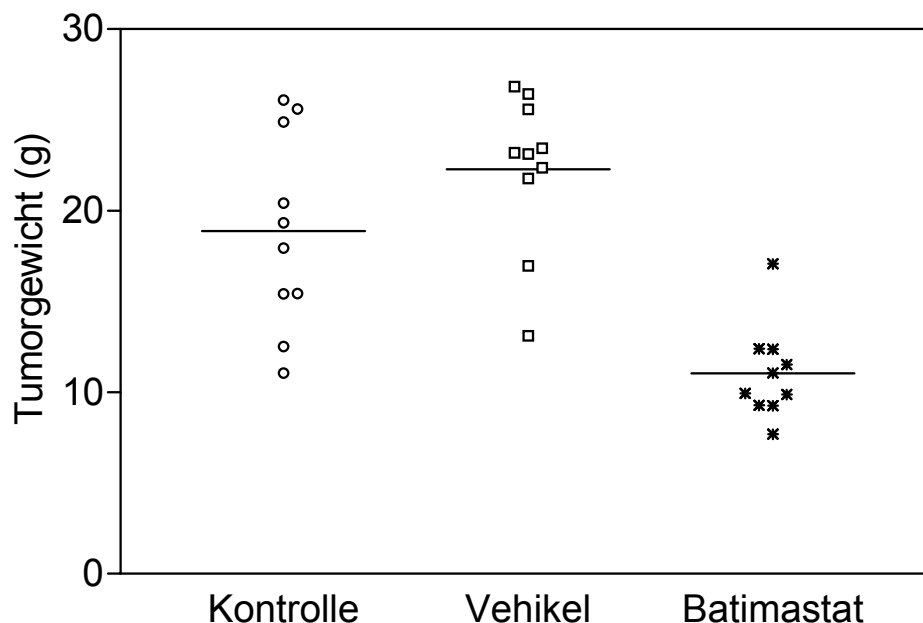


Abb. 10: Tumorgewicht 20 Tage nach der Tumorzellinokulation. Dargestellt sind Einzelwerte und der Mittelwerte.

Das Tumorgewicht ist signifikant unterschiedlich zwischen den Gruppen. Zwanzig Tage nach Tumorzellinokulation war das Gewicht der orthotopen Tumore bei den behandelten Tieren signifikant kleiner als bei der Kontrollgruppe oder der

Vehikelgruppe (MW 11,1 g vs. 18,9 g vs. 22,3 g; $p < 0,001$). Zwischen der Kontrollgruppe und der Vehikelgruppe fand sich kein signifikanter Unterschied beim Tumorgewicht (MW 18,9 g vs. 22,3 g; $p > 0,05$). Im Vergleich zu den unbehandelten Gruppen verminderte Batimastat das Tumorstadium um bis zu 50 %. Das gleiche Ergebnis ergab sich aus der Berechnung der Tumorumfänge, die in Abbildung 11 dargestellt sind. Das Tumorumfang war in der Batimastat-Gruppe signifikant kleiner als bei Kontroll- und Vehikelgruppe (MW 10,8 ml vs. 20,4 ml vs. 24,2 ml, $p < 0,01$). Zwischen Kontrollgruppe und Vehikelgruppe fand sich kein signifikanter Unterschied im Tumorumfang.

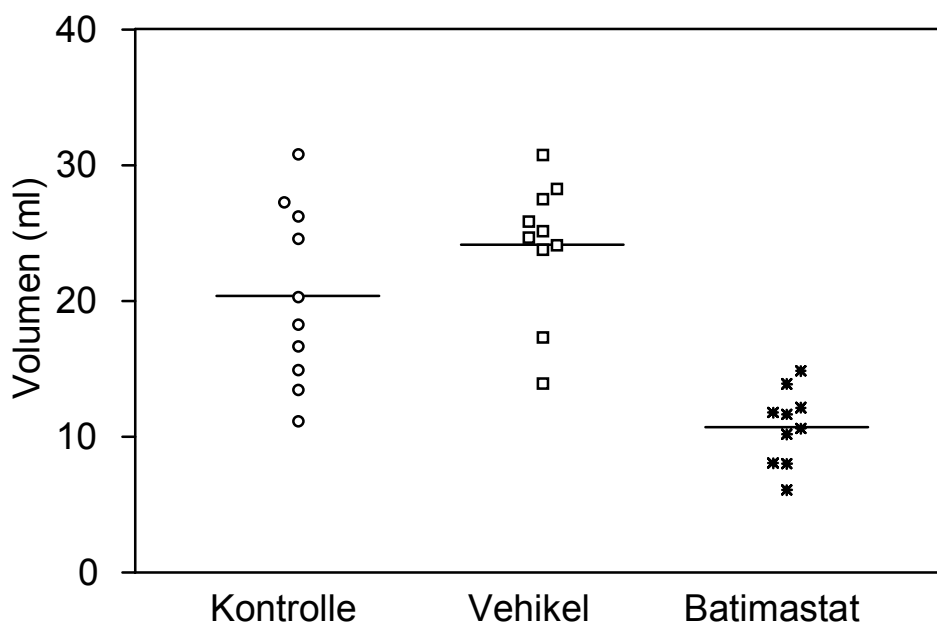


Abb. 11: Tumorumfang in Milliliter (ml) nach 20 Tagen. Dargestellt sind Einzelwerte und Mittelwerte.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß Batimastat das orthotope Tumorstadium signifikant vermindert hat. Das Vehikel für Batimastat blieb ohne Einfluß auf das Tumorstadium im Vergleich zur Kontrollgruppe.

5 Diskussion

5.1 Bewertung des MTT - Test

In meiner Untersuchung wurde der MTT-Test zur Messung der enzymatischen Aktivität und der Proliferation von PCa-Zelllinien *in vitro* eingesetzt. Der MTT-Test basiert auf einem Tetrazoliumfarbstoff. Die Tetrazoliumsalze werden außer in zytologischen Versuchen auch bei enzymatischen Untersuchungen, histochemischen Methoden und in der bakteriologischen Diagnostik verwendet. Die zelluläre Reduktion des Tetrazoliumsalzes korreliert mit der Glykolyserate und der NADH-Produktion und weniger mit der mitochondrialen Zellatmung wie bei Einführung des MTT-Testes ursprünglich angenommen. Eine Beeinflussung des Farbstoffumsatzes über die Behinderung der NADH-Produktion durch Batimastat ist nicht bekannt und könnte im hier gewählten Ansatz nicht von zytostatischen Effekten differenziert werden.

Der in meiner Arbeit verwendete Versuchsansatz wurde gegenüber Standardprotokollen modifiziert [140,141]. So wurde die Azidifizierung des zu Formazankristallen durch die Zellen umgesetzten MTT, wie von Plumb et al. beschrieben, nicht durchgeführt. Der Grund hierfür war die im Ansatz primär niedrigeren Zellzahlen im Vergleich zu Plumb et al. [134]. Der umgesetzte und aufgelöste Farbstoff wird in einigen Studien als instabil beschrieben. Deswegen gilt die unmittelbare photometrische Messung nach Auflösung des Farbstoffes als Standard. Im vorliegenden Versuchsansatz wurde die Messung mit dem Photometer 20-30 Minuten zeitverzögert durchgeführt, da sich der Abfall der Farbintensität nach dieser Zeit als vernachlässigbar zeigte (Abb.4). Sieuwerts et al. beschrieben Unterschiede zwischen Zellmorphologie, metabolischer Aktivität und dem erreichten Farbstoffumsatz [139].

In der vorliegenden Untersuchung scheinen schnell wachsende Zelllinien wie MATLyLu mehr Farbstoff umzusetzen als die anderen PCa Zelllinien. MATLyLu wächst *in vitro* aber auch in "Häufchen" und formt sehr schnell sog. "domes".

Diese "Türmchen"-Formation erschwert die Abschätzung der Zellmasse. Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit wird hierdurch jedoch nicht beeinflusst, da MATLyLu, trotz Häufchenbildung, absolut gesehen die Zelllinie mit dem stärksten Farbstoffumsatz ist. Der Vergleich der Zelllinien untereinander durch prozentuale Auswertung gegenüber der jeweiligen Vehikelkontrolle erfolgte nach dem Protokoll von Sieuwerts et al. [139]. Unter diesen Bedingungen zeigte sich der MTT-Test als zuverlässiger Test zur Messung der metabolischen Aktivität und Proliferation von PCa Zelllinien *in vitro*. Daher konnte ich den MTT-Test in meiner Untersuchung als Methode zur Messung von Lebensfähigkeit und Proliferation der PCa-Zellen einsetzen.

5.2 Batimastat unter *in vitro* Bedingungen

Durch die schlechte Löslichkeit und die Ausfällung von kristallinen Aggregaten von Batimastat kann es zu vermindertem Ansprechen der Zelllinien auf die Substanz kommen. Aus diesem Grund wurde das Batimastat-Medium im 48-h-Zyklus erneuert. Unter *in vitro* Bedingungen zeigt Batimastat in der vorliegenden Untersuchung in hohen Konzentrationen proliferationshemmende Effekte. Diese sind bei MATLyLu und LNCaP innerhalb der Versuchsdauer reversibel. In den *in vitro* Versuchen konnte dargestellt werden, daß Batimastat in hohen Konzentrationen (4000 ng/ml) sowohl hormonabhängige (LNCaP) als auch hormonunabhängige (DU 145, PC-3 und MATLyLu) Zelllinien im Wachstum und der metabolischen Aktivität inhibiert. Es zeigt sich eine dosisabhängige Reduktion dieses Effektes. Ein zytotoxischer Effekt läßt sich bei Konzentrationen bis 4000 ng/ml Batimastat nicht nachweisen. Dieses Ergebnis ist vereinbar mit Untersuchungen von Batimastat an Zelllinien anderer Tumorentitäten. In diesen Studien wurde die Proliferation von Zelllinien unter Batimastat mit validierten Verfahren wie MTT-Test, Trypanblau-Test, ³H-Thymidin-Inkorporation und Gesamteiweißbestimmung gemessen [83,100,101,105,106]. Diese Studien zeigen an unterschiedlichen Tumorzelllinien zytostatische, jedoch keine zytotoxischen

Eigenschaften von Batimastat. Damit lässt sich Batimastat gegen andere zytotoxische synthetische Inhibitoren der MMP wie Col-3, ein Tetrazyklinderivat, abgrenzen [111].

Nemeth et al. berichten, keine dosisabhängige Hemmung der Proliferationsrate von PC-3 Zellen bei Batimastatkonzentrationen von 0,1 bis 20 μM (10000 ng/ml) festgestellt zu haben [72]. Die Ergebnisse meiner Arbeit zeigen, dass bei einer Konzentration von 8 μM (4000 ng/ml) das Wachstum von PC-3 Zellen vermindert wird (Abb. 6C). Beim *in vitro* Versuch von Nemeth et al. wurde die gleiche MTT-Technik angewandt.

Die in meiner Arbeit verwendeten PCa-Zelllinien wurden zum ersten Mal bezüglich der Wirkung eines synthetischen MMPI miteinander verglichen. Dabei wurde DU 145 aufgrund der stabilen Eigenschaften als Referenzzelllinie eingesetzt. Es zeigt sich, dass die Zelllinie LNCaP in absoluten Werten eine geringere Proliferation und metabolisch schwächere Aktivität als die anderen Zelllinien hat (Abb. 4, 7 u. 8). Dies ist in Übereinstimmung mit den bekannten Eigenschaften von LNCaP, wie der langen Verdopplungsrate von 72 Stunden, den geringen adhärenen Eigenschaften und der Entwicklung von Subklonen [117,142]. Die geringen adhärenen Eigenschaften von LNCaP erklären auch die größere Standardabweichung (Abb. 8). Wird LNCaP prozentual gegenüber den anderen Zelllinien und zur jeweiligen Vehikelkontrolle verglichen, so zeigt sich jedoch ein anderes Bild. LNCaP ist verglichen mit DU 145 und PC-3 weniger empfindlich gegenüber den zytostatischen Eigenschaften von Batimastat bei höheren Konzentrationen (Tab.1 und 2).

Während DU 145 und PC-3 eine kontinuierliche Abnahme der Proliferationsrate unter 4000 ng/ml Batimastat zeigen, steigt die Proliferationsrate unter dieser zytostatischen Batimastatkonzentration bei LNCaP und MATLyLu in der Gesamtanalyse (Tab. 2) an. So nimmt das Wachstum von LNCaP vom 4. auf den 5. Versuchstag durchschnittlich von 60,3 % auf 68,0 % und bei MATLyLu von

66,8 % auf 72,5 % bei 4000 ng/ml im Vergleich zur jeweiligen Vehikelkontrolle zu. Dies zeigt die potentiell unterschiedliche zytostatische Wirkung von Batimastat in hohen Konzentrationen, die unterschiedliche Empfindlichkeit von PCa-Zelllinien auf pharmakologische Beeinflussung und die Reversibilität der zytostatischen Eigenschaften von Batimastat. Ein Signifikanzniveau läßt sich für diese Interpretation nicht angeben, da die Signifikanzniveaus nur für die Einzelversuche gültig sind (Abb. 6 und 7). Für die tierexperimentellen Versuche hat diese Beobachtung eingeschränkte Übertragbarkeit, da bei den *in vivo* Experimenten Konzentrationen unterhalb von 40 ng/ml verwendet wurden.

Als Ergebnis der *in vitro* Untersuchungen ist hiermit gezeigt, daß Batimastat in hohen Konzentrationen auf hormonabhängige und homonunabhängige PCa-Zelllinien zytostatisch wirkt. Ebenso läßt sich mit der vorliegenden Untersuchung nachweisen, daß Batimastat in Abhängigkeit von der Konzentration unterschiedliche zytostatische Wirkung auf PCa-Zelllinien hat. Schließlich deutet die vergleichende Gesamtanalyse daraufhin, daß die Wirkung von Batimastat nicht von der Hormonempfindlichkeit der PCa-Zelllinien abhängt.

5.3 Reduktion des Tumorwachstum im Tiermodell

In der vorliegenden Untersuchung konnte nach Inokkulation von 100000 MATLyLu Zellen ein orthotopes Tumorwachstum in allen Tieren nachgewiesen werden. Am Ende des Untersuchungszeitraumes war kein signifikanter Gewichtsunterschied bei den behandelten und unbehandelten Gruppen zu beobachten. In der vorliegenden Studie wurde eine Dosierung von 30 mg Batimastat pro kg Körpergewicht bei täglicher intraperitonealer Applikation verwendet. Bei dieser Dosierung wurde in "Nacktmäusen" Serumkonzentrationen von 12-30 ng/ml über 24 Stunden erreicht [87].

Es ist davon auszugehen, dass diese Konzentrationen trotz der geringen Löslichkeit von Batimastat und der Bildung von kleinen kristallinen Aggregaten an den Injektionsstellen auch in dieser Studie erreicht wurden. Eine ausreichende intraperitoneale Resorption von Batimastat kann vorausgesetzt werden.

Ein orthotopes Tumorgewicht von über 20 g schien der limitierende Faktor in diesem Tumormodell zu sein, da drei Tiere mit diesem Tumorgewicht starben. Die während des Versuches verstorbenen Tiere waren aus der Kontrollgruppe. Es starb keines der Tiere aus der mit Batimastat behandelten Versuchsgruppe und der Vehikelgruppe. Die Tumoren in der behandelten Gruppe waren signifikant kleiner als die Tumoren in der Kontroll- und Vehikelgruppe. Batimastat reduzierte das Tumorwachstum um bis zu 50 %. In Tiermodellen mit Leber- und Kolontumoren wurden vergleichbare Raten in der Tumorreduktion zwischen 30 - 50 % gesehen [83,87].

In vitro hat Batimastat in den Konzentrationen von 40-400 ng/ml nur einen geringen Effekt auf die Proliferation von MATLyLu-Zellen. Es kann davon ausgegangen werden, dass diese Konzentrationen gleich bzw. bis zu 10 mal höher als die *in vivo* erreichten Konzentrationen sind. Dennoch bewirkt eine relativ geringe Batimastatkonzentration von < 40 ng/ml im Serum einen signifikanten reduktiven Effekt auf das Tumorwachstum (Abb. 10, $p < 0,001$). Mit dem signifikant geringeren Tumorgewicht in der behandelten Tiergruppe korreliert das ebenfalls signifikant verminderte Tumolvolumen (Abb. 11, $p < 0,01$). Der Tumor stellte sich in der behandelten Tiergruppe makroskopisch als solider, bindegewebig abgekapselter Tumor ohne Infiltration in die Umgebung dar. Dies legt die Effektivität des Konzeptes der MMP-Inhibition nahe und unterstützt die bereits in anderen Tierversuchen gemachten Erfahrungen mit Batimastat [70]. Aus der vorliegenden Untersuchung kann geschlossen werden, dass das Dunning R-3327 Adenokarzinom der *Copenhagen* Ratte ein zuverlässiges Modell für die Evaluierung von synthetischen Inhibitoren der MMP beim PCa ist.

5.3.1 Tierexperimentelle und klinische Ergebnisse im Vergleich

Die Ergebnisse meiner Arbeit sind in Übereinstimmung mit Untersuchungen an anderen Tumormodellen. Diese zeigen ebenfalls eine Reduktion des lokalen Tumorwachstums unter Behandlung mit synthetischen MMPi. So untersuchten Watson et al. den Effekt von Batimastat in einem Tiermodell für kolorektale Tumoren. Hierbei wurden C170HM2 Zellen (Kolonkarzinom-Zellen) in die Peritonealhöhle von immundefizienten Mäusen (SCID-Mäuse) injiziert. Die SCID-Mäuse entwickeln darunter solide Tumormanifestationen und Aszites. Batimastat verhinderte die Aszitesentwicklung in 47 % der Tiere und reduzierte das Wachstum von peritonealen Tumoren [143].

In einer ähnlichen Studie von Davies et al. wurden Ovarialkarzinomzellen in die Peritonealhöhle von "Nacktmäusen" implantiert. Die Behandlung mit Batimastat führte zu einem signifikant längeren Überleben der Tiere [80]. In einem Mensch-Tier Brustkrebsmodell wurden menschliche Tumorzellen in das Fettgewebe der Brustdrüsen von "Nacktmäusen" implantiert. Nach Anwachsen wurde der Tumor extirpiert. Unter Therapie mit Batimastat zeigte sich eine signifikante Reduktion des lokalen Wiederauftretens des Tumors und der Entstehung von Lungenmetastasen [86].

Klinisch ist bisher noch wenig über die Rolle der MMP beim PCa bekannt [59,60,144,145]. Baker et al. bestimmten die Konzentrationen von MMP-1, MMP-3, TIMP-1 und TIMP-2 im Blut von PCa-Patienten. Dabei wurden erhöhte TIMP-1 und MMP-1, unveränderte MMP-3 und erniedrigte TIMP-2 Konzentrationen gefunden [146]. Dagegen fanden Jung et al. erhöhte MMP-3 und TIMP-1 Konzentrationen bei PCa-Patienten mit Metastasen im Vergleich zu Kontrollpersonen und Patienten ohne Metastasen [145]. Auch in Gewebeproben von PCa wurden Veränderungen im Verhältnis von MMP und TIMP gefunden. Diese Ergebnisse unterstützen den in der vorliegenden Arbeit gemachten Ansatz zur experimentellen Untersuchung von synthetischen Inhibitoren der MMP in einem Tiermodell des PCa.

Bei Patienten mit hormonrefraktärem PCa erreichte der synthetische MMPI Marimastat eine PSA-Reduktion in 6 von 11 Patienten [147]. Das hormonrefraktäre PCa kann mit konventionellen Strategien bis heute nur unzureichend therapiert werden. Das PCa ist eine Tumorentität mit dynamischen Eigenschaften. Dies wird an der sich verändernden Resistenz von Tumorzellen gegenüber der hormonellen Therapie deutlich [148]. Gegen diese dynamischen Veränderungen der Tumorzellen gibt es nur unspezifische zytostatische oder zytotoxische Therapieansätze. Deshalb ist gegenüber den bisherigen Therapien der Einsatz spezifischer Methoden wünschenswert, die unabhängig von der Tumordynamik sind. Die synthetischen MMPI bieten den Ansatz einer neuen und spezifischen therapeutischen Strategie.

Den hier zitierten sowie selbst durchgeführten Versuchen mit synthetischen Inhibitoren der MMP ist gemeinsam, daß der Tumor im Modell unter kontrollierten Bedingungen entsteht und nach Initialisierung therapiert wird. Dies gilt auch für MMP-Knockout und Überexpressions-Modelle, bei denen die genetische Konstellation vor Initialisierung des Tumors gegeben ist. Diese Bedingungen erschweren die Interpretation hinsichtlich des menschlichen PCa. Das ursprüngliche Konzept bei dem ein Ungleichgewicht im Verhältnis der MMP zu deren physiologischen Inhibitoren durch synthetische Inhibitoren ausgeglichen werden kann, läßt sich anhand der vorliegenden Versuche nicht bewerten. Auch die Vorstellung der Auflösung der EZM durch tumorinduzierte MMP und deren Verhinderung durch synthetische Inhibitoren wurde in meinen Experimenten nicht untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, daß im verwendeten Tiermodell, dem Dunning Tumor der *Copenhagen* Ratte, die Wirkung synthetischer Inhibitoren auf das PCa gut untersucht werden kann. Bei fehlender Zytotoxizität und geringer bis fehlender Proliferationshemmung bei niedrigen Batimastat-Konzentrationen (< 40 ng/ml), liegt ein bisher gegenüber dem konventionellen chemotherapeutisch-zytotoxischen Strategien neuer Therapiemodus vor. Eine Bewahrung der Integrität

der Basalmembranen und der EZM durch die Inhibierung tumorinduzierter MMP, nach dem ursprünglichen MMP-TIMP-Konzept, läßt sich durch die vorliegende Untersuchung insofern bestätigen, als die Tiere der mit Batimastat behandelten Gruppe eine abgekapselte, kleinere Tumormorphologie nach Beendigung des Versuches zeigten. Im Gegensatz dazu weisen die unbehandelten Tiere eine Tumorausbreitung und -invasion auf. Die Annahme eines einfachen Wirkungsmechanismus ist aufgrund der in der Einleitung geschilderten vielfältigen Wirkung von MMP eher abzulehnen. Durch die peritoneale Applikation von Batimastat können sowohl lokale als auch über die serosale Resorption systemische Effekte die Tumorprogression in der behandelten Tiergruppe beeinflußt haben.

5.4 MMP und TIMP bei Malignomen

Die biologische Bedeutung der MMP liegt im Umbau von Gewebeverbänden. Dies erklärt auch die zunehmende Erforschung der MMP im Bereich der reproduktiven Medizin. Die MMP finden sich unter normalen physiologischen Bedingungen nur in niedriger Konzentration und geringer Aktivität in Blut und Urin. Bei physiologischem Gewebeumbau z.B. während des Menstruationszyklus, bei der Involution von Organen, wie dem Uterus nach Schwangerschaft oder der Involution der Brust sind MMP vermehrt nachweisbar. Dies trifft auch für pathologische Zustände wie infektiöse Prozesse oder das Tumorwachstum zu [149,150].

Der Zusammenhang zwischen MMP und der Entstehung und Progression von Tumoren wird durch eine breite Forschung belegt. Die Beteiligung von MMP an der Entstehung und Entwicklung von Malignomen läßt sich sowohl experimentell in Tierversuchen als auch korrelativ in klinisch-pathologischen Untersuchungen zeigen. Trotz der umfangreichen und überzeugenden Ergebnisse über den Zusammenhang zwischen MMP und Malignomen sind die zugrundeliegenden Mechanismen der Wirkung von MMP bis heute nicht ausreichend geklärt.

Die selektive Hemmung der MMP als therapeutisches Ziel bei der Tumorthherapie gilt jedoch als unumstritten. Eine andere Situation zeigt sich dagegen für die spezifischen physiologischen Inhibitoren der MMP. Für TIMP liegen experimentelle und histopathologische Untersuchungen vor, die dem therapeutischen Konzept der Enzymhemmung möglicherweise widersprechen. TIMP weisen außer der Enzym-Inhibitor-Interaktion eine Vielfalt weiterer Eigenschaften auf. Diese TIMP-Eigenschaften umfassen neben dem Einfluß auf die MMP-Aktivität auch die Stimulation von malignen Prozessen [151]. Eines der bisher wichtigsten Ergebnisse der MMP-Forschung, das Ungleichgewicht zwischen MMP und TIMP in Prozessen der malignen Transformation, ist jedoch experimentell und klinisch vielfach bestätigt worden.

5.4.1 Korrelation von MMP und TIMP bei Malignomen

Die Konzentration von aktiven und latenten Formen der MMP in Tumorgewebe von Mensch und Tier ist tendenziell höher, als die des jeweiligen gesunden oder prämaligen Gewebes [67,152]. Es kann eine Korrelation von hohen MMP-Konzentrationen im Tumorgewebe mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium nachgewiesen werden [153]. Die Expression der MMP zeigt ihr größtes Ausmaß an der Tumorfront, dem Ort zwischen Tumor und Bindegewebe mit aktiver Tumorerkrankung [154]. In verschiedensten Tumorentitäten zeigte sich eine signifikante positive Korrelation zwischen der Expression der MMP und klinisch-pathologischen Indikatoren. Die Expression der MMP korreliert mit der zunehmenden Entdifferenzierung und dem histologischen Grading von Tumoren, einem fortgeschrittenen Tumorstadium, zunehmender Tumorgöße sowie Beteiligung lymphatischer und vaskulärer Strukturen. Ebenso läßt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen Lymphknotenmetastasen, Fernmetastasen, erneutem und therapierefraktärem Tumorwachstum und anderen Parametern, wie einem niedrigen Hormonrezeptorstatus, nachweisen [155-160].

Einige Studien fanden eine signifikante Beziehung zwischen der Expression spezifischer MMP und dem Wiederauftreten bzw. dem Überleben der Patienten. Beim Mammakarzinom repräsentiert die MMP-11 Expression einen unabhängigen prognostischen Parameter für das tumorfreie Überleben [161,162]. Diese hinsichtlich der Korrelation zwischen MMP und Malignomen überzeugend scheinende Datenlage existiert für TIMP bis heute nicht.

Eine vermehrte Expression von TIMP zeigt sich u.a. bei Brustkrebs, kolorektalen Karzinomen, PCa, Magenkarzinomen und Lungentumoren [145,163-166]. Dies weist zunächst darauf hin, daß eine vermehrte Expression von TIMP bei Malignomen auftritt. Wenn eine vermehrte Expression von physiologischen Inhibitoren vorhanden ist, sollte eine vermehrte Hemmung von MMP, eine geringere Invasion und Metastasierung und damit eine geringere Progression resultieren. Tatsächlich zeigt sich statt dessen häufig eine negative Prognose bei TIMP-überexprimierenden Malignomen. So ist TIMP-1 mit einer schlechten Prognose bei kolorektalen Karzinomen, Brustkrebs, Magenkarzinom, Lymphomen, Lungentumoren, und PCa assoziiert [62,165,167-169].

Hohe präoperative Plasmakonzentrationen von TIMP-1 bei kolorektalen Karzinomen, Lungentumoren und Magenkarzinomen sind mit einem niedrigen Patientenüberleben korreliert [170,171]. Die Plasmakonzentrationen von TIMP-1 sind bei Patienten mit metastasiertem PCa signifikant höher als bei gesunden Personen. Bei Zervixkarzinomen und Brusttumoren korreliert eine schlechte Prognose mit höheren Expressionsraten für TIMP-2 [172]. Diese nachweislich vermehrte und in positiver Korrelation zu Malignomen stehende TIMP-Expression kann auf unterschiedliche Weise interpretiert werden. Einerseits stellt diese Überexpression unter Umständen eine Reaktion des Tumors bzw. des umliegenden Gewebes auf die Tumorentstehung dar. Andererseits kann die Überexpression von TIMP einer MMP-unabhängigen Stimulation unterliegen, die ihrerseits das Tumorwachstum beeinflusst.

Der prognostische Wert von MMP und TIMP unterliegt methodischen und tumorspezifischen Bedingungen. So können MMP, TIMP als auch deren Verhältnis (MMP zu TIMP) prognostische Bedeutung besitzen. Die Expressionsmuster der einzelnen Proteinasen und ihrer Inhibitoren sind von Faktoren wie dem Tumorstadium, der Tumorentität und der Tumorlokalisierung abhängig.

Das in experimentellen und histopathologischen Untersuchungen festgestellte Ungleichgewicht im MMP-TIMP-Verhältnis wird zunehmend durch klinische Studien bestätigt. So wurde ein verändertes Verhältnis von MMP zu TIMP bei colorektalen Karzinomen, bei Lungentumoren und beim Prostatakarzinom gefunden [145,171,173,174]. Dieses Ungleichgewicht hat Bezug zur Prognose der Erkrankung. Darüberhinaus normalisieren sich die Enzymwerte im Serum bei Patienten nach radikaler Tumoroperation [175].

5.4.2 Maligne Transformation durch MMP und TIMP

Die u.a. von Liotta et al. 1980 publizierte Auffassung, daß Tumoren die Basalmembran mit Hilfe proteolytischer Enzyme durchbrechen, führte auf dem Gebiet der MMP in den 90iger Jahren zu vielfachen Studien mit genetisch veränderten Zelllinien und Mäusen. In diesen wurden proteolytische oder inhibitorische Enzyme überexprimiert, um den so verstärkten Effekt besser sichtbar bzw. unterscheidbar zu machen. Dabei ließ sich feststellen, daß MMP-überexprimierende Tiere eine vermehrte spontane Malignombildung aufwiesen. Ausserdem reagierten diese Mausmodelle auch schneller mit einer Tumorentstehung unter dem Einfluß von Karzinogenen. So konnte bei MMP-3 und MMP-7 transfizierten Mäusen ein verstärktes spontanes Wachstum von Mammakarzinomen herbeigeführt werden [176,177]. MMP-1 überexprimierende Mäuse zeigten unter Stimulation mit Karzinogenen eine höhere Rate an Hauttumoren [53,73]. Korrespondierend hierzu ließ sich durch eine

Überexpression von TIMP oder MMP-defiziente Tiermodelle sowie durch Einsatz synthetischer MMPI eine Verminderung der spontanen Tumorentstehung zeigen [66,178,179,180]. Allerdings demonstrieren neuere Tierexperimente, daß das Tumorwachstum durch die systemische Gabe oder die Überexpression von TIMP in Tumormodellen des Mammakarzinoms, bei Modellen intestinaler Tumore und bei tierexperimentellen Lymphomen auch verstärkt werden kann [38,151,181,182]. TIMP haben außer der Inhibition von MMP weitere komplexe Eigenschaften. So können die antiapoptotischen und parakrinen Wirkungen der TIMP die maligne Transformation veränderter Zellen begünstigen.

5.4.3 Einfluß auf die Tumorinvasion durch MMP und TIMP

Maligne Tumore werden von prämaligen oder benignen Tumoren dadurch unterschieden, daß sie die Gewebegrenzen, die Basalmembran, durchbrechen und in andere Organe einwachsen oder in entfernte Körperregionen metastasieren. Ausgehend von der initialen Entdeckung, daß ein Kaulquappenscheibchen Kollagen auflösen kann, wurden in fast allen menschlichen Tumoren die proteolytische Aktivität der MMP entdeckt [183]. Die Tumorinvasion verläuft in mehreren Schritten, in denen Zellmotilität und Proteolyse unter Einwirkung des umgebenden Stroma eng miteinander verbunden sind. MMP sind die einzigen Enzyme, die in der Lage sind die Hauptstrukturelemente der EZM, wie die fibrillären Kollagene, aufzulösen. Der Einfluß von MMP und TIMP auf die Tumorinvasion wurde durch Invasionsversuche mit der sogenannten Boyden-Kammer, in Hühnerembryos unter Benutzung der chorioallantoiden Membran, in der kornealen Tasche, in Mausmodellen und durch Einsatz synthetischer MMPI untersucht. Auch hier läßt sich wie bei Versuchen zur malignen Transformation zeigen, daß MMP das invasive Verhalten bestimmen, während TIMP und synthetische MMPI die Invasion verhindern können [23,101,106,184,185].

Ein Standard für Invasionsversuche, stellt die intravenöse Applikation von Tumorzellen dar, die die Lunge besiedeln [186]. Nach einiger Zeit wird die Lunge entnommen und die Tumorbildung im Organ evaluiert. Durch eine zusätzliche Untersuchung, der intravitalen Videomikroskopie, läßt sich die Extravasation von Tumorzellen sichtbar machen. Mit dieser Methode konnten Koop et al. 1994 zeigen, daß auch TIMP-überexprimierende Tumorzellen effektiv die Blutbahn verließen [44]. Die TIMP-Überexpression konnte in diesem Versuch die Extravasation entgegen der Erwartung nicht verhindern. Die TIMP-überexprimierenden Tumorzellen bildeten aber signifikant kleinere Metastasen als die genetisch nicht veränderte Mutterzelllinie. Den Zusammenhang zwischen Tumordinvasion und MMP beim PCa demonstrierten Knox et al. in einem *in vitro* Invasionsversuch. Dieser Versuch bestätigte die Fähigkeit von Batimastat, die lokale Invasion von Tumorzellen zu verhindern. Knox et al. transfizierten DU-145 Zellen mit MMP-7 (Matrilysin), um so die Aggressivität der Invasion durch Überexpression von MMP-7 zu steigern. Die MMP-7 überexprimierenden Zellen erreichten einen stärkeren Invasionsgrad im Vergleich zu den nicht-transfizierten Zellen. Batimastat schränkte die Invasivität beider Zelllinien ein [68].

Die Deletion einer einzelnen MMP oder TIMP aus dem Genom führt im Tierversuch nicht notwendigerweise zu einer veränderten Invasivität von Tumoren. Dies ist bei einer Enzymfamilie von mehr als 20 Enzymen, die am ständigen Ab-, Um- und Neubau der EZM beteiligt sind plausibel. Durch redundante und pleiotrope Eigenschaften von Enzymen kann die Funktion fehlender Enzyme aufgefangen werden. Der Verlust einzelner Enzym-kodierender Abschnitte im Genom führt auch beim Menschen nicht unbedingt zu pathologischen Veränderungen.

Beeindruckende Beweise für die Beteiligung der MMP an der Tumordinvasion lieferten Nabeshima et al. Ausgehend von der Entdeckung der perizellulären fibrinolytischen Aktivität der zellmembranständigen Membran-Typ-MMP (MT-MMP) [31,65], konnte diese Arbeitsgruppe den Beweis führen, daß MMP an der Tumorzellinvasion beteiligt sind und dieser Prozess durch den synthetischen MMPI Batimastat gehemmt werden kann. Nabeshima et al. beschrieben die

Tumorzellbewegung in Einzelzellbewegungen (single cell locomotion) und Zellkohortenbewegungen (cohort migration) unter dem Einfluß zellmembranständiger MT-MMP und sezernierter MMP. In den Untersuchungen zur Funktion der MMP bei der Zellbewegung ließ sich auch eine dichotome Eigenschaft der MMP zeigen. Außer den bekannten Eigenschaften der MMP wie Ab-, Um- und Aufbau der EZM ließ sich eine "Pfadfinder"-Funktion nachweisen, die den Weg eines Tumorzellverbandes im Gewebe steuert. Diese "Pfadfinder"-Funktion der MMP läßt sich nicht nur bei Tumorzellen, sondern auch bei der physiologischen Migration von Zellen des Alveolar- und Bronchialsystems nachweisen [187,188,189].

5.4.4 Gefäßneubildung durch MMP und TIMP

Die Tumorentwicklung ist ein komplexer Prozess, der eine Reihe koordinierter Abläufe einschließt. Zu diesen gehört die Entstehung einer tumoreigenen Gefäßversorgung. Frühe Ereignisse in der Tumorprogression sind die zunehmende Proliferation, die verminderte Fähigkeit zur Differenzierung und die Modulation der Immunabwehr. Diese Veränderungen resultieren in der Bildung eines hyperplastischen Gewebes. Ab einer kritischen Größe dieses Areal kann sich der Tumor ohne Gefäßversorgung nicht mehr ausbreiten. Für die Gefäßversorgung müssen endotheliale Zellen in das Tumorgebiet durch die Basalmembran einsprossen. In dieser Situation könnte sich die proteolytisch-antiproteolytische Balance letztlich zugunsten einer Situation mit zunehmender enzymatischer Aktivität verändern [190].

MMP und andere Proteasen bauen die Basalmembran und die umliegenden Gefäßstrukturen ab. Hiraoka et al. prägten hierzu den Begriff der "Invasionskompetenten Zelle" [65]. Diese Zellen ermöglichen unter Umständen die Migration von Endothelzellen in das hyperplastische Gewebe durch Stimulierung der Gewebeauflösung und Produktion von Signalmolekülen. MMP könnten diese Entwicklung fördern, indem sie Wachstumsfaktoren aus der kompakten EZM oder

von Zelloberflächen freisetzen [191]. Bergers et al. zeigten wie MMP-9 in Pankreasinselzelltumoren die Bildung von Gefäßen durch Freisetzung von VEGF bewirken [192].

Der Effekt von MMP auf die Gefäßneubildung konnte indirekt auch durch eine Hemmung mit synthetischen MMPI demonstriert werden. Taraboletti et al. erzielten mit dem Einsatz von Batimastat eine signifikante Verminderung bei der Bildung von Hämangiomen im Tierversuch [102].

Dennoch ist die Situation auch hinsichtlich der Neubildung von Gefäßen durch Malignome im Zusammenhang mit MMP und TIMP nicht eindeutig. So bewirken MMP-2, -7, -9 und -12 die Konversion von Plasminogen in Angiostatin. Andere MMP generieren Endostatin. Angiostatin und Endostatin sind potente Inhibitoren der Gefäßneubildung [193]. Eine Blockierung dieser MMP durch synthetische MMPI würde das Ziel der pharmakologischen Hemmung damit möglicherweise ungünstig beeinflussen. Für die bis heute bekannten TIMP ist gezeigt, daß sie auf verschiedenen Arten die Gefäßneubildung vermindern. TIMP können die pro-angiogenetischen Eigenschaften der MMP, die Proliferation und die Motilität von Endothelzellen hemmen [193-196]. Zumindest für TIMP-1 ist auch ein gegenteiliger Effekt bekannt. TIMP-1 fördert die Expression von VEGF im Mammakarzinom und die Gefäßneubildung in der Retina [197,198]. Der Nettoeffekt von MMP und TIMP auf die Gefäßneubildung bei Malignomen ist schwierig einzuschätzen. Hier bedarf es weiterer experimenteller und klinischer Forschung.

5.4.5 Wirkung von MMP und TIMP auf die Tumorprogression

Die Untersuchung von MMP und TIMP in tierexperimentellen und klinischen Studien dient vielfach der Korrelation dieser Enzyme mit der Tumorprogression. Zahlreiche Untersuchungen beschreiben prägnant die Bedeutung der MMP und TIMP bei der Progression von Tumoren. So läßt sich z.B. für MMP-7 in der bisherigen Forschung eine Sequenz angefangen vom MMP-7 defizienten

Mausmodell für benigne intestinale Tumoren [41], über die Beteiligung von MMP-7 bei Colitis ulcerosa-assoziierten Tumoren [199], bis zur histopathologischen Korrelation mit schlechter Prognose bei kolorektalen Karzinomen nachweisen [200]. Besonders eindrücklich wurde der Einfluß von MMP auf die Tumorprogression mehrfach durch Demonstration der MMP-Expression bei kolorektalen Karzinomen mit eindeutiger und signifikanter Abhängigkeit von den Dukes Stadien gezeigt [201,202]. Ähnliche Ergebnisse gibt es auch für die Beteiligung der MMP an der Tumorprogression bei Zervixkarzinomen. Dieser Tumor läßt sich klinisch und histopathologisch sehr gut in den unterschiedlichen Stadien darstellen. Die Forschung zum Zervixkarzinom zeigt die Beteiligung von MMP in frühen Stadien [160,203], die immunmodulierende Wirkung der MMP [204] und schließlich eine erhöhte Expression und Aktivierung der MMP bei fortgeschrittenen Tumorstadien und Metastasen [205]. Auch bei anderen Tumorentitäten wie dem PCa und Lungentumoren lassen sich stadienabhängige Veränderungen der MMP nachweisen.

Die Datenlage zu den TIMP kann hinsichtlich der Untersuchung der Tumorprogression als weniger ausführlich bezeichnet werden. Ähnlich sequentielle Darstellungen wie zum kolorektalen Karzinom oder Zervixkarzinom lassen sich für TIMP aus der internationalen Literatur nicht belegen. Einzelne Versuche weisen daraufhin, daß TIMP auch bei der Tumorprogression ungünstige Effekte haben können. So begünstigen TIMP die Entstehung intestinaler Adenome, während dies durch Batimastat im gleichen Tiermodell vermindert wird [38]. Insgesamt wenig ist bisher auch über die zeitliche und lokale Verteilung von MMP und TIMP bei der Progression von Malignomen bekannt. Guedez et al. zeigten im Tierversuch einen biphasischen Effekt von TIMP auf das Wachstum von Lymphomen. Nach initialer Tumorstimulation bewirkte TIMP-1 in späteren Tumorstadien eine Hemmung der Lymphome im Tierversuch [181].

Im Gegensatz zum aktuellen Wissenstand zur Wirkung der TIMP auf die Tumorprogression, sind die Ergebnisse zur Wirkung der synthetischen MMPI aus Tierversuchen besser abschätzbar. In vielen Untersuchungen mit unterschiedlichsten Tumoren und Versuchsanordnungen konnte die Hemmung der Tumorprogression durch synthetische MMPI belegt werden. Wie schwierig dagegen die Übertragung der im Tierversuch gewonnenen Informationen sind, illustriert das beim Menschen gefundene "vanishing bone syndromes" in Saudi-Arabischen Familien. Die Betroffenen weisen einen Defekt des MMP-2 Gens auf [206]. Die klinisch-pathologischen Aspekte dieser Erkrankung, wie Wachstumsretardierung und Verlust von Knochensubstanz, sind mit denen von Membran-Typ-1-MMP defizienten Mäusen vergleichbar. MMP-2 defiziente Mäuse zeigen dagegen kaum eine Wachstumsretardierung oder Verlust der Knochensubstanz. Die Diskrepanz zwischen den bisher bekannten biologischen Effekten von MMP und TIMP und dem erfolgreichen Einsatz der synthetischen MMPI macht eine weitere Erforschung dieses Gebietes bis zum klinischen Einsatz notwendig.

5.4.6 Zusammenfassung

Verschiedenste Proteaseinhibitoren sind bei mikrobiellen und viralen Infektionen, rheumatologischen und pulmonalen Erkrankungen im klinischen Einsatz. Der Einsatz von synthetischen MMPI bei Tumorerkrankungen ist bisher wenig erforscht. Ein Ungleichgewicht im Verhältnis von MMP und deren physiologischen Inhibitoren begünstigt die Tumorprogression. Die Hemmung der MMP durch synthetische MMPI wird als neue therapeutische Strategie zur Verminderung der Tumorprogression angesehen. In der Erforschung befinden sich spezifische und unspezifische synthetische MMPI. Batimastat ist ein unspezifischer Inhibitor zahlreicher MMP. In meiner Arbeit wurde der Einfluß von Batimastat auf Prostatakarzinom Zelllinien *in vitro* und im Tiermodell untersucht. Für den Zellkulturversuch wurden die PCa Zelllinien DU 145, PC-3, LNCaP und MATLyLu verwendet. Nach einer Adhäsionszeit von 24 h inkubierten die Zelllinien über einen Zeitraum von fünf Tagen mit Batimastatkonzentrationen von 40, 400 und 4000 ng/ml. Das Batimastat-Medium wurde im 48-h-Zyklus erneuert. *In vitro* zeigt Batimastat zytostatische, aber keine zytotoxischen Effekte. Die zytostatische Wirkung wurde insbesondere bei hohen Batimastatkonzentrationen von 400 und 4000 ng/ml nachgewiesen. Die Wirkung von Batimastat ist konzentrationsabhängig. Verschiedene Tumorzellen der gleichen Tumorentität können unterschiedlich auf Batimastat reagieren. Wachstum und metabolische Aktivität von hormonabhängigen und hormonunabhängigen Tumorzelllinien des PCa sind unter dem Einfluß von Batimastat nicht gleich. Eine eindeutige Abhängigkeit vom Hormonstatus der Zelllinien ließ sich jedoch nicht nachweisen. Zytostatische Effekt von Batimastat können innerhalb von 24 h reversibel sein.

Zur Untersuchung von Batimastat im Tiermodell wurde der Dunning Tumor der *Copenhagen* Ratte verwendet. Die Induktion des Tumors erfolgte durch Inokulation von 100000 MATLyLu Zellen in die ventrale Rattenprostata. Es wurden drei Tiergruppen zu je 10 Tieren untersucht. Die Tiergruppen unterteilten sich in

eine unbehandelte Kontrollgruppe, eine mit Vehikel und eine mit Batimastat behandelte Gruppe. In letzterer erfolgte ab dem Tag der Tumorinduktion eine tägliche intraperitoneale Gabe von 30 mg/kg KG Batimastat über 20 Tage. Während des Beobachtungszeitraumes wurden die Tiere täglich gewogen. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Gewichtsentwicklung bei den drei Versuchsgruppen. Nach Tötung der Tiere wurden Tumorgewicht und Tumolvolumen bestimmt. Drei Tiere der Kontrollgruppe starben vor Versuchsende. Die Tumore der mit Batimastat behandelten Tiergruppe waren klein und abgekapselt. Die Tumore der unbehandelten Kontrollgruppe und der Vehikelgruppe waren signifikant größer und zeigten ein infiltrierendes Wachstum in das Kolon und in die Samenbläschen. Tumorgewicht und Tumolvolumen von Kontroll- und Vehikelgruppe waren nicht signifikant unterschiedlich. Dagegen waren Tumorgewicht und Tumolvolumen der mit Batimastat behandelten Tiergruppe signifikant kleiner im Vergleich zu den beiden anderen Tiergruppen. Batimastat verminderte das Tumorwachstum um bis zu 50 % im Vergleich zur Vehikel- und Kontrollgruppe (MW 11,1 g vs. 18,9 g vs. 22,3 g; $p < 0,001$). Aus diesen Ergebnissen kann ein deutlicher inhibitorischer Effekt des unspezifischen MMPI Batimastat auf das PCa-Wachstum beim Dunning Tumor der *Copenhagen* Ratte abgeleitet werden.

Im Zellkulturversuch zeigt Batimastat keine zytotoxischen Eigenschaften. Niedrige Konzentrationen von Batimastat (40 ng/ml) haben keine zytostatischen Effekte auf MATLyLu *in vitro*. Die Batimastatkonzentrationen im Serum sind bei einer intraperitonealen Gabe von 30 mg/kg KG geringer als die *in vitro* verwendeten Konzentrationen von Batimastat. Daher können zytostatische Eigenschaften von Batimastat die Tumorreduktion im untersuchten Tiermodell nicht bewirkt haben. Die Verminderung des Tumorwachstums kann auf die Hemmung der vom Tumor freigesetzten MMP zurückgeführt werden. Der Dunning Tumor der *Copenhagen* Ratte kann aus diesem Grund als zuverlässiges Modell zur Untersuchung von synthetischen MMPI angesehen werden.

Der Gewebeumbau unter physiologischen sowie pathologischen Bedingungen erfolgt unter Zusammenwirkung vieler Enzyme. Deshalb kann eine Hemmung mehrerer MMP durch unspezifische MMPI sinnvoll erscheinen. Einzelne MMP werden in unterschiedlichen Tumorentitäten verstärkt nachgewiesen. Dies macht ein tumorspezifisches Proteasenprofil wahrscheinlich. Der verstärkte Nachweis einzelner MMP, macht den Einsatz spezifischer MMP plausibel.

MMP-2 und MMP-9 werden vermehrt mit der Progression des PCa beim Menschen in Zusammenhang gebracht [207,208]. Die spezifischen MMP des Dunning Tumors sind nicht bekannt. Allerdings zeigt eine neuere Arbeit erhöhte Plasmaspiegel von MMP-9 beim Dunning Tumor der *Copenhagen* Ratte [209]. Das veränderte Verhältnis von MMP und ihren physiologischen Inhibitoren ist das Ziel neuer Strategien in der Tumorthherapie. Die Eignung der pharmakologischen Hemmung der MMP als neuer Therapieansatz wird durch die vorliegende Untersuchung ebenso wie durch Untersuchungen an Tiermodellen anderer Tumorentitäten bestätigt.

Auf der Ebene von *in vitro*-Untersuchungen und Tierexperimenten muß der Effekt von MMPI mit unspezifischen und spezifischen Inhibitoren weiter untersucht werden, um lokale als auch systemische Wirkungen abgrenzen zu können. Die Untersuchung mit spezifischen und unspezifischen MMPI ist weiterhin notwendig, um den Nettoeffekt im speziellen Tumormodell besser beurteilen zu können. Die bisherigen klinischen Versuche wurden mit unspezifischen MMPI durchgeführt. Deshalb sollte in weiteren Studien die Wirkung von MMPI nach Bestimmung des tumorspezifischen Proteasenprofils in Zukunft mit spezifischen MMPI erfolgen.

Literaturverzeichnis

- (1) Pienta, K. J. und Esper, P. S. (1993): Risk factors for prostate cancer, Ann.Intern.Med. 118 [10], Seite 793-803.
- (2) Robert - Koch - Institut: Tumorregister.
URL:www.rki.de/GBE/KREBS/KREBS.HTM?/GBE/KREBS/SCHAETZUNG/KREBSNEUERKRANKUNGEN1998.HTM&1
- (3) Jemal, A.; Tiwari, R. C.; Murray, T.; Ghafoor, A.; Samuels, A.; Ward, E.; Feuer, E. J. und Thun, M. J. (2004): Cancer statistics, 2004, CA Cancer J Clin. 54 [1], Seite 8-29.
- (4) Hankey, B. F.; Feuer, E. J.; Clegg, L. X.; Hayes, R. B.; Legler, J. M.; Prorok, P. C.; Ries, L. A.; Merrill, R. M. und Kaplan, R. S. (1999): Cancer surveillance series: interpreting trends in prostate cancer--part I: Evidence of the effects of screening in recent prostate cancer incidence, mortality, and survival rates, J Natl.Cancer Inst. 91 [12], Seite 1017-1024.
- (5) Chybowski, F. M.; Keller, J. J.; Bergstralh, E. J. und Oesterling, J. E. (1991): Predicting radionuclide bone scan findings in patients with newly diagnosed, untreated prostate cancer: prostate specific antigen is superior to all other clinical parameters, J Urol. 145 [2], Seite 313-318.
- (6) Smith, D. S. und Catalona, W. J. (1994): The nature of prostate cancer detected through prostate specific antigen based screening, J Urol. 152 [5 Pt 2], Seite 1732-1736.
- (7) Harlan, L.; Brawley, O.; Pommerenke, F.; Wali, P. und Kramer, B. (1995): Geographic, age, and racial variation in the treatment of local/regional carcinoma of the prostate, J Clin.Oncol. 13 [1], Seite 93-100.

-
- (8) Johansson, J. E.; Adami, H. O.; Andersson, S. O.; Bergstrom, R.; Krusemo, U. B. und Kraaz, W. (1989): Natural history of localised prostatic cancer. A population-based study in 223 untreated patients, *Lancet* 1 [8642], Seite 799-803.
- (9) Walsh, P. C.; Partin, A. W. und Epstein, J. I. (1994): Cancer control and quality of life following anatomical radical retropubic prostatectomy: results at 10 years, *J Urol.* 152 [5 Pt 2], Seite 1831-1836.
- (10) Deger, S.; Boehmer, D.; Turk, I.; Roigas, J.; Wernecke, K. D.; Wiegel, T.; Hinkelbein, W.; Dinges, S.; Budach, V. und Loening, S. A. (2002): High dose rate brachytherapy of localized prostate cancer, *Eur.Urol.* 41 [4], Seite 420-426.
- (11) Zincke, H.; Oesterling, J. E.; Blute, M. L.; Bergstralh, E. J.; Myers, R. P. und Barrett, D. M. (1994): Long-term (15 years) results after radical prostatectomy for clinically localized (stage T2c or lower) prostate cancer, *J Urol.* 152 [5 Pt 2], Seite 1850-1857.
- (12) Carlin, B. I. und Andriole, G. L. (2000): The natural history, skeletal complications, and management of bone metastases in patients with prostate carcinoma, *Cancer* 88 [12 Suppl], Seite 2989-2994.
- (13) Whitmore, W. F., Jr. (1984): Natural history and staging of prostate cancer, *Urol.Clin.North Am.* 11 [2], Seite 205-220.
- (14) Nagase, H. und Woessner, J. F., Jr. (1999): Matrix metalloproteinases, *J Biol.Chem.* 274 [31], Seite 21491-21494.
- (15) Vihinen, P. und Kahari, V. M. (2002): Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets, *Int.J Cancer* 99 [2], Seite 157-166.
- (16) Barrett, A. J.; Rawlings, N. D. und Woessner, J. F., Jr. (1998): *Handbook of Proteolytic Enzymes*, San Diego, ISBN: 0-12-079370-9.
-

- (17) Sterchi, E. E. und Stöcker, W. (1999): Proteolytic Enzymes - Tools and Targets, Seite 1-11, Springer- Verlag, ISBN: 3-540-61233-5.
- (18) Hulboy, D. L.; Rudolph, L. A. und Matrisian, L. M. (1997): Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function, Mol.Hum.Reprod. 3 [1], Seite 27-45.
- (19) Bullard, K. M.; Lund, L.; Mudgett, J. S.; Mellin, T. N.; Hunt, T. K.; Murphy, B.; Ronan, J.; Werb, Z. und Banda, M. J. (1999): Impaired wound contraction in stromelysin-1-deficient mice, Ann.Surg. 230 [2], Seite 260-265.
- (20) Alexander, C. M.; Hansell, E. J.; Behrendtsen, O.; Flannery, M. L.; Kishnani, N. S.; Hawkes, S. P. und Werb, Z. (1996): Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation, Development 122 [6], Seite 1723-1736.
- (21) Gearing, A. J.; Beckett, P.; Christodoulou, M.; Churchill, M.; Clements, J.; Davidson, A. H.; Drummond, A. H.; Galloway, W. A.; Gilbert, R. und Gordon, J. L. (1994): Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases, Nature 370 [6490], Seite 555-557.
- (22) Dubois, B.; Starckx, S.; Pagenstecher, A.; Oord, J.; Arnold, B. und Opendakker, G. (2002): Gelatinase B deficiency protects against endotoxin shock, Eur.J Immunol 32 [8], Seite 2163-2171.
- (23) Kim, J.; Yu, W.; Kovalski, K. und Ossowski, L. (1998): Requirement for specific proteases in cancer cell intravasation as revealed by a novel semiquantitative PCR-based assay, Cell 94 [3], Seite 353-362.

- (24) Lochter, A.; Galosy, S.; Muschler, J.; Freedman, N.; Werb, Z. und Bissell, M. J. (1997): Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells, *J Cell Biol.* 139 [7], Seite 1861-1872.
- (25) Ala-Aho, R.; Johansson, N.; Baker, A. H. und Kahari, V. M. (2002): Expression of collagenase-3 (MMP-13) enhances invasion of human fibrosarcoma HT-1080 cells, *Int.J Cancer* 97 [3], Seite 283-289.
- (26) Bernhard, E. J.; Gruber, S. B. und Muschel, R. J. (1994): Direct evidence linking expression of matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/collagenase) to the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91 [10], Seite 4293-4297.
- (27) Werb, Z. (1997): ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology, *Cell* 91 [4], Seite 439-442.
- (28) Johnson, L. L.; Pavlovsky, A. G.; Johnson, A. R.; Janowicz, J. A.; Man, C. F.; Ortwine, D. F.; Purchase, C. F.; White, A. D. und Hupe, D. J. (2000): A rationalization of the acidic pH dependence for stromelysin-1 (Matrix metalloproteinase-3) catalysis and inhibition, *J Biol.Chem.* 275 [15], Seite 11026-11033.
- (29) Borkakoti, N. (1998): Matrix metalloproteases: variations on a theme, *Prog.Biophys.Mol.Biol.* 70 [1], Seite 7-94.
- (30) Van Wart, H. E. und Birkedal-Hansen, H. (1990): The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87 [14], Seite 5578-5582.

- (31) Sato, H.; Takino, T.; Okada, Y.; Cao, J.; Shinagawa, A.; Yamamoto, E. und Seiki, M. (1994): A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells, *Nature* 370 [6484], Seite 61-65.
- (32) Cox, G.; Steward, W. P. und O'Byrne, K. J. (1999): The plasmin cascade and matrix metalloproteinases in non-small cell lung cancer, *Thorax* 54 [2], Seite 169-179.
- (33) Woolley, D. E.; Roberts, D. R. und Evanson, J. M. (1976): Small molecular weight beta 1 serum protein which specifically inhibits human collagenases, *Nature* 261 [5558], Seite 325-327.
- (34) Jiang, Y.; Goldberg, I. D. und Shi, Y. E. (2002): Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer, *Oncogene* 21 [14], Seite 2245-2252.
- (35) Pavlaki, M. und Zucker, S. (2003): Matrix metalloproteinase inhibitors (MMPis): the beginning of phase I or the termination of phase III clinical trials, *Cancer Metastasis Rev.* 22 [2-3], Seite 177-203.
- (36) Nuovo, G. J.; MacConnell, P. B.; Simsir, A.; Valea, F. und French, D. L. (1995): Correlation of the in situ detection of polymerase chain reaction-amplified metalloproteinase complementary DNAs and their inhibitors with prognosis in cervical carcinoma, *Cancer Res.* 55 [2], Seite 267-275.
- (37) Coussens, L. M. und Werb, Z. (1996): Matrix metalloproteinases and the development of cancer, *Chem.Biol.* 3 [11], Seite 895-904.
- (38) Goss, K. J.; Brown, P. D. und Matrisian, L. M. (1998): Differing effects of endogenous and synthetic inhibitors of metalloproteinases on intestinal tumorigenesis, *Int.J.Cancer* 78 [5], Seite 629-635.

- (39) Gasson, J. C.; Golde, D. W.; Kaufman, S. E.; Westbrook, C. A.; Hewick, R. M.; Kaufman, R. J.; Wong, G. G.; Temple, P. A.; Leary, A. C.; Brown, E. L. und . (1985): Molecular characterization and expression of the gene encoding human erythroid-potentiating activity, *Nature* 315 [6022], Seite 768-771.
- (40) DeClerck, Y. A. und Imren, S. (1994): Protease inhibitors: role and potential therapeutic use in human cancer, *Eur.J Cancer* 30A [14], Seite 2170-2180.
- (41) Wilson, C. L.; Heppner, K. J.; Labosky, P. A.; Hogan, B. L. und Matrisian, L. M. (1997): Intestinal tumorigenesis is suppressed in mice lacking the metalloproteinase matrilysin, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94 [4], Seite 1402-1407.
- (42) Khokha, R. und Denhardt, D. T. (1989): Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases: a review of their role in tumorigenesis and tissue invasion, *Invasion Metastasis* 9 [6], Seite 391-405.
- (43) Hashimoto, K.; Kihira, Y.; Matuo, Y. und Usui, T. (1998): Expression of matrix metalloproteinase-7 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human prostate, *J Urol.* 160 [5], Seite 1872-1876.
- (44) Koop, S.; Khokha, R.; Schmidt, E. E.; MacDonald, I. C.; Morris, V. L.; Chambers, A. F. und Groom, A. C. (1994): Overexpression of metalloproteinase inhibitor in B16F10 cells does not affect extravasation but reduces tumor growth, *Cancer Res.* 54 [17], Seite 4791-4797.
- (45) Wojtowicz-Praga, S. M.; Dickson, R. B. und Hawkins, M. J. (1997): Matrix metalloproteinase inhibitors, *Invest New Drugs* 15 [1], Seite 61-75.

- (46) Grant, G. M.; Giambenardi, T. A.; Grant, A. M. und Klebe, R. J. (1999): Overview of expression of matrix metalloproteinases (MMP-17, MMP-18, and MMP-20) in cultured human cells, *Matrix Biol.* 18 [2], Seite 145-148.
- (47) Greene, G. F.; Kitadai, Y.; Pettaway, C. A.; von Eschenbach, A. C.; Bucana, C. D. und Fidler, I. J. (1997): Correlation of metastasis-related gene expression with metastatic potential in human prostate carcinoma cells implanted in nude mice using an in situ messenger RNA hybridization technique, *Am.J Pathol.* 150 [5], Seite 1571-1582.
- (48) Wilson, M. J.; Sellers, R. G.; Wiehr, C.; Melamud, O.; Pei, D. und Peehl, D. M. (2002): Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and their inhibitors, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2, in primary cultures of human prostatic stromal and epithelial cells, *J Cell Physiol* 191 [2], Seite 208-216.
- (49) Zhang, J.; Jung, K.; Lein, M.; Kristiansen, G.; Rudolph, B.; Hauptmann, S.; Schnorr, D.; Loening, S. A. und Lichtinghagen, R. (2002): Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in human primary cultured prostatic cells and malignant prostate cell lines, *Prostate* 50 [1], Seite 38-45.
- (50) Li, H.; Fang, W. und Zheng, J. (1998): [Zymographic analysis of MMPs in human carcinoma cell lines with different metastasis potential], *Zhonghua Bing.Li Xue.Za Zhi.* 27 [5], Seite 341-343.
- (51) Powell, W. C.; Fingleton, B.; Wilson, C. L.; Boothby, M. und Matrisian, L. M. (1999): The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis, *Curr.Biol.* 9 [24], Seite 1441-1447.

- (52) Sanchez-Sweatman, O. H.; Orr, F. W. und Singh, G. (2000): Human metastatic prostate PC3 cell lines degrade bone using matrix metalloproteinases [In Process Citation], *Invasion Metastasis* 18 [5-6], Seite 297-305.
- (53) Sternlicht, M. D.; Lochter, A.; Sympton, C. J.; Huey, B.; Rougier, J. P.; Gray, J. W.; Pinkel, D.; Bissell, M. J. und Werb, Z. (1999): The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis, *Cell* 98 [2], Seite 137-146.
- (54) Kolkhorst, V.; Sturzebecher, J. und Wiederanders, B. (1998): Inhibition of tumour cell invasion by protease inhibitors: correlation with the protease profile, *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* 124 [11], Seite 598-606.
- (55) Codony-Servat, J.; Albanell, J.; Lopez-Talavera, J. C.; Arribas, J. und Baselga, J. (1999): Cleavage of the HER2 ectodomain is a pervanadate-activable process that is inhibited by the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in breast cancer cells, *Cancer Res.* 59 [6], Seite 1196-1201.
- (56) Dong, J.; Opresko, L. K.; Dempsey, P. J.; Lauffenburger, D. A.; Coffey, R. J. und Wiley, H. S. (1999): Metalloprotease-mediated ligand release regulates autocrine signaling through the epidermal growth factor receptor, *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 96 [11], Seite 6235-6240.
- (57) Festuccia, C.; Bologna, M.; Vicentini, C.; Tacconelli, A.; Miano, R.; Violini, S. und Mackay, A. R. (1996): Increased matrix metalloproteinase-9 secretion in short-term tissue cultures of prostatic tumor cells, *Int.J Cancer* 69 [5], Seite 386-393.

- (58) Hamdy, F. C.; Fadlon, E. J.; Cottam, D.; Lawry, J.; Thurrell, W.; Silcocks, P. B.; Anderson, J. B.; Williams, J. L. und Rees, R. C. (1994): Matrix metalloproteinase 9 expression in primary human prostatic adenocarcinoma and benign prostatic hyperplasia, *Br J Cancer* 69 [1], Seite 177-182.
- (59) Knox, J. D.; Wolf, C.; McDaniel, K.; Clark, V.; Lorient, M.; Bowden, G. T. und Nagle, R. B. (1996): Matrilysin expression in human prostate carcinoma, *Mol.Carcinog.* 15 [1], Seite 57-63.
- (60) Stearns, M. und Stearns, M. E. (1996): Evidence for increased activated metalloproteinase 2 (MMP-2a) expression associated with human prostate cancer progression, *Oncol.Res.* 8 [2], Seite 69-75.
- (61) Stearns, M. E. und Stearns, M. (1996): Immunohistochemical studies of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2a) expression in human prostate cancer, *Oncol.Res.* 8 [2], Seite 63-67.
- (62) Still, K.; Robson, C. N.; Autzen, P.; Robinson, M. C. und Hamdy, F. C. (2000): Localization and quantification of mRNA for matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 (TIMP-2) in human benign and malignant prostatic tissue, *Prostate* 42 [1], Seite 18-25.
- (63) Wood, M.; Fudge, K.; Mohler, J. L.; Frost, A. R.; Garcia, F.; Wang, M. und Stearns, M. E. (1997): In situ hybridization studies of metalloproteinases 2 and 9 and TIMP-1 and TIMP-2 expression in human prostate cancer, *Clin.Exp.Metastasis* 15 [3], Seite 246-258.
- (64) Festuccia, C.; Giunciuglio, D.; Guerra, F.; Villanova, I.; Angelucci, A.; Manduca, P.; Teti, A.; Albini, A. und Bologna, M. (1999): Osteoblasts modulate secretion of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human prostate cancer cells promoting migration and matrigel invasion, *Oncol.Res.* 11 [1], Seite 17-31.

- (65) Hiraoka, N.; Allen, E.; Apel, I. J.; Gyetko, M. R. und Weiss, S. J. (1998): Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins, *Cell* 95 [3], Seite 365-377.
- (66) Masson, R.; Lefebvre, O.; Noel, A.; Fahime, M. E.; Chenard, M. P.; Wendling, C.; Kebers, F.; LeMeur, M.; Dierich, A.; Foidart, J. M.; Basset, P. und Rio, M. C. (1998): In vivo evidence that the stromelysin-3 metalloproteinase contributes in a paracrine manner to epithelial cell malignancy, *J.Cell Biol.* 140 [6], Seite 1535-1541.
- (67) McKerrow, J. H.; Bhargava, V.; Hansell, E.; Huling, S.; Kuwahara, T.; Matley, M.; Coussens, L. und Warren, R. (2000): A functional proteomics screen of proteases in colorectal carcinoma, *Mol.Med.* 6 [5], Seite 450-460.
- (68) Knox, J. D.; Bretton, L.; Lynch, T.; Bowden, G. T. und Nagle, R. B. (1998): Synthetic matrix metalloproteinase inhibitor, BB-94, inhibits the invasion of neoplastic human prostate cells in a mouse model, *Prostate* 35 [4], Seite 248-254.
- (69) Hofmann, U. B.; Westphal, J. R.; Zendman, A. J.; Becker, J. C.; Ruiters, D. J. und van Muijen, G. N. (2000): Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and its co-localization with membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) correlate with melanoma progression, *J Pathol.* 191 [3], Seite 245-256.
- (70) Zervos, E. E.; Shafii, A. E. und Rosemurgy, A. S. (1999): Matrix metalloproteinase (MMP) inhibition selectively decreases type II MMP activity in a murine model of pancreatic cancer, *J.Surg.Res.* 81 [1], Seite 65-68.
- (71) Lokeshwar, B. L. (1999): MMP inhibition in prostate cancer, *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 878, Seite 271-289.

- (72) Nemeth, J. A.; Yousif, R.; Herzog, M.; Che, M.; Upadhyay, J.; Shekarriz, B.; Bhagat, S.; Mullins, C.; Fridman, R. und Cher, M. L. (2002): Matrix metalloproteinase activity, bone matrix turnover, and tumor cell proliferation in prostate cancer bone metastasis, *J Natl.Cancer Inst.* 94 [1], Seite 17-25.
- (73) Sternlicht, M. D.; Bissell, M. J. und Werb, Z. (2000): The matrix metalloproteinase stromelysin-1 acts as a natural mammary tumor promoter, *Oncogene* 19 [8], Seite 1102-1113.
- (74) Fingleton, B. M.; Heppner Goss, K. J.; Crawford, H. C. und Matrisian, L. M. (1999): Matrilysin in early stage intestinal tumorigenesis, *APMIS* 107 [1], Seite 102-110.
- (75) Cockett, M. I.; Murphy, G.; Birch, M. L.; O'Connell, J. P.; Crabbe, T.; Millican, A. T.; Hart, I. R. und Docherty, A. J. (1998): Matrix metalloproteinases and metastatic cancer, *Biochem.Soc.Symp.* 63, Seite 295-313.
- (76) Parsons, S. L.; Watson, S. A.; Collins, H. M.; Griffin, N. R.; Clarke, P. A. und Steele, R. J. (1998): Gelatinase (MMP-2 and -9) expression in gastrointestinal malignancy, *Br.J.Cancer* 78 [11], Seite 1495-1502.
- (77) Lein, M.; Nowak, L.; Jung, K.; Koenig, F.; Schnorr, D. und Loening, S. A. (1998): [Metalloproteinases (MMP-1, MMP-3) and their inhibitors (TIMP) in blood plasma of patients with prostate carcinoma], *Urologe A* 37 [4], Seite 377-381.
- (78) Ahmad, A.; Hanby, A.; Dublin, E.; Poulsom, R.; Smith, P.; Barnes, D.; Rubens, R.; Anglard, P. und Hart, I. (1998): Stromelysin 3: an independent prognostic factor for relapse-free survival in node-positive breast cancer and demonstration of novel breast carcinoma cell expression, *Am.J Pathol.* 152 [3], Seite 721-728.

- (79) Reich, R.; Thompson, E. W.; Iwamoto, Y.; Martin, G. R.; Deason, J. R.; Fuller, G. C. und Miskin, R. (1988): Effects of inhibitors of plasminogen activator, serine proteinases, and collagenase IV on the invasion of basement membranes by metastatic cells, *Cancer Res.* 48 [12], Seite 3307-3312.
- (80) Davies, B.; Brown, P. D.; East, N.; Crimmin, M. J. und Balkwill, F. R. (1993): A synthetic matrix metalloproteinase inhibitor decreases tumor burden and prolongs survival of mice bearing human ovarian carcinoma xenografts [published erratum appears in *Cancer Res* 1993 Aug 1;53(15):3652], *Cancer Res.* 53 [9], Seite 2087-2091.
- (81) Santos, O.; McDermott, C. D.; Daniels, R. G. und Appelt, K. (1997): Rodent pharmacokinetic and anti-tumor efficacy studies with a series of synthetic inhibitors of matrix metalloproteinases, *Clin.Exp.Metastasis* 15 [5], Seite 499-508.
- (82) Shalinsky, D. R.; Brekken, J.; Zou, H.; Bloom, L. A.; McDermott, C. D.; Zook, S.; Varki, N. M. und Appelt, K. (1999): Marked antiangiogenic and antitumor efficacy of AG3340 in chemoresistant human non-small cell lung cancer tumors: single agent and combination chemotherapy studies, *Clin.Cancer Res.* 5 [7], Seite 1905-1917.
- (83) Bu, W.; Tang, Z. Y.; Sun, F. X.; Ye, S. L.; Liu, K. D.; Xue, Q.; Chen, J. und Gao, D. M. (1998): Effects of matrix metalloproteinase inhibitor BB-94 on liver cancer growth and metastasis in a patient-like orthotopic model LCI-D20, *Hepatogastroenterology.* 45 [22], Seite 1056-1061.
- (84) Giavazzi, R.; Garofalo, A.; Ferri, C.; Lucchini, V.; Bone, E. A.; Chiari, S.; Brown, P. D.; Nicoletti, M. I. und Taraboletti, G. (1998): Batimastat, a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases, potentiates the antitumor activity of cisplatin in ovarian carcinoma xenografts, *CLIN.CANC.RES.* 4/4 [985-992]-992.

- (85) Zervos, E. E.; Norman, J. G.; Gower, W. R.; Franz, M. G. und Rosemurgy, A. S. (1997): Matrix metalloproteinase inhibition attenuates human pancreatic cancer growth in vitro and decreases mortality and tumorigenesis in vivo, *J.Surg.Res.* 69 [2], Seite 367-371.
- (86) Sledge-GW, Jr; Qulali, M.; Goulet, R.; Bone, E. A. und Fife, R. (1995): Effect of matrix metalloproteinase inhibitor batimastat on breast cancer regrowth and metastasis in athymic mice, *J.Natl.Cancer Inst.* 87 [20], Seite 1546-1550.
- (87) Wang, X.; Fu, X.; Brown, P. D.; Crimmin, M. J. und Hoffman, R. M. (1994): Matrix metalloproteinase inhibitor BB-94 (batimastat) inhibits human colon tumor growth and spread in a patient-like orthotopic model in nude mice, *Cancer Res.* 54 [17], Seite 4726-4728.
- (88) Anderson, I. C.; Shipp, M. A.; Docherty, A. J. und Teicher, B. A. (1996): Combination therapy including a gelatinase inhibitor and cytotoxic agent reduces local invasion and metastasis of murine Lewis lung carcinoma, *Cancer Res.* 56 [4], Seite 715-718.
- (89) Macaulay, V. M.; O'Byrne, K. J.; Saunders, M. P.; Braybrooke, J. P.; Long, L.; Gleeson, F.; Mason, C. S.; Harris, A. L.; Brown, P. und Talbot, D. C. (1995): Phase I study of matrix metalloproteinase (MMP) inhibitor batimastat (BB-94) in patients with malignant pleural effusions., *Br J Cancer* 71(Suppl XXIV) [11(Abstr)].
- (90) Beattie, G. J., Young, H. A., and Smyth, J. F.:Phase I study of intraperitoneal metalloproteinase inhibitor BB-94 in patients with malignant ascites., 8th NCI-EORTC Symposium on New Drug Development, Amsterdam, March 1994.
- (91) Hidalgo, M. und Eckhardt, S. G. (2001): Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy, *J Natl.Cancer Inst.* 93 [3], Seite 178-193.
-

- (92) Rudek, M. A.; Figg, W. D.; Dyer, V.; Dahut, W.; Turner, M. L.; Steinberg, S. M.; Liewehr, D. J.; Kohler, D. R.; Pluda, J. M. und Reed, E. (2001): Phase I clinical trial of oral COL-3, a matrix metalloproteinase inhibitor, in patients with refractory metastatic cancer, *J.Clin.Oncol.* 19 [2], Seite 584-592.
- (93) Bayer Pharmaceutical Division: Bayer Halts Clinical Trials Evaluating MMPI. URL: www.bayerpharma-na.com/news/co0221.asp
- (94) Brown, P. D. und Giavazzi, R. (1995): Matrix metalloproteinase inhibition: a review of anti-tumour activity, *Ann.Oncol.* 6 [10], Seite 967-974.
- (95) Yip, D.; Ahmad, A.; Karapetis, C. S.; Hawkins, C. A. und Harper, P. G. (1999): Matrix metalloproteinase inhibitors: applications in oncology, *Invest New Drugs* 17 [4], Seite 387-399.
- (96) Heath, E. I. und Grochow, L. B. (2000): Clinical potential of matrix metalloprotease inhibitors in cancer therapy, *Drugs* 59 [5], Seite 1043-1055.
- (97) Coussens, L. M.; Fingleton, B. und Matrisian, L. M. (2002): Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations, *Science* 295 [5564], Seite 2387-2392.
- (98) Aparicio, T.; Kermorgant, S.; Dessirier, V.; Lewin, M. J. und Lehy, T. (1999): Matrix metalloproteinase inhibition prevents colon cancer peritoneal carcinomatosis development and prolongs survival in rats, *Carcinogenesis* 20 [8], Seite 1445-1451.
- (99) Low, J. A.; Johnson, M. D.; Bone, E. A. und Dickson, R. B. (1996): The matrix metalloproteinase inhibitor batimastat (BB-94) retards human breast cancer solid tumor growth but not ascites formation in nude mice, *Clin.Cancer Res.* 2 [7], Seite 1207-1214.

- (100) Eccles, S. A.; Box, G. M.; Court, W. J.; Bone, E. A.; Thomas, W. und Brown, P. D. (1996): Control of lymphatic and hematogenous metastasis of a rat mammary carcinoma by the matrix metalloproteinase inhibitor batimastat (BB-94), *Cancer Res.* 56 [12], Seite 2815-2822.
- (101) Watson, S. A.; Morris, T. M.; Robinson, G.; Crimmin, M. J.; Brown, P. D. und Hardcastle, J. D. (1995): Inhibition of organ invasion by the matrix metalloproteinase inhibitor batimastat (BB-94) in two human colon carcinoma metastasis models, *Cancer Res.* 55 [16], Seite 3629-3633.
- (102) Taraboletti, G.; Garofalo, A.; Belotti, D.; Drudis, T.; Borsotti, P.; Scanziani, E.; Brown, P. D. und Giavazzi, R. (1995): Inhibition of angiogenesis and murine hemangioma growth by batimastat, a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases, *J.Natl.Cancer Inst.* 87 [4], Seite 293-298.
- (103) Chirivi, R. G.; Garofalo, A.; Crimmin, M. J.; Bawden, L. J.; Stoppacciaro, A.; Brown, P. D. und Giavazzi, R. (1994): Inhibition of the metastatic spread and growth of B16-BL6 murine melanoma by a synthetic matrix metalloproteinase inhibitor, *Int.J.Cancer* 58 [3], Seite 460-464.
- (104) Jimenez, R. E.; Hartwig, W.; Antoniu, B. A.; Compton, C. C.; Warshaw, A. L. und Fernandez-Del Castillo, C. (2000): Effect of matrix metalloproteinase inhibition on pancreatic cancer invasion and metastasis: an additive strategy for cancer control, *Ann.Surg.* 231 [5], Seite 644-654.
- (105) Erba, E.; Ronzoni, S.; Bassano, L.; Giavazzi, R. und D'Incalci, M. (1999): The metalloproteinase inhibitor batimastat (BB-94) causes cell cycle phase perturbations in ovarian cancer cells, *Ann.Oncol.* 10 [5], Seite 589-591.

-
- (106) Tonn, J. C.; Kerkau, S.; Hanke, A.; Bouterfa, H.; Mueller, J. G.; Wagner, S.; Vince, G. H. und Roosen, K. (1999): Effect of synthetic matrix-metalloproteinase inhibitors on invasive capacity and proliferation of human malignant gliomas in vitro, *Int.J.Cancer* 80 [5], Seite 764-772.
- (107) Stonelake, P. S.; Jones, C. E.; Neoptolemos, J. P. und Baker, P. R. (1997): Proteinase inhibitors reduce basement membrane degradation by human breast cancer cell lines, *Br.J.Cancer* 75 [7], Seite 951-959.
- (108) Parvathy, S.; Oppong, S. Y.; Karran, E. H.; Buckle, D. R.; Turner, A. J. und Hooper, N. M. (1997): Angiotensin-converting enzyme secretase is inhibited by zinc metalloprotease inhibitors and requires its substrate to be inserted in a lipid bilayer, *Biochem.J.* 327 (Pt 1), Seite 37-43.
- (109) Beattie, G. J. und Smyth, J. F. (1998): Phase I study of intraperitoneal metalloproteinase inhibitor BB94 in patients with malignant ascites, *Clin.Cancer Res.* 4 [8], Seite 1899-1902.
- (110) Bramhall, S. R.; Hallissey, M. T.; Whiting, J.; Scholefield, J.; Tierney, G.; Stuart, R. C.; Hawkins, R. E.; McCulloch, P.; Maughan, T.; Brown, P. D.; Baillet, M. und Fielding, J. W. (2002): Marimastat as maintenance therapy for patients with advanced gastric cancer: a randomised trial, *Br J Cancer* 86 [12], Seite 1864-1870.
- (111) Lokeshwar, B. L.; Selzer, M. G.; Zhu, B. Q.; Block, N. L. und Golub, L. M. (2002): Inhibition of cell proliferation, invasion, tumor growth and metastasis by an oral non-antimicrobial tetracycline analog (COL-3) in a metastatic prostate cancer model, *Int.J Cancer* 98 [2], Seite 297-309.
- (112) Saad, F. Klotz L. Babaian R. Lacombe L. Champagne P. andDupont É.:Phase I/II trial on Æ-941 (Neovastat) in patients with metastatic refractory prostate cancer.URL:
www.aeterna.com/aeterna/ang/search/search.asp?P=1&str=prostate
-

- (113) Wilding, G., Small, E, and Collier, M. (5-15-1999):A phase I pharmacokinetic evaluation of the matrix metalloprotease (MMP) inhibitor AG3340 in combination with mitoxantrone and prednisone in patients with advanced prostate cancer Atlanta, GA.URL: www.conference-cast.com/asco/abstract_frame.htm
- (114) Boasberg, P., Harbaugh, Eisenberger, M., Harris, J, Langleben, A., Ahmann, F., Roth.B., Berkheimer, M., and Rasmussen, H.:Marimastat in patients with hormone refractory prostate cancer: a dose-finding study. (Abstr. No. 1126).URL: www.conference-cast.com/asco/abstract_frame.htm
- (115) Eisenberger, M., Sinibaldi, V., Laufer, M., Carducci, M., Miller, C., Boasberg, P., Ahmann, F., and Roth.B. (2000):Phase-I/+ Pharmacokinetic Evaluation of Marimastat in Patients (PTS) with Advanced Prostate Cancer (PC): Identificataion of the Biologically Acitve Dose. (19).
- (116) Stone, K. R.; Mickey, D. D.; Wunderli, H.; Mickey, G. H. und Paulson, D. F. (1978): Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145), Int.J Cancer 21 [3], Seite 274-281.
- (117) Horoszewicz, J. S; Leong, S S.; Chu, T. M.; Wajzman, Z. L.; Friedman, M.; Papsidero, L.; Kim, U.; Chai, L. S.; Kakati, S.; Arya, S. k. und Sandberg, A. A. (1980): The LNCaP Cell Line - A New Model for Studies on Human Prostatic Carcinoma, Murphy, G. P., Models for Prostate Cancer , Seite 115-132, New York.
- (118) Kaighn, M. E.; Lechner, J. F.; Babcock, M. S.; Marnell, M.; Ohnuki, Y. und Narayan, K. S. (1980): The Pasadena Cell Lines, Murphy, G. P., Models for prostate Cancer , Seite 85-109, New York.
- (119) Lubaroff, D. M.; Canfield, L. und Reynolds, C. W. (1980): The Dunning Tumors, Murphy, G. P., Models for Prostate Cancer , Seite 243-263, New York.

- (120) Lucia, M. S.; Bostwick, D. G.; Bosland, M.; Cockett, A. T.; Knapp, D. W.; Leav, I.; Pollard, M.; Rinker, Schaeffer C.; Shirai, T. und Watkins, B. A. (1998): Workgroup I: rodent models of prostate cancer, *Prostate* 36 [1], Seite 49-55.
- (121) Wikstrom, P.; Lindh, G.; Bergh, A. und Damber, J. E. (1999): Alterations of transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) and TGFbeta receptor expressions with progression in Dunning rat prostatic adenocarcinoma sublines, *Urol.Res.* 27 [3], Seite 185-193.
- (122) Blount, L. V. und Cooke, D. B., III (1996): Point mutations in the Ki-ras2 gene of codon 12 in the Dunning R-3327 Prostatic Adenocarcinoma system, *Prostate* 28 [1], Seite 44-50.
- (123) Rao, B. R.; Slotman, B. J.; Geldof, A. A. und Perez, C. A. (1991): Radiation sensitivity of Copenhagen rat prostatic carcinoma (R3327-AT and R3327-MATLyLu), *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.* 20 [5], Seite 981-985.
- (124) Smolev, J. K.; Heston, W. D.; Scott, W. W. und Coffey, D. S. (1977): Characterization of the Dunning R3327H prostatic adenocarcinoma: an appropriate animal model for prostatic cancer, *Cancer Treat.Rep.* 61 [2], Seite 273-287.
- (125) Tennant, T. R.; Kim, H.; Sokoloff, M. und Rinker-Schaeffer, C. W. (2000): The Dunning model, *Prostate* 43 [4], Seite 295-302.
- (126) Garde, S. V.; Sheth, A. R.; Porter, A. T. und Pienta, K. J. (1993): A comparative study on expression of prostatic inhibin peptide, prostate acid phosphatase and prostate specific antigen in androgen independent human and rat prostate carcinoma cell lines, *Cancer Lett.* 70 [3], Seite 159-166.

- (127) Isaacs, J. T. (1996): The R-3327 System of Rat Prostatic Cancers, *Urologic Oncology* 2 [4], Seite 115-116.
- (128) Isaacs, J. T.; Yu, G. W. und Coffey, D. S. (1981): The characterization of a newly identified, highly metastatic variety of Dunning R 3327 rat prostatic adenocarcinoma system: the MAT LyLu tumor, *Invest Urol.* 19 [1], Seite 20-23.
- (129) Haggstrom, S.; Wikstrom, P.; Bergh, A. und Damber, J. E. (1998): Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the rat ventral prostate and Dunning R3327 PAP adenocarcinoma before and after castration, *Prostate* 36 [2], Seite 71-79.
- (130) Steiner, M. S.; Zhou, Z. Z.; Tonb, D. C. und Barrack, E. R. (1994): Expression of transforming growth factor-beta 1 in prostate cancer, *Endocrinology* 135 [5], Seite 2240-2247.
- (131) Isaacs, J. T.; Isaacs, W. B.; Feitz, W. F. und Scheres, J. (1986): Establishment and characterization of seven Dunning rat prostatic cancer cell lines and their use in developing methods for predicting metastatic abilities of prostatic cancers, *Prostate* 9 [3], Seite 261-281.
- (132) Berridge, M. V.; Tan, A. S.; McCoy, K. D. und Wang, R. (1996): The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts, *Biochemica* 4, Seite 14-19.
- (133) Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro, Wolff A. und et, al (1991): Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines, *J.Natl.Cancer Inst.* 83 [11], Seite 757-766.

- (134) Plumb, J. A.; Milroy, R. und Kaye, S. B. (1989): Effects of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay, *Cancer Res.* 49 [16], Seite 4435-4440.
- (135) Romijn, J. C.; Verkoelen, C. F. und Schroeder, F. H. (1988): Application of the MTT assay to human prostate cancer cell lines in vitro: establishment of test conditions and assessment of hormone-stimulated growth and drug-induced cytostatic and cytotoxic effects, *Prostate* 12 [1], Seite 99-110.
- (136) Berridge, M. V. und Tan, A. S. (1993): Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction, *Arch.Biochem.Biophys.* 303 [2], Seite 474-482.
- (137) Skehan, P. (1998): *Cytotoxicity and Cell Growth Assays*, Celis, J. E., *Cell Biology* , Seite 313-318, ISBN: 0-12-164726-9.
- (138) Bank, U.; Reinhold, D. und Ansorge, S. (1991): Messung der zellulären Aktivität mit Hilfe des MTT-Farbttests, *Allerg Immunol* 37, Seite 119-123.
- (139) Sieuwerts, A. M.; Klijn, J. G.; Peters, H. A. und Foekens, J. A. (1995): The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival, *Eur.J.Clin.Chem.Clin.Biochem.* 33 [11], Seite 813-823.
- (140) Freshney, R. I. (2000): *Measurement of Viability and Cytotoxicity*, Freshney, R. I., *Culture of animal cells* , 3. Auflage, Seite 287-307.
- (141) Holst-Hansen, C. und Brunner, N. (1998): *MTT-Cell Proliferation Assay*, Celis, J. E., *Cell Biology* , 2. Auflage, Seite 16-18, ISBN: 0-12-164726-9.

- (142) Ravenna, L.; Lubrano, C.; Di, Silverio F.; Vacca, A.; Felli, M. P.; Maroder, M.; D'Eramo, G.; Sciarra, F.; Frati, L.; Gulino, A. und et, al (1995): Androgenic and antiandrogenic control on epidermal growth factor, epidermal growth factor receptor, and androgen receptor expression in human prostate cancer cell line LNCaP, *Prostate* 26 [6], Seite 290-298.
- (143) Watson, S. A.; Morris, T. M.; Parsons, S. L.; Steele, R. J. und Brown, P. D. (1996): Therapeutic effect of the matrix metalloproteinase inhibitor, batimastat, in a human colorectal cancer ascites model, *Br.J.Cancer* 74 [9], Seite 1354-1358.
- (144) Hanglow, A. C.; Lugo, A.; Walsky, R.; Finch-Arietta, M.; Lusch, L.; Visnick, M. und Fotouhi, N. (1993): Peptides based on the conserved predomain sequence of matrix metalloproteinases inhibit human stromelysin and collagenase, *Agents Actions* 39 Spec No, Seite C148-C150.
- (145) Jung, K.; Nowak, L.; Lein, M.; Priem, F.; Schnorr, D. und Loening, S. A. (1997): 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* 74 [2], Seite 220-223.
- (146) Baker, T.; Tickle, S.; Wasan, H.; Docherty, A.; Isenberg, D. und Waxman, J. (1994): Serum metalloproteinases and their inhibitors: markers for malignant potential, *Br J Cancer* 70 [3], Seite 506-512.
- (147) Boasberg, P., Harbaugh, B., Roth, B., Eisenberger, M., Langleben, A., Allen, R., and Rasmussen, H.: Marimastat, a novel matrix metalloproteinase inhibitor in patients with hormone-refractory prostate cancer (15). URL: www.asco.org/ac/1,1003,12-002489-00_18-001996-00_19-009282-00_28-00RESULTPAGE_00.asp
- (148) Shaffer, D. R. und Scher, H. I. (2003): Prostate cancer: a dynamic illness with shifting targets, *Lancet Oncol.* 4 [7], Seite 407-414.

- (149) Matsuura, E.; Umehara, F.; Hashiguchi, T.; Fujimoto, N.; Okada, Y. und Osame, M. (2000): Marked increase of matrix metalloproteinase 9 in cerebrospinal fluid of patients with fungal or tuberculous meningoencephalitis, *J Neurol.Sci.* 173 [1], Seite 45-52.
- (150) Zucker, S.; Hymowitz, M.; Conner, C.; Zarrabi, H. M.; Hurewitz, A. N.; Matrisian, L.; Boyd, D.; Nicolson, G. und Montana, S. (1999): Measurement of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in blood and tissues. Clinical and experimental applications, *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 878, Seite 212-227.
- (151) Jiang, Y.; Wang, M.; Celiker, M. Y.; Liu, Y. E.; Sang, Q. X.; Goldberg, I. D. und Shi, Y. E. (2001): Stimulation of mammary tumorigenesis by systemic tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 4 gene delivery, *Cancer Res.* 61 [6], Seite 2365-2370.
- (152) Hanemaaijer, R.; Verheijen, J. H.; Maguire, T. M.; Visser, H.; Toet, K.; McDermott, E.; O'Higgins, N. und Duffy, M. J. (2000): Increased gelatinase-A and gelatinase-B activities in malignant vs. benign breast tumors, *Int.J Cancer* 86 [2], Seite 204-207.
- (153) Kuniyasu, H.; Troncoso, P.; Johnston, D.; Bucana, C. D.; Tahara, E.; Fidler, I. J. und Pettaway, C. A. (2000): Relative expression of type IV collagenase, E-cadherin, and vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in prostatectomy specimens distinguishes organ-confined from pathologically advanced prostate cancers [In Process Citation], *Clin.Cancer Res.* 6 [6], Seite 2295-2308.
- (154) Nakanishi, K.; Kawai, T.; Sato, H.; Aida, S.; Kasamatsu, H.; Aurues, T. und Ikeda, T. (2000): Expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and of membrane-type-1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) in transitional cell carcinoma of the upper urinary tract, *Hum.Pathol.* 31 [2], Seite 193-200.

- (155) Maatta, M.; Soini, Y.; Liakka, A. und Autio-Harminen, H. (2000): Differential expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, and membrane type 1-MMP in hepatocellular and pancreatic adenocarcinoma: implications for tumor progression and clinical prognosis, *Clin.Cancer Res.* 6 [7], Seite 2726-2734.
- (156) Upadhyay, J.; Shekarriz, B.; Nemeth, J. A.; Dong, Z.; Cummings, G. D.; Fridman, R.; Sakr, W.; Grignon, D. J. und Cher, M. L. (1999): Membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and MMP-2 immunolocalization in human prostate: change in cellular localization associated with high-grade prostatic intraepithelial neoplasia, *Clin.Cancer Res.* 5 [12], Seite 4105-4110.
- (157) Vaisanen, A.; Kallioinen, M.; Taskinen, P. J. und Turpeenniemi, Hujanen T. (1998): Prognostic value of MMP-2 immunoreactive protein (72 kD type IV collagenase) in primary skin melanoma, *J.Pathol.* 186 [1], Seite 51-58.
- (158) Bando, E.; Yonemura, Y.; Endou, Y.; Sasaki, T.; Taniguchi, K.; Fujita, H.; Fushida, S.; Fujimura, T.; Nishimura, G.; Miwa, K. und Seiki, M. (1998): Immunohistochemical study of MT-MMP tissue status in gastric carcinoma and correlation with survival analyzed by univariate and multivariate analysis, *Oncol.Rep.* 5 [6], Seite 1483-1488.
- (159) Etoh, T.; Inoue, H.; Yoshikawa, Y.; Barnard, G. F.; Kitano, S. und Mori, M. (2000): Increased expression of collagenase-3 (MMP-13) and MT1-MMP in oesophageal cancer is related to cancer aggressiveness, *Gut* 47 [1], Seite 50-56.
- (160) Moser, P. L.; Kieback, D. G.; Hefler, L.; Tempfer, C.; Neunteufel, W. und Gitsch, G. (1999): Immunohistochemical detection of matrix metalloproteinases (MMP) 1 and 2, and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP 2) in stage IB cervical cancer, *Anticancer Res.* 19 [5C], Seite 4391-4393.
-

- (161) Yamashita, K.; Tanaka, Y.; Mimori, K.; Inoue, H. und Mori, M. (2004): Differential expression of MMP and uPA systems and prognostic relevance of their expression in esophageal squamous cell carcinoma, *Int.J Cancer* 110 [2], Seite 201-207.
- (162) Chenard, M. P.; O'Siorain, L.; Shering, S.; Rouyer, N.; Lutz, Y.; Wolf, C.; Basset, P.; Bellocq, J. P. und Duffy, M. J. (1996): High levels of stromelysin-3 correlate with poor prognosis in patients with breast carcinoma, *Int.J Cancer* 69 [6], Seite 448-451.
- (163) Jones, J. L.; Glynn, P. und Walker, R. A. (1999): Expression of MMP-2 and MMP-9, their inhibitors, and the activator MT1-MMP in primary breast carcinomas, *J Pathol.* 189 [2], Seite 161-168.
- (164) Powe, D. G.; Brough, J. L.; Carter, G. I.; Bailey, E. M.; Stetler-Stevenson, W. G.; Turner, D. R. und Hewitt, R. E. (1997): TIMP-3 mRNA expression is regionally increased in moderately and poorly differentiated colorectal adenocarcinoma, *Br J Cancer* 75 [11], Seite 1678-1683.
- (165) Joo, Y. E.; Seo, K. S.; Kim, H. S.; Rew, J. S.; Park, C. S. und Kim, S. J. (2000): Expression of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in gastric cancer, *Dig.Dis.Sci* 45 [1], Seite 114-121.
- (166) Michael, M.; Babic, B.; Khokha, R.; Tsao, M.; Ho, J.; Pintilie, M.; Leco, K.; Chamberlain, D. und Shepherd, F. A. (1999): Expression and prognostic significance of metalloproteinases and their tissue inhibitors in patients with small-cell lung cancer, *J Clin.Oncol.* 17 [6], Seite 1802-1808.
- (167) Kossakowska, A. E.; Urbanski, S. J. und Edwards, D. R. (1991): Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) RNA is expressed at elevated levels in malignant non-Hodgkin's lymphomas, *Blood* 77 [11], Seite 2475-2481.

- (168) McCarthy, K.; Maguire, T.; McGreal, G.; McDermott, E.; O'Higgins, N. und Duffy, M. J. (1999): High levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 predict poor outcome in patients with breast cancer, *Int.J Cancer* 84 [1], Seite 44-48.
- (169) Zeng, Z. S.; Cohen, A. M.; Zhang, Z. F.; Stetler-Stevenson, W. und Guillem, J. G. (1995): Elevated tissue inhibitor of metalloproteinase 1 RNA in colorectal cancer stroma correlates with lymph node and distant metastases, *Clin.Cancer Res.* 1 [8], Seite 899-906.
- (170) Holten-Andersen, M. N.; Stephens, R. W.; Nielsen, H. J.; Murphy, G.; Christensen, I. J.; Stetler-Stevenson, W. und Brunner, N. (2000): High preoperative plasma tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels are associated with short survival of patients with colorectal cancer, *Clin.Cancer Res.* 6 [11], Seite 4292-4299.
- (171) Ylisirnio, S.; Hoyhtya, M. und Turpeenniemi-Hujanen, T. (2000): Serum matrix metalloproteinases -2, -9 and tissue inhibitors of metalloproteinases -1, -2 in lung cancer--TIMP-1 as a prognostic marker, *Anticancer Res.* 20 [2B], Seite 1311-1316.
- (172) Davidson, B.; Goldberg, I.; Kopolovic, J.; Lerner-Geva, L.; Gotlieb, W. H.; Ben Baruch, G. und Reich, R. (1999): MMP-2 and TIMP-2 expression correlates with poor prognosis in cervical carcinoma--a clinicopathologic study using immunohistochemistry and mRNA in situ hybridization, *Gynecol.Oncol.* 73 [3], Seite 372-382.
- (173) Tutton, M. G.; George, M. L.; Eccles, S. A.; Burton, S.; Swift, R. I. und Abulafi, A. M. (2003): Use of plasma MMP-2 and MMP-9 levels as a surrogate for tumour expression in colorectal cancer patients, *Int.J Cancer* 107 [4], Seite 541-550.

- (174) Lein, M.; Jung, K.; Laube, C.; Hubner, T.; Winkelmann, B.; Stephan, C.; Hauptmann, S.; Rudolph, B.; Schnorr, D. und Loening, S. A. (2000): Matrix-metalloproteinases and their inhibitors in plasma and tumor tissue of patients with renal cell carcinoma, *Int.J Cancer* 85 [6], Seite 801-804.
- (175) Giannelli, G.; Erriquez, R.; Fransvea, E.; Daniele, A.; Trerotoli, P.; Schittulli, F.; Grano, M.; Quaranta, M. und Antonaci, S. (2004): Proteolytic imbalance is reversed after therapeutic surgery in breast cancer patients, *Int.J Cancer* 109 [5], Seite 782-785.
- (176) Rudolph-Owen, L. A.; Chan, R.; Muller, W. J. und Matrisian, L. M. (1998): The matrix metalloproteinase matrilysin influences early-stage mammary tumorigenesis, *Cancer Res.* 58 [23], Seite 5500-5506.
- (177) Witty, J. P.; Wright, J. H. und Matrisian, L. M. (1995): Matrix metalloproteinases are expressed during ductal and alveolar mammary morphogenesis, and misregulation of stromelysin-1 in transgenic mice induces unscheduled alveolar development, *Mol.Biol.Cell* 6 [10], Seite 1287-1303.
- (178) Albini, A.; Melchiori, A.; Santi, L.; Liotta, L. A.; Brown, P. D. und Stetler, Stevenson WG (1991): Tumor cell invasion inhibited by TIMP-2 [see comments], *J.Natl.Cancer Inst.* 83 [11], Seite 775-779.
- (179) Baker, A. H.; George, S. J.; Zaltsman, A. B.; Murphy, G. und Newby, A. C. (1999): Inhibition of invasion and induction of apoptotic cell death of cancer cell lines by overexpression of TIMP-3, *Br.J.Cancer* 79 [9-10], Seite 1347-1355.
- (180) Buck, T. B.; Yoshiji, H.; Harris, S. R.; Bunce, O. R. und Thorgeirsson, U. P. (1999): The effects of sustained elevated levels of circulating tissue inhibitor of metalloproteinases-1 on the development of breast cancer in mice, *Ann.N Y.Acad.Sci* 878, Seite 732-735.
-

- (181) Guedez, L.; McMarlin, A. J.; Kingma, D. W.; Bennett, T. A.; Stetler-Stevenson, M. und Stetler-Stevenson, W. G. (2001): Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 alters the tumorigenicity of Burkitt's lymphoma via divergent effects on tumor growth and angiogenesis, *Am.J Pathol.* 158 [4], Seite 1207-1215.
- (182) Yoshiji, H.; Buck, T. B.; Harris, S. R.; Ritter, L. M.; Lindsay, C. K. und Thorgeirsson, U. P. (1998): Stimulatory effect of endogenous tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) overexpression on type IV collagen and laminin gene expression in rat mammary carcinoma cells, *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 247 [3], Seite 605-609.
- (183) Gross, J. und Lapierre, C. M. (1962): Collagenolytic Activity in Amphibian Tissues: A Tissue Culture Assay, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 48, Seite 1014-1022.
- (184) Cheng, L.; Mantile, G.; Pauly, R.; Nater, C.; Felici, A.; Monticone, R.; Bilato, C.; Gluzband, Y. A.; Crow, M. T.; Stetler, Stevenson W. und Capogrossi, M. C. (1998): Adenovirus-mediated gene transfer of the human tissue inhibitor of metalloproteinase-2 blocks vascular smooth muscle cell invasiveness in vitro and modulates neointimal development in vivo, *Circulation* 98 [20], Seite 2195-2201.
- (185) Melchiori, A.; Albin, A.; Ray, J. M. und Stetler-Stevenson, W. G. (1992): Inhibition of tumor cell invasion by a highly conserved peptide sequence from the matrix metalloproteinase enzyme prosegment, *Cancer Res.* 52 [8], Seite 2353-2356.
- (186) Itoh, T.; Tanioka, M.; Yoshida, H.; Yoshioka, T.; Nishimoto, H. und Itohara, S. (1998): Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice, *Cancer Res.* 58 [5], Seite 1048-1051.

- (187) Nabeshima, K.; Inoue, T.; Shima, Y.; Kataoka, H. und Kono, M. (1999): Cohort migration of carcinoma cells: differentiated colorectal carcinoma cells move as coherent cell clusters or sheets, *Histol.Histopathol.* 14 [4], Seite 1183-1197.
- (188) Nabeshima, K.; Inoue, T.; Shima, Y.; Okada, Y.; Ito, Y.; Seiki, M. und Kono, M. (2000): Front-cell-specific expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and gelatinase A during cohort migration of colon carcinoma cells induced by hepatocyte growth factor/scatter factor, *Cancer Res.* 60 [13], Seite 3364-3369.
- (189) Legrand, C.; Gilles, C.; Zahm, J. M.; Polette, M.; Buisson, A. C.; Kaplan, H.; Birembaut, P. und Tournier, J. M. (1999): Airway epithelial cell migration dynamics. MMP-9 role in cell-extracellular matrix remodeling, *J Cell Biol.* 146 [2], Seite 517-529.
- (190) Moses, M. A. (1997): The regulation of neovascularization of matrix metalloproteinases and their inhibitors, *Stem.Cells* 15 [3], Seite 180-189.
- (191) Yu, Q. und Stamenkovic, I. (2000): Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis, *Genes Dev.* 14 [2], Seite 163-176.
- (192) Bergers, G.; Brekken, R.; McMahon, G.; Vu, T. H.; Ito, T.; Tamaki, K.; Tazawa, K.; Thorpe, P.; Ito, S.; Werb, Z. und Hanahan, D. (2000): Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis, *Nat.Cell Biol.* 2 [10], Seite 737-744.
- (193) Cornelius, L. A.; Nehring, L. C.; Harding, E.; Bolanowski, M.; Welgus, H. G.; Kobayashi, D. K.; Pierce, R. A. und Shapiro, S. D. (1998): Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization, *J.Immunol.* 161 [12], Seite 6845-6852.

- (194) Fernandez, H. A.; Kallenbach, K.; Seghezzi, G.; Grossi, E.; Colvin, S.; Schneider, R.; Mignatti, P. und Galloway, A. (1999): Inhibition of endothelial cell migration by gene transfer of tissue inhibitor of metalloproteinases-1, *J Surg.Res.* 82 [2], Seite 156-162.
- (195) Murphy, A. N.; Unsworth, E. J. und Stetler-Stevenson, W. G. (1993): Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits bFGF-induced human microvascular endothelial cell proliferation, *J Cell Physiol* 157 [2], Seite 351-358.
- (196) Anand-Apte, B.; Pepper, M. S.; Voest, E.; Montesano, R.; Olsen, B.; Murphy, G.; Apte, S. S. und Zetter, B. (1997): Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase-3, *Invest Ophthalmol.Vis.Sci* 38 [5], Seite 817-823.
- (197) Yoshiji, H.; Harris, S. R.; Raso, E.; Gomez, D. E.; Lindsay, C. K.; Shibuya, M.; Sinha, C. C. und Thorgeirsson, U. P. (1998): Mammary carcinoma cells over-expressing tissue inhibitor of metalloproteinases-1 show enhanced vascular endothelial growth factor expression, *Int.J Cancer* 75 [1], Seite 81-87.
- (198) Yamada, E.; Tobe, T.; Yamada, H.; Okamoto, N.; Zack, D. J.; Werb, Z.; Soloway, P. D. und Campochiaro, P. A. (2001): TIMP-1 promotes VEGF-induced neovascularization in the retina, *Histol.Histopathol.* 16 [1], Seite 87-97.
- (199) Newell, K. J.; Matrisian, L. M. und Driman, D. K. (2002): Matrilysin (matrix metalloproteinase-7) expression in ulcerative colitis-related tumorigenesis, *Mol.Carcinog.* 34 [2], Seite 59-63.
- (200) Yamamoto, H.; Iku, S.; Adachi, Y.; Imsumran, A.; Taniguchi, H.; Noshio, K.; Min, Y.; Horiuchi, S.; Yoshida, M.; Itoh, F. und Imai, K. (2003): Association of trypsin expression with tumour progression and matrilysin expression in human colorectal cancer, *J Pathol.* 199 [2], Seite 176-184.

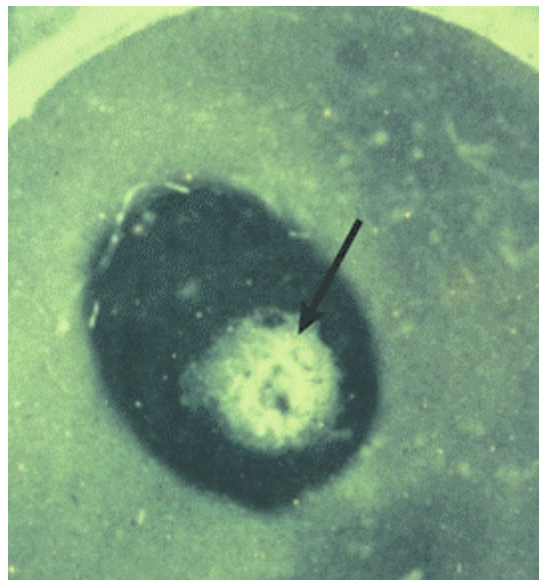
- (201) Baker, E. A. und Leaper, D. J. (2003): The plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in colorectal cancer: relationship to tumour pathology, *Eur.J Cancer* 39 [7], Seite 981-988.
- (202) Murray, G. I.; Duncan, M. E.; O'Neil, P.; Melvin, W. T. und Fothergill, J. E. (1996): Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in colorectal cancer, *Nat.Med* 2 [4], Seite 461-462.
- (203) Davidson, B.; Goldberg, I.; Kopolovic, J.; Lerner-Geva, L.; Gotlieb, W. H.; Weis, B.; Ben Baruch, G. und Reich, R. (1999): Expression of matrix metalloproteinase-9 in squamous cell carcinoma of the uterine cervix-clinicopathologic study using immunohistochemistry and mRNA in situ hybridization, *Gynecol.Oncol.* 72 [3], Seite 380-386.
- (204) Sheu, B. C.; Hsu, S. M.; Ho, H. N.; Lien, H. C.; Huang, S. C. und Lin, R. H. (2001): A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression, *Cancer Res.* 61 [1], Seite 237-242.
- (205) Sheu, B. C.; Lien, H. C.; Ho, H. N.; Lin, H. H.; Chow, S. N.; Huang, S. C. und Hsu, S. M. (2003): Increased expression and activation of gelatinolytic matrix metalloproteinases is associated with the progression and recurrence of human cervical cancer, *Cancer Res.* 63 [19], Seite 6537-6542.
- (206) Martignetti, J. A.; Aqeel, A. A.; Sewairi, W. A.; Boumah, C. E.; Kambouris, M.; Mayouf, S. A.; Sheth, K. V.; Eid, W. A.; Dowling, O.; Harris, J.; Glucksman, M. J.; Bahabri, S.; Meyer, B. F. und Desnick, R. J. (2001): Mutation of the matrix metalloproteinase 2 gene (MMP2) causes a multicentric osteolysis and arthritis syndrome, *Nat.Genet.* 28 [3], Seite 261-265.
- (207) Trudel, D.; Fradet, Y.; Meyer, F.; Harel, F. und Tetu, B. (2003): Significance of MMP-2 expression in prostate cancer: an immunohistochemical study, *Cancer Res.* 63 [23], Seite 8511-8515.

- (208) Lichtinghagen, R.; Musholt, P. B.; Stephan, C.; Lein, M.; Kristiansen, G.; Hauptmann, S.; Rudolph, B.; Schnorr, D.; Loening, S. A. und Jung, K. (2003): mRNA expression profile of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in malignant and non-malignant prostatic tissue, *Anticancer Res.* 23 [3B], Seite 2617-2624.
- (209) Jung, K.; Krell, H. W.; Ortel, B.; Hasan, T.; Romer, A.; Schnorr, D.; Loening, S. A. und Lein, M. (2003): Plasma matrix metalloproteinase 9 as biomarker of prostate cancer progression in Dunning (Copenhagen) rats, *Prostate* 54 [3], Seite 206-211.

Anhang

Eine Froschtaile, initialisierte das Forschungsgebiet der MMP.

Gross und Lapiere entdeckten 1962, daß ein dünnes Querschnittssegment einer Kaulquappe eine **Auflage** aus Kollagen in der Kulturschale auflösen kann (schwarzer Pfeil). Der lytische Prozess präsentiert sich in Form weißer Kollagenelemente über dem Areal des Querschnittssegmentes mit der stärksten MMP-Aktivität. Das Bild wurde von John Jeffrey (†) angefertigt und freundlicherweise von Lynn Matrisian, beide Vanderbilt University, USA, zur Verfügung gestellt.



Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Michael Lein für die Ermöglichung dieser Dissertation und der stets freundlichen und hilfsbereiten Unterstützung.

Herr PD Dr. Michael Lein hat mit seiner konstruktiven Beratung sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt ebenfalls Prof. Dr. med. Klaus Jung für die zu jeder Zeit geduldige Mitbetreuung dieser Dissertation und die anhaltende Bereitschaft zum Diskurs über das wissenschaftliche Arbeitsgebiet, das dieser Arbeit zugrunde liegt.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Frau Marianne Scholz und Frau Silke Klotzek sowie bei allen anderen Mitarbeitern der Urologischen Forschungsabteilung der Charité für die Unterstützung bei den Labortätigkeiten.

Meiner Freundin, Lebensgefährtin und Partnerin Frau Dr. med. Anja Mundhenk danke ich besonders für die Unterstützung während der gesamten Promotionszeit.

Ein besonderer Dank gilt auch meinen Eltern und Brüdern für Ihre Unterstützung während meines Studiums, der Promotions- und AiP-Zeit.

Lebenslauf

Name : Dietmar Borchert
Geburtsdatum : 23. Februar 1971
Geburtsort : Freiburg im Breisgau
Anschrift : Paul - Robeson - Str. 12, 10439 Berlin
Staatsangehörigkeit : deutsch

Schulbildung

1981 - 1990 : Theodor - Heuss - Gymnasium Freiburg i. Brsg.
1990 : Abitur
1990 - 1992 : Ausbildung zum Zimmermann
1993 : selbständige Tätigkeit als Zimmermann
1993 - 1995 : Ausbildung zum Krankenpfleger an der Charité
1995 - 2002 : Studium der Humanmedizin
an der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt Universität zu Berlin
2002 - 2004 : Arzt im Praktikum, Viszeral - und
Transplantationschirurgie, Charité Campus Virchow,
Humboldt Universität zu Berlin
06/2004 - 02/2005 : Senior House officer, Transplant Surgery,
Addenbrookes Hospital, Cambridge

Eidstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich mit meinem Ehrenwort, daß die vorliegende Dissertationsschrift selbständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter von mir verfaßt wurde. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Berlin, im Juni 2004

Dietmar Borchert