

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

DISSERTATION

„Effekt von Estramustin und Etoposid in Kombination mit dem
synthetisch entwickelten Matrix-Metalloproteinase-Inhibitor ICOL-51
auf das Wachstum des Dunning-Tumors
in vivo und in vitro“

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Herrn Winfried Rothaug
aus Stuttgart

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M. Lein

2. Prof. Dr. med. T. Tschernig

3. PD. Dr. med. M. Schrader

Datum der Promotion: 1.6.2008

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Epidemiologie des Prostatakarzinoms.....	1
1.2	Das Prostatakarzinom.....	2
1.2.1	Diagnostik des Prostatakarzinoms.....	2
1.2.2	Therapieprinzipien.....	3
1.2.3	Therapie des lokalen Prostatakarzinoms.....	3
1.2.4	Therapie des metastasierten Prostatakarzinoms.....	4
1.2.5	Entstehung des hormonrefraktären Prostatakarzinoms.....	5
1.3	Zytostatika beim Prostatakarzinom.....	6
1.3.1	Estramustin.....	6
1.3.2	Etoposid.....	7
1.3.3	Taxane.....	7
1.4	Matrixmetalloproteinasen.....	7
1.4.1	Funktion der MMP.....	7
1.4.2	Struktur und Regulation der MMP.....	9
1.4.3	Struktur der MMP.....	10
1.4.4	Regulation der MMP durch deren Inhibitoren.....	13
1.5	Aktivität und Expression von MMP und TIMP.....	14
1.5.1	Untersuchung in der Zelle.....	14
1.5.2	Untersuchung im Gewebeverband.....	15
1.5.3	Tiermodelle.....	16
1.5.4	Mensch.....	17
1.6	Einsatz von synthetischen Inhibitoren der MMP.....	17
1.6.1	Synthetische MMPI im Tiermodell.....	17
1.6.2	Synthetische MMPI in klinischen Studien.....	18
1.7	Mat-LyLu-Zelllinien und Tiermodell.....	18
2.	Zielsetzung der Arbeit.....	20

3.	Material und Methoden.....	21
3.1	Geräte und Medikamente.....	21
3.2	Tumorzelllinie Kulturmedien und Bearbeitung.....	21
3.2.1	Verdünnungsreihen der eingesetzten Medikamente.....	24
3.3	Bestimmung der Zellproliferation mittels XTT-Test.....	25
3.4	Tierexperimentelle Untersuchung.....	25
3.4.1	Tumormodell und Gruppeneinteilung.....	26
3.4.2	Therapieverlauf.....	27
3.4.2.1	Estramustin und Etoposid Behandlung.....	27
3.4.2.2	Etoposid und ICOL-51 Behandlung.....	28
3.4.4	Organentnahme.....	29
3.5	Statistische Auswertung.....	29
4.	Ergebnisse.....	30
4.1	Untersuchung an der MatLyLu-Zellreihe in vitro.....	30
4.1.1	Wirkung von Estramustin als Monotherapie.....	30
4.1.2	Wirkung von Etoposid als Monotherapie	32
4.1.3	Wirkung von Estramustin und Etoposid in Kombination.....	33
4.1.4	Wirkung von Estramustin und ICOL-51 in Kombination.....	35
4.1.5	Wirkung von Etoposid und ICOL-51 in Kombination.....	37
4.2	Untersuchung am Tiermodell.....	40
4.2.1	Wirksamkeit von Estramustin und Etoposid am etablierten Tumor.....	40
4.2.2	Wirksamkeit von ICOL-51 und Etoposid am etablierten Tumor.....	42
5.	Diskussion.....	46
5.1	Untersuchung an der MatLyLu-Zellreihe in vitro.....	46
5.2	Untersuchung am Tiermodell.....	49
6.	Zusammenfassung.....	57
7.	Literaturverzeichnis.....	59

Abkürzungsverzeichnis

CT	Computertomographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonuclein Acid
DPBS	Dulbeccos phosphat-gepufferte Salzlösung
DRU	digitale rektale Untersuchung
EZM	extrazellulär Matrix
FKS	Fetales Kälberserum
HRT	Hormone Replacement Therapy
i.p.	intraperitoneal
KG	Körpergewicht
LH-RH	Luteinisierendes Hormon Releasing Hormon
MLL	MatLyLu Tumorzelllinie
mm ³	Kubikmillimeter
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MMPI	Matrixmetalloproteinase Inhibitor
MRT	Magnetresonanztomographie
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCa	Prostatakarzinom
PSA	Prostataspezifisches Antigen
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
TRUS	transrektaler Ultraschall
U/ml	Units pro Milliliter
VEGF	Vascular endothelium growth factor

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie des Prostatakarzinoms

Das Prostatakarzinom (PCa) ist der häufigste maligne Tumor des Mannes. Er wird meistens zwischen dem fünfzigsten und siebzigsten Lebensjahr diagnostiziert und steht in der Krebsmortalität bei Männern an 2. Stelle. Für das Jahr 2007 werden in den USA 218890 Neuerkrankungen und 27050 Todesfälle an dieser Tumorentität erwartet (1).

Das Prostatakarzinom ist eine Erkrankung mit epidemischem Ausmass. Ätiologische Faktoren und genaue Pathogenese sind zwar vielfältig untersucht, jedoch ist die genaue Ursache unbekannt. Als mögliche Faktoren werden neben genetischen Einflüssen auch der Fettgehalt der Nahrung, Cadmium- und Zinkexposition diskutiert. Die benigne Prostatahypertrophie ist hingegen kein Risikofaktor. Genetische Aberrationen mit chromosomalen Veränderungen werden beschrieben, sind aber in ihrer klinischen Bedeutung nicht gesichert (2,3). Die Therapie des PCa richtet sich nach dem Tumorstadium, dem Alter und des klinischen Zustandes des Patienten. Mittel der Wahl sind beim lokal begrenzten, nicht metastasierten PCa die radikale Prostatektomie bzw. die lokale Strahlentherapie. In fortgeschrittenem Tumorstadium ist die antiandrogene Hormonblockade eine anerkannte, jedoch limitierte Therapie zur Hemmung des Krankheitsprogresses. Die Hormontherapie ist eine nicht kurative Behandlungsmethode, die Patienten sterben letztlich an der fortgeschrittenen Tumorerkrankung im hormonrefraktären Stadium. Deshalb ist es notwendig weitere Therapiemöglichkeiten für das hormonrefraktäre Prostatakarzinom zu entwickeln.

1.2 Das Prostatakarzinom

1.2.1 Diagnostik des Prostatakarzinoms

Für die Diagnose und Früherkennung eines Prostatakarzinoms wird die digitale rektale Untersuchung (DRU), der transrektale Ultraschall (TRUS) und die Bestimmung des prostataspezifischen Antigens (PSA) im Serum eingesetzt. Die DRU war bis in die 80er Jahre das einzige akzeptierte Verfahren der Früherkennungsuntersuchung. Seit der Entdeckung und Einführung des PSA Ende der 80er Jahre ist die Markerbestimmung im Serum fester Bestandteil in der Diagnostik des Prostatakarzinoms. Wegen der eingeschränkten Detektionsfähigkeit des TRUS wird bei Männern ab dem 50. Lebensjahr die DRU zusammen mit der Bestimmung des PSA als Früherkennungsverfahren empfohlen. Inzwischen werden etwa 90% der neu entdeckten Fälle bereits im lokalisierten Krankheitsstadium diagnostiziert (4). Einen entscheidenden Anteil an dieser Entwicklung hat die PSA-Bestimmung. Bei Verdacht auf das Vorliegen eines Prostatakarzinoms durch erhöhtes PSA und/oder einen suspekten Tastbefund wird zur histologischen Diagnosesicherung eine Ultraschall-gestützte Prostatastanziobiopsie durchgeführt. Nach histologischer Sicherung des Prostatakarzinoms wird eine Ausbreitungsdiagnostik durchgeführt.

Die Knochenmetastasendiagnostik erfolgt in erster Linie mittels 99m Technetium-Diphosphat-Knochenszintigraphie. Ergänzend können bei unsicheren bzw. unklaren Knochenszintigraphieergebnissen konventionelle Röntgenzielaufnahmen, CT- oder MRT-Aufnahmen gemacht werden. Die offene oder laparoskopische Lymphadenektomie wird zum Ausschluss oder Nachweis von Lymphknotenmetastasen durchgeführt. Durch die oben genannten Früherkennungsuntersuchungen kann ein Grossteil der Prostatakarzinome im frühen Stadium erkannt und die Patienten einem potentiell kurativem Therapieregime unterzogen werden. Patienten mit einer primären Metastasierung oder mit systemischem Progress nach lokaler Therapie werden mit einer antiandrogenen Hormontherapie behandelt.

1.2.2 Therapieprinzipien

Abhängig vom Tumorstadium, Alter, Allgemeinzustand und vom Wunsch des Patienten wird die Therapieentscheidung getroffen. Die Prognose der Erkrankung korreliert im allgemeinen mit der lokalen Tumorausdehnung, bezogen auf die Kapsel und dem Auftreten metastatischer Absiedlungen in Lymphknoten und Knochen, sowie mit dem Gleason-Score bzw. Grading und dem PSA. Voraussetzung für den lokalen, kurativen Therapieansatz ist der Ausschluss einer Metastasierung. Patienten mit einem systemischen Progress nach lokaler Therapie, bzw. Patienten mit primär metastasierten PCa werden der antiandrogenen Hormontherapie zugeführt. Als weitere Therapieoptionen nach Krankheitsprogression unter antiandrogener Therapie stehen Zytostatika wie Estramustinphosphat oder Doxetaxel zu Verfügung.

1.2.3 Therapie des lokalen Prostatakarzinoms

Die Frühentdeckung des Prostatakarzinoms ist durch das PSA deutlich verbessert worden. So sind die meisten Prostatakarzinome bei Erstdiagnose lokal begrenzt (4), entsprechend ist ein kurativer Therapieansatz möglich. Dafür kommen die radikale Prostatektomie sowie die Strahlentherapie in Frage. Der operative Zugang erfolgt über einen perinealen oder retropubischen bzw. laparoskopischen Zugang. Alternativ kann eine lokale Hochdosis- oder Niedrigdosis Strahlentherapie eingesetzt werden. In bestimmten Situationen mit geringer Progressionswahrscheinlichkeit kann eine Verlaufsbeobachtung der Krankheit erfolgen (5). Bei kapselinfiltrierendem Prozess und vorliegenden Risikofaktoren (hohes Alter, Multimorbidität, Lebenserwartung <10 Jahre), ist die Strahlentherapie verglichen mit operativen Vorgehen eine gute Alternative. Die progressionsfreie tumorspezifische 10-Jahres-Überlebensrate liegt für das lokale, organbegrenzte PCa ohne Kapselinfiltration (pT2) nach erfolgreicher radikaler Prostatektomie bei etwa 80 bis 90% (6). Bei kapselinfiltrierendem Prozess (pT3) sinkt die 10-Jahres-Überlebensrate auf 35-55%. Ebenfalls zeigen sich 30-50% der klinisch als lokal

begrenzt diagnostizierten Tumore (T2) nach histologischer Begutachtung des Operationspräparates als lokal fortgeschritten (pT3) (6). Patienten mit Krankheitsprogress nach radikaler Prostatektomie oder Strahlentherapie werden nachfolgend mit einer antiandrogener Hormontherapie behandelt. Bei dieser Patientengruppe und bei primär metastasiertem PCa kann sich der Einsatz von Matrix Metalloproteinase Inhibitoren (MMPI) in Zukunft als nützlich erweisen.

1.2.4 Therapie des metastasierten Prostatakarzinoms

Das metastasierte Prostatakarzinom ist gegenwärtig nicht heilbar. Ziel der antiandrogenen Hormontherapie ist primär, Symptome, die durch den Tumorprogress auftreten, z.B. Knochenschmerzen, über einen möglichst langen Zeitraum zu kontrollieren, um damit für den Patienten Beschwerdefreiheit und eine gute Lebensqualität zu erreichen. Das Tumorwachstum wird durch Androgene stimuliert und unterhalten (androgenbedingte Proliferationsstimulation der Prostataepithelzellen). Entsprechend wird versucht das Wachstum durch Androgendeprivation oder kompletter Androgenblockade zu hemmen:

1. Orchiektomie: Chirurgische Kastration durch beidseitige Orchiektomie.
 2. Antiandrogene: Medikamentöse Kastration erfolgt über eine Androgenblockade durch steroidale und nichtsteroidale Antiandrogene.
 3. LH-RH-Analoga: Bei androgensensiblen Prostatakarzinom ist das Therapieziel eine komplette Hemmung der Androgensynthese und Blockade der Androgenwirkung. LH-RH-Analoga führen zunächst zu einer Überstimulation der Gonadotropinausschüttung in der Hypophyse mit initial gesteigerten Testosteronkonzentrationen (Flare-up-Phänomen). Durch Herunterregulation der LH-RH-Rezeptoren in der Hypophyse folgt dann ein LH-Abfall mit konsekutivem Absinken des Testosteronspiegels auf Kastrationsniveau.
 4. Östrogene: Durch Östrogene wird der Feedback-Mechanismus zwischen der Hypophyse und der Gonadenachse gestört. Im Rahmen dieses endokrinen Regelkreises bewirkt Östrogenapplikation eine Reduzierung der LH-RH-
-

Sekretion durch die Hypophyse und somit auch eine Absenkung des Testosteronspiegels.

5. Kombinationsbehandlung aus 1.-4.

Wegen der für den Mann psychisch stark belastenden Hodenentfernung, wird die medikamentöse Kastration häufig bevorzugt. Antiandrogene können als Monotherapie, aber vor allem in Kombination eingesetzt werden.

1.2.5 Entstehung des hormonrefraktären Prostatakarzinoms

Bei Patienten mit initial hormonsensiblen Prostatakarzinom, kommt es in etwa 80% der Fälle zu einem androgenunabhängigen und damit für die kontrahormonelle Therapie refraktären Tumor. Diese Patienten entwickeln dann ossäre Metastasen. Detaillierte molekularbiologische Ursachen, die zur Entwicklung eines hormonrefraktären Tumors führen, sind bislang noch wenig bekannt (7). Es wird vermutet, dass für die Entwicklung und den Progress des hormonrefraktären Prostatakarzinoms genetische Abberationen verantwortlich sind (8). Eine entscheidende Tatsache für die Resistenzentwicklung ist die Entstehung von androgenunabhängig wachsenden Krebszellen (9,10). Das Prostatakarzinom kann aus hormonabhängigen und hormonunabhängigen Zellklonen bestehen. Es wurde postuliert, dass es unter Hormontherapie zu einer Selektion der hormonunabhängigen Zellpopulation kommt. Eine Mutation und Alteration des Androgenrezeptors an den hormonabhängigen Zellklonen wird ebenfalls diskutiert. Bei Versagen einer Hormontherapie kann sich unter Berücksichtigung aller Faktoren eine Indikation zur Chemotherapie ableiten. Wirksame Substanzen mit Ansprechraten von ca. 20% sind Estramustinphosphat, Cyclophosphamid, Doxorubicin, als Monotherapie oder Polychemotherapie. Im Vordergrund steht die Erhaltung oder Verbesserung der Lebensqualität. In 70% der Fälle findet man eine symptomatische Besserung der Beschwerden nach Versagen der hormonellen Therapie, bei 20-30% der Patienten objektive Remissionen. In jüngsten Studien konnte eine Verlängerung des Überlebens mit

Taxanen z.B. Docetaxel gezeigt werden (14). Ergänzend seien noch supportive Massnahmen erwähnt, wie der Einsatz von Bisphosphonaten bei Knochenmetastasen zur Prophylaxe von Knochenkomplikationen, sowie die Schmerztherapie.

Nach bisherigem Stand gibt es noch keine heilende Therapieform für das metastasierte, hormonrefraktäre Prostatakarzinom. Weiterführenden Forschungen zur Entwicklung neuer Therapiestrategien sind daher notwendig.

1.3 Zytostatika beim Prostatakarzinom

1.3.1 Estramustin

Eine mögliche therapeutische Intervention beim hormonrefraktären Prostatakarzinom besteht in der Anwendung von Estramustinphosphat einem Kombinationsmolekül aus 17- β -Estradiol und einem alkylierendem Anteil (Stickstoff-Lost). Die Wirkung ist ein antigonadotroper und zytotoxischer Effekt. Es konnte gezeigt werden, dass Estramustin, unabhängig von seiner hormonellen Komponente, in der G2/M-Phase in den Zellen akkumuliert und am Angriffspunkt, dem mikrotubulären Spindelapparat, einen Mitosestop in der Metaphase verursacht. Für die Hemmung des Zellzyklus ist jedoch die Anwesenheit des Estramustin-bindenden Proteins erforderlich. Es handelt sich um ein in vielen Tumoren vorkommendes sekretorisches Protein, welches die Aufnahme von Estramustin in die Zelle erleichtert (11).

1.3.2 Etoposid

Ein weiteres Medikament, welches zur Behandlung beim hormonrefraktären Prostatakarzinom zur Verfügung steht, ist das Zytostatikum Etoposid, ein halbsynthetisches Derivat des Podophyllotoxins aus der Gruppe der Naturstoffe. Seine Wirkung entfaltet diese Substanz durch Hemmung der Topoisomerase-2, welche zu DNA-Strangbrüchen führt (12). Sowohl Estramustin, als auch Etoposid haben als globalen Angriffspunkt Komponenten der Nuklearmatrix. Eine Kombinationstherapie beider Substanzen zeigte Erfolge in präklinischen und auch klinischen Studien (13).

1.3.3 Taxane

Inzwischen gibt es vielversprechende Daten aus Mono- und Kombinationstherapiestudien mit Docetaxel, die neben guter Verträglichkeit und damit verbesserter Lebensqualität unter Therapie, einen Überlebensvorteil nachgewiesen haben. Wegen der Ergebnisse, z.B. aus der Tax- 327-Studie sollte Docetaxel gegenwärtig als Chemotherapeutikum der ersten Wahl beim hormonrefraktären Prostatakarzinom eingesetzt werden (14).

1.4 Matrixmetalloproteinasen

1.4.1 Funktion der MMP

Bei der Überlegung neue Therapiekonzepte zu entwickeln, ist die mögliche Beeinflussung der Mechanismen der Metastasierung von grosser Bedeutung. Einer Gruppe von Enzymen, die bei der Entstehung und Ausbreitung von maligner Tumoren beteiligt sind, sollten speziell in diesem Zusammenhang beachten werden. Dazu zählen die Matrixmetalloproteinasen (MMP) und deren Inhibitoren (TIMP). Durch synonym verwendete Begriffe wie Metalloendopeptidasen,

-endoproteinasen und -endoproteasen wird die Fähigkeit von Proteasen beschrieben, makromolekulare Substanzen zu hydrolysieren. Im Folgenden wird nur noch von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) gesprochen.

Allen Malignomen gemeinsam ist ein veränderter Zellzyklus und die gestörte Interaktion der Zellen mit der extrazellulären Matrix (EZM). Diese Prozesse werden von MMP beeinflusst. MMP sind für Auf-, Um- und Abbau der EZM mit verantwortlich. Substrate der Enzyme sind, u.a. fibrilläre Kollagene der Knochen, der Haut des interstitiellen Bindegewebes sowie nicht-fibrilläre Kollagene, wie Laminin und Fibronectin als Bestandteile von Basalmembranen. Weiterhin gehören zu den Substraten der MMP auch Nicht-Matrixproteine, wie Transportproteine und Wachstumsfaktoren. Biologische Signalketten werden durch proteolytische Spaltung von Rezeptoren beeinflusst. Zum physiologischen Spektrum der biologischen Funktionen der MMP gehören parakrine Wirkungen und durch Proteolyse entstehende bioaktive Spaltprodukte, die Vermittlung der Apoptose, Zellproliferation und Angiogenese. In pathologischer Hinsicht gehört auch die Modulation der Tumorprogression zu den biologischen Funktionen.

Beispiele für die physiologische Funktion der MMP sind die embryonale Trophoblasteninvasion in die Gebärmutter und die Wundheilung (15). Bei der Trophoblasteninvasion handelt es sich um ein komplexes System aus Enzymen. Genetischer Verlust einzelner Enzyme führt selten zu einer fehlenden Implantation. Bei fehlender Gelatinase B (MMP-9), einem für die Trophoblasteneinnistung wichtigen Enzym, kommt es nicht zur Implantation. Für eine suffiziente Wundheilung ist die Kontraktion der Wundränder, sowie die Migrationsfähigkeit der Keratinozyten Voraussetzung. Die Migration der Keratinozyten ist von MMP-1, die Wundrandkontraktion von MMP-3 abhängig. Störung der MMP-1 und MMP-3 kodierender Gene führt zu verzögerter oder gestörter Wundheilung (16,17).

In pathophysiologischen Prozessen spielen MMP ebenfalls eine bedeutende Rolle, wie z.B. bei der Metastasierung und Invasivität von Tumoren, entzündliche Erkrankungen, wie Arthritis und der Sepsis. So ist bekannt, dass TNF- α bei systemischer Freisetzung den Schweregrad bei Erkrankungen, wie beispielsweise bei septischen Zuständen verstärkt und damit die Prognose beeinflusst. Das

Proenzym des TNF- α wird durch MMP in seine aktive Form übergeführt. Im Tiermodell wurde nachgewiesen, dass eine Blockade der MMP mit unspezifischen und spezifischen synthetischen Inhibitoren septische Zustände verhindern kann (18,19). Produziert werden MMP von Tumorzellen, sowie von Zellen des umgebenden Stroma. Eine ektope Produktion von MMP-3 führt z.B. zur verstärkten Invasivität von Brustkrebszellen in das umliegende Gewebe. Experimentelle Überexpression verschiedener MMP führt zu verstärkter Invasivität und Metastasierung von Tumorzelllinien (20,21,22).

1.4.2 Struktur und Regulation der MMP

Die MMP gehören zur Gruppe der Calcium- und Zinkabhängigen Endoproteinasen. Sie katalysieren Prozesse nicht am N- oder C-terminalen Ende von Proteinen (Exoproteinasen), sondern im helikalen Abschnitt einer Proteinstruktur. Ihre enzymatische Aktivität ist direkt gegen Komponenten der EZM gerichtet und löst diese Komponenten wie Kollagene, Laminine, Proteoglykane und Fibronectin auf. Jedes Mitglied der MMP-Familie hat spezifische Wirkungen auf bestimmte Komponenten der EZM. Die MMP-Familie schliesst die einzigen bekannten Enzyme ein, die in der Lage sind, fibrilläres Kollagen aufzulösen. Hauptbestandteile der EZM bestehen aus fibrillären Kollagen Typ I, II, III, V, XI.

Die MMP-Familie wird gegenwärtig in vier Unterklassen eingeteilt: Gelatinasen (MMP-2, MMP-9), Kollagenasen (MMP-1, MMP-8), Stromolysine (MMP-3, MMP-10). Eine weitere Untergruppe beinhaltet Matrilysin (MMP-12), Stromelysin (MMP-11) und Metalloelastase (MMP-12) (23). Inzwischen sind insgesamt 26 verschiedene Metalloproteinasen bekannt. Die MMP unterscheiden sich von anderen Metalloproteinen durch mehrere strukturelle Eigenschaften. Sie enthalten zwei Zink- und mehrere Kalziumatome. Die Faltblattstruktur der MMP enthält eines der Zinkatome und die Kalziumatome. Das katalytische Zentrum stellt das zweite Zinkatom dar. Allen MMP gemeinsam ist eine „Methionin-Schleife“ und der sog.

„Cystein-switch“. Wie alle Enzyme sind auch die MMP in ihrer Funktion vom pH-Wert abhängig, welche man als eine glockenförmige Kurve im pH-Bereich von 4,5 bis 9,5 darstellen kann. Für die synthetischen Inhibitoren vom Typ der Hydroxamsäureinhibitoren ist diese pH-Abhängigkeit entscheidend (24).

1.4.3 Struktur der MMP

MMP bestehen grundsätzlich 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.

Der allgemeine Aufbau der MMP mit ihrer molekularen Struktur und charakteristischen Domäne ist in Abb. 1 schematisch dargestellt.

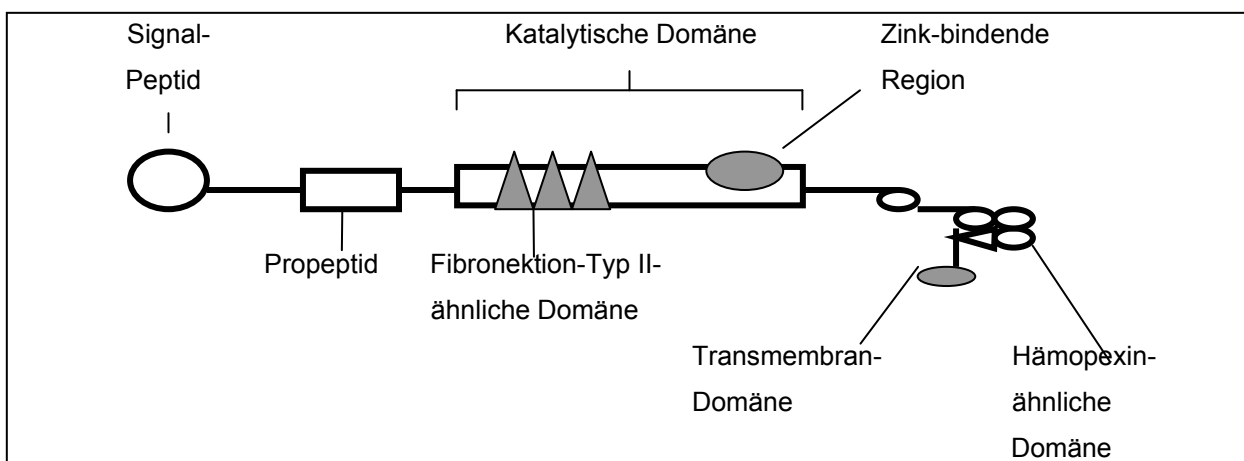


Abb.1: Aufbau und Domänen der Matrix-Metalloproteinasen (25)

Die MMP werden in Form latenter Proenzyme an der Zelloberfläche sezerniert. Sie können auch intrazellulär aktiviert werden und dort proteolytisch wirken. Aufgrund ihres starken proteolytischen Potentials ist ihre Aktivität streng reguliert. Sie unterliegen der Kontrolle der Genexpression und der posttranskriptionellen Phase durch Wachstumsfaktoren und Hormone. Die Aktivierungskaskade der MMP beginnt mit der Abspaltung der Signalsequenz nach dessen Sekretion in das endoplasmatische Retikulum. Um die Proteinase zu aktivieren, muss das Propeptid ebenfalls abgespalten werden. Dadurch wird das Zinkatom der katalytischen Domäne frei und kann reagieren (26). Die Zinkatome wiederum werden in der Zymogenform von Propeptiden koordiniert und konservieren die Enzyme in präaktiven Zustand (27). Ihre enzymatische Aktivität entwickeln sie erst nach Modifizierung oder Entfernung der aminoterminalen Domäne (Propeptid) und Abspaltung einer bestimmten Aminosäure (Cystein 73) vom katalytischen Zinkatom (sog. „Cystein-switch“) (28).

Die Hämapexin-ähnliche Domäne am C-terminalen Ende des Proteins bestimmt die Substratspezifität (29,30). Die Inhibitoren der MMP, die TIMP, werden hier gebunden (31). Die Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9) enthalten eine Fibronectin-ähnliche Struktur, an der Gelatine gebunden wird. Die membranständigen MMP (MT-MMP = Membrane-Type MMP) sind durch ihre Transmembrandomäne an die Zellmembran gebunden.

Die kaskadenförmige Regulierung und Aktivierung der MMP ist vergleichbar mit der Aktivierung des Gerinnungssystems, einbezogen werden dabei freie und membranständige Proteasen der gleichen und anderer Enzymfamilien (32,33). Mit Hilfe von proteolytischen Enzymen, quecksilberhaltigen Agentien oder Hitze kann das Propeptid „*in vitro*“ entfernt werden. Die MMP-Aktivierungskaskade wird sowohl im aktivierten Zustand als auch bei Aktivierung selbst von spezifischen (TIMP) und unspezifischen Inhibitoren auf enzymatischem Weg und durch Wiederaufnahme in die Zelle kontrolliert.

In der folgenden Tabelle sind die bisher bekannten MMP und ihre Substrate dargestellt.

MMP	Molekulargewicht (kDa) Proform/Aktivform	Substrate
Kollagenasen		
MMP-1 (Kollagenase-1)	55, 52 / 42	Kollagen I-III, Gelatine, Proteoglykan
MMP-8 (Kollagenase-2)	91, 75 / 58	Kollagen I-III, V, VII, IX und X, Gelatine
MMP-13 (Kollagenase-13)	65 / 55	Kollagen I-IV, IX, X, XIV, Fibronectin, Gelatine
Stromelysine		
MMP-3 (Stromelysin-1)	60, 57 / 45	Kollagen III-V, IX und X, Fibronectin, Laminin, Proteoglykane
MMP-7 (Matrilysin)	21, 28 / 19	Kollagen IV, Elastin, Fibronectin, Gelatine, Laminin
MMP-10 (Stromelysin-2)	55 / 44	Kollagen III-V, Elastin, Fibronectin, Gelatine
MMP-11 (Stromelysin-3)	58, 55 / 27	Serin-Proteaseinhibitoren
MMP-12 (Metalloelastase)	54 / 21	Fibronectin, Laminin
Gelatinasen		
MMP-2 (Gelatinase A)	72 / 62	Kollagen I, II, IV, V, VII, X, XI, XIV, Elastin, Fibronectin, Gelatine, Laminin
MMP-9 (Gelatinase B)	92 / 84	Kollagen I, III-V, VII, X, XIV, Elastin, Fibronectin, Gelatine
Membranständige MMP (MT-MMP)		
MMP-14 (MT1-MMP)	63	Kollagen I-III, Fibronectin, Laminin, Gelatine
MMP-15 (MT2-MMP)	72	Aggregan, Kollagen I-III, Fibronectin, Laminin, Nidogen
MMP-16 (MT3-MMP)	64	Kollagen I, III, Fibronectin
MMP-17 (MT4-MMP)	71 / 67	Unbekannt
MMP-24 (MT5-MMP)	64	Unbekannt
MMP-25 (MT6-MMP)	34, 28 / 19	Gelatine
Andere MMP		
MMP-19	57	Unbekannt
MMP-20 (Enamelysin)	54	Amelogenin
MMP-23	44	Gelatine
MMP-26	30	Kasein, Gelatine

Tab.1: Matrix Metalloproteinasen und ihre Substrate

1.4.4 Regulation der MMP durch deren Inhibitoren

Die Aktivität der MMP unterliegt einer regulatorischen Kontrolle, den „Tissue Inhibitors of Matrixmetalloproteinases“ (TIMP), von denen bisher vier spezifische bekannt sind: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 und TIMP-4 (34). Normalerweise besteht ein ausgeglichenes Verhältnis in der Aktivität von MMP und TIMP (35). Es wird vermutet, daß dieses Missverhältnis zwischen MMP und TIMP zugunsten der MMP darauf zurückzuführen ist, dass die Tumorzellen für diese abnorme Produktion von MMP verantwortlich sind (32). In verschiedenen Untersuchungen konnte „*in vitro*“ und „*in vivo*“ gezeigt werden, dass das Ungleichgewicht (Störung der Balance) zwischen MMP und deren Inhibitoren wichtig ist für die Tumorerkrankung und Progression (36). Veränderungen dieser Proteine im Tumorgewebe können sich im Serum der Patienten wieder spiegeln. Es wurden beispielsweise erhöhte Werte von MMP-3 im Plasma von Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom nachgewiesen (37,38). Die TIMP gehören zu den spezifischen Inhibitoren. Die wesentliche physiologische Funktion der TIMP liegt möglicherweise in der Limitierung der proteolytischen Wirkung der MMP, wie sie bei der Involution, der embryonalen Implantation und der Wundheilung vorgefunden wird. Dies ist eine der zentralen Eigenschaften der TIMP bei der Tumorerkrankung, der Metastasierung und der Angiogenese (39). Nachgewiesen ist, dass die Veränderung im stöchiometrischen Verhältnis inhibitorischer, antiproteolytischer TIMP und proteolytischer MMP eine Rolle für das invasive Verhalten eines Tumors spielt (40). TIMP bilden einen festen und reversiblen 1:1-Komplex mit MMP. Ihre biologische Rolle ist nicht endgültig geklärt. In verschiedenen Experimenten zeigten die TIMP neben ihrer antiproteolytischen Wirkung auch proliferationsfördernde und signaltransduzierende Eigenschaften (41). TIMP-1 wurde initial als ein Protein gefunden, dass die Erythropoese stimuliert (42). Diese stimulierende Funktion der TIMP kann mit dem Konzept der Enzymhemmung kollidieren. Die Bedeutung liegt darin, dass Versuche mit synthetischen Enzyminhibitoren auf dem Konzept der pharmakologischen Enzymhemmung aufbauen. Grundlage dafür sind Experimente, welche zeigten,

dass eine Überexpression von TIMP und auch deren pharmakologische Applikation experimentell eine Metastasierung verhindern (43).

Vermehrter Nachweis von MMP korreliert mit erhöhter Invasivität von Tumorzellen. Bei Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom wurden erhöhte Werte von MMP-3 im Plasma nachgewiesen. Gestützt wird diese Theorie durch vermindertes Tumorwachstum in „MMP-knockout“ Tieren (44). Ebenso zeigen „TIMP-knockout“ Tieren eine verstärktes Tumorwachstum, stärkere maligne Transformation von Tumoren und eine ausgeprägtere Tumorinvasivität. Bei Tieren mit einer experimentellen Überexprimierung von TIMP zeigt sich ein vermindertes Tumorwachstum, geringere maligne Transformation und weniger Tumorinvasivität (45). TIMP scheinen dabei mehr Einfluss auf das Tumorwachstum zu haben als auf die Metastasierung (46). Die genannte physiologische, hemmende Wirkung der TIMP gibt Anlass, deren Einsatz als innovativen Therapieansatz zu erforschen. Wegen der hohen Molekulargewichte von 20-30 Kilodalton und ihrer kurzen biologischen Halbwertszeit eignen sich physiologische TIMP schlecht für den pharmakologischen Einsatz (47). Es gilt deshalb synthetische TIMP mit veränderten Eigenschaften zur Anwendung zu bringen.

1.5. Aktivität und Expression von MMP und TIMP

1.5.1 Untersuchung in der Zelle

Voraussetzung für das invasive Wachstum von Tumorzellen ist deren Eigenschaft, die Basalmembranen aufzulösen. MMP kommt eine entscheidende Bedeutung bei der Degradierung von Basalmembranen zu. Die physikalische Barriere kann damit durchbrochen werden. Bereits „*in vitro*“ und „*in vivo*“ konnte in verschiedenen Tumorgeweben aus Tiermodellen eine erhöhte Expression von MMP nachgewiesen werden, entsprechende Korrelation mit dem metastatischen Geschehen wurde gezeigt (48,49). MMP beeinflussen weiterhin die Zellproliferation, Apoptose und den Abbau der Knochenmatrix z.B. beim Multiplen Myelom (50,51). Bei der Entwicklung von nicht-invasiven zur invasiven Zellformen

haben MMP transformierende Eigenschaften (52). Bei der Untersuchung an Zellen muss beachtet werden, dass die MMP-Aktivität Folge der Wechselwirkung zwischen Gewebe und Zellen ist (53). Die Auflösung der Zell-Zell Kontakte durch MMP wird durch TIMP verhindert (21). Desweiteren kontrollieren TIMP die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und verhindern die autokrine Stimulation der Zellvermehrung durch MMP (54,55).

1.5.2 Untersuchung im Gewebeverband

Ein Zusammenhang zwischen Expression und Aktivität von MMP, Tumorprogression, Malignitätsgrad und dem Krankheitsstadium beim Menschen konnte durch immunhistologische und biochemische Untersuchungen in Tumorgeweben gezeigt werden (56,57,58). Zu den Studien, welche die Mechanismen der Tumoretablierung und -Progression durch MMP zeigen, gehören Neovaskularisations- und Invasionsversuche. Durch genetische Überexpression, genetische Ausschaltung („knockout“) oder gezielte Hemmung von MMP wurde eine Penetration in künstlichem Gewebe erreicht oder verhindert. Hiraoka et al. zeigten somit, dass MMP die Neovaskularisierung im Gewebe steuern können (59,60,61). Jedoch kam es durch die Anwendung von unterschiedlichen Nachweistechiken, wie Immunhistochemie oder in-situ-Hybridisierung zu unterschiedlichen, teilweise widersprüchlichen Ergebnissen. Diskussionspunkt war dabei, dass MMP nicht von Tumorepithelzellen exprimiert würden, sondern von den umgebenden Zellen des Stromas. Die Wechselwirkung zwischen MMP-Expression durch Stroma- und Epithelzellen wurde bei Hautwunden untersucht. Es kam zu gestörter Wundheilung bei Veränderung der MMP und TIMP Expression. Analog gilt für Tumore eine gestörte Interaktion von Stroma- und Tumorzellen (62). Weiterhin wurde gezeigt, dass bei der Auflösung von Geweben viele Mediatoren und Enzyme freigesetzt werden. Somit kommt es nach Auflösung der Gewebsverbände durch MMP zu zahlreichen weiteren biochemischen Prozessen. Eine Abschätzung der Abhängigkeit und Funktion von MMP innerhalb von Gewebsverbänden wird dadurch schwierig. MMP sind in Tumorgeweben

unterschiedlich überexprimiert, auch wachsen Tumore der gleichen Entität unterschiedlich aggressiv. Es ist daher zu erwarten, dass jeder Tumor sein eigenes Profil von überexprimierten MMP haben könnte (63).

1.5.3 Tiermodelle

Die MMP wurden im Tierversuch anhand von direkten und indirekten Tumormodellen untersucht. Direkte Tumormodelle entstehen durch chemische Induktion, Implantation von Tumorgewebe und Injektion von Tumorzellen, indirekte Modelle durch gezielte Veränderung der DNA. Es werden z.B. genetisch veränderte Tumorzellen appliziert, welche die Tumorinduktion bewirken. Hier wurde ebenfalls ein Zusammenhang zwischen MMP und Entwicklung von Tumoren gezeigt. Induziert man beispielsweise eine MMP-2 Überexpression in der Tumorzelle, kommt es nach Implantation zu einem aggressiveren Tumorverhalten im Vergleich zur Implantation der Mutterzelllinie. Synthetische MMP-Inhibitoren konnten die Tumorausbreitung reduzieren (64). Bei beiden Modellformen wurde die Beteiligung der MMP an der Tumorentstehung und Progression nachgewiesen. Als Beispiel ist der Dunning-Tumor des PCa zu nennen, bei dem auch ein Zusammenhang zwischen MMP und Knochenmetastasierung gezeigt wurde (65,66,67). Tiermodelle mit gezielter Genveränderung der MMP-Gene weisen eine geringere Tumorprogression und Metastasierungsrate auf, hingegen zeigen Modelle mit Aktivierung von MMP-Genen eine verstärkte Tumorinvasivität und Ausbreitung. Diese Tiermodelle sind auch geeignet um die Entstehung von Tumoren zu untersuchen (68).

1.5.4 Mensch

In menschlichem Tumorgewebe wurden erhöhte Konzentrationen und Aktivitäten von MMP gefunden. In malignen Geweben ist dabei die MMP-Expression höher als in prämaligen oder gutartigen Gewebsveränderungen (69,70). In verschiedenen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen MMP-Expression und dem Differenzierungsverlust, einem fortgeschrittenen histologischen „grading“ und klinischem „staging“ (71), der Tumorgröße und dem Invasionsgrad, den Lymphknoten- und Fernmetastasen festgestellt werden (72,73). Beispielhaft dafür steht die Arbeit von Hashimoto et al. bei Prostatakarzinompatienten. Diese Patienten hatten bereits eine Hormontherapie erhalten. Es wurde dabei eine erhöhte Konzentration von MMP-7 im Tumorgewebe nachgewiesen (58). Zusammenhänge wurden zwischen MMP und dem Überleben oder zwischen MMP und der Wahrscheinlichkeit eines Tumorrezidivs in Untersuchungen gezeigt. MMP können die unabhängigen Prognosefaktoren für das erkrankungsfreie Überleben bzw. das Gesamtüberleben repräsentieren (74).

1.6 Einsatz von synthetischen Inhibitoren der MMP

1.6.1 Synthetische MMPI im Tiermodell

Seit Ende der 80er Jahre gibt es zahlreiche Untersuchungen über den Einsatz von MMPI an verschiedenen Tumormodellen. Es wurden unterschiedlichste Ergebnisse am Tiermodell erzielt, abhängig vom Zeitpunkt der Gabe, Dosis und Art des synthetischen MMPI. Eine signifikante Beeinflussung der Tumorprogression bis zur kompletten Wachstumshemmung des Primärtumors konnte erzielt werden. MMPI verminderten die lokale und regionale Tumordinvasion wie auch die Metastasenbildung. In einer Studie wurde eine komplette Reduktion von malignem Aszites und die Tumorabkapselung beobachtet (75). Es wird auch von einem synergistischen Effekt mit Chemotherapeutika berichtet. MMPI

verhinderten das Wiederauftreten der Tumoren und verlängerten das Gesamtüberleben der Tiere. (76,77).

1.6.2 Synthetische MMPI in klinischen Studien

Bereits Ende der 90er Jahre wurden erste klinische Studien an Patienten mit malignem Aszites und Pleuraergüssen durchgeführt (78,79). Bisherige Ergebnisse haben trotz positiver Erfahrung im Tiermodell, beim Menschen zu keinen überzeugenden Erfolgen geführt. Keiner der synthetischen MMPI erhielt bis heute eine offizielle Zulassung. Eine Untersuchung zeigte sogar eine Begünstigung des Tumorwachstums unter synthetischen MMPI beim Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom (80). Die Schlussfolgerung aus den bisher klinisch durchgeführten Studien war, dass eine Übertragung der positiven Effekte im Tiermodell beim Menschen nur eingeschränkt möglich ist. Als Aussicht für die Zukunft sind der Einsatz zunehmend selektiver MMPI sowie deren Kombination mit Chemotherapeutika, Strahlentherapie und Tumorchirurgie zu betrachten. Bei der Einschätzung der Ergebnisse gilt zu berücksichtigen, dass die vorliegenden Untersuchungen bisher bei Patienten mit weit fortgeschrittenen Tumoren erfolgten.

1.7 Mat-LyLu-Zelllinien und Tiermodell

Für den tierexperimentellen Teil dieser Arbeit wurde der Dunning Tumor der Copenhagenratte gewählt. Dr. W. F. Dunning berichtete erstmals 1963 über einen spontan entstandenen Tumor in der Copenhagenratte, bekannt als Dunning-Tumor oder R-3327 System. Er gilt als Standardtiermodell für das menschliche Prostatakarzinom. Der eigentliche Tumor wurde in einem älteren männlichen Tier der Copenhagenratte gefunden und füllte das gesamte Abdomen aus. Er wächst in einer kompakten Form und hat eine feste Konsistenz. Histologisch handelt es sich dabei um ein papilläres Adenokarzinom. Der Originaltumor gleicht mit seinem drüsenartigen Muster dem histologischen Bilde eines gut differenzierten

menschlichen Prostatakarzinoms. Der Tumor wuchs in weiblichen und kastrierten Tieren deutlich langsamer als in intakten männlichen Tieren. Metastatische Manifestationsorte sind die regionalen Lymphknotenstationen, die Lunge, Leber sowie das Zwerchfell (81). Inzwischen ist aus dem eigentlichen Tumor ein System von Tochterzelllinien entwickelt worden. Auch hier sind die Eigenschaften der Tumorzelllinien und dadurch induzierte Tumoren vergleichbar dem des menschlichen Prostatakarzinoms (82). Bei den Dunning Tumoren gibt es hormonsensitive und hormonrefraktäre Tumoren. Das Ansprechen auf Hormon-, Chemo-, und Strahlentherapie entspricht dem Verhalten des menschlichen Prostatakarzinoms (83). Die Tochterzellreihe MatLyLu der vorliegenden Arbeit ist eine hormonrefraktäre, anaplastische Zelllinie des Dunning-Tumor (84,85). MatLyLu hat eine hohe Metastasierungsrate. Mehr als 75% der Tiere mit Tumorzellinokkulation haben neben dem lokalen Tumor auch Fernmetastasen. Die Verdopplungszeit des Tumors „*in vivo*“ beträgt 1,5 Tage. Die MatLyLu Zellreihe ist aufgrund ihrer Eigenschaften und der weiten Verwendung in der Forschung für den Einsatz in meiner Arbeit geeignet (86).

2. Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund der bisher immer noch limitierten Therapie des metastasierten Prostatakarzinoms und der Tatsache, dass MMP und ihre Inhibitoren im Rahmen der Tumorausbreitung eine wichtige Rolle zugeschrieben wird, sind weitere Untersuchungen mit synthetischen MMPI von wissenschaftlichen und klinischen Interesse.

Folgende Fragen soll die vorliegende Arbeit beantworten:

1. Welchen Effekt haben ICOL-51, Estramustin und Etoposid auf das Proliferationsverhalten der hormonrefraktären Prostatakarzinomzelllinie MatLyLu?
2. Hat die Therapie mit ICOL-51, Estramustin und Etoposid einen wachstumshemmenden Effekt am Standardtiermodell des menschlichen Prostatakarzinoms, dem Dunningtumor der Copenhagenratte?

Diese Arbeit untersucht die Wirkung eines von der Firma Roche synthetisch hergestellten, gegen MMP-2 und MMP-9 spezifisch wirksamen Inhibitors (ICOL-51), in Kombination mit Estramustin und Etoposid an der MatLyLu-Zellreihe „*in vitro*“ sowie am Dunning-Tumor der Copenhagenratte.

3. Material und Methoden

3.1 Geräte und Medikamente

Im Rahmen der Zellkulturversuchsreihen wurden folgende Geräte eingesetzt: Die Zentrifuge (Megafuge 1.0 R) sowie der Inkubationsschrank (CO₂ Autozero), sind von Heraeus, Berlin. Die sterile Sicherheitswerkbank (Steag) von Laminarflow Prozeßtechnik Pfullingen und der ELISA-Plattenreader Anthos ht3 von der Firma Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld.

Bei den „*in vitro*“- und „*in vivo*“- Versuchen wurden folgende Medikamente verwendet: Estramustin (Östradiol Stickstofflost Verbindung), Etoposid (Topoisomerase 2-Hemmer). ICOL-51 (Ro28-2653) wurde als ein synthetisch hergestellter, spezifisch gegen MMP-2 und MMP-9 wirksamer Metalloproteinase-Inhibitor von der Firma Roche Diagnostics GmbH in Penzberg entwickelt und zu Forschungszwecken zur Verfügung gestellt.

3.2 Tumorzelllinie Kulturmedien und Bearbeitung

Für die Untersuchungen „*in vitro*“ und „*in vivo*“ wurde die Dunning-Tumorzelllinie (R3327-MatLyLu) verwendet. Diese Tumorzellen wurden freundlicherweise von Dr. Heston (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY) zur Verfügung gestellt.

Dem Kulturmedium RPMI 1640 mit L-Glutamin (Cat. No. 21875-059) wurde 1,25% Penizillin/Streptomycin (10000 U/ml und 10000 µg/ml, Cat.No. 15140-114) zugesetzt. Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS, Cat.No. 11490-094) wurde von der Firma GIBCO Life Technologies (Paisley, Schottland) bezogen. Das auf Mycoplasmen getestete fetale Kälberserum (FKS 10%) als weiterer Zusatz, stammte von der Firma Biochrom KG, Berlin, ebenso wie die

Trypsin/EDTA Lösung (0,05%, 0,02%). Die Plastikkulturflaschen (Lot. # 17300013) bezogen wir von Costar (Corning Incorporated NY, USA), die Gewebekulturplatten (TC steril, No. 655180) von der Firma Greiner Labor Technik (Frickenhausen).

Die isolierten MatLyLu-Zellen wurden in 75 cm² Plastikkulturflaschen ausgesät und im Inkubator (CO₂ AutoZero, Fa. Heraeus) bei 37°C mit 5% CO₂ ausreichend bebrütet. Nach regelmäßigem Mediumwechsel und Passagieren (je nach Wachstumsgeschwindigkeit zwei bis dreimal wöchentlich), wurden die Zellen geerntet. Zuvor wurden die Kulturflaschen auf Kontamination, z.B. durch Pilze, unter dem Mikroskop überprüft. Das Medium wurde unter sterilen Kautelen mit Pasteurpipetten (steril, ungestopft) abgesaugt und die restlichen, lockeren Zellen mit 4 ml PBS Pufferlösung abgewaschen. Das Ablösen der Zellen vom Flaschenboden erfolgte mittels einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,05%, 0,02%) nach dreiminütiger Inkubationszeit bei 37°C und 5% CO₂. Durch Zugabe von 4 ml RPMI-Medium wurde die Trypsin Aktivität gestoppt. Nach optischer Kontrolle des Ablösungsprozesses (Trypsinierungsprozeß) unter dem Phasenkontrastmikroskop wurde die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt und drei Minuten lang bei Raumtemperatur mit 1200 Umdrehungen pro Minute abzentrifugiert. Der Überstand wurde unter einer sterilen Arbeitsbank (Flowbox) abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml PBS-Puffer aufgenommen.

Zur Diskriminierung zwischen vitalen und toten Zellen erfolgte vor der Zellzählung die Anfärbung mit Trypanblau, einem Azolfarbstoff, der nur von nicht vitalen Zellen aufgenommen wird. Anschliessend wurde die Zellösung (9 µl) in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Sie besteht aus neun Quadraten mit einem Volumen von 0,1 µl pro Quadrat. Das Gesamtvolumen der Kammer entspricht von 0,9 µl oder 0,9 mm³. Nach Auszählung von 4 Quadraten wird der gebildete Mittelwert mit 10⁴ multipliziert, man erhält somit die Zellkonzentration pro Milliliter. Bei der Berechnung wird noch der Verdünnungsfaktor durch die Zugabe von Trypanblau der Zellsuspension berücksichtigt.

Nach dem Auszählen der Zellen wurden diese in vorgegebener Menge auf entsprechend sterile 96 „well“ Mikrotiterplatten (TC steril No 655 180, Firma Greiner Labor Technik) gegeben. Die einzelnen Vertiefungen der Platten wurden jeweils mit 500 Zellen (in RPMI-1640 aufgenommen) beimpft (100 µl Zellsuspension/well), wobei eine Spalte mit 6 Vertiefungen als Kontrollgruppe (nur RPMI) ausgespart wurde. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde das Medium abgesaugt und durch die Medikamente Estramustin, Etoposid und ICOL-51, in Medium bzw. DMSO gelöst und mit 100 µl je Vertiefung ersetzt. Diese wurden in unterschiedlichen Konzentrationen, durch entsprechende Verdünnungsreihen hergestellt. Anschliessend als Monotherapie und als Kombinationstherapie hinzugegeben. Mittels des XTT-Testes, wurde nun nach 2, 48, 72 und 96 Stunden über das Ausmaß der Extinktion, das Proliferationsverhalten der MatLyLu-Zellen bestimmt.

3.2.1 Verdünnungsreihen der eingesetzten Medikamente

Die eingesetzten Medikamente wurden anhand der Ausgangslösung und des Molekulargewichtes durch Verdünnungsreihen auf die entsprechend eingesetzten Konzentrationen gebracht.

Die jeweiligen Monotherapien und Kombinationstherapien sind in Tabelle 2 aufgelistet:

Monotherapie:	Estramustin	1 bis 10000 nmol/l
Monotherapie:	Etoposid	1 bis 10000 nmol/l
Kombinationstherapie:	Estramustin	10 nmol/l mit Etoposid 100 nmol/l
Kombinationstherapie:	Estramustin	10 nmol/l mit Etoposid 1000 nmol/l
Kombinationstherapie:	Estramustin	10 nmol/l mit Etoposid 10000 nmol/l
Kombinationstherapie:	Estramustin	100 nmol/l mit Etoposid 100 nmol/l
Kombinationstherapie:	Estramustin	100 nmol/l mit Etoposid 1000 nmol/l
Kombinationstherapie:	Estramustin	100 nmol/l mit Etoposid 10000 nmol/l
Kombinationstherapie:	Estramustin	10 nmol/l mit ICOL-51 200 ng/ml
Kombinationstherapie:	Estramustin	100 nmol/l mit ICOL-51 1000 ng/ml
Kombinationstherapie:	Etoposid	100 nmol/l mit ICOL-51 200 ng/ml
Kombinationstherapie:	Etoposid	100 nmol/l mit ICOL-51 1000 ng/ml
Kombinationstherapie:	Etoposid	1000 nmol/l mit ICOL-51 200 ng/ml
Kombinationstherapie:	Etoposid	1000 nmol/l mit ICOL-51 1000 ng/ml

Tab.2: Übersicht über die in den „*in vitro*“ Versuchen angewendeten Mono- und Kombinationstherapien aus Estramustin, Etoposid und ICOL-51.

3.3 Bestimmung der Zellproliferation mittels XTT Test

Bei dem XTT-Test (Cell Proliferation Kit, Firma Roche, Cat. No. 1 465 015) handelt es sich um eine Messmethode zur Bestimmung und Quantifizierung der Zellproliferation lebender Zellen. Zugrunde dafür liegt die Fähigkeit der Zelle, mittels der mitochondrialen Dehydrogenase, das gelbfarbene Tetrazoliumsalz XTT (sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis-(4-methoxy-6-nitro)benzene sulfonic acid hydrate) in einen wasserlöslichen, orangenen Formazanfarbstoff zu metabolisieren. Die farbliche Umsetzung kann nun über einen ELISA-Plattenreader im Sinne einer Extinktionsveränderung direkt quantifiziert werden. Diese Umsetzung findet nur bei metabolisch aktiven, lebenden Zellen statt. Eine Zellvermehrung bedingt also eine gesteigerte Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase und führt folglich zu einer stärkeren Umsetzung des XTT. Der daraus resultierende Extinktionsanstieg korreliert mit der Menge der vorhandenen Zellzahl.

Nach dem Auftauen der XTT-Reagenzien unmittelbar vor Anwendung des Testes werden zu 5 ml XTT Reagenz 0,1 ml des „electron-coupling“ Reagenz dazu gegeben. Von dieser Mischung werden 50 µl in jede Vertiefung (beinhaltet Zellen in 100 µl Medium) gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden wird die Extinktion im ELISA-Plattenreader bei einer Wellenlänge im Bereich zwischen 450 nm und 500 nm gemessen.

3.4 Tierexperimentelle Untersuchung

Um die Wirkung des MMPI ICOL-51 alleine oder in Kombination mit Estramustin und Etoposid „*in vivo*“ zu testen, wurden für die Versuche Copenhagenratten verwendet. Die Tumorzellen wurden zuvor orthotop appliziert. Die männlichen Tiere waren zwischen 12 und 14 Wochen alt und zwischen 180 und 220 g schwer (Durchschnittsgewicht 200 g). Die Ratten wurden von Charles River (Sulzfeld,

Deutschland) geliefert. Die Haltung und Versorgung der Tiere erfolgte gemäß den Richtlinien des Tierschutzgesetzes § 8 Abs. 2, Satz 3.

3.4.1 Tumormodell und Gruppeneinteilung

Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden am etablierten Dunning-Tumor (R3327 MatLyLu) durchgeführt. Die Tiere wurden in die jeweiligen Gruppen randomisiert und unter identischen Bedingungen gehalten.

Die Tumorzellen wurden entsprechend den „*in vivo*“ Versuchen kultiviert und mit einem Zellanteil von 10^6 /ml in Medium aufgenommen. Die Tiere erhielten für die bevorstehenden Operationen eine Narkose mit Ketamin und Xylocain. Über eine transversale, suprapubische Inzision wurde die Prostata freigelegt und die MatLyLu-Zellen mit einer definierten Menge von 100000 Zellen (in 0,1 ml) orthotop in den ventralen Prostatalappen injiziert. Um ein mögliches Verschleppen der Zellen in die Umgebung bei der Injektion zu vermeiden, wurde vor dem Zurückziehen der Nadel für ca. eine Minute ein Tupfer mit Polyvidon-Iod (Braunol 2000®) auf die Einstichstelle gebracht. Abschließend wurde die Wunde mit Einzelknopfnähten verschlossen und die Tiere für die Aufwachphase in ihren Käfigen beobachtet. Die Narkose wurde von allen Ratten ausnahmslos gut vertragen, auch traten keine Wundheilungsstörungen auf. Eine tägliche Gewichtsbestimmung der Tiere wurde durchgeführt.

Nach der Zellinokkulation wurden die Tiere (n=65) den unterschiedlichen Behandlungsgruppen zugeordnet. Zwei Versuchsreihen mit 25 bzw. 40 Tieren wurden durchgeführt. In der ersten Serie erfolgte die Behandlung mit Estramustin und Etoposid mit 5 Tieren pro Gruppe.

1. Gruppe: PBS-Kontrolle (keine Behandlung)
2. Gruppe: Vehikel Estramustin / Vehikel Etoposid
3. Gruppe: Estramustin (15/7,5 mg/kg) / Vehikel Etoposid
4. Gruppe: Etoposid (25 mg/m²) / Vehikel Estramustin
5. Gruppe: Estramustin (15/7,5 mg/kg) / Etoposid (25 mg/m²)

Eine weitere Versuchsreihe erfolgte mit der Behandlung Etoposid und ICOL-51. In jeder Behandlungsgruppe wurden 8 Tiere eingesetzt.

6. Gruppe: Kontrolle mit 0,9% NaCl
7. Gruppe: Vehikel Etoposid / Vehikel ICOL-51
8. Gruppe: Etoposid (25 mg/m²) / Vehikel ICOL-51
9. Gruppe: ICOL-51 (100 mg/kg) / Vehikel Etoposid
10. Gruppe: Etoposid (25 mg/m²) / ICOL-51 (100 mg/kg)

3.4.2 Therapieverlauf

Der Behandlungsbeginn erfolgte zwischen dem 3. Tag (Estramustin und Etoposid) und 5. Tag (Etoposid und ICOL-51) nach Tumorzellinjektion. Zu diesem Zeitpunkt sind die Tumore in der Prostata etabliert.

3.4.2.1 Estramustin und Etoposid Behandlung

Estramustin wurde in Aqua bidest gelöst und 15 mg/kg den Tieren intraperitoneal verabreicht. Das entspricht bei einer 200g Ratte 6 mg/ml.

Etoposid, gelöst in Erdnußöl, Benzylalkohol, Ethanol, Makrogol wurde den Tieren mit 50 mg/m² Körperoberfläche intraperitoneal appliziert, entsprechend der Äquivalenzdosis beim Menschen. Die Oberfläche einer 200 g Ratte errechnet sich nach folgender Formel:

Oberfläche K (m^2) = $0,1 \times \sqrt[3]{\text{Körpergewicht (kg)}^2}$. Der Faktor 0,1 besitzt Gültigkeit für Körpergewichte bis 100 kg. Für die 200 g Ratte ergibt sich eine Körperoberfläche (K) = $0,034 m^2$.

Die Tiere der Gruppen 1-5 erhielten ihre Therapie ab dem 3. Tag nach der Tumorzellinjektion. Die Behandlung der Tiere mit der Dosierung von 15 mg/kg Estramustin und $50 \text{ mg}/m^2$ Etoposid musste nach 7 Tage Medikamentengabe unterbrochen und für 2 Tage abgesetzt werden. Bei den Tieren wurde starker Gewichtsabfall beobachtet, möglicherweise durch erhöhte Medikamententoxizität bedingt.

Nach einer Erholung der Tiere wurde die Therapie am 10. Tag wieder aufgenommen und bis zum 17. Tag nach Tumorzellinjektion mit halbierter Dosis (Estramustin $7,5 \text{ mg}/kg$, Etoposid $25 \text{ mg}/m^2$) fortgeführt. Organentnahme erfolgte am 18. Tag postoperativ. Die Gesamtdauer der Medikamentenapplikation betrug bei den Tieren dieser Gruppe zehn Tage. Die Applikation von PBS, Vehikel, Estramustin und Etoposid erfolgte einmal täglich durch intraperitoneale Injektion.

3.4.2.2 Etoposid und ICOL-51 Behandlung

Der Wirkstoff ICOL-51 wurde von der Fa. Roche in Puderform geliefert. Zur Verbesserung der Löslichkeit wurde ICOL-51 für 5 Minuten geschüttelt, 3 Minuten direkt mittels Ultraschall behandelt und anschliessend nochmals für 10 Minuten direkt beschallt. Eine bessere Verabreichung dieser nun weitgehend homogenen Lösung wurde dadurch gewährleistet. Den Tieren wurden $100 \text{ mg}/kg$ oral per Schlundsonde appliziert.

Die Tiere aus dieser Gruppe wurden ab dem 6. Tag nach Tumorzellinjektion bis zum 17. Tag behandelt. Das entspricht 12 Behandlungstage. Auch hier erfolgte die Medikamentengabe einmal pro Tag. Die Gabe von 0,9% NaCl (Kontrolle), Vehikel Etoposid, Etoposid ($25 \text{ mg}/m^2$) erfolgte intraperitoneal. Vehikel ICOL-51

und ICOL-51 (100 mg/kg) wurden per os verabreicht. Nach Tötung der Tiere am 18. Tag wurde die Tumor- und Organentnahme vorgenommen.

3.4.4 Organentnahme

Die Organe wurden bei beiden Gruppen am 18. Tag nach Tumorzellinjektion entnommen. Die Körper wurden über einen Längsschnitt geöffnet und die Prostatatumoren entnommen. Wegen seiner Pseudokapselbildung konnte der Tumor gut vom umliegenden Gewebe getrennt werden. Tumorgröße und Gewicht wurden ausgemessen, der Zustand der Tumorkapsel beurteilt (Infiltration, Kapsel intakt). Unter der Annahme, daß die Tumoren Hemiellipsoide sind, wurde das Tumolvolumen mit der Formel bestimmt: $V = \text{Länge} \times \text{Breite} \times \text{Höhe} \times 0,5236$.

3.5 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden mittels des Statistik- und Graphikprogrammes Graph Pad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) ausgewertet. Bei den „*in vivo*“ Versuchen wurde die Varianzanalyse Anova und der Post-Test nach Tukey angewandt, bei den „*in vivo*“ Versuchen zusätzlich noch der Post-Test nach Dunnett. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson und Spearman wurde bei $p < 0,05$ als statistisch signifikant gewertet.

4. Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit basieren auf Versuchen „*in vitro*“ an der Tumorzellreihe MatLyLu und „*in vivo*“ am Dunningtumor der Copenhagenratte.

4.1 Untersuchung an der MatLyLu-Zellreihe „*in vitro*“

Die MatLyLu-Tumorzellen wurden auf Mikrotiterplatten ausgesät und die Medikamente Estramustin in Konzentrationen von 1-10000 nmol/l, Etoposid in Konzentration

1-10000 nmol/l und ICOL-51 in Konzentration von 200 und 1000 ng/ml sowohl als Monotherapie und als Kombinationstherapie eingesetzt. Die Wirkung der einzelnen Medikamente auf die Zellen wurde mittels des XTT-Testes bestimmt.

4.1.1 Wirkung von Estramustin als Monotherapie

Um die Wirkung von Estramustin als Monotherapie zu untersuchen, wurden für jede Medikamentenkonzentration 6 Einzelmessungen an jeweils 500 Tumorzellen pro Mikrotiterplattenvertiefung durchgeführt. Das Ausmaß der Extinktion in Prozent verglichen mit der Kontrollgruppe (Vehikel DMSO) entspricht dem Proliferationsverhalten der Tumorzellen. Auch bei steigenden Estramustin-Konzentrationen zeigt sich kein Einfluss des Medikaments auf das Proliferationsverhalten der Zellen (Abb. 2 und 3). Auch eine längere Inkubationszeit und damit längere Wirkzeit von Estramustin (72 und 96 Stunden) war ohne Einfluss auf das Wachstumsverhalten der MatLyLu-Zellen.

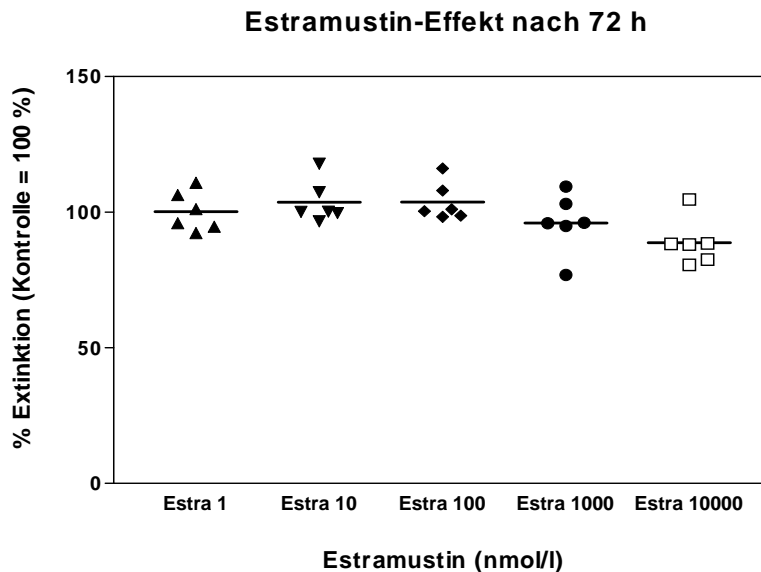


Abb.2

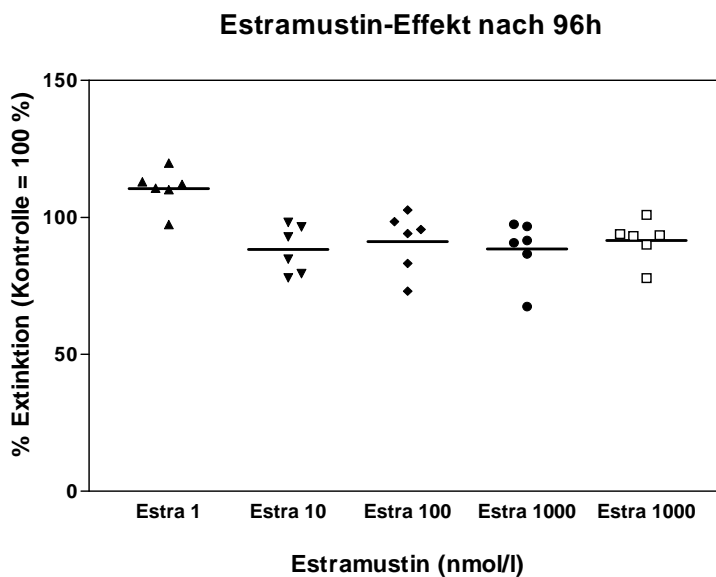


Abb.3

Abb. 2 und 3: Applikation von Estramustin in Konzentrationen von 1-10000 nmol/l nach 72 und 96 Stunden Wirkdauer. Darstellung von Einzelwerten und Medianwerten der Vitalitätsprüfung. Y-Koordinate entspricht der Kontrollgruppe Vehikel DMSO = 100%.

4.1.2 Wirkung von Etoposid als Monotherapie

Zur Beurteilung der Wirksamkeit von Etoposid als Monotherapie wurden pro Konzentration sechs Einzelmessungen an jeweils 500 Zellen pro Mikrotiterplattenvertiefung durchgeführt. Das Ausmaß der Extinktion in Prozent verglichen mit der Kontrollgruppe (Vehikel DMSO) entspricht dem Proliferationsverhalten der Tumorzellen. In Abbildung 4 sind steigende Etoposid-Konzentrationen bis 10000 nmol/l dargestellt. Es zeigt sich kein Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Zellen bis zu einer Konzentration von 1000 nmol/l. Bei einer Etoposid-Konzentration von 10000 nmol/l ist jedoch ein Einschränkung des Zellwachstums bereits nach 48 Stunden Inkubationszeit zu erkennen ($p < 0,001$). Eine Inkubationszeit von 96 Stunden und damit längere Wirkzeit von Etoposid zeigt wie bereits nach 48 Stunden bei einer Konzentration von 10000 nmol/l ein vermindertes Proliferationsverhalten.

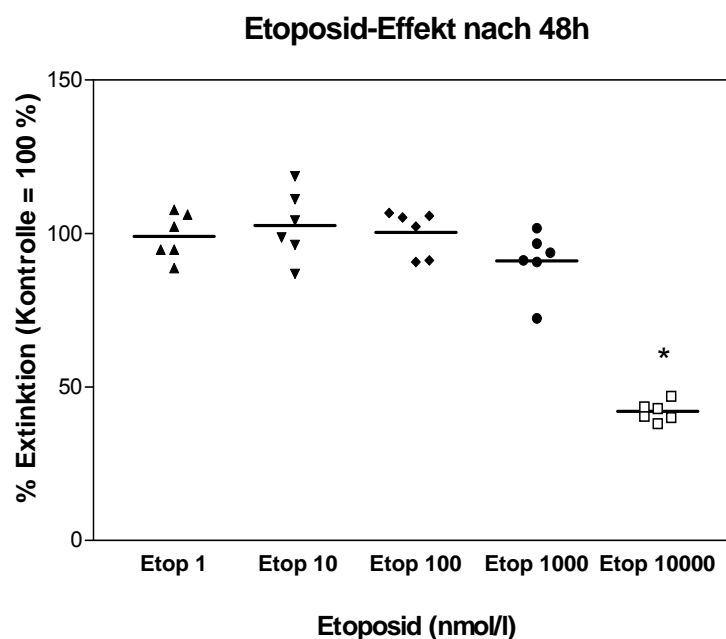


Abb. 4: Applikation von Etoposid-Konzentrationen von 1-10000 nmol/l nach 48 Stunden Wirkdauer. Darstellung der 6 Einzelwerte und der Medianwerte der Vitalitätsprüfung. Signifikante Ergebnisse werden entsprechend mit * $p < 0,001$ angegeben. Y-Koordinate entspricht der Kontrollgruppe (Vehikel DMSO) = 100%.

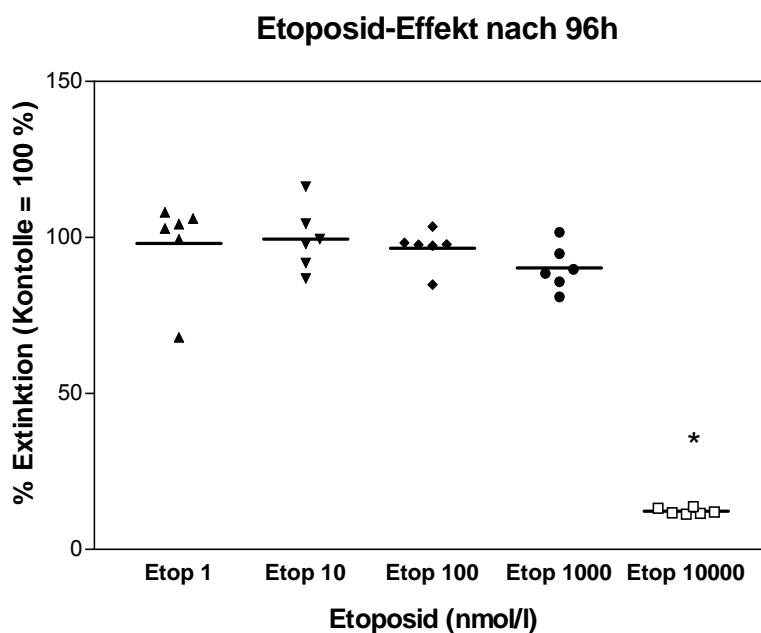


Abb. 5: Applikation von Etoposid-Konzentrationen von 1-10000 nmol/l nach 96 Stunden Wirkdauer. Darstellung der 6 Einzelwerte und der Medianwerte der Vitalitätsprüfung. Signifikante Ergebnisse werden entsprechend mit * $p < 0,001$ angegeben. Y-Koordinate entspricht der Kontrollgruppe Vehikel DMSO = 100%.

4.1.3 Wirkung von Estramustin und Etoposid in Kombination

In den folgenden Versuchsreihen wurde die Wirksamkeit von Estramustin und Etoposid als Kombinationstherapie überprüft. Estramustin wurde in 10 und 100 nmol/l und Etoposid in 100, 1000, 10000 nmol/l eingesetzt. Verglichen mit der Monotherapie von Etoposid, bei der erst ein Effekt ab 10000 nmol/l nachzuweisen war, zeigt sich nun ein synergistischer Effekt mit Estramustin. So ist bei der niedrigsten Estramustinkonzentration von 10 nmol/l mit Etoposid von 1000 nmol/l bereits ein signifikanter proliferationshemmender Effekt zu erkennen (siehe Abb. 6). Das gleiche Ergebnis zeigen die Kombinationen mit Estramustin 10 nmol/l mit Etoposid 10000 nmol/l, Estramustin 100 nmol/l mit Etoposid 1000 nmol/l und

10000 nmol/l ($p < 0,001$), wobei mit steigender Etoposidkonzentration das Wachstum zunehmend stärker gehemmt wird.

Bei einer Inkubationszeitverlängerung von 48 Stunden auf 96 Stunden sind die gleichen Effekte der Substanzen zu beobachten (Abb.7).

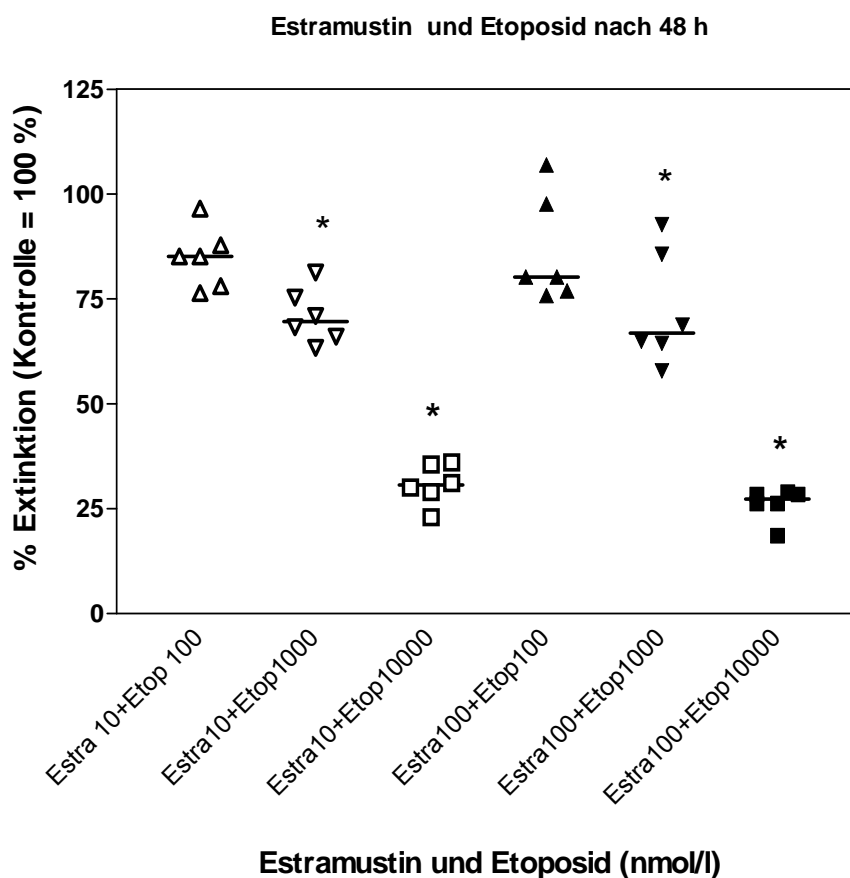


Abb. 6: Applikation von Estramustin-Konzentrationen von 10 und 100 nmol/l kombiniert mit Etoposid 100, 1000 und 10000 nmol/l nach 48 Stunden Wirkdauer. Darstellung der Einzelwerte und der Medianwerte der Vitalitätsprüfung. Signifikante Ergebnisse werden entsprechend mit * $p < 0,001$ angegeben. Y-Koordinate entspricht der Kontrollgruppe Vehikel DMSO = 100%.

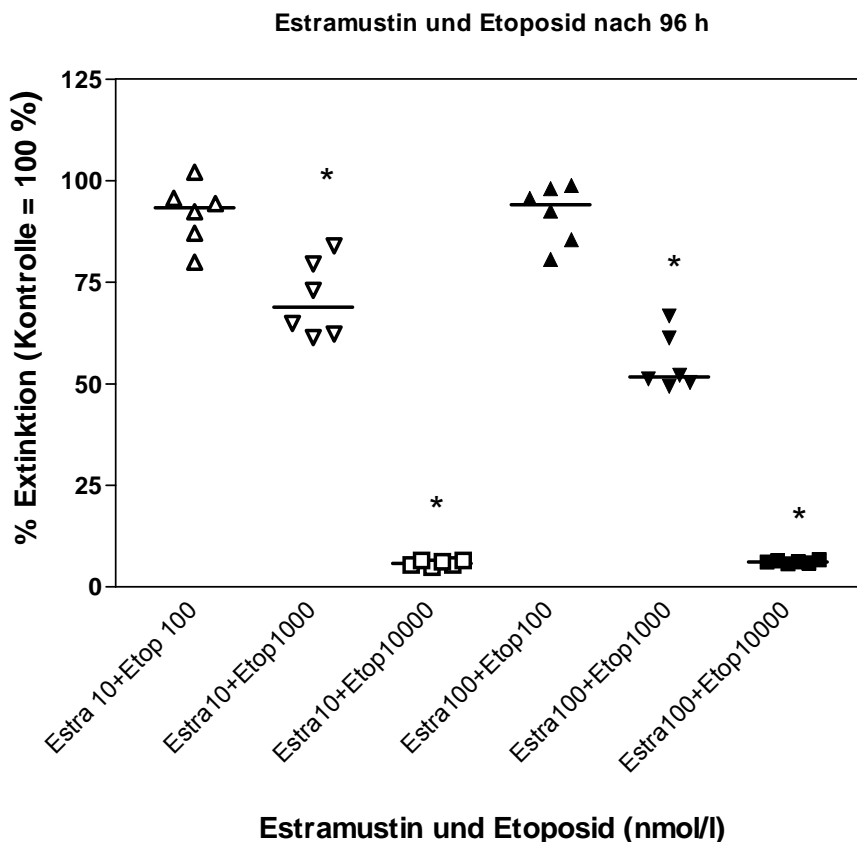


Abb. 7: Applikation von Estramustin-Konzentrationen von 10 und 100 nmol/l kombiniert mit Etoposid 100, 1000 und 10000 nmol/l nach 96 Stunden Wirkdauer. Darstellung der Einzelwerte und der Medianwerte der Vitalitätsprüfung. Signifikante Ergebnisse werden entsprechend mit * $p < 0,001$ angegeben. Y-Koordinate entspricht der Kontrollgruppe Vehikel DMSO = 100%.

4.1.4 Wirkung von Estramustin und ICOL-51

Um die Wirkung der Kombination von Estramustin und ICOL-51 zu untersuchen wurden beide Medikamente in den Dosierungen Estramustin 10 und 100 nmol/l und ICOL-51 in der Konzentration von 200 und 1000 ng/ml einzeln und in Kombination getestet (siehe Abb. 8). Estramustin zeigte erneut wie schon in der initialen Monotherapieversuchsreihe keinen Effekt auf das Zellwachstum. ICOL-51

hat ebenfalls in keiner der eingesetzten Konzentrationen einen nachweislichen Effekt auf die Zellproliferation. Die Kombination beider Medikamente zeigte auch keinen Effekt, weder nach 48 Stunden noch nach 96 Stunden Inkubationszeit.

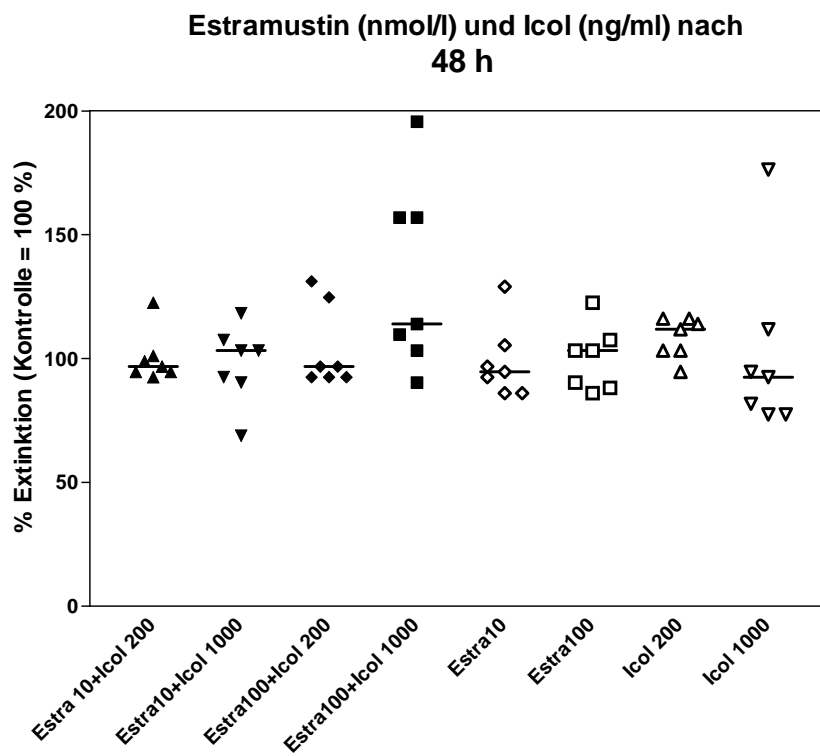


Abb. 8: Applikation von Estramustin-Konzentrationen von 10 und 100 nmol/l und ICOL-51 mit 200 und 1000 ng/ml, einzeln und kombiniert nach 48 Stunden Inkubationszeit. Darstellung von Einzelwerten und Medianwerten der Vitalitätsprüfung. Y-Koordinate entspricht der Extinktion der Kontrollgruppe Vehikel DMSO = 100%.

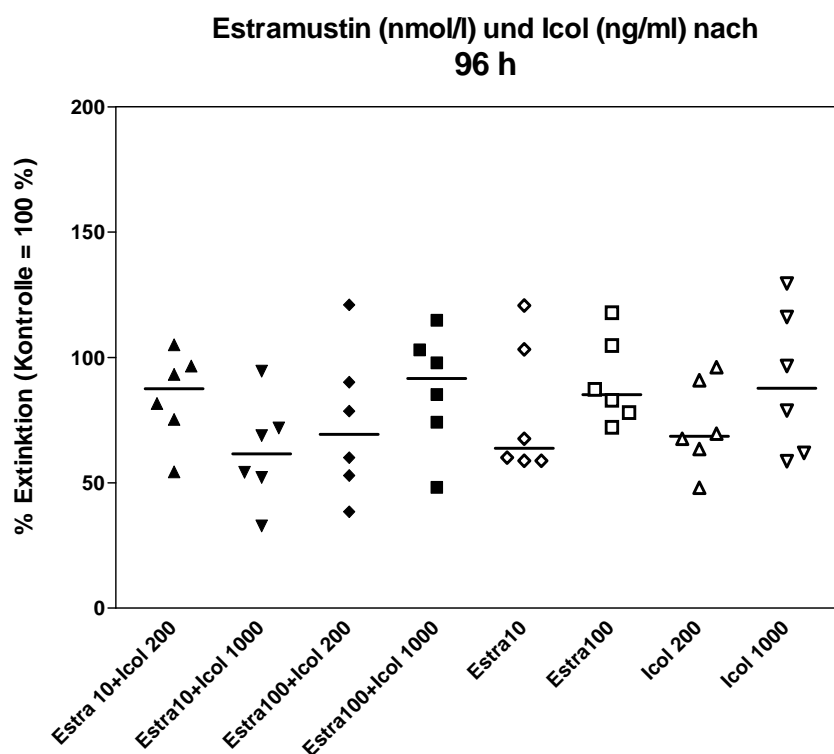


Abb. 9: Applikation von Estramustin-Konzentrationen von 10 und 100 nmol/l und ICOL-51 mit 200 und 1000 ng/ml, einzeln und kombiniert nach 96 Stunden Inkubationszeit. Darstellung von Einzelwerten und Medianwerten der Vitalitätsprüfung. Y-Koordinate entspricht der Extinktion der Kontrollgruppe Vehikel DMSO = 100%.

4.1.5 Wirkung von Etoposid und ICOL-51 in Kombination

Die letzte Versuchsreihe gibt einen Überblick über das Wachstumsverhalten unter den Medikamenten Etoposid und ICOL-51. Signifikante Veränderungen in der Proliferation sind bei den Kombinationen Etoposid 1000 nmol/l mit ICOL-51 200 ng/ml ($p < 0,01$) und Etoposid 1000 nmol/l mit ICOL-51 1000 ng/ml festzustellen ($p < 0,01$). Keinen Effekt zeigt Etoposid 100 nmol/l mit ICOL-51 200 ng/ml und Etoposid 100 nmol/l mit ICOL-51 1000 ng/ml. Im Rahmen der verlängerten

Inkubationszeit von 48 auf 96 Stunden zeigte sich nach 96 Stunden bei einer Etoposidkonzentration von 1000 nmol/l auch ein signifikanter Effekt ($p < 0,001$). Bei der ersten Testreihe Etoposid-Monotherapie konnte dieser Effekt erst bei einer Konzentration von 10000 nmol/l nachgewiesen werden.

Ein zusätzlicher Effekt nach 48 und auch nach 96 Stunden Wirkzeit durch die Erhöhung von ICOL-51 von 200 auf 1000 ng/ml bei gleicher Etoposid-Konzentration von 1000 nmol/l konnte nicht bestätigt werden. Etoposid 1000 nmol/l mit ICOL 200 ng/ml verglichen mit Etoposid 1000 nmol/l und ICOL 1000 ng/ml zeigt keinen signifikanten Effekt auf das Proliferationsverhalten der Zellen.

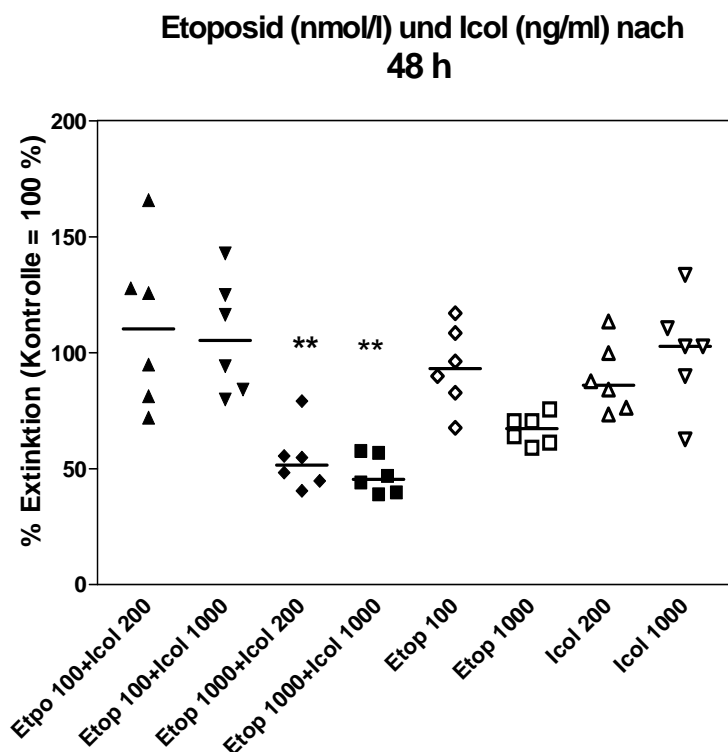


Abb. 10: Effekt der Kombination von Etoposid 100 und 1000 nmol/l kombiniert mit ICOL-51 in Konzentration 200 und 1000 ng/ml nach 48 Stunden Inkubationszeit. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe sind mit * $p < 0,01$ und ** $p < 0,001$ angegeben. Median und Einzelwerte sind dargestellt. Y-Koordinate entspricht der Extinktion der Kontrollgruppe Vehikel DMSO = 100%.

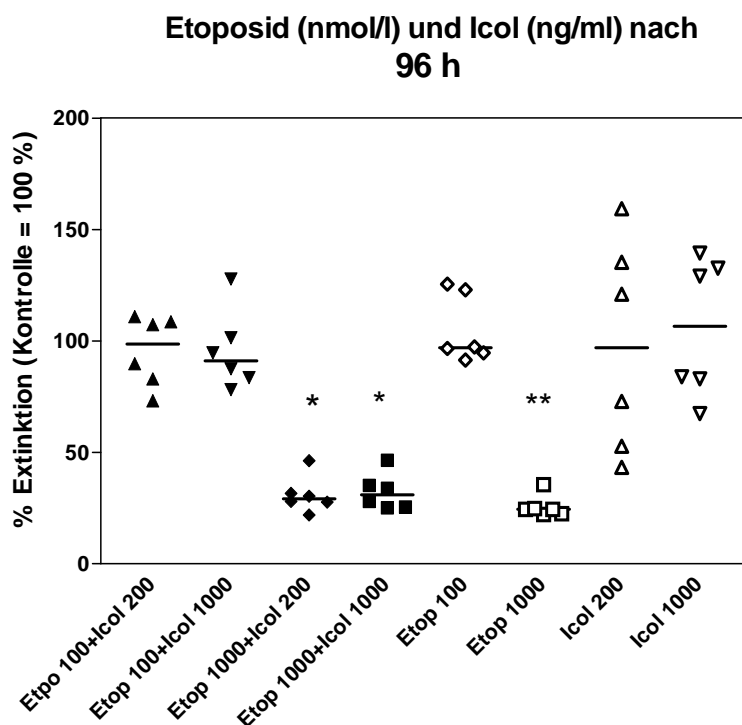


Abb. 11: Effekt der Kombination von Etoposid 100 und 1000 nmol/l kombiniert mit ICOL-51 in Konzentration 200 und 1000 ng/ml nach 96 Stunden Inkubationszeit. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe sind mit * $p < 0,01$ und ** $p < 0,001$ angegeben. Median und Einzelwerte sind dargestellt. Y-Koordinate entspricht der Extinktion der Kontrollgruppe Vehikel DMSO = 100%.

Auf Grundlage der „*in vitro*“ Versuche kann das antiproliferative Potential von Etoposid in hoher Dosierung von 10000 nmol/l auf die MatLyLu Zellen als effektiv wirksam beschrieben werden. In Kombination mit Estramustin oder dem synthetischen MMPI ICOL-51 zeigte sich kein zusätzlicher Effekt auf das Proliferationsverhalten. Auch für Estramustin und ICOL-51 als Einzelsubstanz konnte kein wachstumshemmender Effekt nachgewiesen werden.

4.2 Untersuchung am Tiermodell

4.2.1 Wirksamkeit von Estramustin und Etoposid am etablierten Tumor

Nach Injektion der Tumorzellen in den vorderen Lappen der Rattenprostata entwickelten alle Tiere einen orthotopen Tumor. Operative und postoperative Komplikationen wurden nicht beobachtet, die OP-Wunden heilten problemlos. Der gesamte Beobachtungszeitraum der behandelten Tiere betrug 18 Tage. Estramustin mit 15 mg/kg und Etoposid 50 mg/m² wurde an den Tagen 3-7 nach Tumorzellinjektion intraperitoneal appliziert. Von Tag 13-17 wurde jeweils die halbe Dosis verabreicht (Estramustin 7,5 mg/kg, Etoposid 25 mg/m²). Bei der Initialdosis von 15 mg/kg Estramustin und 50 mg/m² Etoposid kam es zu einem starken Gewichtsabfall, der möglicherweise durch die Medikamententoxizität induziert wurde. Nach Dosisreduktion von Estramustin 15 mg/kg auf 7,5 mg/kg und Etoposid 50 mg/m² auf 25 mg/m² wurde die Therapie gut vertragen. Am Tag 18 erfolgte die Tötung der Tiere. Tumorgewicht und Tumorgröße wurden bestimmt. Die folgenden Abbildungen zeigen den Einfluss von Estramustin und Etoposid auf das Tumorgewicht und Tumolvolumen. Die Kontrollgruppen wurden mit PBS und Vehikel von Estramustin bzw. Etoposid behandelt, ein Effekt der Kontrollsubstanzen wurde nicht nachgewiesen. Auch die Gabe von Estramustin alleine zeigte keine Wirkung auf das Tumorwachstum. Die Applikation von Etoposid alleine und in Kombination mit Estramustin (Abb.12+13) zeigt einen Effekt bezogen auf das Tumorgewicht bzw. Tumolvolumen, im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Einen synergistischen Effekts durch Estramustin lässt sich nicht nachweisen, jedoch ist ein Trend erkennbar ($p > 0,05$).

Gruppendarstellung zu Abb. 12 und 13

Gr. 50 = PBS Kontrollgruppe

Gr. 51 = Veh. Estramustin + Veh. Etoposid

Gr. 52 = Estramustin (15 bzw 7,5 mg/kg) + Veh. Etoposid

Gr. 53 = Veh. Estramustin + Etoposid (50 bzw. 25 mg/m²)

Gr. 54 = Estramustin (15 bzw. 7,5 mg/kg) + Etoposid 50 bzw. 25 mg/m²)

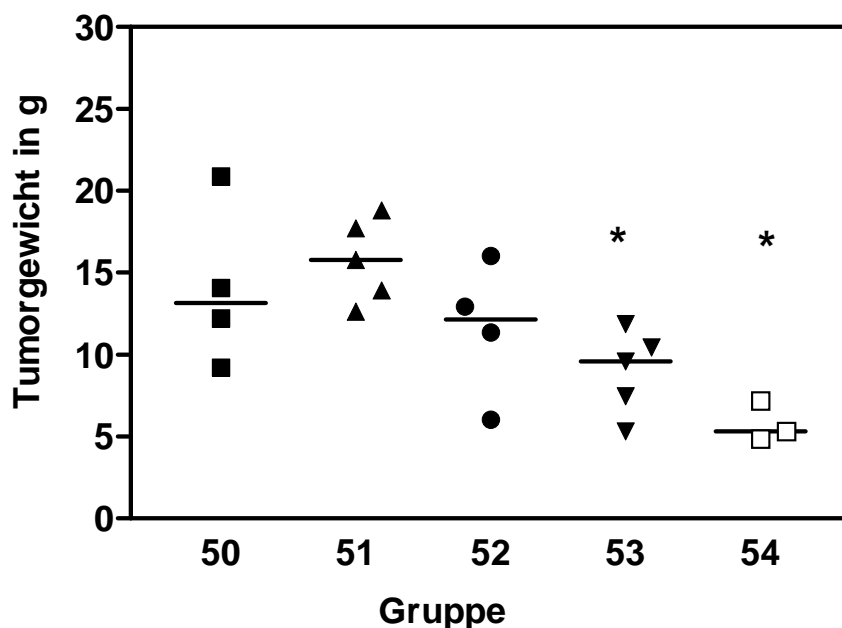


Abb. 12: Tumorgewicht 18 Tage nach Tumorzellinokulation. Median- und Einzelwerte sind dargestellt. Die Gruppen 53+54 zeigen im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe signifikante Tumorgewichtreduktion. Signifikante Veränderungen im Vergleich mit PBS-Kontrollgruppe werden mit * $p < 0,01$ angegeben.

Ebenfalls signifikante Ergebnisse zeigen die Gruppen 53 und 54 bezogen auf das Tumolvolumen (Abb.13) verglichen mit PBS-Kontrollgruppe. Etoposid als Monotherapie zeigte einen Effekt auf das Tumorstadium. Ein synergistischer, jedoch nicht signifikanter Trend von Etoposid durch Zugabe von Estramustin (Gruppe 54) ist zu erkennen (siehe Abb.12 und 13). 2 Tiere dieser Gruppe sind verstorben.

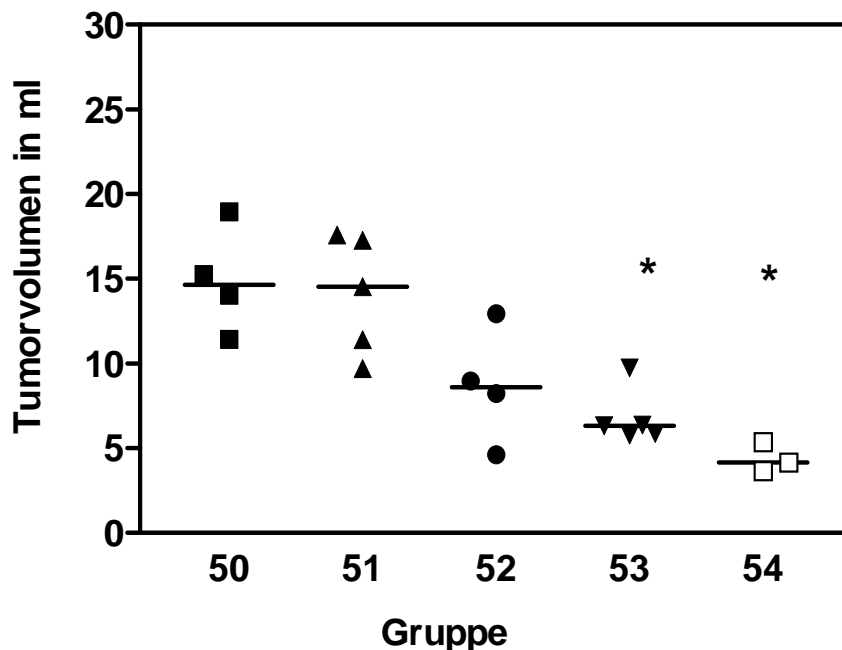


Abb.13: Tumolvolumen 18 Tage nach Tumorzellinokulation. Median- und Einzelwerte sind dargestellt. Auch hier scheint tendenziell die Kombination Etoposid und Estramustin besser wirksam zu sein verglichen mit der Monotherapie Etoposid, jedoch ohne Signifikanz (vgl. Gr.53 und 54). Signifikanzen im Vergleich mit der Kontrollgruppe werden mit * $p < 0,01$ angegeben.

4.2.2 Wirksamkeit von ICOL-51 und Etoposid am etablierten Tumor

Die folgenden Gruppen (siehe Abb. 14 und Abb. 15 auf Seite 44, 45) zeigen die Wirkung von Etoposid in Kombination mit dem synthetischen MMPI ICOL-51. Etoposid mit 25 mg/m^2 und ICOL-51 mit 100 mg/kg (p.o.) wurde an den Tagen 6-17 nach Tumorzellinjektion appliziert. Die Bestimmung von Tumorgröße und -gewicht erfolgte am Tag 18 nach Tötung der Tiere. Die Abbildungen 14 und 15 zeigen den Einfluss von Etoposid und ICOL-51 bezogen auf das Tumorgewicht

und Tumolvolumen. Die Kontroll –und Vehikelgruppe waren nicht unterschiedlich. Diese wurden daher für die Berechnung vereinigt.

Verglichen mit der Kontrollgruppe zeigt die Gabe von Etoposid allein einen Effekt auf das Tumorgewicht und Tumorgrosse (siehe Abb. 14 und 15; * $p < 0,01$) in unserer Versuchsanordnung. ICOL-51 hat ebenfalls einen signifikanten Effekt ($p < 0,01$) verglichen mit der Kontrollgruppe. ICOL-51 als Einzelsubstanz zeigt verglichen mit der Etoposid-Monotherapie einen noch besseren, Einfluss auf Tumorgewicht und Volumen (Gr. 61 vs. Gr. 62 $p < 0,01$). Die Kombination von Etoposid und ICOL-51 (Gr. 63) hat verglichen mit der schon wirksamen Einzeltherapie von Etoposid (Gr. 61) einen zusätzlichen, Effekt auf das Wachstum der Tumors. Die Kombination Etoposid und ICOL (Gr. 63) hat verglichen mit ICOL-51 als Monosubstanz (Gr. 62) keinen nachweisbaren zusätzlichen Effekt.

Zusammenfassend hat Etoposid und ICOL-51 einen hemmenden Effekt auf das lokale Tumorwachstum. ICOL-51 ist hierbei im Vergleich mit Etoposid als Einzelsubstanz deutlich wirksamer. Ein Synergieeffekt beider Substanzen ist bei den durchgeführten Untersuchungen nicht nachzuweisen.

Gr.59 = 0,9% NaCl

Gr.60 = Veh. Etoposid + Veh. ICOL-51

Gr.61 = Etoposid 25 mg/m² + Veh. ICOL-51

Gr.62 = Veh. Etoposid + ICOL-51 100 mg/kg

Gr.63 = Etoposid 25 mg/m² + ICOL-51 100 mg/kg

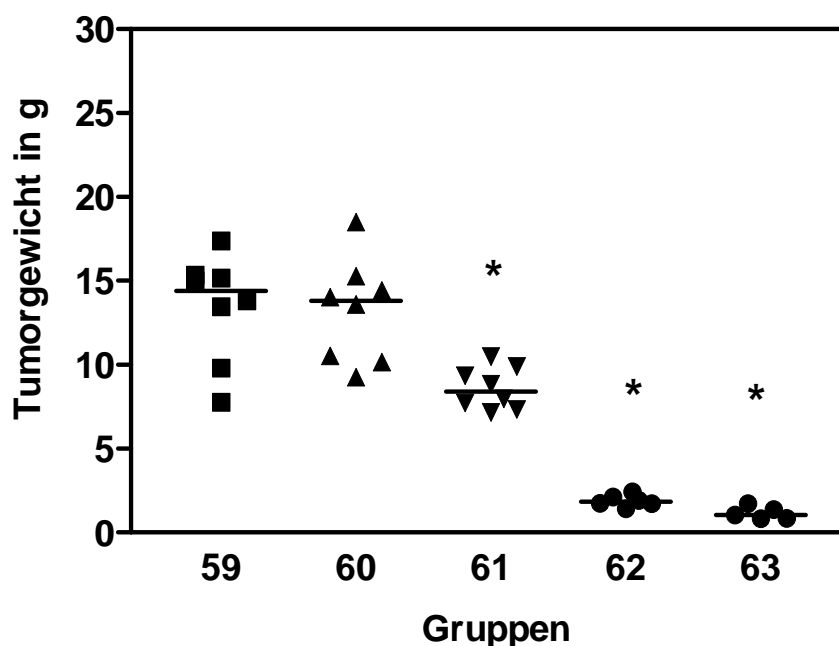


Abb. 14: Tumorgewicht 18 Tage nach Tumorzellinokulation. Bei den mit Etoposid behandelten Tiere (Gr. 61) ist das Tumorgewicht signifikant kleiner als in den Kontroll -und Vehikelgruppen (* $p < 0,01$). ICOL-51 (Gr. 62) zeigt zusätzlich signifikante Unterschiede zu Etoposid (Gr. 61; * $p < 0,01$). Etoposid und ICOL -51 (Gr. 63) vgl. mit ICOL-51 (Gr. 62) zeigt keinen weiteren synergistischen Effekt. Median -und Einzelwerte sind dargestellt. Signifikanzen sind mit * $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontroll -und Vehikelgruppe angegeben.

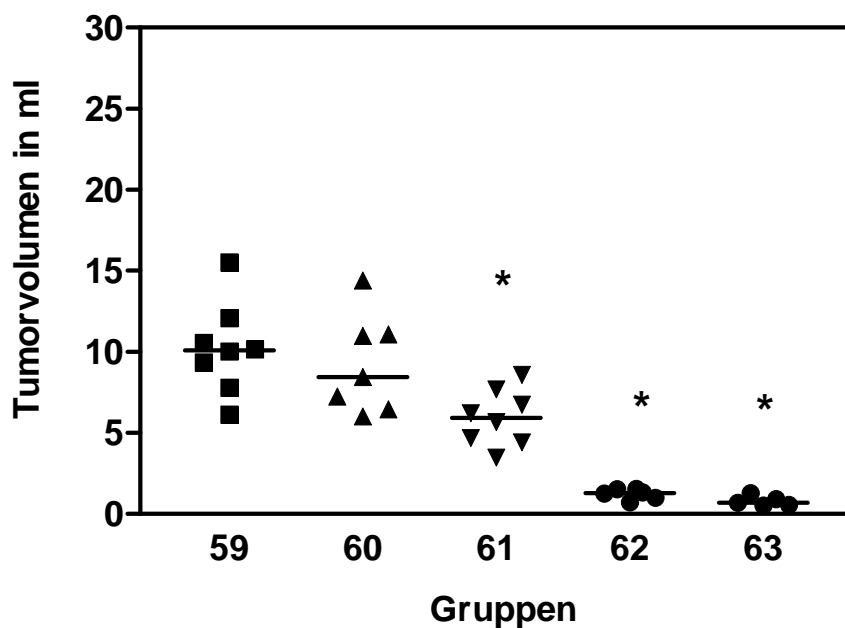


Abb. 15: Tumorzellen 18 Tage nach Tumorzelleninokulation. Bei den mit Etoposid behandelten Tiere (Gr. 61) ist das Tumorzellen signifikant kleiner als in den Kontroll –und Vehikelgruppen (* $p < 0,01$). ICOL-51 (Gr. 62) zeigt zusätzlich signifikante Unterschiede zu Etoposid (Gr.61; * $p < 0,01$). Etoposid und ICOL-51 (Gr. 63) vgl. mit ICOL-51 (Gr. 62) zeigt keinen weiteren synergistischen Effekt. Median -und Einzelwerte sind dargestellt. Signifikanzen sind mit * $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontroll -und Vehikelgruppe angegeben.

5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Wirkung des synthetisch hergestellten MMPI ICOL-51 in Kombination mit Estramustin und Etoposid bei der Anwendung auf den orthotopen Dunningtumor der Ratte und der entsprechenden MatLyLu-Zellkultur. Mit dem Einsatz des spezifischen MMPI ICOL-51 wird ein neuer möglicher Therapieansatz beim hormonrefraktären Prostatakarzinom geprüft. Estramustin und Etoposid sind bisher Bestandteil der Chemotherapie beim hormonrefraktären Prostatakarzinom. Das Dunning-Tumormodell wurde von uns gewählt, da es bereits als gut etabliertes und anerkanntes Modell zur Prüfung von Therapieeffekten am hormonrefraktären Prostatakarzinom dient (87).

5.1 Untersuchung an der MatLyLu-Zellreihe „*in vitro*“

Um die Wirkung von Estramustin auf die MatLyLu-Zellreihe zu untersuchen, wurden unterschiedliche Konzentrationen sowie verschiedene Wirkzeiten (48-92 Stunden) getestet. Weder in geringer Konzentration (1 nmol/l) noch in hoher Konzentration (10000 nmol/l) konnte ein proliferationshemmender Effekt in unserem Model nachgewiesen werden. Diese „*in vitro*“ Ergebnisse bestätigen die bisher bekannte Datenlage über die fehlende Wirkung von Estramustin auf die MatLyLu -Zellreihe (87).

Obwohl Estramustin intrazelluläre Wirkungsmechanismen aufweist (Hemmung der DNA-Replikation) bleibt unklar, warum bei isolierter Zellkultur kein hinreichender proliferationshemmender Effekt nachzuweisen ist. Möglicherweise deshalb, weil zur erleichterten Aufnahme von Estramustin in die Zelle ein sekretorisches Protein notwendig ist (Estramustin-bindendes Protein), dieses jedoch bei der isolierten Zelle fehlt. Anders verhält es sich mit Etoposid.

Bei der Untersuchung der Wirkung von Etoposid auf das Wachstum der MatLyLu - Zellreihe konnte gezeigt werden, dass in Abhängigkeit der Dosierung erst bei einer Konzentration von 10000 nmol/l ein wachstumshemmender Effekt auftrat. Etoposid ist das einzige, der von mir „*in vitro*“ getesteten Medikamente, welches einen proliferationshemmenden Effekt auf die MatLyLu -Zellreihe aufzeigt. Die Erklärung könnte in der intrazellulären Wirkweise von Etoposid liegen. Sie ist stark abhängig vom Zellzyklus, weil die Topoisomerase II in den Zellzyklusphasen sehr unterschiedlich exprimiert wird. Die in der G0/G1-Phase schwach ausgeprägte Expression steigt in der S-Phase stark an und erreicht ihr Maximum in der G2/M-Phase. Dort induziert die Hemmung der Topoisomerase II letale DNA-Doppelstrangbrüche. Ausserdem existiert ein weiterer Mechanismus der Zytotoxizität von Etoposid. So führt Etoposid zur Bildung von DNA-Strangbrüchen, die nicht aus der DNA Schädigung von Etoposid selbst entstehen, sondern vielmehr das Ergebnis des intrazellulären enzymatischen Metabolismus des Chemotherapeutikums sind (88). Dabei entstehen metabolische Produkte wie das Orthochinon, welches sich fest an doppelsträngige DNA bindet und diese biologisch inaktiviert. Weiterhin existieren auch Daten, dass die zytotoxische Etoposidaktivität durch thiolabhängigen oxidativen Stress erhöht werden kann. (89,90).

Ein synergistischer Effekt konnte bei der Kombination von Estramustin und Etoposid „*in vitro*“ nachgewiesen werden. So zeigte sich hier schon eine Wachstumshemmung bei einer Etoposidkonzentration von 1000 nmol/l kombiniert mit Estramustin. Anscheinend besteht in der Kombination beider Medikamente ein additiver Wirkungseffekt durch Estramustin auf Etoposid. Dieser Synergismus wurde bereits von Williams et al. im Tiermodell beschrieben (91). Dort zeigte sich eine Wirkungsverstärkung von Docetaxel durch Estramustin verglichen mit den Substanzen alleine betrachtet. Zukünftige Versuche mit anderen Estramustin-Konzentrationen könnten möglicherweise neue Erkenntnisse bringen.

Im Weiteren wird die Wirkung von Estramustin in Kombination mit dem synthetischen MMPI ICOL-51 beschrieben.

Weder ICOL-51 als Monosubstanz in einer Dosierung von 200 und 1000 ng/ml noch die Kombination mit Estramustin zeigte einen Effekt auf das Proliferationsverhalten der MatLyLu -Zellen. Die fehlende antiproliferative Effektivität von MMPI „*in vitro*“ könnte durch das Fehlen der Extrazellmatrix und sonstigen extrazellulären Bestandteilen zu erklären sein. Allerdings konnte in einer Arbeit über Batimastat, einem unspezifischer MMPI, „*in vitro*“ ein proliferationshemmender Effekt an der MatLyLu-Zellreihe gezeigt werden (92).

Die Wirksamkeit von Etoposid und ICOL-51 in Kombination zeigt sich synergistisch. Bei der Etoposid Monotherapie war der proliferationshemmende Effekt erst bei einer Dosierung von 10000 nmo/l aufgetreten, in Kombination mit ICOL-51 schon bei einer Konzentration von 1000 nmo/l.

ICOL-51 alleine hat weder in den Konzentrationen 200 noch 1000 ng/ml eine zytoreduktive Wirkung „*in vitro*“. Dieses Phänomen der synergistischen Wirkung mit Etoposid bleibt zum gegenwärtigen Zeitpunkt ungeklärt. Die Kombinationswirkung von ICOL-51 und Etoposid müsste erst noch in weiteren Untersuchungen mit der Methode des Isobologramms geprüft werden. Mit ihrer Hilfe können Abweichungen der experimentellen Daten von einer spezifischen Referenzlinie, welche Konzentrationsadditivität markiert, detektiert werden. Trotz der eingeschränkten Aussagekraft dieser Arbeit bezüglich der Zellkulturergebnisse, scheint die Kombinationstherapie der verwendeten Medikamente Etoposid und ICOL-51 schon bei den Zellkulturen effektiver zu wirken. Dasselbe gilt für die Kombination von Estramustin mit Etoposid. Im Weiteren wurde der therapeutische Effekt der drei Medikamente am MatLyLu Dunningtumor der Ratte geprüft.

5.2 Untersuchung am Tiermodell

Nach Inokkulation von 100000 MatLyLu Zellen konnte ein orthotopes Tumorwachstum in allen Tieren nachgewiesen werden. In den Versuchsreihen mit Etoposid und Estramustin wurde bei Dosierungen von 15 mg/kg Estramustin und 50 mg/m² Etoposid ein initialer Gewichtsabfall beobachtet, am ehesten verursacht durch Medikamententoxizität. Nach Dosisreduktion auf 7,5 mg/kg bzw. 25 mg/m² wurde die Therapie gut toleriert. Estramustin als Monotherapie zeigte wie auch schon an der isolierten Zellkultur keinen Effekt auf das Tumorwachstum. Die Wirkung von Etoposid auf das Tumorwachstum war signifikant im Vergleich zu den Kontroll- bzw. Vehikelgruppen. Ein synergistischer Effekt durch Estramustin war nur vom Trend her zu verzeichnen jedoch ohne statistische Signifikanz. Bei den entsprechenden Gruppen sollte aber die geringe Fallzahl berücksichtigt werden. Der Versuchsaufbau wurde ähnlich wie bereits bei Pienta et al. (87) durchgeführt, wobei in unseren Versuchen der Tumor orthotop in die Prostata implantiert wurde. Die nur im Trend vorhandene hemmende Wirkung von Estramustin auf das Zellwachstum „*in vitro*“ konnte von uns analog zu Pienta beobachtet werden. Im Tiermodell zeigte sich bei den Vergleichsarbeiten ein wachstumshemmender Effekt.

Etoposid zeigte wie in den Kombinationsversuchen mit Estramustin einen signifikanten Effekt auf das Tumorwachstum als Monosubstanz. Bei ICOL-51 als Monosubstanz findet man verglichen mit Etoposid einen deutlich stärkeren proliferationshemmenden Effekt. Die Kombination aus beiden Substanzen brachte statistisch keinen zusätzlichen Effekt. Der Effekt der synthetischen MMPI auf das Tumorwachstum ist dagegen bei den Tierversuchen deutlich nachzuweisen, während bei den Zellkulturen keine eindeutige Wirkung zu sehen ist, allenfalls eine synergistische Wirkung durch Etoposid. Ähnliche Untersuchungen mit Etoposid und synthetischen MMPI beim Dunningtumor lagen zum Zeitpunkt unserer Untersuchungen nicht vor.

Die Ergebnisse der tierexperimentellen Studien stehen im Einklang mit Untersuchungen am Tiermodell anderer Forscher. Es zeigte sich ebenfalls in verschiedenen Studien eine lokale Tumorreduktion unter synthetischen MMPI. In einer Studie von Watson wurden immundefizienten Mäusen Kolonkarzinom-Zellen intraperitoneal appliziert um die Wirkung von Batimastat im Tiermodell für kolorektale Tumoren zu untersuchen. Batimastat ist ein Breitspektrum-Inhibitor der Matrixmetalloproteinasen. Die Tiere entwickelten dabei solide Tumore und Aszites, wobei unter Therapie mit Batimastat die Aszitesentwicklung bei 47% der Tiere verhindert wurde und das Wachstum der peritonealen Tumoren reduziert werden konnte (93).

Bei einer weiteren Studie von Davies et al. wurden Ovarialkarzinomzellen Mäusen intraperitoneal injiziert. Ein signifikantes längeres Überleben der Tiere wurde durch Batimastat erreicht (75). In einem anderen Xenograft-Modell wurden menschliche Brustkrebszellen orthotop in das Brustfettgewebe von Nacktmäusen eingebettet. Nach Tumorextirpation und anschließender Therapie mit Batimastat konnte das Wiederauftreten von Tumoren sowie die Entstehung von Lungenmetastasen reduziert werden (94). Klinische Erfahrungen über die Rolle der MMP beim Prostatakarzinom liegen nur in geringen Untersuchungen vor. Korrelation von erhöhten MMP-Spiegeln und niedrige TIMP-Spiegel in Prostatakarzinompatienten wurde von Lokeshwar et al. bisher gefunden (66). Auch Brehmer et al. konnten in 40 Prostataproben von Prostatakarzinompatienten ein Ungleichgewicht von vermehrtem MMP-2 und MMP-9 sowie erniedrigtem TIMP-1 und TIMP-2 finden (36). Tastbare Tumoren (T2 und T3) exprimierten sogar noch signifikant mehr MMP-2 und signifikant weniger MMP-9 als T1c Tumoren. Das Ungleichgewicht zwischen MMP und TIMP wurde auf den Verlust von TIMP-1 zurückgeführt. Aufgrund dieser Ergebnisse ist der Ansatz dieser Arbeit synthetische MMP-Inhibitoren weiter am Tiermodell zu untersuchen gerechtfertigt. Das Prostatakarzinom ist eine Tumorentität mit dynamischen Eigenschaften. Das zeigt sich an der veränderten Resistenz von Tumorzellen gegenüber der antihormonellen Therapie (95). Bei den bisherigen Therapieoptionen gegen diese dynamischen Veränderungen der Tumorzellen stehen nur unspezifische zytostatische bzw. zytotoxische Therapieansätze zur Verfügung.

Wünschenswert wäre gegenüber den bisherigen Therapien der Einsatz spezifischer Methoden, unabhängig von der Tumordynamik. Synthetische MMPI bieten einen Ansatz für eine neue spezifische Therapie.

Im vorliegenden Modell entstand der Tumor unter kontrollierten Bedingungen, anschliessend erfolgte die Therapie. Dies ist den hier beschriebenen Arbeiten und den von uns durchgeführten Versuchen mit synthetischen Inhibitoren der MMP gemeinsam. Direkte Vergleiche der Modelle mit dem humanen Prostatakarzinom sind nur eingeschränkt möglich. Ob in den Versuchen dieser Arbeit nach Tumorzellinjektion und Wachstum tatsächlich eine Dysbalance zwischen MMP und TIMP vorlag, wurde nicht untersucht. Auch wurde die Annahme nicht untersucht, ob eine Degradierung der Extrazellulärmatrix durch tumorinduzierte MMP und die Hemmung durch deren Inhibitoren im Gewebe vorliegt. Allerdings zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit im Tiermodell des Dunningtumors der Copenhagenratte, dass die Wirkung von ICOL-51, einem synthetischen MMPI sich wachstumshemmend auf das Wachstum des induzierten Prostatakarzinoms auswirkt. Ebenfalls zeigt sich, dass die Tiere die mit ICOL-51 behandelt wurden, keine makroskopisch sichtbares, kapselüberschreitendes Tumorwachstum aufweisen, ein möglicher Beleg für die Erhaltung der Basalmembranintegrität, obgleich deren mikroskopischer Bestand nicht untersucht wurde.

Die biologische Bedeutung der MMP für den Organismus liegt im Um- und Abbau von Gewebeverbänden, Gewebsneubildung und dem Wachstum einschließlich Zellabbau bzw. Zellerneuerung. Unter physiologischen Bedingungen finden sich MMP in nur geringer Konzentration im Blut und Urin. Beim Gewebeumbau unter Normalbedingungen wie beispielsweise während der Involution der Organe z.B. Uterus nach Schwangerschaft oder der Brust, sind MMP vermehrt in Gewebe nachweisbar. Der Blutspiegel von MMP spiegelt den Gewebe-MMP-Spiegel nur eingeschränkt wieder. In pathologischen Prozessen, wie Infektionen oder Tumorbildung trifft dies ebenfalls zu (96,97). Tumorentstehung und -Progress im Zusammenhang mit MMP wurden in umfangreichen Untersuchungen hinreichend belegt. Trotz dieser Ergebnisse über das Zusammenspiel zwischen MMP und Tumoren sind die Wirkmechanismen der MMP bis dato nicht ausreichend erklärt.

Ungeachtet dessen, könnte die selektive Hemmung der MMP als zukünftiges therapeutisches Ziel in der Tumorthherapie gelten. Für TIMP hingegen haben experimentelle und histologische Untersuchungen gezeigt, dass außer der MMP Inhibition weitere Eigenschaften vorliegen, welche neben dem Einfluss auf die MMP auch die Stimulation maligner Prozesse fördern könnte (98,99). Eine wichtige Erkenntnis der MMP- und TIMP-Forschung ist deren Ungleichgewicht in malignen Prozessen. Diese Tatsache ist experimentell und klinisch ausreichend dokumentiert.

In Tumorgewebe von Tier und Mensch ist die Konzentration von MMP höher als in jeweils gesundem Gewebe (100). Es besteht eine Korrelation von höheren MMP-Konzentrationen und fortgeschritteneren Tumorstadien (101). Laut Nakanishi et al. zeigt sich stärkste Expression von MMP direkt an der Grenze zwischen Tumor und Bindegewebe (102). Eine signifikante positive Korrelation zwischen MMP-Expression und klinisch pathologischen Indikatoren zeigte sich bei verschiedensten Tumorentitäten. So korreliert die Expression der MMP mit der Entdifferenzierung und dem Grading von Tumoren, dem Tumorstadium, der Tumorgröße sowie Beteiligung von vaskulärer und lymphatischer Strukturen. Weiterhin zeigt sich ein Zusammenhang zwischen Fernmetastasen, Lymphknotenmetastasen, Tumorrezidiv oder refraktärem Therapieverhalten und der Expression bzw. Aktivität der MMP (103,104,105).

Es wurde in einigen Studien auch Beziehung zwischen MMP-Expression und dem Wiederauftreten des Tumors bzw. dem Überleben der Patienten gefunden. Stromelysin 3 Expression (MMP-11) beim Mammakarzinom hat prognostische Bedeutung auf das tumorfreie Überleben. Patientinnen mit immunhistochemisch nachgewiesener hoher Stromelysinkonzentration im Gewebe hatten ein kürzeres krankheitsfreies Intervall und ein kürzeres Gesamtüberleben (106). Für TIMP und Malignome existiert diese Korrelation bisher nicht. Hinweise für eine vermehrte Expression von TIMP in Tumoren gibt es. So findet sich eine Überexpression in Blut oder Gewebe von Mammakarzinomen, kolorektale Karzinomen, Prostatakarzinomen, Magenkarzinome und Bronchialtumoren (107,108,71,109,110). Hypothetisch gesehen sollte bei einer vermehrten

Expression von physiologischen Inhibitoren, eine vermehrte Hemmung von MMP und damit eine geringere Invasion und Metastasierung und folglich geringere Progression erfolgen. Leider zeigt sich statt dessen häufig eine schlechtere Prognose bei TIMP-1 überexprimierten Tumoren (111,112,113,114,115). Bei kolorektalen Karzinomen, Magenkarzinomen, und Bronchialtumoren korreliert hohe präoperative TIMP-1 Plasmakonzentration mit einem kürzerem Patientenüberleben (113,114,116). TIMP-2 Überexpression bei Zervixkarzinomen und Mammakarzinom korreliert mit einer schlechteren Prognose (117). Die nachgewiesene positive Korrelation von vermehrter TIMP-Expression in Malignomen könnte sich folgendermassen interpretieren lassen: Einerseits kann die vermehrte TIMP Expression eine Reaktion des Tumors oder des umliegenden Gewebes auf die Tumorentstehung sein. Andererseits kann die erhöhte TIMP-Expression auch durch eine MMP unabhängigen Stimulation erfolgen und somit das Tumorwachstum beeinflussen. Der prognostische Wert vom MMP und TIMP unterliegt methodischen und tumorspezifischen Bedingungen. MMP und TIMP und deren Verhältnis zu einander (MMP zu TIMP) besitzen prognostische Bedeutung. Die Expressionsmuster der einzelnen Proteinasen und ihrer Inhibitoren sind von Faktoren wie Tumorstadium, Tumorentität und Tumorlokalisierung abhängig. Klinische Studien bestätigen zunehmend das bisher in experimentellen und immunhistochemischen Untersuchungen festgestellte Ungleichgewicht im MMP/TIMP Verhältnis. Beim Prostatakarzinom, Bronchialkarzinom und kolorektalen Karzinom wurde dieses Missverhältnis zwischen MMP und TIMP gefunden (38,115,118). Dieses veränderte Verhältnis korreliert mit der Prognose der Erkrankung. Bei Brustkrebspatientinnen veränderte sich das Verhältnis von MMP-9 und TIMP-1 postoperativ signifikant (119).

Anfang der 80er Jahre wurde von unterschiedlichen Autoren postuliert, dass Tumoren mit Hilfe proteolytischer Enzyme die Basalmembranen durchbrechen. Dies führte im Bereich der MMP-Forschung bis Mitte der 90iger Jahre zu vielen Studien mit genetisch veränderten Zellreihen und Mäusen. Bei diesen Versuchen wurde durch Überexprimierung von proteolytischen oder inhibitorischen Enzymen festgestellt, dass bei MMP überexprimierte Tiere vermehrte Malignombildung

auftrat. Überexpression wurde durchgeführt um somit den erwarteten Effekt deutlicher nachzuweisen. Durch zusätzliche Exposition von Karzinogenen entwickelten sich die Tumoren in den Mäusen noch schneller. Es konnte bei den Tieren ein verstärktes Wachstum von Mammakarzinom durch MMP-3 und MMP-7 induziert werden (120,121). Auch bei MMP-1 überexprimierten Mäusen wurde durch Karzinogenstimulation eine erhöhte Rate von Hauttumoren hervorgerufen (122). Im Analogschluss konnte bei Tiermodellen mit MMP-Defizienz oder TIMP-Überexpression bzw. durch den Einsatz synthetischer MMPI eine verminderte spontane Tumorentstehung gezeigt werden (123,124). Jedoch zeigen neuere Tierexperimente, dass durch Überexpression oder systemische Gabe von TIMP in den Tumormodellen des Mammakarzinoms und Lymphomen das Tumorstadium auch verstärkt werden kann (99,125).

Ein Unterschied von malignen Tumoren verglichen mit benignen Tumoren ist die Degradierung der Basalmembran. Dadurch können Tumore andere Organe per kontinuitatem besiedeln oder aber auch Fernmetastasen gebildet werden. 1962 wurde bereits die kollagenauflösende Eigenschaft bei Kaulquappen beschrieben. Bis heute wurde in fast allen menschlichen Tumoren proteolytische Eigenschaften der MMP entdeckt (126). Der Vorgang der Tumordinvasion ist ein komplexer Vorgang, der in mehreren Schritten verläuft, wobei die Zellmotilität und Proteolyse unter Einwirkung des umgebenden Bindegewebes miteinander verbunden sind. Bisher sind MMP die einzigen Enzyme, welche Hauptstrukturelemente der EZM wie z.B. fibrilläres Kollagen, aufzulösen vermögen. Durch Invasionsversuchen am Modell der Boyden-Kammer wurde die Wirkung von MMP und MMPI in Mausmodellen untersucht. Es zeigte sich, wie bei den Versuchen zur malignen Transformation, dass MMP invasives Verhalten fördern und physiologische und synthetische MMPI die Tumordinvasion verhindern (127,128,129).

Bei einer Form der Invasionsversuche werden Tumorzellen intravenös appliziert, welche dann die Lunge besiedeln (130). Die Organe werden später entnommen und die Tumorbildung evaluiert. Man kann mittels Videomikroskopie intravital die Extravasation von Tumorzellen sichtbar machen. Koop et al. zeigten 1994, dass Tumorzellen mit TIMP-Überexpression die Blutbahn verließen (46). Die

Extravasation von Tumorzellen konnte durch TIMP-Überexpression wider Erwarten nicht verhindert werden. Jedoch zeigte sich signifikant weniger Metastasenbildung bei den TIMP-überexprimierten Tumorzellen als bei der genetisch unveränderten Mutterzelllinie. Auch beim Prostatakarzinom wurde durch Invasionsversuche ein Zusammenhang zwischen MMP und Tumorinvasion „*in vitro*“ dargestellt. Es bestätigte sich die Fähigkeit des synthetischen MMPI Batimastat lokale Tumorinvasion zu verhindern. Um das Ausmaß der Tumorinvasion durch MMP-Überexpression zu verstärken, wurden DU-145 Zellen mit MMP-7 transfiziert. Ein stärkerer Invasionsgrad verglichen mit nicht transfizierten Zellen wurde erreicht. Durch Batimastat wurde die Invasivität der transfizierten und der nichttransfizierten Zellen eingeschränkt (65).

Bei den Prozessen der Malignomentstehung ist unter anderem die Tumorinduzierte Bildung von Blutgefäßen (Angiogenese) zur Versorgung und dadurch Unterhaltung und Etablierung des Tumorwachstums ein wichtiger Vorgang. Tumoren können sich ab einer gewissen Größe nicht mehr autark mit Nährstoffen versorgen, worauf angiogenetische Stimuli ausgeschüttet werden um die Gefäßneubildung durch Endothelinsprossung in das Tumorgebiet durch die Basalmembran zu fördern. Dabei kommt es zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen proteolytischer und enzymatischer Aktivität zu Gunsten der enzymatischen Aktivität (131). MMP-9 induziert z.B. die Gefäßneubildung in Pankreasinselzelltumoren durch die Freisetzung von Vascular endothelium growth factor (VEGF) (132). Die Verminderung der Gefäßneubildung im Tierversuch am Beispiel eines aggressiv vaskularisierenden Tumors, dem Hämangiom, konnten Taraboletti et al. mit dem synthetischen Breitband MMPI Batimastat nachweisen (133). Der genaue Zusammenhang zwischen MMP und TIMP bezüglich Angiogenese ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. So wurde auch gegensätzliche Wirkung der MMP auf die Gefäßneubildung beschrieben. Bestimmte MMP (MMP-2,-7,-9 und -12) konvertieren Plasminogen in Angiostatin. Auch werden Endostatine durch MMP gebildet (134). Die beiden Produkte Angiostatin und Endostatin sind effektive Inhibitoren der Angiogenese (134). Eine Hemmung dieser Substanzen durch Hemmung der MMP hätte folglich auch einen

ungünstigen Einfluss auf die Angiogenese. Über den Einfluss von TIMP auf die Angiogenese gibt es ebenfalls widersprüchliche Daten. TIMP können die Proliferation und Motilität der Endothelzellen und damit die gefässbildende Eigenschaften der MMP unterdrücken (134,135). Allerdings wurde beispielsweise für TIMP-1 gezeigt, dass die Expression von VEGF beim Mammakarzinom und in der Retina gefördert wird (136,137).

Es müssen weitere experimentelle Studien abgewartet werden um den Effekt von MMP und TIMP auf die Angiogenese von Tumoren zu beurteilen.

Um den Einsatz von synthetischen unspezifischen und spezifischen MMPI als Monotherapie oder Kombinationstherapie z.B. mit den bisher vielversprechenden Taxanen beim hormonrefraktären Prostatakarzinom zu evaluieren, sind weitere Untersuchungen am Tiermodell und „*in vitro*“ erforderlich.

6. Zusammenfassung

Matrixmetalloproteinasen (MMP) und deren Inhibitoren (MMPI) sind wegen ihrer Beteiligung bei der Tumorentstehung Gegenstand unterschiedlichster experimenteller und klinischer Untersuchungen. Es konnte bisher gezeigt werden, dass bei Malignomen, anders als unter physiologischen Bedingungen, ein Ungleichgewicht zu Gunsten von MMP vorliegt. Ein möglicher therapeutischer Ansatz zur Reduktion von Tumorprogression- und Metastasierung könnte daher der Einsatz von synthetischen unspezifischen oder selektiven MMPI sein. In meiner Arbeit wurde der von der Firma Roche entwickelte MMP-2 und MMP-9 selektive Inhibitor ICOL-51 in Kombination mit Estramustin und Etoposid, zwei Chemotherapeutika für das hormonrefraktärem Prostatakarzinom, untersucht. Ziel dieser Untersuchung war, die potentielle wachstumshemmende Wirkung der synthetischen MMPI zu evaluieren. „*In vitro*“ wurden die Einzel- und Kombinationstherapien an der MatLyLu-Zellreihe durchgeführt, „*in vivo*“ an einem etablierten Tumormodell, dem Dunningtumor der Copenhagenratte. Eine Wirkung von Estramustin im Sinne einer Proliferationshemmung konnte weder an isolierten Zellen, noch im Tiermodell nachgewiesen werden. Etoposid hatte in hoher Konzentration einen signifikanten Effekt auf das Tumorwachstum. In der Kombination mit Estramustin zeigte Etoposid eine Proliferationshemmung schon in geringerer Konzentration. Estramustin und ICOL-51 hatten keinen Effekt in den Versuchen mit der MatLyLu-Zelllinie.

Im Tierversuch zeigte die Monotherapie mit Estramustin keine tumorreduzierende Wirkung. Etoposid und ICOL-51 hingegen konnten das Tumorwachstum signifikant reduzieren, wobei ICOL-51 verglichen mit Etoposid einen signifikant grösseren hemmenden Effekt auf das Tumorwachstum aufwies. Die Kombination beider Substanzen erbrachte keine zusätzliche Wirkung in meiner Untersuchung.

Aufgrund meiner Ergebnisse mit dem synthetischen MMPI ICOL-51 und der Tatsache, dass bisherige Therapieoptionen des hormonrefraktäre Prostatakarzinom immer noch begrenzt sind, sollten die spezifischen MMPI in weiteren klinischen Studien untersucht werden.

Literaturverzeichnis

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ
Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin.* 2007 Jan-Feb;57 (1):43-66
2. Bubendorf L. Molecular pathology of prostate carcinoma. Academic
playground or guide for diagnosis and therapy planning?
Verh Dtsch Ges Pathol. 2004;88:158-64
3. Sauter G, Bubendorf L, Moch H, Gasser TC, Mihatsch MJ. Cytogenetic
changes in prostatic carcinoma, *Pathologe.* 1998 Jan;19 (1):63-8.
4. Guess BW, PCRI New Development in Prostate Cancer 2006, Vol.9:No.2
5. Bott SR, Birtle AJ, Taylor CJ, Kirby RS, Prostate cancer management: an
update on localised disease. *Postgrad Med J.* 2003 Oct;79 (936):575-80
6. Epstein JI, Partin AW, Sauvageot J, Walsh PC, Prediction of progression
following radical prostatectomy. A multivariate analysis of 721 men with
long-term follow-up. *Am J Surg Pathol.* 1996 Mar;20 (3):286-92.
7. Visakorpi T. The molecular genetics of prostate cancer. *Urology.* 2003
Nov;62 (5 Suppl 1):3-10.
8. Li LC, Carroll PR, Dahiya R. Epigenetic changes in prostate cancer:
implication for diagnosis and treatment. *J Natl Cancer Inst.* 2005 Jan 19;97
(2):103-15.

9. Taplin ME, Balk SP. Androgen receptor: a key molecule in the progression of prostate cancer to hormone independence. *J Cell Biochem.* 2004 Feb 15;91 :483-90.
 10. Cabrespine A, Guy L, Chollet P, Debiton E, Bay JO. Molecular mechanisms involved in hormone resistance of prostate cancer. *Bull Cancer.* 2004 Oct;91 (10):747-57.
 11. Eklov S, Mahdy E, Wester K, Bjork P, Malmstrom PU, Busch C, Nilsson S. Estramustine-binding protein (EMBP) content in four different cell lines and its correlation to estramustine induced metaphase arrest. *Anticancer Res.* 1996 Jul-Aug;16 (4A):1819-22.
 12. Long BH. Mechanisms of action of teniposide (VM-26) and comparison with etoposide (VP-16). *Semin Oncol.* 1992 Apr;19 (2 Suppl 6):3-19.
 13. Kimura M, Sasagawa T, Tomita Y, Katagiri A, Morishita H, Saito T, Tanikawa T, Kawasaki T, Saito K, Nishiyama T, Kasahara T, Hara N, Takahashi K. Intermittent oral hormonal chemotherapy using estramustine phosphate and etoposide for the treatment of hormone-refractory prostate cancer. *Hinyokika Kyo.* 2003 Dec;49 (12):709-14.
 14. Van Poppel H. Recent docetaxel studies establish a new standard of care in hormone refractory prostate cancer. *Can J Urol.* 2005 Feb;12 Suppl 1:81-5.
 15. Hulboy DL, Rudolph LA, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Mol Hum Reprod.* 1997 Jan;3 (1):27-45.
 16. Xue M, Le NT, Jackson CJ. Targeting matrix metalloproteases to improve cutaneous wound healing. *Expert Opin Ther Targets.* 2006 Feb;10 (1):143-55.
-

17. Bullard KM, Lund L, Mudgett JS, Mellin TN, Hunt TK, Murphy B, Ronan J, Werb Z, Banda MJ. Impaired wound contraction in stromelysin-1-deficient mice. *Ann Surg.* 1999 Aug;230 (2):260-5.
 18. Dubois B, Starckx S, Pagenstecher A, Oord J, Arnold B, Opdenakker G. Gelatinase B deficiency protects against endotoxin shock. *Eur J Immunol.* 2002 Aug;32 (8):2163-71.
 19. Hu J, Van den Steen PE, Dillen C, Opdenakker G. Targeting neutrophil collagenase/matrix metalloproteinase-8 and gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 with a peptidomimetic inhibitor protects against endotoxin shock. *Biochem Pharmacol.* 2005 Aug 15;70 (4):535-44.
 20. Kim J, Yu W, Kovalski K, Ossowski L. Requirement for specific proteases in cancer cell intravasation as revealed by a novel semiquantitative PCR-based assay. *Cell.* 1998 Aug 7;94 (3):353-62.
 21. Lochter A, Galosy S, Muschler J, Freedman N, Werb Z, Bissell MJ. 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. *Cell Biol.* 1997 Dec 29;139 (7):1861-72.
 22. Ala-Aho R, Johansson N, Baker AH, Kahari VM. Expression of collagenase-3 (MMP-13) enhances invasion of human fibrosarcoma HT-1080 cells *Int J Cancer.* 2002 Jan 20;97 (3):283-9.
 23. Somerville RP, Oblander SA, Apte SS. Matrix Metalloproteinases: Old dogs with new tricks. *Genome Biol.* 2003;4 (6):216. Epub 2003 May 29.
-

24. Johnson LL, Pavlovsky AG, Johnson AR, Janowicz JA, Man CF, Ortwine DF, Purchase CF 2nd, White AD, Hupe DJ. A rationalization of the acidic pH dependence for stromelysin-1 (Matrix metalloproteinase-3) catalysis and inhibition. *J Biol Chem.* 2000 Apr 14;275 (15):11026-33.
25. Määttä M. Role of basement membranes and their break-down in human carcinomas. A study by in situ hybridization and immunohistochemistry of the expression of laminin chains, matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). Department of Pathology, University of Oulu, P O Box 5000, FIN-90014 University of Oulu, Finland 2000;[Review].
26. Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* 1991 May;5 (8):2145-54.
27. Borkakoti N. Matrix metalloproteases: variations on a theme. *Prog Biophys Mol Biol.* 1998;70 (1):73-94.
28. Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. 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.* 1990 Jul;87 (14):5578-82.
29. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993;4 (2):197-250.
30. Yu AE, Hewitt RE, Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Molecular regulation of cellular invasion--role of gelatinase A and TIMP-2. *Biochem Cell Biol.* 1996;74 (6):823-31.
-

31. Murphy G, Willenbrock F, Crabbe T, O'Shea M, Ward R, Atkinson S, O'Connell J, Docherty A. Regulation of matrix metalloproteinase activity. *Ann N Y Acad Sci.* 1994 Sep 6;732:31-41.
32. Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature.* 1994 Jul 7;370(6484):61-5.
33. Cox G, Steward WP, O'Byrne KJ. The plasmin cascade and matrix metalloproteinases in non-small cell lung cancer. *Thorax.* 1999 Feb;54 (2):169-79.
34. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003 May 2;92 (8):827-39.
35. Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci.* 2002 Oct 1;115 (Pt 19):3719-27.
36. Brehmer B, Biesterfeld S, Jakse G. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and -9) and their inhibitors (TIMP-1 and -2) in prostate cancer tissue. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2003;6 (3):217-22.
37. Lein M, Nowak L, Jung K, Koenig F, Schnorr D, Loening SA. Metalloproteinases (MMP-1, MMP-3) and their inhibitors (TIMP) in blood plasma of patients with prostate carcinoma. *Urologe A.* 1998 Jul;37 (4):377-81.

38. Jung K, Nowak L, Lein M, Priem F, Schnorr D, Loening SA. 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*. 1997 Apr 22;74 (2):220-3.
39. Jiang Y, Goldberg ID, Shi YE. Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene*. 2002 Mar 28;21 (14):2245-52.
40. Nuovo GJ, MacConnell PB, Simsir A, Valea F, French DL. Correlation of the in situ detection of polymerase chain reaction-amplified metalloproteinase complementary DNAs and their inhibitors with prognosis in cervical carcinoma. *Cancer Res*. 1995 Jan 15;55 (2):267-75.
41. Luparello C, Avanzato G, Carella C, Pucci-Minafra I. Tissue inhibitor of metalloprotease (TIMP)-1 and proliferative behaviour of clonal breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 1999 Apr;54 (3):235-44.
42. Chesler L, Golde DW, Bersch N, Johnson MD. Metalloproteinase inhibition and erythroid potentiation are independent activities of tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *Blood*. 1995 Dec 15;86 (12):4506-15.
43. DeClerck YA, Imren S. Protease inhibitors: role and potential therapeutic use in human cancer. *Eur J Cancer*. 1994;30A (14):2170-80.
44. Wilson CL, Heppner KJ, Labosky PA, Hogan BL, Matrisian LM. Intestinal tumorigenesis is suppressed in mice lacking the metalloproteinase matrilysin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Feb 18;94 (4):1402-7.
45. Denhardt DT, Khokha R, Yagel S, Overall CM, Parhar RS. Oncogenic consequences of down-modulating TIMP expression in 3T3 cells with antisense RNA. *Matrix Suppl*. 1992;1:281-5.
-

46. Koop S, Khokha R, Schmidt EE, MacDonald IC, Morris VL, Chambers AF, Groom AC. Overexpression of metalloproteinase inhibitor in B16F10 cells does not affect extravasation but reduces tumor growth. *Cancer Res.* 1994 Sep 1;54 (17):4791-7.
47. Wojtowicz-Praga SM, Dickson RB, Hawkins MJ. Matrix metalloproteinase inhibitors. *Invest New Drugs.* 1997;15 (1):61-75.
48. Zhang J, Jung K, Lein M, Kristiansen G, Rudolph B, Hauptmann S, Schnorr D, Loening SA, Lichtinghagen R. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in human primary cultured prostatic cells and malignant prostate cell lines. *Prostate.* 2002 Jan 1;50 (1):38-45.
49. Wilson MJ, Sellers RG, Wiehr C, Melamud O, Pei D, Peehl DM. 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.* 2002 May;191 (2):208-16.
50. Meyer E, Vollmer JY, Bovey R, Stamenkovic I. Matrix metalloproteinases 9 and 10 inhibit protein kinase C-potentiated, p53-mediated apoptosis. *Cancer Res.* 2005 May 15;65 (10):4261-72.
51. Vacca A, Ribatti D, Presta M, Minischetti M, Iurlaro M, Ria R, Albini A, Bussolino F, Dammacco F. Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential, and matrix metalloproteinase-2 secretion parallel progression of human multiple myeloma. *Blood.* 1999 May 1;93 (9):3064-73.
52. Sternlicht MD, Lochter A, Symson CJ, Huey B, Rougier JP, Gray JW, Pinkel D, Bissell MJ, Werb Z. The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell.* 1999 Jul 23;98 (2):137-46.
-

53. Kolkhorst V, Sturzebecher J, Wiederanders B. Inhibition of tumour cell invasion by protease inhibitors: correlation with the protease profile. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1998;124 (11):598-606.
54. Codony-Servat J, Albanell J, Lopez-Talavera JC, Arribas J, Baselga J. Cleavage of the HER2 ectodomain is a pervanadate-activable process that is inhibited by the tissue inhibitor of metalloproteases-1 in breast cancer cells. *Cancer Res.* 1999 Mar 15;59 (6):1196-201.
55. Dong J, Opresko LK, Dempsey PJ, Lauffenburger DA, Coffey RJ, Wiley HS. Metalloprotease-mediated ligand release regulates autocrine signaling through the epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 May 25;96 (11):6235-40.
56. Knox JD, Wolf C, McDaniel K, Clark V, Loriot M, Bowden GT, Nagle RB. Matrilysin expression in human prostate carcinoma. *Mol Carcinog.* 1996 Jan;15 (1):57-63.
57. Still K, Robson CN, Autzen P, Robinson MC, Hamdy FC. 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.* 2000 Jan;42 (1):18-25.
58. Hashimoto K, Kihira Y, Matuo Y, Usui T. Expression of matrix metalloproteinase-7 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human prostate. *J Urol.* 1998 Nov;160 (5):1872-6.
59. Greene GF, Kitadai Y, Pettaway CA, von Eschenbach AC, Bucana CD, Fidler IJ. 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.* 1997 May;150(5):1571-82.
-

60. Hiraoka N, Allen E, Apel IJ, Gyetko MR, Weiss SJ. Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell*. 1998 Oct 30;95 (3):365-77.
61. Festuccia C, Giunciuglio D, Guerra F, Villanova I, Angelucci A, Manduca P, Teti A, Albini A, Bologna M. 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*. 1999;11 (1):17-31.
62. Masson R, Lefebvre O, Noel A, Fahime ME, Chenard MP, Wendling C, Kebers F, LeMeur M, Dierich A, Foidart JM, Basset P, Rio MC. In vivo evidence that the stromelysin-3 metalloproteinase contributes in a paracrine manner to epithelial cell malignancy. *J Cell Biol*. 1998 Mar 23;140 (6):1535-41.
63. McKerrow JH, Bhargava V, Hansell E, Huling S, Kuwahara T, Matley M, Coussens L, Warren R. A functional proteomics screen of proteases in colorectal carcinoma. *Mol Med*. 2000 May;6 (5):450-60.
64. Cockett MI, Murphy G, Birch ML, O'Connell JP, Crabbe T, Millican AT, Hart IR, Docherty AJ. Matrix metalloproteinases and metastatic cancer. *Biochem Soc Symp*. 1998;63:295-313
65. Knox JD, Bretton L, Lynch T, Bowden GT, Nagle RB. Synthetic matrix metalloproteinase inhibitor, BB-94, inhibits the invasion of neoplastic human prostate cells in a mouse model. *Prostate*. 1998 Jun 1;35 (4):248-54.
66. Lokeshwar BL. MMP inhibition in prostate cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 1999 Jun 30;878:271-89.
-

67. Nemeth JA, Yousif R, Herzog M, Che M, Upadhyay J, Shekarriz B, Bhagat S, Mullins C, Fridman R, Cher ML. Matrix metalloproteinase activity, bone matrix turnover, and tumor cell proliferation in prostate cancer bone metastasis. *J Natl Cancer Inst.* 2002 Jan 2;94 (1):17-25.
68. Brown PD, Giavazzi R. Matrix metalloproteinase inhibition: a review of anti-tumour activity. *Ann Oncol.* 1995 Dec;6 (10):967-74.
69. Jiang WG, Davies G, Martin TA, Parr C, Watkins G, Mason MD, Mansel RE. Expression of membrane type-1 matrix metalloproteinase, MT1-MMP in human breast cancer and its impact on invasiveness of breast cancer cells. *Int J Mol Med.* 2006 Apr;17 (4):583-90.
70. Parsons SL, Watson SA, Collins HM, Griffin NR, Clarke PA, Steele RJ. Gelatinase (MMP-2 and -9) expression in gastrointestinal malignancy. *Br J Cancer.* 1998 Dec;78 (11):1495-502.
71. Lein M, Nowak L, Jung K, Koenig F, Schnorr D, Loening SA. Metalloproteinases (MMP-1, MMP-3) and their inhibitors (TIMP) in blood plasma of patients with prostate carcinoma. *Urologe A.* 1998 Jul;37 (4):377-81.
72. Stearns M, Stearns ME. Evidence for increased activated metalloproteinase 2 (MMP-2a) expression associated with human prostate cancer progression. *Oncol Res.* 1996;8 (2):69-75.
73. Katayama A, Bando N, Kishibe K, Takahara M, Ogino T, Nonaka S, Harabuchi Y. Expressions of matrix metalloproteinases in early-stage oral squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastases and prognosis. *Clin Cancer Res.* 2004 Jan 15;10 (2):634-40.
-

74. Hofmann HS, Hansen G, Richter G, Taege C, Simm A, Silber RE, Burdach S. Matrix metalloproteinase-12 expression correlates with local recurrence and metastatic disease in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2005 Feb 1;11 (3):1086-92.
75. Davies B, Brown PD, East N, Crimmin MJ, Balkwill FR. A synthetic matrix metalloproteinase inhibitor decreases tumor burden and prolongs survival of mice bearing human ovarian carcinoma xenografts. *Cancer Res.* 1993 May 1;53 (9):2087-91. Erratum in: *Cancer Res* 1993 Aug 1;53 (15):3652.
76. Ohta M, Konno H, Tanaka T, Baba M, Kamiya K, Oba K, Kaneko T, Syouji T, Igarashi A, Nakamura S. Effect of combination therapy with matrix metalloproteinase inhibitor MMI-166 and mitomycin C on the growth and liver metastasis of human colon cancer. *Jpn J Cancer Res.* 2001 Jun; 92 (6):688-95.
77. Shalinsky DR, Brekken J, Zou H, Bloom LA, McDermott CD, Zook S, Varki NM, Appelt K. 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.* 1999 Jul;5 (7):1905-17.
78. Macaulay VM, O'Byrne KJ, Saunders MP, Braybrooke JP, Long L, Gleeson F, Mason CS, Harris AL, Brown P, Talbot DC. Phase I study of intrapleural batimastat (BB-94), a matrix metalloproteinase inhibitor, in the treatment of malignant pleural effusions. *Clin Cancer Res.* 1999 Mar;5 (3):513-20.
79. Beattie GJ, Smyth JF. Phase I study of intraperitoneal metalloproteinase inhibitor BB94 in patients with malignant ascites. *Clin Cancer Res.* 1998 Aug;4 (8):1899-902.
-

80. Leslie WT, Bonomi PD. Novel treatments in non-small cell lung cancer. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2004 Feb;18 (1):245-67.
81. Lubaroff DM, Canfield L, Reynolds CW. The Dunning tumors. *Prog Clin Biol Res.* 1980;37:243-63.
82. Quax PH, de Bart AC, Schalken JA, Verheijen JH. Plasminogen activator and matrix metalloproteinase production and extracellular matrix degradation by rat prostate cancer cells in vitro: correlation with metastatic behavior in vivo. *Prostate.* 1997 Aug 1;32 (3):196-204.
83. Rao BR, Slotman BJ, Geldof AA, Perez CA. Radiation sensitivity of Copenhagen rat prostatic carcinoma (R3327-AT and R3327-MATLyLu). *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1991 May;20 (5):981-5.
84. Smolev JK, Heston WD, Scott WW, Coffey DS. Characterization of the Dunning R3327H prostatic adenocarcinoma: an appropriate animal model for prostatic cancer. *Cancer Treat Rep.* 1977 Mar-Apr;61 (2):273-87.
85. Isaacs JT, Yu GW, Coffey DS. The characterization of a newly identified, highly metastatic variety of Dunning R 3327 rat prostatic adenocarcinoma system: the MAT LyLu tumor. *Invest Urol.* 1981 Jul;19 (1):20-3.
86. Isaacs JT, Isaacs WB, Feitz WF, Scheres J. 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.* 1986;9 (3):261-81.
87. Pienta KJ, Lehr JE. Inhibition of prostate cancer growth by estramustine and etoposide: evidence for interaction at the nuclear matrix. *J Urol.* 1993 Jun;149 (6):1622-5.
-

88. Haim N, Roman J, Nemec J, Sinha BK. Peroxidative free radical formation and O-demethylation of etoposide (VP-16) and teniposide (VM-26). *Biochem Biophys Res Commun.* 1986 Feb 26;135 (1):215-20.
89. Gantchev TG, Hunting DJ. Inhibition of the topoisomerase II-DNA cleavable complex by the ortho-quinone derivative of the antitumor drug etoposide (VP-16). *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Aug 8;237 (1):24-7.
90. Gantchev TG, Hunting DJ. Enhancement of etoposide (VP-16) cytotoxicity by enzymatic and photodynamically induced oxidative stress. *Anticancer Drugs.* 1997 Feb;8 (2):164-73.
91. Williams JF, Muenchen HJ, Kamradt JM, Korenchuk S, Pienta KJ. Treatment of androgen-independent prostate cancer using antimicrotubule agents docetaxel and estramustine in combination: an experimental study. *Prostate.* 2000 Sep 1;44 (4):275-8.
92. Lein M, Jung K, Le DK, Hasan T, Ortel B, Borchert D, Winkelmann B, Schnorr D, Loenings SA. Synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases (batimastat) reduces prostate cancer growth in an orthotopic rat model. *Prostate.* 2000 May 1;43 (2):77-82.
93. Watson SA, Morris TM, Parsons SL, Steele RJ, Brown PD. Therapeutic effect of the matrix metalloproteinase inhibitor, batimastat, in a human colorectal cancer ascites model. *Br J Cancer.* 1996 Nov;74 (9):1354-8.
94. Sledge GW Jr, Qulali M, Goulet R, Bone EA, Fife R. Effect of matrix metalloproteinase inhibitor batimastat on breast cancer regrowth and metastasis in athymic mice. *J Natl Cancer Inst.* 1995 Oct 18;87 (20):1546-50.
-

95. Shaffer DR, Scher HI. Prostate cancer: a dynamic illness with shifting targets. *Lancet Oncol.* 2003 Jul;4 (7):407-14.
96. Cheung C, Luo H, Yanagawa B, Leong HS, Samarasekera D, Lai JC, Suarez A, Zhang J, McManus BM. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in coxsackievirus-induced myocarditis. *Cardiovasc Pathol.* 2006 Mar-Apr;15 (2):63-74.
97. Chabottaux V, Sounni NE, Pennington CJ, English WR, van den Brule F, Blacher S, Gilles C, Munaut C, Maquoi E, Lopez-Otin C, Murphy G, Edwards DR, Foidart JM, Noel A. Membrane-type 4 matrix metalloproteinase promotes breast cancer growth and metastases. *Cancer Res.* 2006 May 15;66 (10):5165-72.
98. Holten-Andersen MN, Hansen U, Brunner N, Nielsen HJ, Illemann M, Nielsen BS. Localization of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) in human colorectal adenoma and adenocarcinoma. *Int J Cancer.* 2005 Jan 10;113 (2):198-206.
99. Jiang Y, Wang M, Celiker MY, Liu YE, Sang QX, Goldberg ID, Shi YE. Stimulation of mammary tumorigenesis by systemic tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 4 gene delivery. *Cancer Res.* 2001 Mar 15;61 (6):2365-70.
100. Chabottaux V, Sounni NE, Pennington CJ, English WR, van den Brule F, Blacher S, Gilles C, Munaut C, Maquoi E, Lopez-Otin C, Murphy G, Edwards DR, Foidart JM, Noel A. Membrane-type 4 matrix metalloproteinase promotes breast cancer growth and metastases. *Cancer Res.* 2006 May 15;66 (10):5165-72.
-

101. Bugdayci G, Kaplan T, Sezer S, Turhan T, Koca Y, Kocer B, Yildirim E. Matrix metalloproteinase-9 in broncho-alveolar lavage fluid of patients with non-small cell lung cancer. *Exp Oncol*. 2006 Jun;28 (2):169-71.
 102. Nakanishi K, Kawai T, Sato H, Aida S, Kasamatsu H, Aurues T, Ikeda T. 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*. 2000 Feb;31 (2):193-200.
 103. Jin JS, Hsieh DS, Lin YF, Wang JY, Sheu LF, Lee WH. Increasing expression of extracellular matrix metalloprotease inducer in renal cell carcinoma: tissue microarray analysis of immunostaining score with clinicopathological parameters. *Int J Urol*. 2006 May;13 (5):573-80.
 104. Yamashita K, Tanaka Y, Mimori K, Inoue H, Mori M. Differential expression of MMP and uPA systems and prognostic relevance of their expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2004 Jun 10;110 (2):201-7.
 105. Turpeenniemi-Hujanen T. Gelatinases (MMP-2 and -9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers *Biochimie*. 2005 Mar-Apr;87 (3-4):287-97.
 106. Chenard MP, O'Siorain L, Shering S, Rouyer N, Lutz Y, Wolf C, Basset P, Bellocq JP, Duffy MJ. High levels of stromelysin-3 correlate with poor prognosis in patients with breast carcinoma. *Int J Cancer*. 1996 Dec 20;69 (6):448-51.
 107. Jones JL, Glynn P, Walker RA. Expression of MMP-2 and MMP-9, their inhibitors, and the activator MT1-MMP in primary breast carcinomas. *J Pathol*. 1999 Oct;189 (2):161-8.
-

108. Waas ET, Hendriks T, Lomme RM, Wobbes T. Plasma levels of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 correlate with disease stage and survival in colorectal cancer patients. *Dis Colon Rectum*. 2005 Apr;48 (4):700-10.
 109. Joo YE, Seo KS, Kim HS, Rew JS, Park CS, Kim SJ. Expression of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in gastric cancer. *Dig Dis Sci*. 2000 Jan;45 (1):114-21.
 110. Michael M, Babic B, Khokha R, Tsao M, Ho J, Pintilie M, Leco K, Chamberlain D, Shepherd FA. Expression and prognostic significance of metalloproteinases and their tissue inhibitors in patients with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 1999 Jun;17 (6):1802-8.
 111. Ross JS, Kaur P, Sheehan CE, Fisher HA, Kaufman RA Jr, Kallakury BV. Prognostic significance of matrix metalloproteinase 2 and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 expression in prostate cancer. *Mod Pathol*. 2003 Mar;16 (3):198-205.
 112. Talvensaaari-Mattila A, Turpeenniemi-Hujanen T. High preoperative serum TIMP-1 is a prognostic indicator for survival in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*. 2005 Jan;89 (1):29-34.
 113. Holten-Andersen MN, Nielsen HJ, Sorensen S, Jensen V, Brunner N, Christensen IJ. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in the postoperative monitoring of colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2006 Aug;42 (12):1889-96. Epub 2006 Jun 30.
 114. Wang CS, Wu TL, Tsao KC, Sun CF. Serum TIMP-1 in gastric cancer patients: a potential prognostic biomarker. *Ann Clin Lab Sci*. 2006 Winter;36 (1):23-30.
-

115. Ylisirnio S, Hoyhtya M, Turpeenniemi-Hujanen T. Serum matrix metalloproteinases -2, -9 and tissue inhibitors of metalloproteinases -1, -2 in lung cancer--TIMP-1 as a prognostic marker. *Anticancer Res.* 2000 Mar-Apr;20 (2B):1311-6.
116. Suemitsu R, Yoshino I, Tomiyasu M, Fukuyama S, Okamoto T, Maehara Y. Serum tissue inhibitors of metalloproteinase-1 and -2 in patients with non-small cell lung cancer. *Surg Today.* 2004;34 (11):896-901.
117. Davidson B, Goldberg I, Kopolovic J, Lerner-Geva L, Gotlieb WH, Ben-Baruch G, Reich R. 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.* 1999 Jun;73 (3):372-82.
118. Tutton MG, George ML, Eccles SA, Burton S, Swift RI, Abulafi AM. Use of plasma MMP-2 and MMP-9 levels as a surrogate for tumour expression in colorectal cancer patients. *Int J Cancer.* 2003 Nov 20;107 (4):541-50.
119. Giannelli G, Erriquez R, Fransvea E, Daniele A, Trerotoli P, Schittulli F, Grano M, Quaranta M, Antonaci S. Proteolytic imbalance is reversed after therapeutic surgery in breast cancer patients. *Int J Cancer.* 2004 May 1;109 (5):782-5. Comment in: *Int J Cancer.* 2005 Oct 10;116 (6):1000-1; author reply 1002-3.
120. Rudolph-Owen LA, Chan R, Muller WJ, Matrisian LM. The matrix metalloproteinase matrilysin influences early-stage mammary tumorigenesis. *Cancer Res.* 1998 Dec 1;58 (23):5500-6.
-

121. Witty JP, Wright JH, Matrisian LM. 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*. 1995 Oct;6 (10):1287-303.
 122. Sternlicht MD, Lochter A, Sympton CJ, Huey B, Rougier JP, Gray JW, Pinkel D, Bissell MJ, Werb Z. The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell*. 1999 Jul 23;98 (2):137-46.
 123. Knox JD, Bretton L, Lynch T, Bowden GT, Nagle RB. Synthetic matrix metalloproteinase inhibitor, BB-94, inhibits the invasion of neoplastic human prostate cells in a mouse model. *Prostate*. 1998 Jun 1;35 (4):248-54.
 124. Albini A, Melchiori A, Santi L, Liotta LA, Brown PD, Stetler-Stevenson WG. Tumor cell invasion inhibited by TIMP-2. *J Natl Cancer Inst*. 1991 Jun 5;83 (11):775-9. Comment in: *J Natl Cancer Inst*. 1991 Jun 5;83 (11):740-2.
 125. Guedez L, Martinez A, Zhao S, Vivero A, Pittaluga S, Stetler-Stevenson M, Raffeld M, Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) promotes plasmablastic differentiation of a Burkitt lymphoma cell line: implications in the pathogenesis of plasmacytic/plasmablastic tumors. *Blood*. 2005 Feb 15;105 (4):1660-8. Epub 2004 Oct 12.
 126. Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1962 Jun 15;48:1014-22.
 127. Cheng L, Mantile G, Pauly R, Nater C, Felici A, Monticone R, Bilato C, Gluzband YA, Crow MT, Stetler-Stevenson W, Capogrossi MC. 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*. 1998 Nov 17;98 (20):2195-201.
-

128. Agarwal R, D'Souza T, Morin PJ. Claudin-3 and claudin-4 expression in ovarian epithelial cells enhances invasion and is associated with increased matrix metalloproteinase-2 activity. *Cancer Res.* 2005 Aug 15;65 (16):7378-85.
129. Itoh F, Yamamoto H, Hinoda Y, Imai K Enhanced secretion and activation of matrilysin during malignant conversion of human colorectal epithelium and its relationship with invasive potential of colon cancer cells. *Cancer.* 1996 Apr 15;77 (8 Suppl):1717-21.
130. Yamamoto A, Yano S, Shiraga M, Ogawa H, Goto H, Miki T, Zhang H, Sone S. A third-generation matrix metalloproteinase (MMP) inhibitor (ONO-4817) combined with docetaxel suppresses progression of lung micrometastasis of MMP-expressing tumor cells in nude mice. *Int J Cancer.* 2003 Mar 1;103 (6):822-8.
131. Moses MA. The regulation of neovascularization of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Stem Cells.* 1997;15 (3):180-9.
132. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol.* 2000 Oct;2 (10):737-44.
133. Taraboletti G, Garofalo A, Belotti D, Drudis T, Borsotti P, Scanziani E, Brown PD, Giavazzi R. Inhibition of angiogenesis and murine hemangioma growth by batimastat, a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases. *J Natl Cancer Inst.* 1995 Feb 15;87 (4):293-8.
134. Cornelius LA, Nehring LC, Harding E, Bolanowski M, Welgus HG, Kobayashi DK, Pierce RA, Shapiro SD. Matrix metalloproteinases generate angiotatin: effects on neovascularization. *J Immunol.* 1998 Dec 15;161 (12):6845-52.
-

135. Fernandez HA, Kallenbach K, Seghezzi G, Grossi E, Colvin S, Schneider R, Mignatti P, Galloway A. Inhibition of endothelial cell migration by gene transfer of tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J Surg Res.* 1999 Apr;82 (2):156-62.
136. Yoshiji H, Harris SR, Raso E, Gomez DE, Lindsay CK, Shibuya M, Sinha CC, Thorgeirsson UP. Mammary carcinoma cells over-expressing tissue inhibitor of metalloproteinases-1 show enhanced vascular endothelial growth factor expression. *Int J Cancer.* 1998 Jan 5;75 (1):81-7.
137. Yamada E, Tobe T, Yamada H, Okamoto N, Zack DJ, Werb Z, Soloway PD, Campochiaro PA. TIMP-1 promotes VEGF-induced neovascularization in the retina. *Histol Histopathol.* 2001 Jan;16 (1):87-97.

Danksagung

Ich danke ganz besonders Herrn Prof. Dr. med. Klaus Jung und Prof. Dr. Michael Lein für die Möglichkeit diese Dissertation in der Forschungsabteilung der Klinik für Urologie der Charité anfertigen zu können. Ihre Beratung, Unterstützung und Geduld haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein besonderer Dank gebührt Frau Marianne Scholz, die mich geduldig und liebevoll in den Umgang mit den Zellkulturen einarbeitete, unterstützend zur Seite stand und immer ein ruhender Pol für mich war. Ebenfalls danke ich herzlich Frau Sabine Becker und Frau Silke Klotzek sowie allen anderen Mitarbeitern der urologischen Forschungsabteilung der Charité für die grossartige Unterstützung bei den tierexperimentellen Untersuchungen.

Meinen Eltern Horst und Else Rothaug, meinem Bruder Wolfram und meiner Freundin Helin Kocadağ möchte ich an dieser Stelle diese Arbeit widmen als Dank für die jahrelange Unterstützung während des Studiums und die Liebe, die sie mir immer wieder entgegenbrachten.

Lebenslauf

„Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.“

Erklärung

„Ich, Rothaug, Winfried, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Effekt von Estramustin und Etoposid in Kombination mit dem synthetisch entwickelten Matrix-Metalloproteinase-Inhibitor ICOL-51 auf das Wachstum des Dunning-Tumors in vivo ,und in vitro“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 5. August 2007

Winfried Rothaug