

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt  
Hämatologie und Onkologie am Campus Benjamin Franklin  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die Expression des Neoangiogenesemarkers ED-B  
beim Adenokarzinom der Prostata**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Ricarda Johanna Locher

aus Cuxhaven

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. H.-D. Menssen

2. Prof. Dr. med. U. Keilholz

3. Prof. Dr. D. Neri

Datum der Promotion: 07.09.2012

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1	Das Adenokarzinom der Prostata . . . . .	5
1.1.1	Epidemiologie . . . . .	5
1.1.2	Stadieneinteilung und Klassifikation . . . . .	6
1.1.3	Diagnose und Therapie . . . . .	7
1.2	Neoangiogenese - Neubildung von Blutgefäßen . . . . .	9
1.3	ED-B: Die Extradomäne B des Fibronektins . . . . .	10
1.3.1	Marker der Neoangiogenese . . . . .	10
1.3.2	Expression im Tumorgewebe . . . . .	11
1.3.3	Antikörper, die gezielt mit ED-B interagieren . . . . .	12
1.4	Photodynamische Therapie PDT . . . . .	13
1.4.1	Geschichte und Entwicklung . . . . .	13
1.4.2	Wirkmechanismus und Effektivität . . . . .	14
1.4.3	Anwendungsgebiete . . . . .	15
1.5	Fragestellung . . . . .	17
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>18</b>
2.1	Übersicht über verwendete Reagenzien . . . . .	18
2.2	Auswahl der Gewebeproben . . . . .	19
2.3	Vorbereitung der Gewebeproben . . . . .	19

## *Inhaltsverzeichnis*

2.4	Färbungen . . . . .	20
2.4.1	Immunhistochemische Färbung mit den monoklonalen Antikörpern MX1 oder $\alpha$ CD34 . . . . .	20
2.4.2	Doppelfluoreszenzfärbung mit den monoklonalen Antikörpern MX1 und $\alpha$ CD34 . . . . .	21
2.5	Auswertung . . . . .	22
2.5.1	Immunhistochemie . . . . .	22
2.5.2	Konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie . . . . .	22
2.5.3	Statistische Auswertung der Ergebnisse . . . . .	23
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>24</b>
3.1	Konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie . . . . .	24
3.1.1	Adenokarzinom der Prostata, Prostatahyperplasie und normales Pro- statagewebe ohne pathologische Veränderung . . . . .	24
3.1.2	Lymphknotenmetastasen des Prostatakarzinoms . . . . .	25
3.2	Immunhistochemische Färbungen . . . . .	27
3.2.1	Gefäßfärbung mit $\alpha$ CD34: Vergleich der Gefäßdichte zwischen Prosta- takarzinomgewebe und angrenzendem normalem Prostatagewebe .	27
3.2.2	ED-B-Färbung mit MX1 . . . . .	29
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>34</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>45</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>47</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>52</b>
	<b>Lebenslauf</b>	
	<b>Selbständigkeitserklärung</b>	
	<b>Danksagung</b>	

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Adenokarzinom der Prostata

### 1.1.1 Epidemiologie

Das Adenokarzinom der Prostata ist die häufigste bösartige Erkrankung bei Männern in Deutschland. Sechszwanzig % aller neu diagnostizierten Malignome fallen darunter und 10% aller Krebssterbefälle sind dadurch verursacht.<sup>1</sup> Laut Robert-Koch-Institut und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister erkrankten im Jahr 2006 in Deutschland 60 120 Männer an einem Prostatakarzinom, für 2010 war ein Anstieg auf 64 370 prognostiziert.<sup>1</sup> Die Diagnosehäufigkeit der jährlich neu aufgetretenen Prostatakreberkrankungen ist seit 1980 kontinuierlich (insgesamt um über 200%) gestiegen,<sup>1</sup> zum einen Folge der demographischen Entwicklung, zum anderen auf verbesserte Früherkennungsmaßnahmen und elektive Diagnostik zurückzuführen. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate, die zwischen 1984 und 1998 noch bei 82% lag, hat sich in den letzten Jahren deutlich erhöht und erreicht Werte um die 90%.<sup>1</sup> Hier darf man ebenfalls einen Effekt der Früherkennungsmaßnahmen unterstellen, da sich die Sterberate (Todesfälle pro 100 000 Patienten) in den letzten 30 Jahren kaum oder nur geringfügig verändert hat. Im Jahre 2006 starben in Deutschland 11 577 Patienten an den Folgen eines Prostatakarzinoms.<sup>1</sup> Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei etwa 69 Jahren und entspricht ungefähr dem für Krebserkrankungen insgesamt, wobei die Krankheit bei den meisten Betroffenen nicht vor dem 50. Lebensjahr auftritt.<sup>1</sup>

### 1.1.2 Stadieneinteilung und Klassifikation

In der Klinik findet die Stadieneinteilung nach der TNM-Klassifikation<sup>2</sup> Anwendung. T steht dabei für die Tumorgöße und -ausbreitung, Begrenzung des Tumors auf die Prostata oder Befall von Nachbarstrukturen, und wird in der Regel mittels digital-rektalem Tastbefund und transrektalem Ultraschall ermittelt. N gibt Auskunft über regionäre Lymphknotenmetastasen und M über Fernmetastasen, beispielsweise in nichtregionäre Lymphknoten oder Knochen. Die Stadien T1N0M0 und T2N0M0 werden als „lokal begrenztes Prostatakarzinom“ und die Stadien T3N0M0 und T4N0M0 als „lokal fortgeschrittenes Prostatakarzinom“ zusammengefasst. Sofern also weder Lymphknoten- noch Fernmetastasen vorhanden sind, befindet sich die Krankheit im „lokalen Stadium“. Jeder Tumor mit Lymphknoten- (N1) und/oder Fernmetastasen (M1) wird dagegen als „fortgeschrittenes bzw. metastasiertes Prostatakarzinom“ bezeichnet.

Histopathologisch handelt es sich bei malignen Prozessen der Prostata in über 95% der Fälle um Adenokarzinome. Meist ist ein Nebeneinander verschiedener Wachstumsformen (gut, mittelgradig oder schlecht differenziert; glandulär, kribriform oder solide) zu finden, wobei die Einteilung beim histopathologischen Grading nach Sommerkamp und Böcking<sup>3</sup> dem am wenigsten differenzierten Anteil folgt: G1 bezeichnet ein gut differenziertes, noch sehr gewebeähnliches Tumorwachstum, G2 ein mittelgradig differenziertes und G3 ein schlecht differenziertes Tumorwachstum, das kaum mehr Ähnlichkeiten zum ursprünglichen Gewebe hat. Analog dazu hat sich international der Gleason-Score<sup>4,5</sup> durchgesetzt, wobei jeweils das am häufigsten und am zweithäufigsten vorkommende glanduläre Wachstumsmuster mit Punkten von 1 (gut differenziert) bis 5 (schlecht differenziert) bewertet und die Summe der Zahlenwerte, z.B. 2+2=4, gebildet wird. Es entsprechen die Scores von 2 bis 4 Grad 1, von 5 bis 7a (3+4) Grad 2 und von 7b (4+3) bis 10 Grad 3. Das histopathologische Grading ist wichtig für Therapie und Prognose des Prostatakarzinoms.

### 1.1.3 Diagnose und Therapie

Die Deutsche Gesellschaft für Urologie gibt Leitlinien mit evidenzbasierten Empfehlungen zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms heraus,<sup>6</sup> auf die sich der folgende Abschnitt hauptsächlich bezieht.

Die Primärdiagnostik des Prostatakarzinoms umfasst die digital-rektale Untersuchung (DRU) und den transrektalen Ultraschall. Bei Verdacht auf einen malignen Prozess in der Prostata wird eine Stanzbiopsie mit folgender anatomisch-pathologischer Begutachtung durchgeführt. Die Bestimmung des prostata-spezifischen Antigens PSA ist nicht standardmäßig vorgesehen, kann aber bei Verdacht auf einen malignen Prozess zur Therapieplanung und -kontrolle erfolgen.<sup>6</sup> Das Staging erfolgt risikoadaptiert, d.h. das Karzinom wird nach bestimmten Kriterien in eine Risikogruppe eingeordnet, woran sich das weitere Vorgehen orientiert. So kann eine Skelettszintigraphie zur Detektion von Knochenmetastasen angezeigt sein oder eine MRT zur Bewertung der Lymphknotenstationen.<sup>6</sup>

Die Therapie des Prostatakarzinoms beinhaltet je nach Risikoprofil des Tumors grundsätzlich verschiedene Konzepte. Sogenanntes „Watchful Waiting“, also Zuwarten ohne Intervention, kommt bei Patienten mit eingeschränkter Lebenserwartung durch höheres Alter oder das Vorhandensein von Komorbidität infrage. Die „Active-Surveillance“-Strategie soll unter genauer Überwachung des Krankheitsverlaufes die rechtzeitige Einleitung einer kurativen Behandlung möglichst lange aufschieben. Die kurative Therapie des Prostatakarzinoms ist grundsätzlich nur im lokalen Stadium möglich, bei metastasierten Tumoren wird palliativ behandelt.<sup>6</sup>

Das operative Standardverfahren bei lokal begrenztem (Stadium T1 und T2) und lokal fortgeschrittenem (T3 und T4) Prostatakarzinom ist die radikale Prostatektomie, bei der mit der Prostata auch die Samenbläschen und teilweise die drainierenden Lymphknoten entfernt werden.<sup>6</sup> Zusätzlich zu den bekannten Operations- und Narkoserisiken wie

## 1 Einleitung

Blutung oder Verletzung umliegender Organe können weitere unerwünschte Folgeerscheinungen auftreten. Durch operationsbedingte Nervenläsionen tritt in ca. 75% der Fälle eine erektile Dysfunktion auf.<sup>7</sup> Ferner bilden sich in 5-20% der Fälle Lymphozelen, die durch Kompression venöser Gefäße das Thromboserisiko erhöhen, in 5-10% der Fälle kommt es zu Stressinkontinenz und in 3-5% der Fälle bilden sich Anastomosenstrikturen.<sup>7</sup>

Die perkutane Radiotherapie mittels Linearbeschleuniger mit Strahlendosen von durchschnittlich 70 bis 72 Gy wird ebenfalls als Primärtherapie bei lokalem Stadium angewendet.<sup>6</sup> Radiotherapie wird auch bei fortgeschrittenem bzw. metastasierendem Prostatakarzinom oder Tumorrezidiven eingesetzt, um das Fortschreiten der Krankheit einzudämmen und Symptome zu lindern. Besonders bei Knochenmetastasen lässt sich dadurch eine Verbesserung der Lebensqualität erreichen. Durch die hohe Strahlenbelastung kommt es jedoch häufig zu Nebenwirkungen wie beispielsweise Verdauungsstörungen und Diarrhoen. Die erektile Dysfunktion durch strahlenbedingte Nervenläsionen stellt ein mit 40-70% häufig auftretendes Problem dar. Seltener kommt es als Folge der Bestrahlung zu bleibenden Schädigungen des Urogenitaltraktes (Strahlenzystitis 3-5%) und des Gastrointestinaltraktes (Proktitis 1-3%) sowie zu Dysfunktion der Sphinkteren.<sup>7</sup> Eine Möglichkeit der Verringerung der systemischen Strahlenbelastung stellt die Brachytherapie dar, bei der niederenergetische radioaktive <sup>125</sup>Iod- oder <sup>103</sup>Palladium-Partikel (sogenannte Seeds) gewebe-nah oder direkt in die Prostata appliziert werden.

Weitere Behandlungsmöglichkeiten bestehen in der antiandrogenen Therapie (operative Orchiektomie, medikamentöse Behandlung mit Östrogenen oder LHRH-Blockade, periphere Androgenblockade und 5-Alpha-Reduktase-Hemmer) und der Chemotherapie.<sup>6</sup> Durch antiandrogene Hormontherapie bei testosteronabhängigen Karzinomen kann der Krankheitsverlauf verlangsamt werden. Da im Laufe der Zeit jedoch eine Hormonresistenz auftritt, wird diese Therapie nur in Verbindung mit anderen Methoden eingesetzt. Als Nebenwirkungen sind hierbei wiederum erektile Dysfunktion und verringerte Libido zu nennen. Die



## 1 Einleitung

Chemotherapie mit Zytostatika (u.a. Docetaxel) ist wegen ihrer Nebenwirkungen eine oft erst im späten Behandlungsverlauf bei metastasierenden Tumoren eingesetzte Möglichkeit der (palliativen) Prostatakarzinombehandlung.<sup>6,7,8</sup>

Insgesamt ist die Aussicht auf Heilung durch Anwendung einer oder mehrerer kombinierter Therapieformen bei lokal begrenzten Tumoren mit ca. 90% relativ gut. Karzinome, die benachbartes Gewebe infiltrieren, haben im Gegensatz dazu nur eine Heilungsquote von ca. 50%.<sup>9</sup> Bei metastasierter Erkrankung besteht keine kurative Option mehr, allerdings stirbt ein nicht unerheblicher Teil der Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom eines natürlichen Todes.

### 1.2 Neoangiogenese - Neubildung von Blutgefäßen

Als Angiogenese wird ganz allgemein die Bildung von Blutgefäßen bezeichnet. Man unterscheidet zwischen zwei grundsätzlich verschiedenen Gefäßbildungsmechanismen.<sup>10</sup> Die Vaskulogenese beschreibt die Neubildung von Gefäßen aus endothelialen Vorläuferzellen bei der Ausbildung des Gefäßsystems in der Embryonalzeit. Die Neoangiogenese bezeichnet die Bildung von Gefäßen aus bereits vorhandenen Gefäßstrukturen im adulten Organismus und spielt sich insbesondere bei Entzündungsvorgängen, Prozessen der Wundheilung und im weiblichen Reproduktionszyklus ab, kommt ansonsten jedoch physiologischerweise nur sehr selten vor. Vielmehr ist die Neoangiogenese ein Merkmal verschiedener pathologischer Vorgänge, wie der altersbedingten Maculadegeneration, Psoriasis, rheumatoider Arthritis und malignen Tumoren.<sup>11</sup> Besonders maligne Neoplasien sind auf ein eigenes, sich beständig erweiterndes Gefäßnetz angewiesen, um ab einer bestimmten Größe ihr Wachstum aufrecht zu erhalten.<sup>12</sup> Die Tumorgefäße imponieren dabei durch ungeordnetes, gewundenes Wachstum und Uneinheitlichkeit in Durchmesser und Wanddicke, intervaskuläre Verbindungen (Shunts) und diskontinuierliche oder fehlende Basalmembranen.<sup>13,14</sup> Im Rahmen der Neoangiogenesevorgänge werden bestimmte Markerproteine gebildet, welche sich eignen, die

neugebildeten Gefäße gezielt zu erkennen.

Auf der Suche nach neuen Therapieformen gegen maligne Krebserkrankungen konzentriert man sich auf Wirkstoffe, die gezielt tumorspezifische Strukturen - und hier bieten sich Neoangiogenese-assoziierte Markermoleküle an - angreifen und somit theoretisch keine Nebenwirkungen auf andere (proliferierende) Zellen haben.<sup>15,16</sup> Zusätzlich zur Verringerung der systemischen Wirkungen sprechen folgende Vorteile für diesen Ansatz: Erstens sind Gefäßendothelzellen und die Extrazellulärmatrix neu gebildeter Blutgefäße im Tumorgewebe im Gegensatz zu den Tumorzellen selbst gut über den Blutweg erreichbar und zweitens werden sie von normalen Zellen (im Gegensatz zu Tumorzellen) exprimiert, sind genetisch stabil und bilden somit weniger Resistenzmechanismen gegenüber Tumorthérapien aus.<sup>17</sup> Mithilfe von spezifischen Antikörpern, die gegen Neoangiogenese-assoziierte Markermoleküle gerichtet sind, könnten nun Anti-Tumor-Wirkstoffe direkt zum Tumor gebracht werden und dort entweder die Durchblutung des Tumorgewebes und damit die Ernährungsgrundlage der Tumorzellen stören oder die Tumorzellen direkt angreifen. Da sich die angiogenetischen Markermoleküle nicht auf den Tumorzellen selbst, sondern auf tumornahen gesunden Zellen befinden, wird der Aufbau eines Selektionsdruckes gegen die Tumorzellen und somit ein im Laufe der Behandlung mit den entsprechenden Antikörpern auftretender Antigenverlust vermieden.

### **1.3 ED-B: Die Extradomäne B des Fibronektins**

#### **1.3.1 Marker der Neoangiogenese**

Die Extradomäne B (ED-B) des Fibronektins ist neben dem VEGF-/VEGF-Rezeptor-Komplex, den Integrinen  $\alpha V\beta 2$  und  $\alpha V\beta 5$ , Endoglin CD105, CD44 u.a. ein wichtiges Element der extrazellulären Matrix neugebildeter Gefäßstrukturen und stellt somit einen Marker der Neoangiogenese dar.<sup>18</sup> ED-B wird durch alternatives Spleißen in Fibronektin eingebaut. Das entstandene ED-B-Fibronektin (ED-B-FN) ist mit angiogeneseaktiven Pro-



## 1 Einleitung

mit Hauttumoren,<sup>23</sup> im Mammakarzinom,<sup>24</sup> intrakraniellm Meningeom,<sup>25</sup> Glioblastom,<sup>26</sup> HNO-Karzinomen,<sup>27,28,29</sup> Pankreas- und hepatozellulärem Karzinom,<sup>30</sup> nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom<sup>31</sup> und hämatologischen Neoplasien (u.a. dem Hodgkin-Lymphom)<sup>32</sup> nachgewiesen.

### 1.3.3 Antikörper, die gezielt mit ED-B interagieren

Um ED-B für das zielgerichtete Aufsuchen von Tumoren sowohl in der Diagnostik als auch in der Therapie nutzen zu können, wurden verschiedene ED-B-spezifische Antikörper entwickelt. Eine Schwierigkeit bereitet die Tatsache, dass Antikörper, die direkt gegen ED-B gerichtet sind, nicht mittels Hybridomtechnologie z.B. in Mäusen hergestellt werden können, weil das Immunsystem von Mäusen das hochkonservierte ED-B nicht als fremdes Antigen erkennt.<sup>18</sup>

Bevor dieses Problem mithilfe der Phage Display-Technik gelöst wurde, verwendeten Castellani et al.<sup>19</sup> einen Antikörper, BC1, der nicht direkt gegen ED-B gerichtet war, sondern gegen eine angrenzende Struktur auf dem Fibronectin-Molekül. Diese wird nur durch die Integration der Extradomäne B in das Fibronectinmolekül freigelegt und damit zugänglich. Der monoklonale murine Anti-ED-B-Antikörper BC1 weist zwar eine hohe Tumorselektivität auf und interagiert hochspezifisch mit humanem ED-B, reagiert jedoch nicht mit ED-B in Maus und Huhn. Daher ist die Verwendung von BC1 im Tiermodell limitiert. Die Herstellung mittels Hybridomtechnologie bringt weitere Limitationen mit sich, da eine sog. humane Anti-Mausantikörper-Reaktion (HAMA-Reaktion) induziert wird.<sup>18</sup>

Pini et al.<sup>33</sup> entwickelten 1998 mittels Phage-Display-Technologie den humanen Antikörper L19 gegen ED-B. Es wurden verschiedene Formate hergestellt, die sich hinsichtlich Bindungsaffinität, Ladungseigenschaften, Größe etc. unterscheiden:<sup>34</sup> Viti et al.<sup>35</sup> beispielsweise beschrieben einen Vorteil der dimeren (scFv)<sub>2</sub> Form des L19 gegenüber der monomeren Form in Bezug auf Anreicherung in Tumorgefäßen. Weitere Variationen des L19 sind

## 1 Einleitung

das L19-SIP (small immuno protein), bestehend aus der variablen Kette des L19 und einer Chelatbildungsdomäne, und L19-IgG1. MX1 ist ein ED-B-spezifischer monoklonaler muriner IgG2a-Antikörper (unveröffentlichte Ergebnisse von Andreas Menrad, 2005). Sauer et al.<sup>32</sup> wiesen nach, dass MX1 und L19 vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der Reaktion mit ED-B liefern. MX1 weist im Vergleich zu L19 jedoch eine verbesserte Bindungsaffinität in immunhistologischen Färbungen auf und wird in der vorliegenden Arbeit angewendet. Mehrere Forschungsansätze befassen sich mit der Möglichkeit, zytotoxische Wirkstoffe, die wegen dieser Eigenschaft systemisch nicht in therapeutischen Dosen gegeben werden können, mithilfe des tumor-selektiven Antikörpers L19 direkt in die Nähe von Tumorzellen zu bringen. Die Behandlung mit Zytokinen wie Interleukin(IL)-2<sup>36</sup> und IL-12,<sup>37</sup> die eine Immunreaktion auslösen, und  $\text{TNF}\alpha$ ,<sup>38</sup> das die Apoptose in Tumorzellen einleiten kann, erzielt bessere Ergebnisse mit weniger Nebenwirkungen, wenn die Wirkstoffe an L19 gekoppelt verabreicht werden und so hauptsächlich in unmittelbarer Nähe der Tumorzellen wirken. Mit Immunkonjugaten behandelte Tumore zeigen eine deutlich stärkere Immunreaktion als jene der unbehandelten Kontrollgruppe, sodass ihr Wachstum stark verringert werden kann.<sup>36,37,38</sup>

## 1.4 Photodynamische Therapie PDT

### 1.4.1 Geschichte und Entwicklung

Die Photodynamische Therapie (PDT) stellt eine Möglichkeit dar, den spezifischen Angriffspunkt ED-B auf Tumorgefäßen zu nutzen. Das Wirkprinzip beruht auf der Zerstörung von Gewebe durch intrazelluläre Oxidationsvorgänge, welche durch Bestrahlung und Aktivierung bestimmter photosensitiver Substanzen ausgelöst werden.<sup>39</sup>

Erste Versuche der Tumorbehandlung mittels lokaler Eosinapplikation und darauffolgender Lichtexposition wurden bereits 1907 durch Jesionek und von Tappeiner durchgeführt.<sup>40</sup> Im Jahre 1975 beschrieben Dougherty et al.<sup>41</sup> erstmals die erfolgreiche Mammakarzinom-

behandlung im Tiermodell durch die Kombination von Hämatoporphyrinapplikation und Rotlichtbestrahlung; 1978 folgte die erste größere Studie zum klinischen Einsatz der PDT,<sup>42</sup> welche die Grundlage für weitere Forschung und Entwicklung auf dem Gebiet bildete. 1993 wurde dann erstmals mit Zulassung des Photosensitizers Porfimer-Natrium (Photofrin®) in Kanada der klinische Einsatz der Photodynamischen Therapie bei Blasenkrebs ermöglicht.<sup>40</sup>

### 1.4.2 Wirkmechanismus und Effektivität

Eine photosensitive Substanz wird oral, lokal oder intravenös appliziert und das zu behandelnde Gewebe nach einer gewissen Verteilungszeit im Organismus mit Licht einer definierten Wellenlänge bestrahlt. Nun laufen verschiedene Prozesse in der Zelle ab, wobei man zwei Reaktionstypen unterscheidet. Die Absorption von Licht erhöht das Energieniveau des Photosensitizers vom Grundzustand in den angeregten Zustand. In Anwesenheit von Sauerstoff können sich nun durch Energietransfer auf umgebende Moleküle freie Radikale bilden (Typ-I-Reaktion). Als Typ-II-Reaktion wird sowohl die direkte Energieübertragung vom Photosensitizer auf ein Sauerstoffmolekül mit Bildung des hochreaktiven, sehr kurzlebigen „singlet oxygen“<sup>43</sup> bezeichnet, als auch die Oxidation des Photosensitizers unter Bildung von Superoxidanionen.<sup>44</sup> Diese freien Radikale und Sauerstoffintermediate führen zu einer Schädigung der Zelle u.a. durch Denaturierung von Proteinen (Enzymen), Permeabilitätsänderungen in Membranen und Strukturveränderungen in der DNA.

Zur ersten Generation der Photosensitizer gehören Hämatoporphyrin, das Hämatoporphyrinderivat HpD (Photofrin I) und die Reinform Porfimer-Natrium (Photofrin II, Photofrin®), von denen nur letztere zur Behandlung von Patienten zugelassen ist. Porfimer-Natrium weist eine relativ geringe tumorselektive Anreicherung und demzufolge eine enge therapeutische Breite auf.<sup>45</sup> Als wichtigste Nebenwirkung bei Anwendung gegen jegliche Karzinomarten beschreiben Wagnieres et al.<sup>46</sup> eine bis zu zwölf Wochen anhaltende erhöhte Photosensibilität der Haut. Die Photosensitizer der zweiten Generation zeichnen sich durch eine vergleichsweise höhere Tumorselektivität und eine geringere kutane Photosensibili-

## 1 Einleitung

sierung aus.<sup>47</sup> 5-Aminolävulinsäure ALA (Levulan®), zugelassen 1999, hat durch seine hydrophilen Eigenschaften den Nachteil, Zellmembranen nur schwer passieren zu können. Die 2001 zugelassene Weiterentwicklung Methylester-ALA (Metvix®) hat dieses Problem nicht mehr. Der neueste Photosensitizer auf dem Markt, mTHPC (Temoporfin, Foscan®), weist eine höhere Aktivität<sup>39</sup> und photodynamische Potenz als seine Vorgänger auf und ermöglicht eine etwas größere Eindringtiefe der Lichtstrahlen, da mTHPC mit Licht einer größeren Wellenlänge aktiviert werden kann. Sowohl bei ALA als auch bei Methyl-ALA und mTHPC wird von einer teilweise mehrere Tage andauernden Photosensibilität der Haut nach der Behandlung berichtet.<sup>40,48</sup> Allen bislang genutzten Photosensitizern ist gemein, dass das zur Aktivierung benötigte Licht bestimmter Wellenlängen (meist um die 600nm) bis zu 10mm ins Gewebe eindringen kann.<sup>49</sup>

Die Effektivität der PDT ist nicht unbedingt von der Konzentration des Photosensitizers im Tumor zum Zeitpunkt der Bestrahlung abhängig. Vielmehr gibt es einen Zusammenhang zwischen Effektivität der PDT und Plasmakonzentration des Photosensitizers zum Zeitpunkt der Bestrahlung,<sup>40,50</sup> was darauf hinweist, dass der Effekt der PDT von einer suffizienten Nachschublage des Photosensitizers abhängig ist.

### 1.4.3 Anwendungsgebiete

Die photodynamische Therapie erscheint besonders für die Behandlung von Hauttumoren geeignet und ist derzeit u.a. in Europa zur Behandlung der aktinischen Keratose, des superfiziellen, basozellulären Karzinoms und des Plattenepithelkarzinoms der Haut (Morbus Bowen) zugelassen,<sup>51,52</sup> wobei es Hinweise gibt, dass z.B. die PDT mit Methyl-ALA ein besseres ästhetisches Ergebnis und weniger Nebenwirkungen aufweist als konventionelle Behandlungsmethoden.<sup>53</sup> Die Hauptnebenwirkung der PDT ist die bereits erwähnte stark ausgeprägte, bei einigen Substanzen bis zu mehrere Wochen anhaltende Photosensitivität der Haut, weil das Spektrum des Sonnenlichts die Aktivierungsfrequenzen des jeweiligen Photosensitizers ebenfalls beinhaltet.<sup>40</sup> Bei kleinen oberflächlichen HNO-Karzinomen im frühen

## 1 Einleitung

Stadium hat sich diese Behandlungsform teilweise als ebenso effektiv erwiesen wie Radiotherapie oder operative Verfahren.<sup>51</sup> Bei Ösophaguskarzinom und Barrett-Ösophagus gibt es zwar erfolgversprechende Ansätze zur Behandlung mit PDT, die Überlegenheit gegenüber anderen Methoden ist jedoch noch nicht gesichert, was unter anderem mit unerwünschten Wirkungen wie Stenosen und häufigem Auftreten von Rezidiven zusammenhängt. Auch beim Blasenkarzinom hat sich die photodynamische Therapie hauptsächlich wegen hoher Rezidivraten bisher nicht durchgesetzt.<sup>51</sup>

Die Anwendung der PDT beim Prostatakarzinom wird schon seit den 1980er Jahren erforscht.<sup>54</sup> Im Jahre 2002 wurde die erste klinische Studie an Patienten mit Lokalrezidiv eines Prostatakarzinoms veröffentlicht, die vielversprechende Ergebnisse zeigte.<sup>55</sup> Derzeit laufen diverse Phase-II-Studien zur Klärung der offenen Fragen bezüglich Sicherheit und Effektivität dieser Therapie.<sup>56</sup>

Keine Erfahrungen gibt es bisher jedoch mit einer antikörper-vermittelten, gezielten Photodynamischen Therapie des Prostatakarzinoms. Möglich wäre hier - analog zu den Experimenten mit an L19 gekoppelten Zytokinen - die Kopplung von Photosensitizern an den Antikörper L19 gegen ED-B, wie bereits durch mehrere Arbeitsgruppen beschrieben. Birchler et al.<sup>57</sup> konnten im Tiermodell zeigen, dass L19-PDT den gezielten Verschluss von Gefäßen okulärer Neovaskulatur vermittelt und die Apoptose der umliegenden Endothelzellen unterstützt. Fabbrini et al.<sup>58</sup> setzten L19-PDT gegen subkutane Hauttumore bei Ratten ein und konnten ein Sistieren des Tumorstwachstums feststellen. Palumbo et al.<sup>59</sup> beschrieben an F9-Teratkarzinom und A431-Epitheloidzellkarzinom im Mausmodell den kompletten Untergang des Tumorgewebes nach Behandlung mit L19-PDT. Im Gegensatz zu der alleinigen Gabe von an L19 gekoppelten Antitumorsubstanzen, die trotz gezielter Reaktion mit dem Karzinomgewebe dennoch auch systemisch wirken können, ist mit der L19-PDT eine doppelte Selektion möglich, da die eigentliche Angriffsreaktion nur dort stattfindet, wo Licht zur Aktivierung eingestrahlt wird. Falls sich die Vermutung bestätigt, dass auch das



Adenokarzinom der Prostata, wie viele andere solide Tumore, in relevantem Maße den Neoangiogenesemarker ED-B exprimiert, öffnen sich möglicherweise neue Wege in der Therapie dieser malignen Erkrankung.

### 1.5 Fragestellung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die systematische Untersuchung und Charakterisierung der Expression des Neoangiogenesemarkers ED-B beim Adenokarzinom der Prostata und tumorbehafteten Lymphknoten mithilfe immunhistochemischer Färbungen und konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie. Besonderes Augenmerk wird dabei auf den Vergleich mit normalem Prostatagewebe und benigner Prostatahyperplasie gerichtet. Die gewonnenen Erkenntnisse sollen weitere Überlegungen zur Nutzbarkeit des ED-B als spezifischem Marker für maligne Prozesse ermöglichen und einen Beitrag zur Diskussion um neue Optionen in Therapie und Diagnostik des Prostatakarzinoms leisten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Übersicht über verwendete Reagenzien

---

<b>TBS-Puffer mit Tween 20 (TBST)</b>	<b>pH=7,5</b>	6,85g Tris-HCL 0,9g Tris-Base 1ml Tween 20 mit H <sub>2</sub> O dest. ad 1l
<b>EDTA-Lösung 0,5M</b>	<b>pH=8,0</b>	186,1g EDTA mit H <sub>2</sub> O dest. ad 1l NaOH bis pH=8,0
<b>Citratpuffer 10mM</b>	<b>pH=6,0</b>	2,1g Citrat mit H <sub>2</sub> O dest. ad 1l NaOH bis pH=6,0
<b>Hämalaun nach Mayer</b>		1,0g Hämatoxylin 0,2g Natriumiodat 50,0g Kalialaun 50,0g Chloralhydrat 1,0g Citrat mit H <sub>2</sub> O dest. ad 1l

---

## 2.2 Auswahl der Gewebeproben

Das in Paraffin eingebettete Gewebematerial wurde vom pathologischen Institut der Charité, Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, bereitgestellt. Nachdem aus den Datenbanken eine Vorauswahl erfolgte, wurden histologisch und morphologisch geeignete Präparate herausgesucht. Für die Präparate mit Adenokarzinom der Prostata wurde der Gleason-Score erhoben und anschließend der korrelierende Grad nach Sommerkamp und Böcking ermittelt. Es wurden 8 Prostatektomiepräparate mit gut differenziertem Adenokarzinom Grad 1 (G1), 25 Präparate mit mittelgradig differenziertem Adenokarzinom Grad 2 (G2), 35 Präparate mit schlecht differenziertem Adenokarzinom Grad 3 (G3) und 5 Lymphknotenpräparate mit Metastasenbefall untersucht. Darüber hinaus wurden 4 Präparate, die eine Prostatahyperplasie aufwiesen, untersucht und 6 vollständig resezierte gesunde Prostaten von Patienten, bei denen aufgrund eines Harnblasentumors therapeutisch eine Vesicoprostatektomie durchgeführt wurde, die Prostata selbst aber keine histologisch erkennbaren pathologischen Veränderungen aufwies (im Folgenden auch „tumorfremde Prostatektomien“ genannt), analysiert. Als Positivkontrolle für die immunhistologischen Färbungen und die Immunfluoreszenzfärbungen diente Gewebe des klarzelligen Nierenzellkarzinoms.

## 2.3 Vorbereitung der Gewebeproben

Die Gewebeproben wurden am Mikrotom auf 2  $\mu\text{m}$  Dicke zugeschnitten und auf beschichtete Objektträger (Capillary Gap Microscopic Slides 75  $\mu\text{m}$ , Dako, Glostrup bzw. SuperFrost Plus Objektträger, R. Langenbrinck, Emmendingen) aufgezogen, wobei die elektrostatischen Eigenschaften des Beschichtungsmaterials eine bessere Haftung des Gewebes auf den Objektträgern, dadurch einfachere Handhabung bei den folgenden Bearbeitungsschritten und letztlich bessere Färbungsergebnisse ermöglichen sollten. Anschließend wurden die Proben über Nacht bei ca. 50°C im Wärmeschrank getrocknet. In Xylol wurden die Proben für drei mal 5 Min. entparaffiniert und durch eine absteigende Alkoholreihe in TBS-Puffer mit 0,1% (v/v) Tween 20 (TBST) (Serva Electrophoresis, Heidelberg) überführt. Da die

vorausgegangene Fixierung mit Formaldehyd und Paraffin eine Verklumpung und Dehydrierung der Proteinstrukturen des Gewebes verursacht, musste das ED-B-Epitop erst wieder zugänglich gemacht werden. In Vorversuchen wurden die verschiedenen Methoden und Parameter zur Freilegung des ED-B-Epitops im Hochdruckkochtopf (Kochzeiten der Schnitte bei 125°C und 100 kPa von jeweils 1 Min., 2 Min. und 5 Min.; Kochlösung EDTA-Lösung pH=8,0 oder Citratpuffer pH=6,0) miteinander verglichen. Als optimale Vorbehandlung der histologischen Schnitte für die ED-B-Färbung erwies sich eine Kochzeit von 5 Min. im Hochdruckkochtopf in EDTA-Lösung, pH=8,0. Diese Art der Vorbehandlung erfolgte für alle mit dem monoklonalen Antikörper MX1 gegen ED-B zu färbenden Proben. Die Färbung von CD34-positiven Gefäßendothelien wurde nach einer etablierten Vorbehandlung von 2 Min. Kochzeit und (10 mM) Citratpuffer, pH=6,0 durchgeführt. Nach dem Kochen wurden die Proben in TBST überführt.

## 2.4 Färbungen

### 2.4.1 Immunhistochemische Färbung mit den monoklonalen

#### Antikörpern MX1 oder $\alpha$ CD34

Nach 30 Min. Inkubation mit dem Primärreagenz MX1 gegen ED-B oder  $\alpha$ CD34 gegen Gefäßendothelien (clone QBEnd 10, Dako, Glostrup) bei Raumtemperatur wurden die Schnitte mit der APAAP (alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase)-Methode nach Cordell et al.,<sup>60</sup> einer indirekten Komplexmethode, entwickelt (APAAP Detection System Mouse, Dako, Glostrup). Als Sekundärreagenz bzw. Brückenantikörper diente hierbei ein Kaninchen-anti ( $\alpha$ )-Maus-Immunglobulin, mit dem die Schnitte für 30 Min. inkubiert wurden. Danach wurde der eigentliche APAAP-Komplex, der aus murinem  $\alpha$ -alkalische-Phosphatase-Immunglobulin besteht, für 30 Min. inkubiert. Zur Verstärkung der Reaktion wurde die Inkubation mit den Sekundärreagenzien für jeweils 10 Min. wiederholt. Danach wurde mit dem Entwicklungspuffer (Naphtholphosphat mit zugefügtem Chromogen Fast Red) für 30 Min. inkubiert, was die Rotfärbung des nachzuweisenden Antigens (ED-B)

bewirkte, wobei durch Zugabe von Levamisol-Lösung die endogene alkalische Phosphatase geblockt wurde. Jedem der beschriebenen Inkubationsschritte folgte ein dreifacher Waschschrift mit TBST-Puffer. Abschließend erfolgte die Gegenfärbung des Gewebes mit Hämalaun nach Mayer und die Einbettung in Gelatine (Kaisers Glyceringelatine, Merck, Darmstadt). Jeder untersuchte Schnitt wurde mindestens zweimal gefärbt.

### 2.4.2 Doppelfluoreszenzfärbung mit den monoklonalen Antikörpern

#### MX1 und $\alpha$ CD34

Für die Doppelfluoreszenz wurden jeweils 5 repräsentative Präparate aus der Gruppe gut (G1), mittelgradig (G2) und schlecht differenziertes (G3) Prostatakarzinom ausgesucht; außerdem 5 tumorbefallene Lymphknoten, 2 Präparate mit der Diagnose Prostatahyperplasie, 1 Präparat mit gesunder, pathologisch nicht veränderter Prostata und als Positivkontrolle Präparate mit klarzelligem Nierenzellkarzinom. In der ersten Phase wurde der ED-B-mAK MX1 für 30 Min. mit den vorbehandelten Schnitten inkubiert. Anschließend wurde der gebundene MX1-Antikörper mittels 30 Min. Inkubation mit einem Cy3-markierten Ziege- $\alpha$ -Maus-Immunglobulin detektiert. Vor Beginn der zweiten Phase wurden die noch freien Immunglobuline für 30 Min. mit einem Ziege- $\alpha$ -Maus-Serum blockiert. In der zweiten Phase wurden die Schnitte zuerst mit dem mAK  $\alpha$ CD34 für 30 Min. und danach mit einem Cy2-markierten Ziege- $\alpha$ -Maus-Immunglobulin für 30 Min. inkubiert. Abschließend erfolgte die Zellkernfärbung durch die Inkubation mit TOTO-3 für 3 Min. und die Einbettung (Fluorescent Mounting Medium, Dako, Glostrup). Während des gesamten Arbeitsprozesses wurden die Schnitte möglichst dunkel und kühl gehalten. Nach jeder Antikörperinkubation wurden die Schnitte drei mal mit TBST gewaschen.

## 2.5 **Auswertung**

### 2.5.1 **Immunhistochemie**

Zur Auswertung der Gefäßfärbungen mit  $\alpha$ CD34 wurde die Gesamtmenge der Gefäßanschnitte, im Folgenden vereinfacht als „Gefäße“ bezeichnet, sowohl im Karzinom- als auch im angrenzenden Normalgewebereich der einzelnen gefärbten Schnitte bei zweihundertfacher Vergrößerung in zehn Arealen mit jeweils einer Fläche von einem Quadratmillimeter ( $1\text{ mm}^2$ ) gezählt und verglichen. Zur Auswertung der Färbungen mit MX1 wurde zuerst die Gesamtmenge an vorhandenen Gefäßen, dann die ED-B-positiven und ED-B-negativen Gefäße sowohl im Karzinom- als auch im angrenzenden Normalgewebereich der einzelnen gefärbten Schnitte ausgezählt, wiederum bei zweihundertfacher Vergrößerung in zehn Arealen mit jeweils einer Fläche von von  $1\text{ mm}^2$ . Aus den ermittelten Zahlen ließen sich dann folgende Werte berechnen: das Verhältnis der Gesamtgefäßzahl von Karzinom- zu Normalgewebe und der prozentuale Anteil von positiven Gefäßen an der Gesamtgefäßzahl (also die Gefäßneubildungsrate), ebenfalls jeweils im Karzinom und im Normalgewebe. Auf dieselbe Art und Weise wurden die Färbungen der pathologisch unveränderten Prostatektomiepräparate ausgewertet.

### 2.5.2 **Konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie**

Die Auswertung der Doppelfluoreszenzfärbungen erfolgte am konfokalen Mikroskop (True Confocal Scanner TCS-NT, Leica, Wetzlar) mit entsprechender Software (LCS Lite, Leica Microsystems, Mannheim). Der Argon-Krypton-Laser liefert eine Kombination diverser Argon- und Kryptonlinien. Der Fluoreszenzfarbstoff Cy3 besitzt eine Anregungswellenlänge von 550 nm und eine Emissionswellenlänge von 570 nm. Er emittiert folglich rotes Licht, weshalb über Cy3 detektierter mAK MX1 rot dargestellt wird. Dagegen besitzt der Fluoreszenzfarbstoff Cy2 eine Anregungswellenlänge von 488 nm und eine Emissionswellenlänge von 520 nm; er emittiert grünes Licht und Cy2-markierter mAK  $\alpha$ CD34 wird grün dargestellt. Der Fluoreszenzfarbstoff TOTO-3 besitzt eine Anregungswellenlänge von 642 nm

und eine Emissionswellenlänge von 660 nm. TOTO-3 gefärbte Kerne emittieren daher infrarotes Licht und werden über die Software blau dargestellt. Die Überlagerung des grünen und roten Lichtes, d. h. eine Ko-Expression von CD34 und ED-B, erscheint gelb (overlay). Die Ergebnisse wurden fotografisch dokumentiert.

### **2.5.3 Statistische Auswertung der Ergebnisse**

Die Ergebnisse der immunhistologischen Färbungen am Prostatakarzinom und am Normalgewebe wurden statistisch ausgewertet unter Verwendung der Software SPSS Statistics für Windows, Version 15.0 (IBM, München). Es kamen verschiedene statistische Tests zur Anwendung, wobei eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  als signifikant gewertet wurde.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie

#### 3.1.1 Adenokarzinom der Prostata, Prostatahyperplasie und normales Prostatagewebe ohne pathologische Veränderung

Um die Ko-Expression des Stammzell- und Endothelmarkers CD34 und des ED-B-Fibronektins nachzuweisen - um also nachzuweisen, dass das ED-B-Antigen wirklich perivaskulär lokalisiert ist - wurde die Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit konfokaler Mikroskopie durchgeführt. Es ließ sich am selben Präparat sowohl die Expression von CD34, die Expression von ED-B als auch ihre genaue Lokalisation visuell darstellen. Es wurden jeweils 5 Präparate aus der Gruppe Prostatakarzinom Grad 1, Grad 2 und Grad 3 gefärbt, 2 Präparate mit Prostatahyperplasie und ein Präparat mit nicht pathologisch veränderter, normaler Prostata. Die konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie am Adenokarzinom der Prostata zeigte bei allen gefärbten Präparaten das Vorhandensein von ED-B und eine Ko-Expression der beiden Antigene in allen drei Gruppen der gut differenzierten, mittelgradig differenzierten und schlecht differenzierten Karzinome (siehe Abb. 3.1). Das ED-B fand sich im Karzinom hauptsächlich perivaskulär, ließ sich aber auch im Stroma nachweisen. Im Normalgewebe der Prostata und in den Präparaten mit Prostatahyperplasie ließ sich nur eine sehr geringe oder gar keine ED-B-Expression nachweisen, was zu den weiter unten beschriebenen Ergebnissen der Gefäßzählungen an immunhistologischen Färbungen passt. So konnte an den Gefäßen von normalem Prostatagewebe und hyperplastisch verändertem Prostatagewebe fast ausschließlich die Expression des CD34-Antigens nachgewiesen werden



(siehe Abb. 3.2).

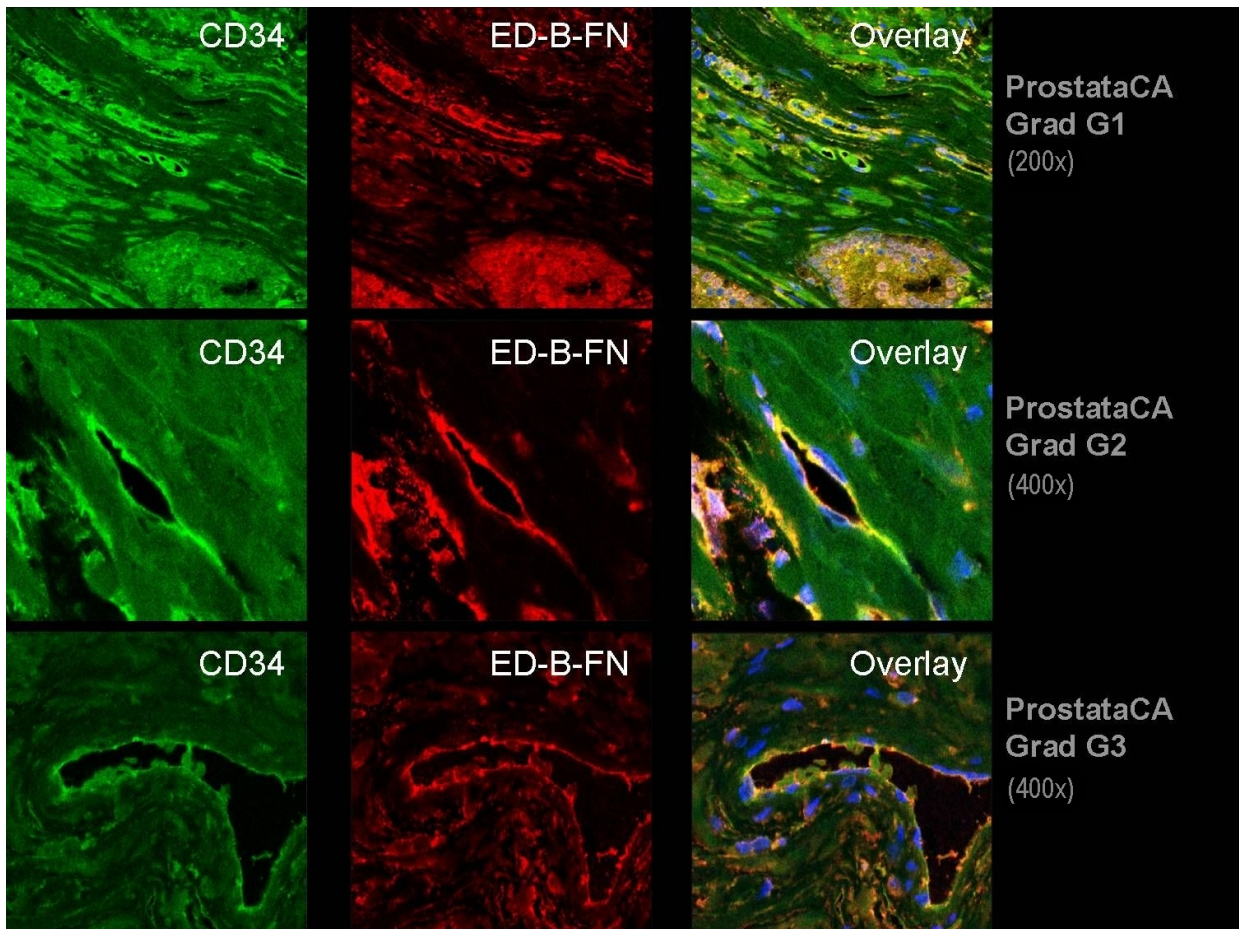


Abbildung 3.1: Nachweis der Ko-Expression von ED-B und CD34 an Gefäßen des gut differenzierten (G1), mittelgradig differenzierten (G2) und schlecht differenzierten (G3) Adenokarzinoms der Prostata mittels konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie. Die CD34-Gefäßfärbung erscheint grün, die ED-B-Färbung erscheint rot, eine Ko-Expression der beiden Antigene erscheint im Overlay gelb. Die Kernfärbung (TOTO) ist blau dargestellt. 200- bzw. 400fache Vergrößerung.

### 3.1.2 Lymphknotenmetastasen des Prostatakarzinoms

Da die immunhistologische APAAP-Methode bei den Präparaten mit Lymphknotenmetastasen von Prostatakarzinomen eine außergewöhnlich hohe Anfärbbarkeit (Hintergrundfärbung) hervorruft, war eine verlässliche Gefäßzählung wie weiter unten beschrieben bei alleiniger immunhistochemischer Analyse der Präparate nicht möglich. Daher wurde hier ergänzend die konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie durchgeführt und ausgewertet. ED-

### 3 Ergebnisse

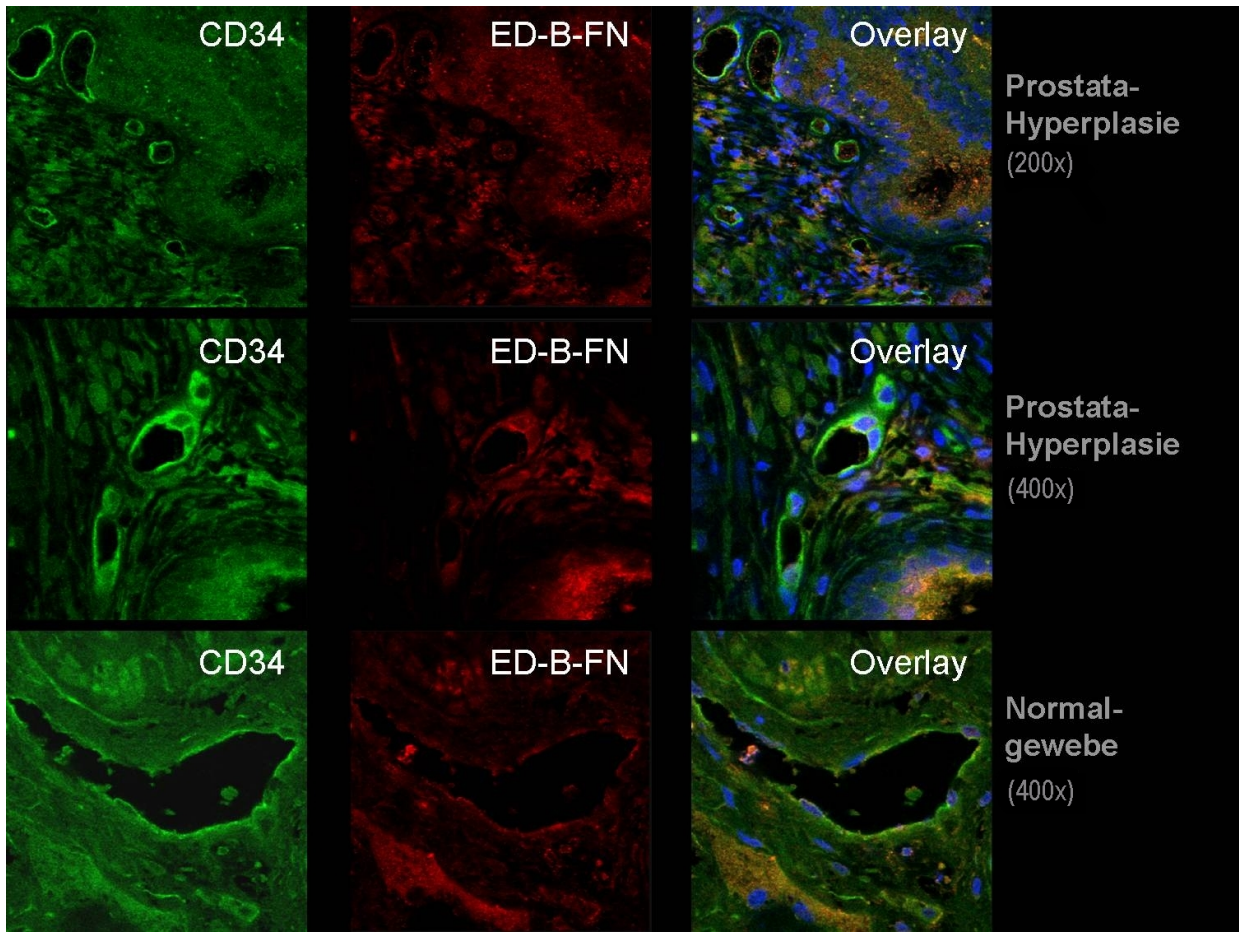


Abbildung 3.2: Keine Ko-Expression von ED-B und CD34 bzw. kein Nachweis von ED-B an Präparaten mit Prostatahyperplasie und an regelhaftem Prostatagewebe mittels konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie. Die CD34-Gefäßfärbung erscheint grün, die ED-B-Färbung erscheint rot, eine Ko-Expression der beiden Antigene erscheint im Overlay gelb. Die Kernfärbung (TOTO) ist blau dargestellt. 200- bzw. 400fache Vergrößerung.

B wurde in allen untersuchten Lymphknotenmetastasen in den Karzinom-infiltrierten Bereichen nachgewiesen und auch die Ko-Expression mit dem Gefäßmarker CD34 war eindeutig zu belegen (siehe Abb. 3.3).

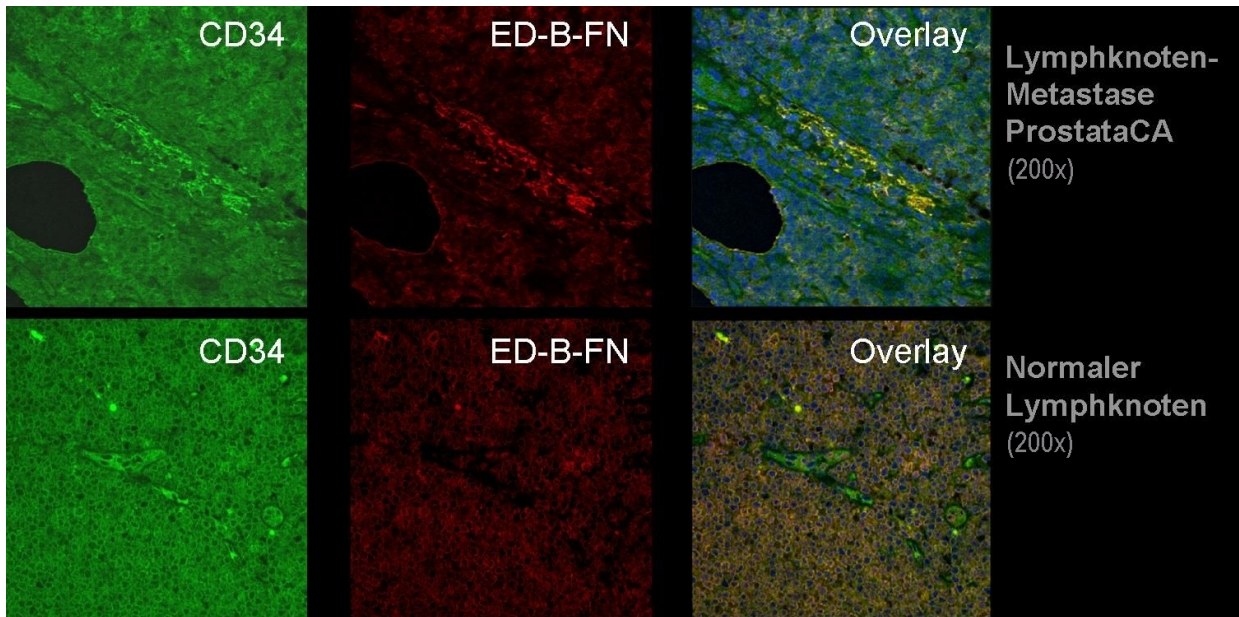


Abbildung 3.3: Konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie an der Lymphknotenmetastase eines Prostatakarzinoms. Die Gefäßfärbung mit CD34 erscheint grün, die ED-B-FN-Färbung erscheint rot, eine Ko-Expression der beiden Antigene erscheint im Overlay gelb. Die Kernfärbung (TOTO) ist blau dargestellt. 200fache Vergrößerung.

## 3.2 Immunhistochemische Färbungen

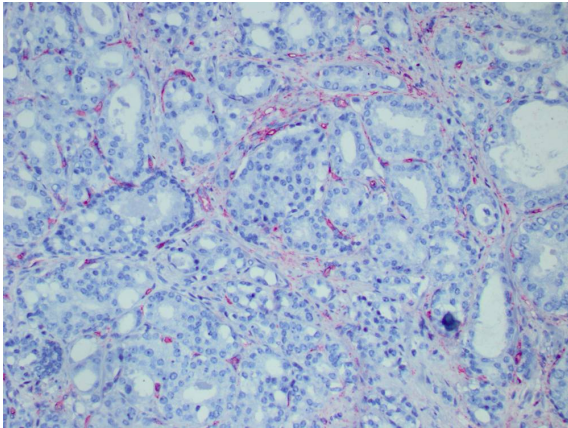
### 3.2.1 Gefäßfärbung mit $\alpha$ CD34: Vergleich der Gefäßdichte zwischen Prostatakarzinomgewebe und angrenzendem normalem Prostatagewebe

Es wurden jeweils 10 Areale innerhalb und außerhalb des Tumorgewebes von Präparaten mit gut, mittelgradig und schlecht differenziertem Adenokarzinom der Prostata untersucht und nach Fotodokumentation visuell verglichen. Jeder Fall wurde dazu mindestens zweimal gefärbt. Im Prostatakarzinom fand sich eine wesentlich höhere Gefäßdichte, d.h. Anzahl der Gefäßanschnitte pro Flächeneinheit, als im angrenzenden normalen Prostatagewebe, was die immunhistologischen Färbungen des Gefäßmarkers CD34 eindrucksvoll belegen (siehe Abb. 3.4). Im gut differenzierten Prostatakarzinom fanden sich durchschnittlich 81 Gefäße pro  $1\text{ mm}^2$ , im angrenzenden Normalgewebe 63. Im mittelgradig differenzierten Karzinom waren es durchschnittlich 99 Gefäße pro  $1\text{ mm}^2$ , im angrenzenden Normalgewebe 56 und

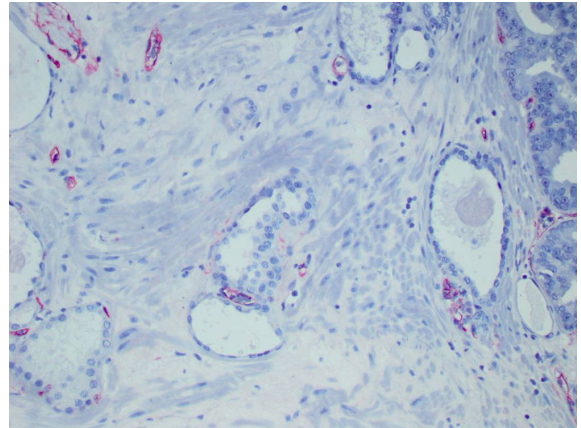
### 3 Ergebnisse

im schlecht differenzierten Karzinom stand eine durchschnittliche Gefäßdichte von 124 pro  $\text{mm}^2$  einer Gefäßdichte von 90 pro  $\text{mm}^2$  im angrenzenden normalen Gewebe gegenüber. Der Unterschied der Gefäßdichte zwischen Prostatakarzinomareal und normalem Prostatagewebe sowohl beim gut differenzierten als auch beim mittelgradig und schlecht differenzierten Prostatakarzinom war statistisch signifikant ( $p \leq 0,05$ ). Die aus den ED-B-Färbungen ermittelten Gefäßdichtewerte (s. unten) entsprachen sowohl im Karzinombereich als auch im normalen Gewebe den Werten der CD34-Färbung.

Die Gefäße im Prostatakarzinomareal waren im Vergleich zum angrenzenden Normalgewebe fast alle deutlich kleiner, während im Prostanormalgewebe kleine, mittelgroße und große Gefäße in einigermaßen gleichmäßiger Verteilung gefunden wurden. Auch schienen die Gefäße im Karzinombereich unregelmäßiger angeordnet als im tumorfreien Bereich. Im Normalgewebe der Prostata war eine deutliche Tendenz zur Anordnung der Gefäße um die drüsigen Anteile des Gewebes zu erkennen, im Prostatakarzinom hingegen fand man Gefäße ungeordnet und praktisch überall, sowohl um neoplastische Drüsenstrukturen herum als auch verteilt im Stromagewebe. Während im angrenzenden normalen Prostatagewebe die Gefäße meist eindeutig zu differenzieren waren und beteiligten Strukturen (beispielsweise Lumina im Längs- oder Querschnitt, Gefäßverzweigungen) zuzuordnen waren, waren neue Gefäßaussprossungen im Stroma des Prostatakarzinoms teilweise nur flächig zu erahnen und die immunhistologische Färbung war einzelnen Gefäßen nicht mehr eindeutig zuzuordnen. Am deutlichsten war dies auf Färbungen der mittelgradig (G2) und schlecht (G3) differenzierten Tumore zu erkennen.

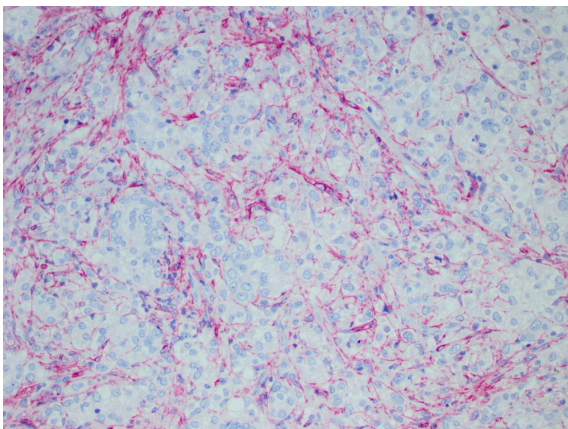


(a) Prostatakarzinom G2

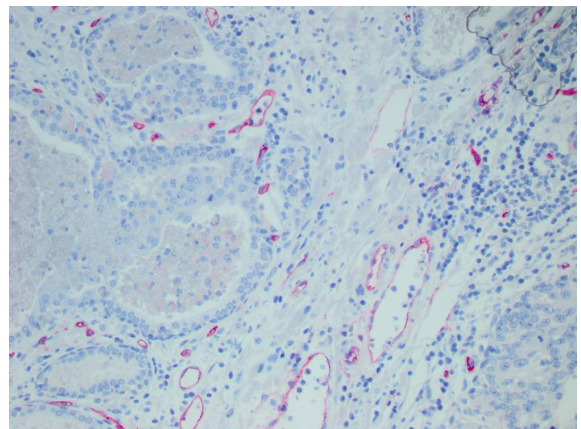


(b) normales Prostatagewebe

Abbildung 3.4: Nachweis der deutlich höheren Gefäßdichte im Prostatakarzinom im Vergleich zu Normalgewebe mittels der immunhistologischen Gefäßfärbung mit  $\alpha$ CD34. a) mittelgradig differenziertes Prostatakarzinom G2, b) regelhaftes Prostatagewebe. 200fache Vergrößerung.



(a) Prostatakarzinom G3



(b) normales Prostatagewebe

Abbildung 3.5: Nachweis der deutlich höheren Gefäßdichte im Prostatakarzinom im Vergleich zu Normalgewebe mittels der immunhistologischen Gefäßfärbung mit  $\alpha$ CD34. a) schlecht differenziertes Prostatakarzinom G3, b) regelhaftes Prostatagewebe. 200fache Vergrößerung.

### 3.2.2 ED-B-Färbung mit MX1

#### 3.2.2.1 Vergleich der Gefäßzahlen im an Karzinom angrenzenden normalen Prostatagewebe und in der gesunden Prostata

Als Vergleichsgewebe zum Prostatakarzinom wurde tumorfreies Prostatanormalgewebe aus demselben Präparat, in dem auch das Prostatakarzinom untersucht wurde, verwendet. Um

### 3 Ergebnisse

sicherzustellen, dass dieses repräsentativ für gesundes, pathologisch unverändertes Prostata-gewebe ist, wurden sechs vollständig resezierte gesunde Prostatae, die keine pathologi-schen Veränderungen aufwiesen, auf ihre ED-B-Expression untersucht und die ermittelten Gefäßzahlen und Gefäßneubildungsraten mit denen des an Karzinom angrenzenden Prosta-tanormalgewebes verglichen (siehe Tab. 3.1). In Bezug auf die Gefäßdichte ergab die Va-rianzanalyse aller vier Gruppen gemeinsam zwar einen Unterschied zwischen den Werten, doch im Vergleich jeweils zweier benachbarter Gruppen (also Normalgewebe aus gesunder Prostata vs. an G1-Tumore grenzendes Normalgewebe, an G1- vs. an G2-Tumore grenzen-des Normalgewebe, an G2- vs. an G3-Tumore grenzendes Normalgewebe) ergab sich kein signifikanter Unterschied ( $p \leq 0,05$ ). Auch die Anzahl der ED-B-positiven Gefäße und die Gefäßneubildungsrate waren so vergleichbar ( $p \leq 0,05$ ).

Prostata-Karzinom		Mittelwerte		
Differenzierungsgrad		Gefäße pro 1 mm <sup>2</sup>	ED-B+ pro 1 mm <sup>2</sup>	Neubildungsrate in %
gut (G1) n=8	Tumorgewebe	85 ± 8	59 ± 9	68 ± 8
	Normalgewebe <sup>a</sup>	64 ± 9	15 ± 4	25 ± 7
mittelgradig (G2) n=25	Tumorgewebe	95 ± 9	65 ± 9	68 ± 6
	Normalgewebe <sup>a</sup>	65 ± 10	14 ± 9	22 ± 13
schlecht (G3) n=35	Tumorgewebe	128 ± 18	97 ± 23	75 ± 10
	Normalgewebe <sup>a</sup>	87 ± 14	27 ± 13	30 ± 12
tumorfremie Prostatektomien <sup>b</sup> n=6		57 ± 9	7 ± 5	13 ± 10

Tabelle 3.1: Gefäßdichte (Gefäße pro 1 mm<sup>2</sup>), ED-B-positive Gefäße pro 1 mm<sup>2</sup> und Gefäß-neubildungsraten (Anteil der ED-B-positiven Gefäße an der Gesamtmenge der Gefäße in %) beim Prostatakarzinom verschiedener Differenzierungsgrade im Vergleich zum angrenzenden Normalgewebe aus demselben Präparat und zu Normalgewebe aus tumorfreien Prostatektomiepräparaten.

<sup>a</sup> an Karzinom angrenzendes, normales Prostatagewebe

<sup>b</sup> normales Prostatagewebe aus vollständig resezierter gesunder Prostata, die keine pathologischen Veränderungen aufwies

### 3 Ergebnisse

Prostatakarzinom		Neubildungsrate			
		≥ 70 %	50-69 %	31-49 %	≤ 30 %
Differenzierungsgrad					
gut (G1) n=8	Tumorgewebe	4/8	4/8	0/8	0/8
	Normalgewebe <sup>a</sup>	0/8	0/8	1/8	7/8
mittelgradig (G2) n=25	Tumorgewebe	8/25	17/25	0/25	0/25
	Normalgewebe <sup>a</sup>	0/25	0/25	6/25	19/25
schlecht (G3) n=35	Tumorgewebe	24/35	10/35	1/35	0/35
	Normalgewebe <sup>a</sup>	0/35	2/35	16/35	17/35

Tabelle 3.2: Gefäßneubildungsraten (prozentualer Anteil ED-B-positiver Gefäße an der Gesamtzahl der Gefäße) auf 1 mm<sup>2</sup> beim Prostatakarzinom verschiedener Differenzierungsgrade im Vergleich zum angrenzenden normalen Prostatagewebe aus demselben Präparat. Angegeben ist jeweils das Verhältnis der ED-B-positiven Präparate zur Gesamtzahl der Präparate.

<sup>a</sup> an Karzinom angrenzendes, normales Prostatagewebe

#### 3.2.2.2 Vergleich der verschiedenen Karzinomdifferenzierungsgrade untereinander

Tab. 3.1 zeigt eine Übersicht über Gefäßdichte (Gefäße pro 1 mm<sup>2</sup>), ED-B-positive Gefäße pro 1 mm<sup>2</sup> und Gefäßneubildungsraten (Anteil der ED-B-positiven Gefäße an der Gesamtmenge der Gefäße) beim Prostatakarzinom verschiedener Differenzierungsgrade im Vergleich zum angrenzenden Normalgewebe aus demselben Präparat und zu normalem Prostatagewebe aus vollständig resezierter gesunder Prostata. Bei der ED-B-Färbung an Prostatagewebe fand sich eine relativ hohe Anfärbbarkeit, die bei Karzinomfärbungen deutlich stärker erschien und dann der korrelierenden CD34-Färbung desselben Areales sehr ähnlich war, also ebenfalls auf die hohe Gefäßdichte des Prostatakarzinoms hinwies. Auch Tumorzellen stellten sich schwach positiv dar. Die aus den ED-B-Färbungen ermittelten Werte für die Gefäßdichte waren jedenfalls sowohl im Karzinombereich als auch im normalen Gewebe (an Karzinom angrenzend oder aus tumorfreien Prostatektomien) mit den Werten der CD34-Färbung vergleichbar.

Die Gefäßdichte, d.h. die Gefäßanzahl pro 1 mm<sup>2</sup>, war im gut, mittelgradig und schlecht differenzierten Prostatakarzinom jeweils signifikant höher als im angrenzenden normalen

### 3 Ergebnisse

Prostatagewebe ( $p \leq 0,05$ ). Während sie beim gut differenzierten Karzinom G1 im Mittel 1,3fach erhöht war (durchschnittlich 64 Gefäße/mm<sup>2</sup> im tumorfreien Bereich und 85 Gefäße/mm<sup>2</sup> im Karzinomareal), erreichte sie beim mittelgradig differenzierten Prostatakarzinom G2 das 1,5fache (durchschnittlich 65 Gefäße/mm<sup>2</sup> im tumorfreien Bereich und 95 Gefäße/mm<sup>2</sup> im Tumorareal). Ebenso verhielt es sich beim schlecht differenzierten Prostatakarzinom G3 (durchschnittlich 87 Gefäße/mm<sup>2</sup> im tumorfreien Bereich und 128 Gefäße/mm<sup>2</sup> im Tumorareal). Das gut differenzierte G1-Karzinom zeigte also unter den drei Gruppen die geringste Gefäßdichte; der Unterschied zum Normalgewebe war zwar signifikant vorhanden, aber nicht ganz so stark ausgeprägt wie bei den Gruppen G2 und G3. Bei einer Steigerung von durchschnittlich 85 Gefäßen pro 1 mm<sup>2</sup> im Tumorbereich des gut differenzierten Karzinoms G1 zu 95 Gefäßen im mittelgradig differenzierten Karzinom G2 und 128 Gefäßen im schlecht differenzierten Karzinom G3 ließ sich eine signifikante positive Korrelation ( $p \leq 0,05$ ) zwischen dem Differenzierungsgrad des Karzinoms und der absoluten Gefäßdichte zeigen; je schlechter differenziert das Karzinom, desto höher die Gefäßdichte.

Auch die Gefäßneubildungsrate, also der prozentuale Anteil ED-B-positiver Gefäße an der Gesamtzahl der Gefäße, war in allen drei Differenzierungsgraden des Prostatakarzinoms jeweils signifikant höher als im angrenzenden normalen Prostatagewebe ( $p \leq 0,05$ ). Hier verhielten sich das gut und mittelgradig differenzierte Karzinom ähnlich mit jeweils einer Gefäßneubildungsrate von durchschnittlich 68% im Tumorgewebe und 22% bzw. 25% im an G1-Tumor bzw. G2-Tumor angrenzenden Normalgewebe. Das schlecht differenzierte Prostatakarzinom erreichte mit durchschnittlich 75% wiederum den höchsten Wert, das angrenzende normale Prostatagewebe ebenfalls (30%). Ein anderer Blickwinkel auf die Fragestellung der Gefäßneubildungsrate ist mit der Darstellung in Tabelle 3.2 gewählt, wodurch der klare Unterschied zwischen Karzinom- und angrenzendem Normalgewebe besonders deutlich wird. Die untersuchten Proben wurden nach ihrer Gefäßneubildungsrate in vier Gruppen unterteilt und die Anzahl der dazugehörigen Proben aufgeschlüsselt. Die erste Gruppe umfasst die Anzahl der untersuchten Präparate mit durchschnittlichen Gefäßneubildungsraten



### 3 Ergebnisse

von über 70%, die zweite 50-69%, die dritte 31-49% und die vierte von unter 30%. Aus der Tabelle wird ersichtlich, dass ausnahmslos alle Gewebeproben der gut und mittelgradig differenzierten Prostatakarzinome eine durchschnittliche Gefäßneubildungsrate von 50% oder mehr aufwiesen, im Gegensatz zu den Gewebeproben des angrenzenden normalen Prostatagewebes, deren Neubildungsrate immer unter durchschnittlich 50% und beim größten Teil der Proben sogar unter 30% lag. Bis auf drei Ausnahmefälle trennte auch beim schlecht differenzierten Karzinom G3 die 50%-Grenze das Tumorgewebe vom angrenzenden normalen Prostatagewebe. Vierundzwanzig der 35 Proben aus Tumorgewebe des G3-Karzinoms, also über zwei Drittel, hatten dabei eine Gefäßneubildungsrate von über 70%.

Auch der Absolutwert der ED-B-positiven Gefäße pro  $1\text{ mm}^2$  korrelierte mit dem Differenzierungsgrad des Prostatakarzinoms ( $p \leq 0,05$ ). Durchschnittlich fanden sich 59 ED-B-positive Gefäße pro  $1\text{ mm}^2$  im gut differenzierten Karzinom, 65 im mittelgradig differenzierten und 97 im schlecht differenzierten Karzinom. Die Anzahl der ED-B-positiven Gefäße pro  $1\text{ mm}^2$  war in allen drei Differenzierungsgraden des Prostatakarzinoms jeweils signifikant höher als im angrenzenden normalen Prostatagewebe ( $p \leq 0,05$ ). Die Gruppen der gut und mittelgradig differenzierten Karzinome lagen hier recht nah beieinander (durchschnittlich 58 bzw. 65 ED-B-positive Gefäße/ $\text{mm}^2$  Karzinomgewebe und 14 bzw. 16 ED-B-positive Gefäße/ $\text{mm}^2$  im Normalgewebe), wohingegen diese Zahl in schlecht differenzierten Tumoren mit 97 ED-B-positiven Gefäßen im Tumorbereich und 27 im angrenzenden Normalbereich deutlich höher war. Der große Unterschied zwischen Prostatakarzinom und angrenzendem normalen Prostatagewebe in Bezug auf die Anzahl der ED-B-positiven Gefäße pro  $1\text{ mm}^2$  war bei allen Differenzierungsgraden des Karzinoms sehr deutlich zu sehen. Beim schlecht differenzierten G3-Karzinom war er besonders ausgeprägt.

## 4 Diskussion

Die Therapie maligner Erkrankungen ist weiterhin Gegenstand intensiver Forschungen, um höhere Heilungsquoten oder bessere Lebensbedingungen für die betroffenen Patienten zu erzielen. Neue Therapieansätze für die Behandlung des Prostatakarzinoms sollen die Nachteile der etablierten Methoden überwinden und möglichst auch eine bessere Wirksamkeit aufweisen. Verstärkte Aufmerksamkeit gilt daher den Wirkstoffen und Methoden, die spezifisch am Tumor angreifen. Die Entdeckung des Neoangiogenesemarkers ED-B ist eine wichtige Grundlage für die Erforschung neuer Therapieformen gegen maligne Tumore, da Neoplasien angiogenetisch sehr aktiv sind, Neoangiogenese jedoch in ausgereiften normalen Geweben nicht oder nur selten vorkommt. Bisher wurde ED-B in allen darauf untersuchten soliden und hämatologischen Tumorarten nachgewiesen. Eine systematische Untersuchung der ED-B-Expression beim Prostatakarzinom wurde bisher jedoch noch nicht durchgeführt und ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Zur Bearbeitung der Fragestellung ist die immunhistochemische Darstellung der Blutgefäße und speziell des ED-B auf neugebildeten Gefäßen durch Färbung mit spezifischen Antikörpern die Methode der Wahl. Sie ermöglicht neben Aussagen zum Ausmaß der Neoangiogenese sowohl solche zur Morphologie des Gewebes und der Gefäße als auch zum räumlichen Zusammenhang zwischen Tumorgefäßen und -zellen, was wiederum von großer Bedeutung für die weiteren Überlegungen bezüglich der Verwertbarkeit der gewonnenen Erkenntnisse ist. Die immunhistologische Färbung mit Antikörpern wie L19 und MX1 weist ED-B in neugebildeten Gefäßen des Prostatakarzinoms zuverlässig nach, sie sind Hauptex-

pressionsort. Bei den Färbungen der Prostatapräparate mit L19 oder MX1 und anschließender Gegenfärbung mit HE war der Unterschied zwischen Gefäßen und Tumorstroma eindeutig anhand morphologischer Unterschiede und anhand der höheren Färbungsintensität der Gefäße zu erkennen.

Im Gegensatz zu normalen oder tumorös (wie z.B. das klarzellige Nierenzellkarzinom) veränderten Geweben anderer Organe zeigte das Prostatagewebe in der Immunhistochemie mit Antikörpern wie L19 oder MX1 eine sehr hohe Anfärbbarkeit. Tangential angeschnittene und erfasste Gefäße trugen zwar zur hohen Signaldichte bei, doch die Färbung war nicht allein auf Gefäße beschränkt. Tumorzellen und Stroma reagierten, mit deutlich schwächerer resultierender Färbungsintensität, ebenfalls, sodass ein gewisser Färbungshintergrund entstand. Diffusionsartefakte waren vermutlich an der Entstehung des Hintergrundes beteiligt. Zusätzlich lässt sich die Stromafärbung durch eine Reaktion des in hohen Mengen in den fibromuskulären Anteilen der Prostata vorkommenden Aktins erklären. Andere Organe haben meist einen wesentlich niedrigeren Aktiningehalt, weshalb charakteristischerweise weniger Hintergrundfärbung entsteht. Auch die an der Bildung des Bindegewebes beteiligten Fibroblasten könnten bei der Produktion des ED-Bs eine Rolle spielen.

Es ist nicht auszuschließen, dass auch Tumorzellen selbst an der Produktion und Sekretion des ED-B beteiligt sind. Midulla et al.<sup>61</sup> vermuteten dies bei Zellen des Mammakarzinoms und des Kolorektalkarzinoms, was von anderen Arbeitsgruppen für weitere Tumorentitäten wie das intrakranielle Meningeom oder HNO-Karzinome unterstützt wurde.<sup>25,28</sup> Möglicherweise lässt sich diese Annahme auch auf das Adenokarzinom der Prostata ausweiten, da sich eine Anfärbbarkeit sowohl der Tumorzellen als auch des Stromas zeigte, was ein Hinweis für die Produktion von ED-B durch diese Zellen und seine Sekretion in das umgebende Gewebe sein könnte. Die durchgeführten Experimente können allerdings nur erste Hinweise auf eine Produktion und Sekretion von ED-B durch Prostatakarzinomzellen liefern. Zur suffizienten Bearbeitung dieser spezifischen Fragestellung wäre eventuell eine

PCR (Polymerase-Chain-Reaction) nach reverser Transkription an Prostatakarzinomzellen geeignet. Die Gewinnung einzelner Karzinomzellen könnte gegebenenfalls mithilfe der lasergestützten Mikrodissektion erfolgen.

Mittels immunhistochemischem CD34-Gefäßnachweis konnte in allen untersuchten Gewebeproben gezeigt werden, dass das Adenokarzinom der Prostata eine signifikant höhere Gefäßdichte (Gefäße pro  $\text{mm}^2$ ) aufweist als angrenzendes normales Prostatagewebe. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den Beobachtungen Folkmans zu den Voraussetzungen für Tumorwachstum und den Eigenschaften solider Tumore bezüglich ihrer Angiogeneseaktivität.<sup>11,12</sup> Die im Ergebnisteil beschriebenen Eigenschaften der Tumorgefäße - kleinere Durchmesser, Unregelmäßigkeiten in funktioneller Anordnung und Struktur - bestätigen die Beschreibungen von Dewhirst<sup>13</sup> und Konerding<sup>14</sup> bezüglich der Vaskularisation maligner Prozesse und erweitern diese um den Aspekt der räumlichen Verteilung im Prostatakarzinomgewebe. Die im Normalgewebe erkennbare Tendenz zur Anordnung der Gefäße um die drüsigen Anteile des Gewebes war im Karzinom aufgehoben. Die Gefäße fanden sich diffus verteilt, das infiltrierte Gewebe wies eine ausgeprägte Architekturstörung auf. Die Gefäßfärbungen mit  $\alpha\text{CD34}$  bestätigten die Reliabilität der Gefäßzählungen an MX1-Färbungen. Die ermittelten Gefäßzahlen stimmten im gut, mittelgradig und schlecht differenzierten Adenokarzinom der Prostata und dem angrenzenden normalen Prostatagewebe in beiden Färbemethoden überein. Diese Beobachtung rechtfertigte im weiteren Vorgehen das alleinige Heranziehen der aus MX1-Färbungen gewonnenen Werte zur Gefäßdichte für die Ermittlung der Anzahl der ED-B-positiven und negativen Gefäße sowie der resultierenden Gefäßneubildungsraten.

In den immunhistologischen Färbungen mit dem gegen ED-B gerichteten Antikörper MX1 wurde Prostatakarzinomgewebe der verschiedenen Differenzierungsgrade G1-G3 mit angrenzendem normalen Prostatagewebe verglichen. Um sicherzustellen, dass das tumorfreie Vergleichsgewebe repräsentativ für gesundes, regelhaftes Prostatagewebe ist, wurden

#### 4 Diskussion

im Vorfeld vollständig resezierte gesunde Prostatae, die keine pathologischen Veränderungen aufwiesen, auf ED-B-Expression untersucht und die Ergebnisse mit denen aus an Karzinomgewebe angrenzendem normalem Prostatagewebe verglichen.

Innerhalb der angrenzenden normalen Prostatagewebe aus 1. gut differenziertem, 2. mittelgradig differenziertem, 3. schlecht differenziertem Prostatakarzinom und Gewebe aus 4. gesundem Prostatagewebe aus tumorfreien Prostatektomien waren die ermittelten Gefäßzahlen (Gefäßdichte, Anzahl an ED-B-positiven Gefäßen und Gefäßneubildungsrate) breit gestreut. Die statistisch signifikante Vergleichbarkeit war nur zwischen jeweils benachbarten Gruppen gegeben; tumorfreies Gewebe aus G2- und G3-Präparaten wies meist höhere Werte auf als gänzlich pathologisch unverändertes Prostatagewebe aus tumorfreien Prostatektomien. Eine mögliche Erklärung bietet die Annahme, dass das an maligne Prozesse angrenzende Gewebe bereits reaktive Aktivität in Form von entzündlichen Prozessen (Desmoplasie) und folglich auch Neoangiogenese zeigt. Dazu passt die Tatsache, dass das an G3-Karzinom - welches das am schnellsten wachsende und aggressivste Prostatakarzinom ist - angrenzende normale Prostatagewebe die relativ höchste Gefäßdichte, die meisten ED-B-positiven Gefäße und die höchste Neubildungsrate unter den Vergleichsgeweben aufweist, während das an das gut differenzierte G1-Karzinom angrenzende Normalgewebe die niedrigsten Werte zeigt. Hier besteht auch kein statistisch signifikanter Unterschied zu gesundem Prostatagewebe aus tumorfreien Prostatektomien. Aus diesem Grund wurde bei den folgenden Experimenten mit Antikörperfärbung gegen ED-B darauf geachtet, dass die beispielsweise aus G1-Karzinom-Präparaten gewonnenen Werte nicht unkritisch mit denen aus G3-Karzinom-Präparaten verglichen werden, sondern primär die Werte von tumorinfiltriertem und tumorfreiem Gewebe innerhalb einer Gruppe aufeinander bezogen werden.

Das Kernstück der vorliegenden Arbeit besteht in der immunhistologischen Analyse der ED-B-Expression im Adenokarzinom der Prostata und der Vergleich mit Prostatanormalgewebe. Hier wird deutlich, dass die Expression von ED-B ein spezifisches Diskriminierungs-

merkmal zwischen Prostatakarzinomgewebe und normalem Prostatagewebe darstellt.

Die Betrachtung der Gefäßneubildungsrate in den mit MX1 immunhistologisch gefärbten Präparaten legt nahe, dass die durch CD34-Färbung gezeigte höhere Gefäßdichte vor allem auf neugebildete Gefäße zurückzuführen ist. Es wurde gezeigt, dass das Karzinomgewebe aller drei Differenzierungsgrade signifikant höhere Neubildungsraten aufweist als das angrenzende normale Prostatagewebe. Dabei wies das schlecht differenzierte G3-Karzinom mit durchschnittlich 75% die höchste Gefäßneubildungsrate auf, was gut zu der Tatsache passt, dass es auch das aggressivste Wachstumsmuster zeigt. Aber auch im gut und mittelgradig differenzierten Prostatakarzinom waren fast 70% der gezählten Gefäße solche, die ED-B-positiv waren und folglich im Rahmen der Tumorangiogenese neu gebildet wurden.

Die konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie des Prostatakarzinomgewebes sowohl mit dem Antikörper gegen den Stammzell- und Endothelmarker CD34 als auch dem Antikörper gegen ED-B (MX1) zeigte die Ko-Lokalisation der beiden Antigene im perivaskulären Bereich. Es konnte nachgewiesen werden, dass ED-B im Adenokarzinom der Prostata in allen Differenzierungsgraden hauptsächlich gefäßassoziiert vorkommt und MX1 spezifisch an gefäßnahe Strukturen bindet. Dies ist zum einen Grundlage und Rechtfertigung, zum anderen inhaltliche Ergänzung der immunhistochemischen Färbungen.

Gerade kleinere Gefäße wiesen das ED-B-Antigen auf, da sie im Rahmen der Tumorangiogenese neu gebildet wurden. Es kamen außerdem kleinste Gefäßaussprossungen, sog. „sprouts“, wie sie auch von Czabanka et al.<sup>62</sup> beschrieben wurden, zur Darstellung, die in den immunhistochemischen Untersuchungen eventuell nicht als solche bewertet werden konnten, und die einen weiteren deutlichen Hinweis auf die hohe ausgeprägte Neoangiogeneseaktivität der Prostatakarzinoms liefern. Die konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie ist im Falle der Untersuchung von Prostatagewebe die sensitivere Methode als die Immunhistochemie. Sie kommt zum einen ohne die Verstärkungs- und Wiederholungsschritte der

im immunhistochemischen Färbungsprotokoll verwendeten APAAP-Methode aus, wodurch Nebenreaktionen und Hintergrund minimiert werden. Zum anderen sind die verwendeten Immunfluoreszenzfarbstoffe und die computergestützte Optik als sensitiver zu bewerten. Die simultane Doppelfärbung mit  $\alpha$ CD34 und MX1 bietet darüber hinaus in der Overlay-Darstellung eine besondere räumliche Übersichtlichkeit. Somit waren ED-B-positive Regionen eindeutig Gefäßen zuzuordnen und sicher abgrenzbar von ED-B-negativen Strukturen wie Tumorzellverbänden. Auch Sauer et al.<sup>32</sup> setzten die konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie aus ebendiesen Gründen zum ergänzenden Nachweis von ED-B in lymphatischen Neoplasien ein und erzielten übereinstimmende Ergebnisse.

Mittels konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie an Präparaten mit normalem Prostatagewebe aus pathologisch nicht veränderten Prostataektomiepräparaten wurde besonders deutlich, dass normales bzw. nicht tumorbefallenes Prostatagewebe ED-B nur an wenigen Gefäßen exprimiert. Besonders größere Gefäße zeigten keine Anfärbbarkeit mit dem Antikörper MX1, was darauf schließen lässt, dass es sich um bereits vorbestehende Gefäße der regelhaften Prostata handelte. Bei den wenigen ED-B-positiven Gefäßen handelte es sich vermutlich um im Rahmen von Umbauprozessen des Gewebes neugebildete Strukturen. Auch in den untersuchten Präparaten mit benigner Prostatahyperplasie wurde ED-B kaum gefunden. Diese Ergebnisse der konfokalen Immunfluoreszenzmikroskopie an der gesunden Prostata zeigen, dass ED-B ein gutes Diskriminierungsmerkmal für maligne Prozesse ist, weil es im nicht tumorös veränderten Gewebe kaum oder in sehr viel niedrigerem Maße exprimiert wird. Dies steht in Einklang mit den Arbeiten verschiedener anderer Forschungsgruppen, die ebenfalls keine ED-B-Expression in Normalgewebe nachweisen konnten.<sup>22,24,25,26,27</sup>

Die Eigenschaft der ED-B-Expression als Diskriminierungsmerkmal zwischen normalem Prostatagewebe und dem Prostatakarzinom ist möglicherweise bei der Suche nach Alternativen in der Diagnostik des frühen Prostatakarzinoms nutzbar, z.B. auf dem Gebiet der

Szintigraphie. Besonders interessant dürfte dabei die Tatsache sein, dass auch die benigne Prostatahyperplasie anhand ihres ED-B-Expressionsmusters eindeutig von malignen Prozessen abzugrenzen war. Mit einer Prävalenz von bis zu 60% in der Gruppe der über 60jährigen<sup>63</sup> stellt die Prostatahyperplasie eine wichtige Differenzialdiagnose zum Prostatakarzinom dar. Derzeit werden maligne Prozesse in der Prostata mittels Stanzbiopsie und anatomisch-pathologischer Begutachtung diagnostiziert.<sup>6</sup> Um eine Aussage zur histologischen Beschaffenheit und zu den Therapiemöglichkeiten einer Raumforderung zu erhalten, ist diese Herangehensweise nicht zu ersetzen. Es stellt sich jedoch die Frage, ob man zur ersten Diagnosestellung eines malignen Prozesses und zur Abgrenzung zu benignen Prozessen wie der Prostatahyperplasie nicht auf weniger invasive Maßnahmen zurückgreifen könnte. Hier kommt die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) oder Radio-Immunszintigraphie in Verbindung mit einem tumorselektiven Marker wie ED-B infrage. Alternativ ließe sich im Vorfeld einer geplanten Biopsie das betreffende verdächtige Areal genauer darstellen und die Trefferquote erhöhen. Santimaria et al.<sup>64</sup> beschrieben bereits die selektive Anreicherung von radiomarkierten Antikörpern gegen ED-B (hier jodmarkiertes L19 <sup>123</sup>Jod-L19(scvF2)) in Hirntumoren, Lungen- und Kolorektalkarzinomen und folgerten daraus, dass ED-B möglicherweise in der Diagnostik maligner Erkrankungen einsetzbar ist. Weitere Forschungsgruppen beschäftigten sich mit dem diagnostischen Einsatz von anderen Antikörperformaten oder Radioisotopen zur tumorselektiven Darstellung von neugebildeten Blutgefäßen wie <sup>124</sup>Jod-L19-SIP, <sup>131</sup>Jod-L19-SIP oder <sup>76</sup>Brom-L19-SIP.<sup>65,66,67,68</sup> Sauer et al.<sup>32</sup> konnten zuletzt zeigen, dass sich auch hämatologische Tumorerkrankungen mit <sup>131</sup>Jod-L19(scvF2) und szintigraphischen Methoden darstellen lassen. Das Ausmaß der Anreicherung radiomarkierter Antikörper gegen ED-B in Raumforderungen der Prostata könnte also möglicherweise auch hier schon in der frühen Diagnostik entscheidende Hinweise auf die Dignität geben. Die PET mit <sup>18</sup>Fluor-Cholin wird beispielsweise zur Rezidivdiagnostik des Adenokarzinoms der Prostata diskutiert<sup>6</sup>, wobei man sich die erhöhte Stoffwechselaktivität in malignen Geweben zunutze macht. Während sich die Stoffwechselaktivität jedoch nicht als spezifisches Unterscheidungsmerkmal zwischen malignen und benignen Läsionen eignet,



konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Expression von ED-B als diagnostisches Diskriminierungsmerkmal zwischen Normalgewebe oder benigner Hyperplasie und Tumorgewebe geeignet ist.

Der immunhistologisch ermittelte Absolutwert an ED-B-positiven Gefäßen im Prostatakarzinom war, unabhängig vom Differenzierungsgrad, jeweils statistisch signifikant höher als im angrenzenden normalen Prostatagewebe. Wie die höhere Gefäß-Neubildungsrate belegt auch dieses Ergebnis die hohe Angiogeneseaktivität des Adenokarzinoms der Prostata. Die hohe Dichte an neugebildeten, ED-B-positiven Gefäßen im Prostatakarzinom bildet eine der wichtigsten Grundlagen im Hinblick auch auf neue Therapiestrategien. Für die zielgerichtete Therapie wird eine Struktur gesucht, die nach systemischer Gabe eines an Antikörper gegen diese Zielstruktur gekoppelten Wirkstoffs in der Lage ist, diesen schnell und spezifisch aus dem Kreislauf zu binden. Die hohen Absolutwerte an ED-B-positiven Gefäßen weisen darauf hin, dass möglicherweise relativ schnell nach intravenöser Gabe viel Wirkstoff-beladener Antikörper im Prostatakarzinom (primäre Lokalisation und metastatische Absiedlungen) angereichert werden könnte und der Prozess einer Gleichgewichtsreaktion der Verteilung des Wirkstoffes im Organismus zugunsten des Zielgewebes ablaufen sollte. In Bezug auf die Gleichgewichtseinstellung ist der oben ausführlicher diskutierte Unterschied zum Normalgewebe von besonderer Bedeutung. Die perivaskuläre Lokalisation des ED-B ist für die weiteren therapeutischen Überlegungen ebenfalls sehr wichtig, da Antikörper gegen ED-B somit gut über den Blutweg zum Tumor transportiert werden können. Die fenestrierten und fragilen neugebildeten Gefäße im Tumor erleichtern dann das Erreichen der Tumorzellverbände. Anti-Tumor-Substanzen mit einem Angriffspunkt in unmittelbarer Nähe der Tumorgefäße wirken dadurch über zwei Mechanismen, nämlich gegen die umliegenden Tumorzellen selbst und gegen die Gefäße, also die Nährstoffversorgung und Überlebensgrundlage des Tumors.

Im Hinblick auf neue Therapiemöglichkeiten für das fortgeschrittene bzw. metastasier-

te Prostatakarzinom ist die Betrachtung von Patientenfällen mit Lymphknotenmetastasen wichtig. Die Untersuchung der Lymphknotenmetastasen des Prostatakarzinoms mittels einfacher immunhistologischer Methoden erwies sich als äußerst schwierig. Lymphknoten in Tumorabflussgebieten zeigten reaktiv eine höhere unspezifische Gewebe- und Entzündungsaktivität, was u.a. vermehrte Neoangiogenese zur Folge hat. Dies erklärt das Vorhandensein von ED-B, auch ohne dass das von Folkman beschriebene Kriterium einer bestimmten Größe einer malignen Neoplasie,<sup>12</sup> hier einer Lymphknotenmetastase des Primärtumors, für tumorinduzierte Angiogenese erfüllt ist. Der Effekt der durch die Metastase induzierten Angiogenese wird also möglicherweise in der Immunhistochemie von einer entzündungsinduzierten Angiogenese überlagert. Darüber hinaus enthalten Lymphknoten auch ohne Tumorerinfiltration einen hohen Anteil extrazellulärer Fasern. Eine Auszählung der Gefäßdichte und Gefäß-Neubildungsrate wie in den immunhistologischen Färbungen am Prostatakarzinom war daher nicht möglich und die Lymphknotenmetastasen wurden mithilfe der übersichtlicheren konfokalen Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. In allen untersuchten Lymphknotenmetastasen des Prostatakarzinoms konnte die Expression von ED-B und seine perivaskuläre Lokalisation dargestellt werden, denn alle untersuchten Präparate wiesen das ED-B-Antigen in Ko-Expression mit dem Endothelmarker CD34 auf.

Mit dem Einsatz von tumorselektiven Antikörpern in der Therapie maligner Erkrankungen befassen sich mehrere Arbeitsgruppen. Bei der Radio-Immuntherapie werden tumorspezifische Antikörper mit radioaktiven Stoffen gekoppelt. Berndorff et al.<sup>69</sup> verglichen mehrere Formate von radiomarkierten ED-B-Antikörpern und konnten zeigen, dass jodmarkiertes L19-SIP (<sup>131</sup>Jod-L19-SIP) am ehesten zur Tumorthherapie geeignet sei. Im Mausmodell mit HNO-Karzinomen konnten unter Radio-Immuntherapie mit <sup>131</sup>Jod-L19-SIP eine Verringerung des Tumorwachstums und verbesserte Überlebensraten erzielt werden.<sup>70</sup> Ähnliche Ergebnisse fanden Spaeth et al.<sup>71</sup> für das Glioblastom im Tumortiermodell. Sauer et al.<sup>32</sup> erzielten mit <sup>131</sup>Jod-L19-SIP gute Therapieergebnisse erstmals bei Patienten mit Hodgkin-Lymphom. Derzeit laufen überdies diverse weitere Studien (Phase I und II), teilweise kom-

biniert mit Radio- oder Chemotherapie, zur Evaluierung der L19-Immunkonjugate, die u.a. die Proliferation und Tumordinfiltration durch Leukozyten fördern. Erprobt wird die Behandlung bei lokal fortgeschrittenem, nicht kleinzelligem Bronchialkarzinom ( $^{131}\text{Jod-L19-SIP}$  plus Chemo- und Radiotherapie), bei Pankreaskarzinom (L19-IL2 plus Chemotherapie mit Gemcitabin), malignem Melanom (L19-IL2 plus Chemotherapie mit Dacarbazin oder intratumorale Injektion von L19-IL2) und die Behandlung von Hirnmetastasen jeglicher solider Primärtumore ( $^{131}\text{Jod-L19-SIP}$  plus Ganzhirnbestrahlung).<sup>72</sup>

Die Therapie mit radiomarkierten Antikörpern oder Antikörper-Zytokin-Fusionsproteinen, die spezifisch an ED-B binden, bildet einen vielversprechenden Behandlungsansatz gegen maligne Erkrankungen und befindet sich bereits im Stadium der klinischen Prüfung bei einigen fortgeschrittenen Tumorerkrankungen. Obwohl die Nebenwirkungen dieser Substanzen durch Nutzung spezifisch agierender Trägersstoffe bereits deutlich verringert werden konnten, stellt die systemische Applikation der aktiven zellschädigenden Substanzen weiterhin einen Nachteil dar, der die Dosis und damit die gewünschte Wirksamkeit limitiert. Durch Kombination von zielgerichtetem Aufsuchen des Tumors mittels ED-B-Antikörper und der photodynamischen Therapie könnte man jedoch die gewünschten Wirkungen weiter optimieren und gleichzeitig die systemischen Wirkungen minimieren. Die PDT wird bereits bei einigen Karzinomarten erfolgreich eingesetzt und könnte schon bald auch in der Therapie des Prostatakarzinoms eine Rolle spielen. Derzeit laufen bereits klinische Studien zur PDT bei Patienten mit lokal begrenztem und rezidivierendem Prostatakarzinom.<sup>73</sup> Mit Hilfe von wasserlöslichen Fusionsproteinen wie L19, die gezielt mit dem auf Tumorgewebe exprimierten ED-B interagieren, könnten die photosensitiven Substanzen direkt zum Tumor gebracht werden. Da sie sich nur dort anreichern und auch die Lichtapplikation nur im gewünschten Gewebe stattfindet, könnten systemische Wirkungen stark verringert werden. Durch die Kopplung mit L19 erreichen sie außerdem eine kürzere Halbwertszeit. Reaktive Sauerstoffspezies wie "Singlet oxygen" haben eine sehr kurze Lebensdauer und können so nur eine kleine Strecke diffundieren,<sup>43</sup> weshalb davon ausgegangen werden kann, dass

die Oxidationsreaktionen auch nur dort stattfinden, wo Licht eingestrahlt wird. Im Umkehrschluss bedeutet das aber auch, dass der Photosensitizer möglichst gezielt im Tumor bzw. in den Tumorgefäßen lokalisiert sein sollte, was zusätzlich auf die Notwendigkeit des tumorspezifischen ED-B als Angriffspunkt hinweist. Erstaunlicherweise scheinen nicht die hohe Konzentration des Photosensitizers im Tumor Voraussetzung für den Erfolg der PDT zu sein, sondern vielmehr hohe Plasmaspiegel zum Zeitpunkt der Bestrahlung.<sup>40,50</sup> Dies lässt darauf schließen, dass die Hauptkomponente der tumortoxischen Wirkung der PDT auf Tumorgefäßschädigung zurückzuführen ist.

ED-B als Marker der Neoangiogenese des Tumors ist also ein idealer Angriffsort für eine targetierte photodynamische Therapie, wobei ein armierter Antikörper gegen ED-B, z.B. mit einer photodynamisch aktivierbaren Substanz beladener L19 (L19-PDT), eingesetzt würde. Mehrere Arbeitsgruppen beschrieben bereits die Anwendung von L19-PDT an verschiedenen Neoangiogenese- und Tumormodellen.<sup>57,58</sup> Unter anderem setzten Birò et al. die L19-PDT erfolgreich zur Behandlung der Retinopathie im Mausmodell ein (unveröffentlichte Ergebnisse von Birò et al., 2005). Zuletzt veröffentlichten Palumbo et al.<sup>59</sup> ihre Ergebnisse zur L19-PDT bei F9-Teratokarzinom und A431-Epitheloidzellkarzinom an Mäusen. Mittels L19-PDT erreichten sie die Zerstörung des Tumorgefäßnetzes und den kompletten Untergang des Tumorgewebes.

Zusammenfassend konnte mit vorliegender Arbeit gezeigt werden, dass der Neoangiogenesemarker ED-B im Adenokarzinom der Prostata umfangreich und signifikant stärker exprimiert wird als im normalen Prostatagewebe. Diese Ergebnisse legen die Grundlage zur Entwicklung neuer targetierter Therapien des Prostatakarzinoms mithilfe von armierten ED-B-Antikörpern. Darüber hinaus könnten sich auch diagnostische Anwendungen, z.B. mithilfe radioaktiv markierter ED-B-Antikörper, zur frühzeitigen Diagnose des Prostatakarzinoms ergeben.

## 5 Zusammenfassung

Das Adenokarzinom der Prostata ist in Deutschland die am häufigsten diagnostizierte Krebserkrankung bei Männern. Die derzeitige Therapie umfasst operative, strahlen- und chemotherapeutische Ansätze und bringt ein breites Nebenwirkungsspektrum mit sich. Ein vielversprechender neuer Therapieansatz gegen maligne Erkrankungen ist der gezielte Angriff auf Tumorgefäße unter Verwendung des perivaskulär lokalisierten Neoangiogenesemarkers ED-B als Target, da solide Tumore auf Neoangiogenese angewiesen sind, um ihr Wachstum aufrechtzuerhalten. Bislang wurde ED-B schon in einigen Karzinomarten, nicht jedoch im Prostatakarzinom nachgewiesen. Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der ED-B-Expression im Adenokarzinom der Prostata und Lymphknotenmetastasen im Vergleich zu normalem Prostatagewebe und der benignen Prostatahyperplasie.

Es wurden 68 Präparate verschiedener Differenzierungsgrade des Adenokarzinoms der Prostata, 5 Präparate mit Lymphknotenmetastasen, 4 Präparate mit benigner Prostatahyperplasie und 6 vollständig resezierte gesunde Prostatae, die keine pathologischen Veränderungen aufwiesen, analysiert. Die Doppelfluoreszenzfärbung an Paraffinschnitten erfolgte mit den monoklonalen Antikörpern  $\alpha$ CD34 (Gefäß-/Endothelmarker) oder MX1 (ED-B), anschließender Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen und Auswertung am konfokalen Mikroskop. Die immunhistochemische Färbung an Paraffinschnitten wurde ebenfalls mit den oben aufgeführten Antikörpern, anschließender Entwicklung mittels APAAP und Auswertung am Lichtmikroskop durchgeführt. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen wurden unter Verwendung der Software SPSS statistisch ausgewertet.

Mittels der durch konfokale Mikroskopie ausgewerteten Doppelfluoreszenzfärbung konn-

te das Vorhandensein von ED-B, ebenso wie seine Ko-Lokalisation mit dem endothelialen Gefäßmarker CD34, qualitativ in allen untersuchten Prostatakarzinompräparaten und in den Lymphknotenmetastasen nachgewiesen werden, während sich im Normalgewebe der Prostata und in den Präparaten mit Prostatahyperplasie nur eine sehr geringe oder gar keine ED-B-Expression nachweisen ließ. Durch immunhistochemische Färbung des Endothelmarkers CD34 konnte quantitativ eine signifikant höhere Gefäßdichte im Prostatakarzinom aller drei Differenzierungsgrade im Vergleich zu angrenzendem normalen Prostatagewebe nachgewiesen werden. Die Anzahl der ED-B-positiven Gefäße pro  $1 \text{ mm}^2$  war bei allen drei Differenzierungsgraden des Prostatakarzinoms ebenfalls jeweils signifikant höher als im angrenzenden normalen Prostatagewebe. Auch die Gefäßneubildungsrate, also der prozentuale Anteil ED-B-positiver Gefäße an der Gesamtzahl der Gefäße, war in allen drei Differenzierungsgraden des Prostatakarzinoms jeweils signifikant höher als im angrenzenden normalen Prostatagewebe. Die durchschnittliche Gefäßneubildungsrate im schlecht differenzierten Karzinom erreichte über 70%, während der Wert in allen untersuchten Proben von normalem Prostatagewebe maximal 30% betrug.

Mit der Entdeckung des Neoangiogenesemarkers ED-B eröffneten sich neue Wege in der Diagnostik und Therapie maligner Erkrankungen, da gegen ED-B gerichtete Antikörper wie L19 eine gezielte Lokalisation des erkrankten Gewebes ermöglichen. In der vorliegenden Untersuchung zur ED-B-Expression beim Adenokarzinom der Prostata konnte gezeigt werden, dass die Expression von ED-B ein spezifisches Diskriminierungsmerkmal zwischen normalem oder hyperplastischem und tumorös verändertem Prostatagewebe ist. Zum einen ergeben sich dadurch möglicherweise neue Ansätze in der (Primär-)Diagnostik des Adenokarzinoms der Prostata, z.B. durch den Einsatz von  $^{124}\text{Jod-L19}$  Immuno-PET, zum anderen lassen sich neue, gezielte Therapien wie z.B. mit Immunkonjugaten (L19-IL2) oder die kombinierte Therapieform L19-PDT entwickeln. Anders als bei der alleinigen Gabe von an L19 gekoppelten Antitumorsubstanzen, die trotz gezielter Reaktion mit dem Karzinomgewebe dennoch auch systemisch wirken können, wäre mit der L19-PDT eine doppelte Selektion möglich, da die eigentliche Angriffsreaktion nur dort stattfindet, wo auch Licht zur Aktivierung eingestrahlt wird.

## Literaturverzeichnis

- <sup>1</sup>Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.). Krebs in Deutschland 2005/06. Häufigkeiten und Trends. 7. überarbeitete Auflage. Berlin 2010.
- <sup>2</sup>Wittekind C und Meyer HJ (Hrsg.) TNM. Klassifikation maligner Tumoren, Weinheim 2010;229-233.
- <sup>3</sup>Böcking A und Sommerkamp H. Histologisches Malignitätsgrading des Prostatakarzinoms. Verh Dtsch Ges Urol 1980;32:63-65.
- <sup>4</sup>Gleason DF. Histologic grade, clinical stage, and patient age in prostate cancer. NCI Monogr 1988;15-8.
- <sup>5</sup>Epstein JI. An Update von the Gleason Grading System. J Urol 2010;183:433-40
- <sup>6</sup>Deutsche Gesellschaft für Urologie (Hrsg.). Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms. Version 1.0, 2009.
- <sup>7</sup>Schmelz H, Sparwasser C, Weidner W (Hrsg.) Facharztwissen Urologie. Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2006;227-258.
- <sup>8</sup>Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ (Hrsg.) Campbell's Urology. Saunders Company, Philadelphia 2002;3001-3221.
- <sup>9</sup>Berufsverband der Deutschen Urologen e.V. (Hrsg.) und die Deutsche Gesellschaft für Urologie e.V. (Hrsg.). Der Krebs der Vorsteherdrüse. Zugegriffen über <http://www.dgu.de/prostatakarzinom.html> am 8. Februar 2011.
- <sup>10</sup>Risau W. Mechanisms of angiogenesis. Nature 1997;386:671-4
- <sup>11</sup>Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. Nat Med 1995;1:27-31.
- <sup>12</sup>Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth. Sem Cancer Biol 1992;3:65-71.
- <sup>13</sup>Dewhirst MW, Tso CY, Oliver R, et al. Morphologic and hemodynamic comparison of tumor and healing normal tissue microvasculature. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1989;17:91-99.
- <sup>14</sup>Konerding MA, Fait E, and Gaumann A. 3D microvascular architecture of pre-cancerous lesions and invasive carcinomas of the colon. Br J Cancer 2001;84:1354-62.
- <sup>15</sup>Kerbel R and Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. Nat Rev Cancer 2002;2:727-39.
- <sup>16</sup>Alessi P, Ebbinghaus C, and Neri D. Molecular targeting of angiogenesis. Biochim Biophys Acta 2004;1654:39-49.
- <sup>17</sup>Menrad A and Menssen HD. ED-B fibronectin as a target for antibody-based cancer treatment. Expert Opin Ther Targets 2005;9:491-500.
- <sup>18</sup>Ebbinghaus C, Scheuermann J, Neri D, and Elia G. Diagnostic and therapeutic applications of recombinant antibodies: targeting the extra-domain B of fibronectin, a marker of tumor angiogenesis. Curr Pharm Des 2004;10:1537-49.
- <sup>19</sup>Castellani P, Viale G, Dorcaratto A, et al. The fibronectin isoform containing the ED-B oncofetal domain: a marker of angiogenesis. Int J Cancer 1994;59:612-618.

## LITERATURVERZEICHNIS

- <sup>20</sup>Zardi L, Carnemolla B, Siri A, et al. Transformed human cells produce a new fibronectin isoform by preferential alternative splicing of a previously unobserved exon. *EMBO J* 1987;6:2337-42.
- <sup>21</sup>Fattorusso R, Pellicchia M, Viti F, Neri P, Neri D, and Wüthrich K. NMR structure of the human oncofetal fibronectin ED-B domain, a specific marker for angiogenesis. *Structure* 1999;7:381-90.
- <sup>22</sup>Pujuguet P, Hammann A, Moutet M, et al. Expression of fibronectin ED-A+ and ED-B+ isoforms by human and experimental colorectal cancer. Contribution of cancer cells and tumor-associated myofibroblasts. *Am J Pathol* 1996;148:579-92.
- <sup>23</sup>Karelina TV and Eisen AZ. Interstitial collagenase and the ED-B oncofetal domain of fibronectin as markers of angiogenesis in human skin tumors. *Cancer Detect Prev* 1998;22:438-44.
- <sup>24</sup>D'Ovidio M, Mastracchio A, Marzullo A, et al. Intratumoral microvessel density and expression of ED-A/ED-B sequences of fibronectin in breast carcinoma. *Eur J Cancer* 1998;34:1081-85.
- <sup>25</sup>Castellani P, Dorcaratto A, Pau A, et al. The angiogenesis marker ED-B+ fibronectin isoform in intracranial meningiomas. *Act Neurochir* 2000;142:277-82.
- <sup>26</sup>Ohnishi T, Hiraga S, Izumoto S, et al. Role of fibronectin-stimulated tumor cell migration in glioma invasion in vivo: clinical significance of fibronectin and fibronectin receptor expressed in human glioma tissues. *Clin Exp Metastasis* 1998;16:729-41.
- <sup>27</sup>Kosmehl H, Berndt A, Strassburger S, et al. Distribution of laminin and fibronectin isoforms in oral mucosa and oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 1999;81:1071-9.
- <sup>28</sup>Mhaweck P, Dulguerov P, Aassaly M, et al. ED-B fibronectin expression in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncology* 2005;41:82-88.
- <sup>29</sup>Birchler M, Milisavljevic C, Pfaltz M, et al. Expression of the extra domain B of fibronectin, a marker of angiogenesis, in head and neck tumors. *Laryngoscope* 2003;113:1231-7.
- <sup>30</sup>Menrad A, Rosewicz S, Wagner K, et al. Therapeutic efficacy of the recombinant fusion protein L19-IL2 in orthotopic animal models for pancreatic and hepatocellular carcinoma. *The 21st International Conference of Advances in the Application of Monoclonal Antibodies in Clinical Oncology June 28-30 2004; Proceedings Suppl.* p.15.
- <sup>31</sup>Khan ZA, Caurtero J, Barbin YP, Chan BM, Uniyal S, and Chakrabarti S. ED-B fibronectin in non-small cell lung carcinoma. *Exp Lung Res* 2005;31:701-11.
- <sup>32</sup>Sauer S, Erba PA, Petrini M, et al. Expression of the oncofetal ED-B-containing fibronectin isoform in hematologic tumors enables ED-B-targeted 131-I-L19SIP radioimmunotherapy in Hodgkin lymphoma patients. *Blood* 2009;113:2265-74.
- <sup>33</sup>Pini A, Viti F, Santucci A, et al. Design and use of a phage display library. Human antibodies with subnanomolar affinity against a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel. *J Biol Chem* 1998;273:21769-76.
- <sup>34</sup>Borsi L, Balza E, Bestagno M, et al. Selective targeting of tumoral vasculature: comparison of different formats of an antibody (L19) to the ED-B domain of fibronectin. *Int J Cancer* 2002;102:75-85.



## LITERATURVERZEICHNIS

- <sup>35</sup>Viti F, Tarli L, Giovannoni L, Zardi L, and Neri D. Increased binding affinity and valence of recombinant antibody fragments lead to improved targeting of tumoral angiogenesis. *Cancer Res* 1999;59:347-52.
- <sup>36</sup>Carnemolla B, Borsi L, Balza E, et al. Enhancement of the antitumor properties of interleukin-2 by its targeted delivery to the tumor blood vessel extracellular matrix. *Blood* 2002;99:1659-65.
- <sup>37</sup>Halin C, Rondini S, Nilsson F, et al. Enhancement of the antitumor activity of interleukin-12 by targeted delivery to neovasculature. *Nat Biotechnol* 2002;20:264-9.
- <sup>38</sup>Borsi L, Balza E, Carnemolla B, et al. Selective targeted delivery of TNF $\alpha$  to tumor blood vessels. *Blood* 2003;102:4384-92.
- <sup>39</sup>Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, et al. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:889-905.
- <sup>40</sup>Triesscheijnn M, Baas P, Schellens JH, and Stewart FA. Photodynamic therapy in oncology. *Oncologist* 2006;11:1034-44.
- <sup>41</sup>Dougherty TJ, Grindey GB, Fiel R, et al. Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. *J Natl Cancer Inst* 1975;55:115-21.
- <sup>42</sup>Dougherty TJ, Kaufman JE, Goldfarb A, et al. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res* 1978;38:2628-35.
- <sup>43</sup>Moan J and Berg K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem Photobiol* 1991;53:549-53.
- <sup>44</sup>Foote CS. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol* 1991;54:659.
- <sup>45</sup>Hahn SM, Putt ME, Metz J, et al. Photofrin uptake in the tumor and normal tissues of patients receiving intraperitoneal photodynamic therapy. *Clin Cancer Res* 2006;12:5464-70.
- <sup>46</sup>Wagnieres G, Hadjur C, Grosjean P, et al. Clinical Evaluation of the Cutaneous Phototoxicity of 5,10,15,20-Tetra(mhydroxyphenyl)chlorin. *Photochemistry and Photobiology* 1998;68:382-87.
- <sup>47</sup>Dougherty TJ. An update on photodynamic therapy applications. *J Clin Laser Med Surg* 2002;20:3-7.
- <sup>48</sup>Lehmann P. Methyl aminolaevulinate-photodynamic therapy: a review of clinical trials in the treatment of actinic keratoses and nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol* 2007;156:793-801.
- <sup>49</sup>Ris HB, Altermatt HJ, and Inderbitzi R. Photodynamic therapy with chlorins for diffuse malignant mesothelioma: initial clinical results. *Br J Cancer* 1991;64:1116-20.
- <sup>50</sup>Triesscheijnn M, Ruevekamp M, Aalders M, Baas P, and Stewart FA. Outcome of mTHPC mediated photodynamic therapy is primarily determined by the vascular response. *Photochem Photobiol* 2005;81:1161-7.
- <sup>51</sup>Fayter D, Corbett M, Heirs M, Fox D, and Eastwood A. A systematic review of photodynamic therapy in the treatment of pre-cancerous skin conditions, Barrett's oesophagus and cancers of the biliary tract, brain, head and neck, lung, oesophagus and skin. *Health Technol Assess* 2010;14:1-288.
- <sup>52</sup>Zeitouni NC, Shieh S, and Oseroff AR. Laser and photodynamic therapy in the management of cutaneous malignancies. *Clin Dermatol* 2001;19:328-38.
- <sup>53</sup>Rhodes LE, de Rie M, Enström Y, et al. Photodynamic therapy using topical methyl aminolevulinat

## LITERATURVERZEICHNIS

vs surgery for nodular basal cell carcinoma: results of a multicenter randomized prospective trial. *Arch Dermatol* 2004;140:17-23.

<sup>54</sup>Camps JL Jr, Powers SK, Beckman WC Jr, Brown JT, and Weissman RM. Photodynamic therapy of prostate cancer: an in vitro study. *J Urol* 1985;134:1222-6.

<sup>55</sup>Nathan TR, Whitelaw DE, Chang SC, et al. Photodynamic therapy for prostate cancer recurrence after radiotherapy: a phase I study. *J Urol* 2002;168:1427-32.

<sup>56</sup>Colin P, Estevez JP, Betrouni N, et al. Photodynamic therapy and prostate cancer. *Prog Urol* 2011;21:85-92.

<sup>57</sup>Birchler M, Viti F, Zardi L, Spiess B, and Neri D. Selective targeting and photocoagulation of ocular angiogenesis mediated by a phage-derived human antibody fragment. *Nat Biotechnol* 1999;17:984-8.

<sup>58</sup>Fabbrini M, Trachsel E, Soldani P, et al. Selective occlusion of tumor blood vessels by targeted delivery of an antibody-photosensitizer conjugate. *Int J Cancer* 2006;118:1805-13.

<sup>59</sup>Palumbo A, Hauler F, Dziunycz P, et al. A chemically modified antibody mediates complete eradication of tumours by selective disruption of tumour blood vessels. *Br J Cancer* 2011;104:1106-15.

<sup>60</sup>Cordell JL, Falini B, Erber WN, et al. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal antialkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 1984;32:219-29.

<sup>61</sup>Midulla M, Verma R, Pognatelli M, et al. Source of Oncofetal ED-B-containing Fibronectin: Implications of Production by Both Tumor and Endothelial Cells. *Cancer Res* 2000;60:164-9.

<sup>62</sup>Czabanka M, Parmaksiz G, Bayerl SH, et al. Microvascular biodistribution of L19-SIP in angiogenesis targeting strategies. *Eur J Cancer* 2011;47:1276-84.

<sup>63</sup>Robert Koch-Institut (Hrsg.) in Zusammenarbeit mit dem Statistischen Bundesamt (Hrsg.). Prostataerkrankungen. Reihe Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Heft 36. Berlin 2007.

<sup>64</sup>Santimaria M, Moscatelli G, Viale GL, et al. Immunoscintigraphic detection of the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, in patients with cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:571-9.

<sup>65</sup>Wyss MT, Spaeth N, Biollaz G, et al. Uptake of 18F-Fluorocholine, 18F-FET, and 18F-FDG in C6 gliomas and correlation with 131I-SIP(L19), a marker of angiogenesis. *J Nucl Med* 2007;48:608-14.

<sup>66</sup>Birchler MT, Thuerl C, Schmid D, et al. Immunoscintigraphy of patients with head and neck carcinomas, with an anti-angiogenetic antibody fragment. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;136:543-8.

<sup>67</sup>Tijink BM, Perk LR, Budde M, et al. (124)I-L19-SIP for immuno-PET imaging of tumour vasculature and guidance of (131)I-L19-SIP radioimmunotherapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2009;36:1235-44.

<sup>68</sup>Rossin R, Berndorff D, Friebe M, Dinkelborg LM, and Welch MJ. Small-animal PET of tumor angiogenesis using a (76)Br-labeled human recombinant antibody fragment to the ED-B domain of fibronectin. *J Nucl Med* 2007;48:1172-9.

<sup>69</sup>Berndorff D, Borkowski S, Sieger S, et al. Radioimmunotherapy of solid tumors by targeting extra domain B fibronectin: identification of the best-suited radioimmunoconjugate. *Clin Cancer Res* 2005;11:7053-

## LITERATURVERZEICHNIS

63.

<sup>70</sup>Tijink BM, Neri D, Leemans CR, et al. Radioimmunotherapy of head and neck cancer xenografts using 131I-labeled antibody L19-SIP for selective targeting of tumor vasculature. *J Nucl Med* 2006;47:1127-35.

<sup>71</sup>Spaeth N, Wyss MT, Pahnke J, et al. Radioimmunotherapy targeting the extra domain B of fibronectin in C6 rat gliomas: a preliminary study about the therapeutic efficacy of iodine-131-labeled SIP(L19). *Nucl Med Biol* 2006;33:661-6.

<sup>72</sup>ClinicalTrials.gov, a service of the U.S. National Institutes of Health. Zugegriffen über <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=L19-SIP+OR+L19-IL2+OR+L19-TNF> am 20. Juli 2011.

<sup>73</sup>ClinicalTrials.gov, a service of the U.S. National Institutes of Health. Zugegriffen über <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=PDT+prostate+cancer> am 20. Juli 2011.

# Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	anti-
ab, AK	antibody, Antikörper
ALA	Aminolävulinsäure
APAAP	alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase
Ca, CA	Karzinom
CD(34)	cluster of differentiation, „Unterscheidungsgruppe“
DNA	desoxy ribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DRU	digital-rektale Untersuchung
ED-B	Extradomäne B
ED-B-FN	Fibronektin, welches die Extradomäne B enthält
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Gy	Gray
G1	gut differenziert
G2	mittelgradig differenziert
G3	schlecht differenziert
HE	Hämatoxylin-Eosin
HNO	Hals-Nasen-Ohren
HpD	Hämatoporphyrinderivat
Ig	Immunglobulin
I-L2	Interleukin 2
IL-12	Interleukin 12
L19	Antikörper L19 gegen ED-B
mAK	monoklonaler Antikörper
MRT	Magnetresonanztomographie
mTHCP	meta-Tetrahydroxyphenylchlor
P-CA	Prostatakarzinom
PCR	polymerase-chain-reaktion, Polymerase-Kettenreaktion
PDT	Photodynamische Therapie
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
scFv	single chain Fragment - variable
SIP	small immuno protein
TBS	tris-buffered saline, Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
TNM	Tumor, Lymphknoten (Nodes), Metastasen
VEGF	vascular endothelia growth factor, vasoendothelialer Wachstumsfaktor
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

# Erklärung

“Ich, Ricarda Locher, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:  
*Die Expression des Neoangiogenesemarkers ED-B beim Adenokarzinom der Prostata*  
selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst, keine anderen als die angegebenen  
Quellen und Hilfsmittel benutzt und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten darge-  
stellt habe.“

Datum

Unterschrift

# Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Priv. Doz. Dr. Hans Dietrich Menssen, der den ursprünglichen Anstoß zur Bearbeitung des Themas gab und mir - wenn nötig auch am Wochenende oder vom anderen Ende der Welt - mit fachlichem Rat und organisatorischer Tat, mit Ideen, Zuspruch und geduldigen Korrekturen zur Seite stand.

Ebenso bedanke ich mich bei Prof. Dr. Horst Dürkop für die engagierte und sehr geduldige Anleitung während meiner Arbeit an den praktischen Experimenten und dem Verfassen der Dissertation, die vielen Denkanreize und strengen Korrekturen und die langen, mitunter durchaus gemütlichen, Abende am Mikroskop.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern des Instituts für Pathologie am Campus Benjamin Franklin der Charité für die gute Zusammenarbeit, insbesondere Frau Constanze Cieluch für die Unterstützung bei den Färbungen, Frau Sandra Maier für die Einarbeitung und Hilfestellung am Mikrotom, Frau Ines Puschendorf und Frau Edda von der Wall für den Arbeitsplatz zur Doppelfluoreszenz und nicht zuletzt Herrn Dr. Burkhard Hirsch, der endlose Stunden mit mir vor dem konfokalen Mikroskop zugebracht hat.