

Aus der Urologischen Klinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg  
Direktor: Prof. Dr. med. H. Riedmiller

**IDENTIFIZIERUNG UND ISOLIERUNG VON ANGIOSTATIN AUS DEM URIN BEI  
PATIENTEN MIT PROSTATAKARZINOM**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von  
**Bernhard Partzsch**  
aus Ehekirchen

Würzburg, Oktober 2004

Referent: Prof. Dr. med. H. Riedmiller

Koreferent: Prof. Dr. med. A. Marx

Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Februar 2006

Der Promovend ist Arzt.

## INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Benigne Prostatahyperplasie (BPH) und Prostatakarzinom (PCa)</b>	<b>1</b>
1.1.1 Grundlagen, Epidemiologie, Ätiologie	1
1.1.2 Pathologie, Staging und Grading des Prostatakarzinoms	3
1.1.3 Klinik	4
1.1.4 Diagnostik	5
1.1.5 Therapie	7
1.1.6 Prognose des Prostatakarzinoms	8
<b>1.2 Angiogenese und Inhibition der Angiogenese</b>	<b>9</b>
1.2.1 Ablauf der physiologischen Angiogenese	9
1.2.2 Tumorangiogenese	11
1.2.3 Faktoren der Anti-Angiogenese	12
<b>2 Fragestellung</b>	<b>15</b>
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>16</b>
<b>3.1 Untersuchungsmaterial</b>	<b>16</b>
3.1.1 Herkunft	16
3.1.2 Gewinnung und Aufbereitung	16
<b>3.2 Untersuchungsmethoden</b>	<b>16</b>
3.2.1 Protein-A-Sepharose-System	16
3.2.2 Säulenchromatographie	17
3.2.3 SDS-PAGE und Western-Blot	18
3.2.3.1 Angiostatinnachweis	20
3.2.4 Zellkultur-Assay	20
3.2.4.1 bFGF-Konzentration	21
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>24</b>
<b>4.1 Angiostatinnachweis im Western-Blot</b>	<b>24</b>
4.1.1 gesunde Probanden	24

<b>4.1.2</b>	<b>Patienten mit Prostatakarzinom</b>	<b>25</b>
<b>4.2</b>	<b>Wachstumshemmung im Endothelzellkultur-Assay</b>	<b>26</b>
<b>4.2.1</b>	<b>gesunde Probanden</b>	<b>26</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Patienten mit Prostatakarzinom</b>	<b>27</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>29</b>
<b>5.1</b>	<b>Übertragbarkeit des Tiermodells auf den Menschen</b>	<b>29</b>
<b>5.2</b>	<b>klinischer Einsatz von Angiogenese-Inhibitoren</b>	<b>29</b>
<b>5.3</b>	<b>Nachweis von Angiostatin bei Gesunden</b>	<b>31</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>33</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>34</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>35</b>

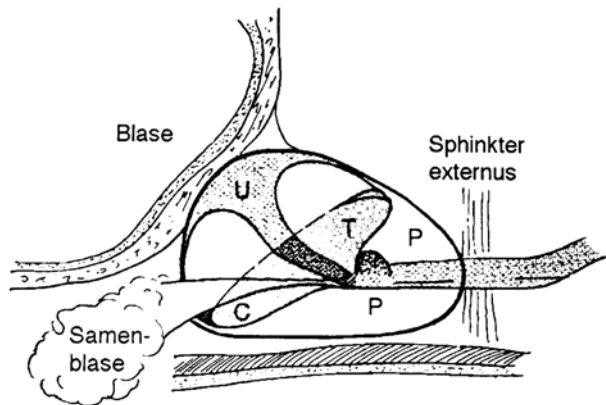
## 1 Einleitung

### 1.1 Benigne Prostatahyperplasie (BPH) und Prostatakarzinom (PCa)

#### 1.1.1 Grundlagen, Epidemiologie, Ätiologie

Bei der benignen Prostatahyperplasie (BPH) handelt es sich um einen beinahe obligaten pathologisch-anatomischen Vorgang beim alternden Mann. Mikroskopische Veränderungen im Sinne einer BPH finden sich bei Sektionen an Verstorbenen über 70 Jahren in nahezu 100 % der Fälle, in 50 % der Fälle liegt auch eine makroskopische, tastbare BPH vor, etwa die Hälfte davon hat eine klinisch symptomatische BPH.<sup>1</sup>

Die Ätiologie der BPH ist noch nicht vollständig geklärt. Wichtig für das Verständnis der Pathogenese ist jedoch die Kenntnis des zonalen Aufbaus der Prostata (vgl. Abb. 1): Die Prostata umfasst zwischen Blasenaustritt und externem Sphinkter gelegen die proximale Harnröhre. Dabei bedingt die Inhomogenität aus stromalen und glandulären Anteilen den zonalen Aufbau der Prostata. Man unterscheidet die zentrale Zone (etwa 20 bis 25 % des gesamten glandulären Volumens), die Transitionalzone (5 bis 10 %), die periphere Zone (70 bis 75 %) und die anteriore Zone (lediglich fibromuskuläres Gewebe ohne glanduläre Anteile).<sup>2</sup>



*Abb. 1: Zonaler Aufbau der Prostata im Sagittalschnitt. U: periurethrale Drüsen, T: Transitionalzone, C: Zentralzone, P: periphere Drüse (nach Weingärtner, 1999)<sup>3</sup>*

Bei der BPH kommt es zu einer Proliferation der periurethralen Drüsen und der Drüsen der Transitionalzone. Das druckempfindliche Gewebe der peripheren Zone wird nach außen verdrängt und bildet die sogenannte „chirurgische Kapsel“.

Da im Rahmen der BPH die stromalen Anteile im Vergleich zu den glandulären Anteilen stärker zunehmen, geht man davon aus, dass es sich bei der BPH um eine primär stromale Erkrankung handelt, die sekundär zu einer glandulären Proliferation führt.<sup>4</sup> Die Bedeutung von Östrogenen für die Entstehung der BPH liegt in der Tatsache, dass die altersbedingte

Erhöhung des 17- $\beta$ -Östradiol/Testosteron-Quotienten zu einer Hyperplasie der östrogenabhängigen, periurethralen Zone führt, während die androgenabhängigen Drüsen der peripheren Zone atrophieren.<sup>5</sup>

Das Prostatakarzinom (PCa) ist bei Männern ab dem 70. Lebensjahr der häufigste maligne Tumor. Bei Sektionen an Verstorbenen über 80 Jahren findet sich in 50 %, bei Verstorbenen über 90 Jahren in 70 bis 100 % der Fälle ein latentes Karzinom.

Die Sterblichkeitsrate steigt linear mit dem Alter und hängt sowohl davon ab, in welchem geographischen Gebiet die Männer leben, als auch davon, welcher ethnischen Gruppe sie angehören: Die Mortalitätsrate in allen Altersgruppen bei der weißen westlichen Bevölkerung beträgt 20 bis 45 pro 100 000 Einwohner, die der schwarzen Bevölkerung der USA 100 pro 100 000 Einwohner.<sup>6,7</sup>

Auch die genaue Ätiologie des PCa ist noch nicht bekannt. Diskutiert werden Umweltfaktoren, Strahlenbelastung und Ernährungsgewohnheiten. Fest steht, dass das Tumorwachstum durch Testosteron begünstigt wird, während Östrogene protektiv wirken. Gesichert wurde in letzter Zeit auch eine familiäre Häufung als Hinweis auf eine genetische Komponente.<sup>8</sup>

In etwa 50 bis 70 % der PCa-Fälle findet sich eine prostatiche intraepitheliale Neoplasie (PIN), eine intraglanduläre, atypische Wucherung des Prostataepithels mit intakter Basalmembran. Man unterscheidet PIN von niedrigem und hohem Grad. Bei der Low-grade-PIN ist die Basalzellschicht intakt, die Epithelien gleichen jenen eines hochdifferenzierten Karzinoms. Bei fragmentierter Basalzellschicht und ausgeprägten Atypien handelt es sich um eine High-grade-PIN. Histologisch zeigt das Epithel papilläre oder kribriforme Muster und zelluläre Atypien, die Mitosenzahl ist gegenüber der BPH deutlich erhöht und ist vergleichbar mit der des PCa. Da es sich bei der PIN um eine prämaligene Läsion der Prostata handelt, gilt, dass bei Nachweis einer PIN in der Biopsie mit hoher Wahrscheinlichkeit ein PCa vorliegt. Von der PIN abzugrenzen sind einerseits die postatrophe Hyperplasie (PAH), andererseits die atypische mikroazinäre Proliferation (atypical small acinar proliferation, ASAP).

Bei der PAH handelt es sich um eine benigne mikrogländuläre Prostataläsion, die sich überwiegend in den kapselnahen Abschnitten der peripheren Zone, seltener auch in der Transitionalzone findet. Sie weist einen lobulären Aufbau der mikroazinären Proliferationen auf und zeigt eine enge Assoziation zu vorbestehenden atrophischen Drüsen, die Basalzellschicht ist intakt.

Eine ASAP liegt vor, wenn einzelne Kriterien für das PCa [Kernveränderungen (Kerngröße, Hyperchromasie, Nukleolen), fehlende Basalzellschicht, Ausschluß benigner mikroazinärer Proliferationen] nicht sicher beurteilbar oder nicht vollständig ausgeprägt sind, d.h. es liegen atypische mikroazinäre Prostataläsionen vor, die verdächtig aber nicht beweisend für ein PCa sind. Es handelt sich somit nicht um eine definierte prä maligne Läsion, sondern um eine Umschreibung unklarer Befunde.

### **1.1.2 Pathologie, Staging und Grading des Prostatakarzinoms**

Das PCa entsteht in der Mehrzahl der Fälle in der dorsalen peripheren, androgenabhängigen Zone der Prostata. Von dort wächst es nach zentral in das Organ vor und/oder durchbricht nach peripher die Kapsel (gilt als ungünstiges Zeichen der Erkrankung). Hierbei kann es zu Infiltration von Samenblasen, Harnblase oder Rektum kommen. Charakteristisch für das PCa ist die Ausbreitung entlang der Nerven in der Prostatakapsel.

Die lymphogene Metastasierung erfolgt in die regionären pelvinen (unter Bevorzugung der parailiacalen<sup>9</sup>) und paraaortalen Lymphknoten, die hämatogene Metastasierung erfolgt vor allem über den prävertebralen Venenplexus in Wirbelsäule, Femur und Beckenknochen. Die Stadieneinteilung des PCa richtet sich nach der TNM-Klassifikation der UICC (vgl. Tab. 1).

**Tab. 1: TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms (6. Auflage der UICC, 2003)<sup>10</sup>**

T	Primärtumor	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden	
T0	Kein Anhalt für Primärtumor	
T1	Tumor weder tastbar noch sichtbar (inzidentelles Karzinom)	
	T1a	< 5% des Resektionsmaterials
	T1b	> 5% des Resektionsmaterials
	T1c	bioptisch gesicherter Tumor
T2	Organbegrenzt Karzinom	
	T2a	≤ die Hälfte eines Prostatalappens befallen
	T2b	> die Hälfte eines Prostatalappens befallen
	T2c	beide Lappen befallen
T3	Kapselüberschreitendes Karzinom	
	T3a	Ein- oder beidseitiges extrakapsuläres Wachstum
	T3b	Tumoreinbruch in eine oder beide Samenblasen
T4	Tumor ist fixiert oder infiltriert Nachbarstrukturen, die nicht bei T3 aufgeführt sind	
N	Regionäre Lymphknoten	
NX	Beurteilung der regionären Lymphknoten nicht möglich	
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen	
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen	
M	Fernmetastasen	
MX	Beurteilung von Fernmetastasen nicht möglich	
M0	keine Fernmetastasen	
M1	Fernmetastasen	
	M1a	Nicht regionäre Lymphknotenmetastasen
	M1b	Knochenmetastasen
	M1c	andere Lokalisation

Histologisch unterscheidet man vier Grundtypen: das hochdifferenzierte Adenokarzinom, das niedrigdifferenzierte Adenokarzinom, das kribriforme Karzinom und das anaplastische Karzinom.

Der histologische Differenzierungsgrad gemäß dem WHO-Grading beinhaltet drei Stufen:

G1: gut differenziert, leichte Anaplasie

G2: mäßig differenziert, mäßige Anaplasie

G3: schlecht differenziert/undifferenziert, ausgeprägte Anaplasie

Da mit zunehmender Größe des Karzinoms die Häufigkeit für das Auftreten unterschiedlich differenzierter Anteile (pluriformes Karzinom) steigt, wurde der sogenannte „Gleason-Score“, der heutzutage vor allem in den USA verwendet wird, eingeführt: Der vorherrschende sowie der zweite eventuell vorkommende Strukturtyp mit abweichender struktureller Differenzierung werden getrennt mit Punkten, entsprechend dem Entdifferenzierungsgrad, in einer Skala von 1 - 5 bewertet. Aus der Summe der Punktwerte ergibt sich der "Gleason-Score" des PCa.

### 1.1.3 Klinik

Wie bereits oben erwähnt, zeigen nur 50 % der Patienten mit tastbarer BPH auch Symptome. Die Folgen der BPH, vor allem irritative und obstruktiven Miktionsbeschwerden, ergeben



sich aus der mehr oder weniger starken Einengung der Urethra. Das Vorgehen im klinischen Alltag orientierte sich lange Zeit an der Stadieneinteilung der BPH nach Alken<sup>11</sup>:

Stadium I : Stadium der Kompensation mit leichter Dysurie und Nykturie; kein Restharn

Stadium II : beginnende Dekompensation des Detrusor vesicae mit Restharnbildung

Stadium III : Überlaufblase oder totaler Harnverhalt, Hydronephrose, Niereninsuffizienz

Heutzutage hat der internationale Prostata-Symptomen-Score (IPSS) allgemeine Akzeptanz gefunden und ist weit verbreitet. Hierbei muss der Patient in 7 Fragen (Wie oft hatten Sie das Gefühl, dass Ihre Blase nach dem Wasserlassen nicht ganz entleert war? Wie oft mussten Sie innerhalb von 2h ein zweites Mal Wasser lassen? Wie oft mussten Sie beim Wasserlassen mehrmals aufhören und wieder neu beginnen (Harnstottern)? Wie oft hatten Sie Schwierigkeiten, das Wasserlassen hinauszuzögern? Wie oft hatten Sie einen schwachen Strahl beim Wasserlassen? Wie oft mussten Sie pressen oder sich anstrengen, um mit dem Wasserlassen zu beginnen? Wie oft sind Sie im Durchschnitt nachts aufgestanden, um Wasser zu lassen?) jeweils 0 bis 5 Punkte verteilen. Gemäß den IPSS-Werten werden Patienten mit milder (IPSS <8), mit mittlerer (IPSS 8-19) und mit schwerer (IPSS 20-35) Symptomatik unterschieden. Eine Therapieindikation wird im Allgemeinen bei IPSS-Werten über 7 gesehen. Ergänzend zu den 7 Fragen ist eine Frage zur Lebensqualität eingeschlossen.<sup>12</sup>

Das PCa wächst langsam und bleibt lange Zeit klinisch stumm. Symptome, die denen der BPH ähneln (die bereits erwähnten irritative und obstruktive Miktionsbeschwerden) treten meist nicht im Frühstadium auf. Häufig führen Symptome wie Knochenschmerzen bei Knochenmetastasen, Flankenschmerzen bei Stauungsniere oder unspezifische Allgemeinsymptome wie Leistungsabfall oder Gewichtsverlust, die alle bereits ein fortgeschrittenes Tumorstadium anzeigen, den Patienten zum Arzt.

#### **1.1.4 Diagnostik**

Zur Standarddiagnostik bei der BPH (im klinischen Gebrauch spricht man besser vom benignen Prostata-Syndrom, BPS) zählen neben der genauen Anamnese (Miktionsanamnese, neuourologische Anamnese, Medikamentenanamnese), dem bereits erwähnten IPSS und der digitalen rektalen Untersuchung (DRU) auch Laboruntersuchungen: Serumkreatinin zur Beurteilung der Nierenfunktion, Urinstatus und Bestimmung des prostataspezifischen Antigens [PSA, zumindest bei Patienten mit Symptomen des unteren Harntraktes (lower urinary tract symptoms, LUTS) ab einem Alter von 50 Jahren]. Weitere wichtige Bestandteile der Diagnostik sind die Uroflowmetrie, die Restharnbestimmung und die Urosonographie (Harnstau, Steinausschluss, Divertikel, Tumor), die bei Bedarf durch fakultative

Untersuchungen wie transrektaler Ultraschall (TRUS, Bestimmung des Prostatavolumens genauer als bei transabdomineller Messung), Miktionsprotokoll, Urodynamik, Urographie oder Urethrozystogramm ergänzt werden können.<sup>12</sup>

Zur Diagnostik des PCa beim symptomatischen Patienten gehören die DRU, die Bestimmung des PSA-Wertes, der TRUS und gegebenenfalls die Biopsie.<sup>13</sup>

Das PCa tastet sich in der DRU klassischerweise als holzharter, unregelmäßig erhabener, nicht verschieblicher Knoten.

Bei dem prostata-spezifischen Antigen (PSA) handelt es sich um ein Glykoprotein, das in den Drüsenepithelien der Prostata gebildet wird. Für DRU und/oder PSA gelten bezüglich des PCa folgende positive Vorhersagewerte: Bei alleiniger positiver DRU 21-51 %, bei PSA-Werten  $\leq 4$  ng/ml 31,5 %, bei PSA-Werten von 4,1 bis 9,9 ng/ml 26,1 %, bei PSA-Werten  $\geq 10$  ng/ml 52,9 %, wenn DRU positiv und PSA-Wert von 4,1 bis 9,9 ng/ml 40,8 % und wenn DRU positiv und PSA-Wert  $\geq 10$  ng/ml 69,1 % Karzinomwahrscheinlichkeit.<sup>14</sup> Die Entdeckungsrate bei asymptomatischen Männern über 50 Jahre beträgt in Screeninguntersuchungen bei alleiniger DRU 1,0-3,2 %, bei alleiniger PSA-Wert-Bestimmung 4,6 % und bei Kombination beider Methoden 5,8 %.<sup>15</sup>

Der transrektale Ultraschall wird sowohl zur Diagnostik des PCa als auch zur Bestimmung der lokalen Ausbreitung angewandt. Eine Kombination von digitaler rektaler Untersuchung mit Bestimmung des PSA und transrektaler Sonographie steigert die diagnostische Treffsicherheit.<sup>16,17</sup>

Die Diagnosesicherung erfolgt durch Gewinnung histologischen oder zytologischen Tumormaterials. Hierzu wird unter digitaler oder sonographischer Kontrolle transrektal eine Prostatabiopsie durchgeführt.

In der Praxis hat sich folgender diagnostischer Algorithmus bewährt: Bei positiver DRU wird unabhängig vom PSA-Wert ein TRUS durchgeführt. Ergibt sich kein weiterer Aufschluss über den Palpationsbefund (z.B. Verkalkung), erfolgt eine Biopsie. Bei unauffälligem Palpationsbefund und einem PSA-Wert von 4 bis 10 ng/ml erfolgt eine Laborkontrolle nach 4 bis 6 Wochen. Bestätigt sich der Wert, erfolgt ebenfalls eine Biopsie. Bei einem PSA-Wert  $> 10$  ng/ml wird sofort biopsiert. Fällt bei bestehendem Karzinomverdacht die erste Biopsie negativ aus, ist eine zweite Biopsie gerechtfertigt (bei negativer DRU wird in diesem Fall zusätzlich die Transitionalzone punktiert). Um besonders im sogenannten Graubereich (Gesamt-PSA von 2,5 bis 10 ng/ml) besser zwischen BPH und PCa unterscheiden zu können, kann der Anteil des freien PSA am Gesamt-PSA (PSA-Quotient) bestimmt werden. Der

Anteil des freien PSA ist bei PCa-Patienten mit etwa 10 % signifikant niedriger als bei BPH-Patienten mit etwa 20 %.<sup>13</sup>

Ergänzt werden können die oben genannten Untersuchungen im Bedarfsfall durch die abdominelle Sonographie und das Ausscheidungsurogramm zur näheren Diagnostik des Primärtumors bzw. durch Röntgen-Thorax, Knochen-Szintigrafie oder pelvine Lymphadenektomie bei Verdacht auf Ausbreitung des Tumors.

Wird ein PCa erst aufgrund seiner Metastasen diagnostiziert, spricht man von einem okkulten Karzinom. Findet sich in einer, wegen BPH resezierten Prostata ein Karzinom, wird dies als inzidentelles, ein im Rahmen einer Autopsie gefundenes als latentes Karzinom bezeichnet.

### **1.1.5 Therapie**

Wie bereits erwähnt besteht eine Therapieindikation für die BPH bei IPSS-Werten über 7. Generell richtet sich die Therapie der BPH nach den individuellen Voraussetzungen des Patienten, wie Leidensdruck oder Operabilität, und klinischen Kriterien, wie Restharn oder durch die BPH bedingtes Nierenversagen.

Stadium I der BPH kann medikamentös mit  $\alpha$ -Rezeptorenblockern oder 5- $\alpha$ -Reduktase-Inhibitoren behandelt werden. Therapie der Wahl bei der Behandlung der fortgeschrittenen BPH (Stadien II und III) ist die TURP, die, eingesetzt in 80 bis 90 % der Fälle das am häufigsten angewandte Verfahren ist.

Bei der TURP wird die Prostata mithilfe eines Endoskops bis auf die chirurgische Kapsel reseziert. Adenome mit einem Gewicht über 80 g werden meist chirurgisch durch transvesikale Prostatektomie (TVP) entfernt.

Zu den häufigsten Komplikationen nach TURP zählen Blutungen, Harnröhrenstrikturen, Inkontinenz und Impotentia generandi (aufgrund einer retrograden Ejakulation).

Bei der Behandlung des PCa werden ein kurativer und ein nichtkurativer Ansatz unterschieden.

Ist der Tumor lokal begrenzt (T1-2,N0,M0), gilt die radikale Prostatektomie als Standardverfahren. Um mit der Operation einen Nutzen für den Patienten zu erzielen, sollte die Lebenserwartung mehr als 10 Jahre betragen. Der am häufigsten angewandte Operations-Zugang ist der retropubische, der im Vergleich zum perinealen den Vorteil hat, dass gleichzeitig eine pelvine Lymphadenektomie durchgeführt werden kann. Andernfalls wäre eine Kombination aus laparoskopischer pelviner Lymphadenektomie und perinealer Prostatektomie möglich. Zu den postoperativen Komplikationen zählen drittgradige

Inkontinenz ein Jahr nach Therapie (7,7 % der Patienten), zweit- bis drittgradige Inkontinenz bei Entlassung (bis 50 %), Anastomoseninsuffizienz (1,2-4 %) und Mortalität (0-1,5 %).<sup>18</sup> Häufige Nebenwirkung der radikalen Prostatektomie ist die erektile Dysfunktion, die bei über 90 % der Patienten auftritt.<sup>19</sup> Eine potenzschonende radikale Prostatektomie ist den frühen Tumorstadien mit nur einseitiger positiver Biopsie vorbehalten, da sonst vermehrt mit lokalen Rezidiven zu rechnen ist.

Alternativ kommt mit kurativer Zielsetzung die perkutane Strahlentherapie gegebenenfalls in Kombination mit Brachytherapie (z.B. mit <sup>192</sup>Iridium) in Frage.

Ein endgültiger Vergleich zwischen radikaler Prostatektomie und Strahlentherapie liegt noch nicht vor, so dass sich bisher die eindeutige Überlegenheit der einen oder anderen Therapieform nicht sicher ableiten lässt.<sup>18</sup> Vergleicht man die Progressionsraten nach radikaler Prostatektomie und nach Strahlentherapie beim organbegrenzten PCa, so reichen die Werte für Progressionsfreiheit nach 5 bzw. 10 Jahren von 97 bzw. 90 % bis 87 bzw. 70 % bei der Prostatektomie, bei der Strahlentherapie liegen sie bei 85 bzw. 67 %.<sup>18</sup>

Bei lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Karzinom gibt es verschiedene adjuvante Therapieformen: einerseits die Androgendeprivation, die durch chirurgische Kastration oder pharmakologisch mit GnRH-/LHRH-Analoga und Antiandrogenen erreicht wird, andererseits die adjuvante Strahlentherapie. Zur Verbesserung der Lebensqualität stehen unter anderem symptomorientierte Chemotherapie, Hormontherapie, Gabe von Bisphosphonaten, Schmerztherapie und palliative Strahlentherapie (z.B. von schmerzhaften Knochenmetastasen oder bei Frakturgefahr) zur Verfügung.<sup>18</sup>

### **1.1.6 Prognose des Prostatakarzinoms**

Da es sich bei dem PCa in der Regel um einen langsam wachsenden Tumor handelt, muss bei Langzeitprognosen auf jeden Fall Beachtung finden, dass nach einer Rezidivfreiheit von 10 Jahren noch nicht von einer sicheren Heilung ausgegangen werden darf. Aus dem gleichen Grund weisen Langzeitüberlebenswahrscheinlichkeiten, die aufgrund eines zu kurzen Nachbeobachtungszeitraums durch Extrapolation berechnet werden, häufig eine gewisse Ungenauigkeit auf. Bei alleiniger Betrachtung des Primärtumor-Stadiums, ohne durchgeführte pelvine Lymphadenektomie, wird vernachlässigt, dass Patienten mit Lymphknotenmetastasen eine schlechtere Prognose besitzen.

Neuere Studien zeigen, wie wichtig beim Vergleich der unterschiedlichen Ergebnisse die Beachtung des Tumor-Gradings ist.<sup>20</sup>

Stellvertretend für die Prognose des PCa soll die Beobachtung von Patienten nach radikaler Prostatektomie an der Urologischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg über einen Zeitraum von mindestens 15 Jahren aufgeführt werden (vgl. Tab. 2).

**Tab. 2: Stadienabhängige Gesamtüberlebensraten und tumorfreie Überlebensraten 15 Jahre nach radikaler Prostatektomie sowie stadienabhängige Progressionsraten und Todesfälle an Prostatakarzinom innerhalb von 15 Jahren nach radikaler Prostatektomie (nach Frohmüller, 1995)<sup>21</sup>**

Tumorstadium	15-Jahres-Überlebensrate gesamt	15-Jahres-Überlebensrate tumorfrei	15-Jahres-Progressionsrate	Tod am Prostatakarzinom
pT2pN0	32/59 (54,2 %)	29/59 (49,1 %)	14/59 (23,7 %)	12/59 (20,3 %)
pT3pN0	4/10 (40 %)	3/10 (30 %)	4/10 (40 %)	3/10 (30 %)
pT2-3pN1-2	1/5 (20 %)	0/5 (0 %)	4/5 (80 %)	2/5 (40 %)
alle Patienten	37/74 (50 %)	32/74 (43,2 %)	22/74 (29,7 %)	17/74 (23 %)

Demnach betrug die tumorbezogene 15-Jahres-Überlebensrate für das PCa im Stadium pT2pN0 79,7 %, im Stadium pT3pN0 70 %, im Stadium pT2-3pN1-2 60 % und für alle Patienten 77 %.

## 1.2 Angiogenese und Inhibition der Angiogenese

### 1.2.1 Ablauf der physiologischen Angiogenese

Die Angiogenese beschreibt einen multifaktoriell kontrollierten Prozess, bei dem aus vorhandenen Kapillaren neue Blutgefäße gebildet werden.

Von der Angiogenese abzugrenzen sind die Vasculogenese, eine *de novo* Bildung von Blutgefäßen während der Embryonalentwicklung und die vaskuläre Expansion, eine Erweiterung bereits bestehender Blutgefäße.

Physiologischerweise kommt die Angiogenese in der Embryonalentwicklung, im Erwachsenenalter z.B. bei der Wundheilung und bei Entzündungen, aber auch im Menstruationszyklus vor.<sup>22,23,24</sup>

In unkontrollierter Weise bildet die Angiogenese die pathophysiologische Grundlage vieler Krankheiten: So sorgt das Einsprossen von Kapillaren bei der Arthritis für die Zerstörung des Knorpels, neue, von der Retina ausgehende und in den Glaskörper einwachsende Kapillaren führen bei Diabetes mellitus zu fortschreitender Sehverschlechterung. Außerdem spielt die Bildung neuer Blutgefäße bei Tumorwachstum und –metastasierung eine wichtige Rolle.<sup>25,26</sup>

Der Vorgang der Angiogenese, der in seinen Einzelheiten Gegenstand intensiver Forschung

ist, ähnelt in seiner Komplexität dem der Blutgerinnung und besteht aus mehreren Einzelschritten:

- I Aktivierung des Endothels, Gefäßdilatation, Erhöhung der Permeabilität
- II Degradation des Stromas und der kapillären Basalmembran mithilfe proteolytischer Enzyme (z.B. Katepsin D, Stromelysin 1 und 2, Plasminogenaktivator, Typ-I-Kollagenase und Typ-IV-Kollagenase), die von Endothelzellen und Fibroblasten sezerniert werden
- III Migration der Endothelzellen in Richtung des angiogenen Stimulus (Chemotaxis)
- IV Proliferation der Endothelzellen
- V Bildung von Kapillaren und Kapillarschleifen zwischen benachbarten Migrationsgebieten

Wenngleich die genauen Vorgänge der Angiogenese noch unklar sind, so konnte doch mittlerweile eine Vielzahl angiogenesestimulierender Faktoren nachgewiesen werden. Diese werden aus der extrazellulären Matrix, von Tumorzellen oder von tumorinfiltrierenden Leukozyten freigesetzt. Von den in Tab. 3 aufgeführten angiogenen Faktoren (Abkürzungen vgl. 7) zählen der vascular endothelial growth factor (VEGF) und der basic fibroblast growth factor (bFGF) zu den wichtigsten.<sup>27</sup>

**Tab. 3: Angiogene Polypeptide (nach Folkman, 1992)<sup>22</sup>**

	Molekulargewich (kD)	Angiogeneseassoziierte Aktivität
BFGF	18	Mitogen auf Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Fibroblasten und bestimmte Epithelzellen,
AFGF	16,4	Stimulation der Endothelzellen zu Migration und Produktion von Proteasen und u-PA
VEGF/VPF	45	mitogen auf Endothelzellen, Erhöhung der Gefäßpermeabilität, Induktion von u-PA,t-PA und PAI-1
PD-ECGF	45	mitogen auf Endothelzellen, Stimulation der Chemotaxis und DNA-Synthese von Endothelzellen
TGF- $\alpha$	5,5	mitogen auf Endothelzellen, transformiert normale Zellen
Angiogenin	14,1	Stimulation von Endothelzellen zur Diacylglycerol-Bildung und zur Prostacyclin-Sekretion
TGF- $\beta$	25	Verstärkung der extrazellulären Matrixproduktion
TNF- $\alpha$	55	induziert bFGF-Produktion und -Sekretion in Endothelzellen

VEGF fördert die Angiogenese, indem er die Gefäßpermeabilität erhöht [wird daher auch vascular permeability factor (VPF) genannt] und Endothelzellen zur Proliferation und Migration anregt. Die Migration wird vermutlich dadurch erleichtert, dass VEGF die mRNA-Expression von urokinase-type plasminogen activator (u-PA) und tissue-type plasminogen activator (t-PA) erhöht. Zusätzlich wird die mRNA-Expression von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) gesteigert.<sup>28</sup>

Im Gegensatz zu VEGF, das hauptsächlich auf Endothelzellen mitogen wirkt, hat bFGF Einfluss auf eine Vielzahl von Zellen (pleiotrop), z.B. Endothelzellen, glatte Muskelzellen,

Fibroblasten und Epithelzellen. bFGF regt Endothelzellen zur Produktion von Proteasen und u-PA an.<sup>22</sup>

### 1.2.2 Tumorangiogenese

Obwohl bereits lange bekannt war, dass die meisten soliden Tumoren eine große Gefäßdichte besitzen, dauerte es bis Anfang der 70er Jahre, bevor Judah Folkman postulierte, dass für die Expansion eines Tumors über eine Größe von einem mm<sup>3</sup> hinaus die Bildung neuer Gefäße absolut notwendig sei, da ansonsten mangelnde Diffusion von Nährstoffen und anfallende Abfallprodukte das Wachstum limitierten.<sup>29</sup> Weiter vermutete er, dass eine Hemmung der Angiogenese - wenn eine Gefäßneubildung für die Tumorexpanansion essentiell wäre – eine Hemmung des Tumorwachstums bedeuten müsse.<sup>30</sup>

Es stellte sich heraus, dass nicht nur für das Tumorwachstum, sondern auch für die Metastasierung Angiogenese eine entscheidende Rolle spielt.

Einerseits erleichtern die unreifen Blutgefäße des Tumors mit ihren reduzierten Basalmembranen und den in geringerer Anzahl vorkommenden interzellulären Verbindungen (erhöhte Permeabilität) sowie die durch Enzyme degradierte Matrix den Tumorzellen den Eintritt in den Blutstrom<sup>31</sup>, andererseits ist Angiogenese im Zielorgan notwendig, um die Metastasen auf klinisch nachweisbare Größe anwachsen zu lassen.<sup>32</sup>

Für eine Vielzahl maligner Tumore konnte mittlerweile nachgewiesen werden, dass die Gefäßdichte im Primärtumor direkt mit der Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen und der Anzahl der Metastasen und damit indirekt mit der Prognose korreliert: für das Mamma-Karzinom<sup>33,34,35,36</sup>, für das PCa<sup>37,38,37,40,41</sup>, für das Bronchial-Karzinom<sup>42,43</sup>, für das Cervix-Karzinom<sup>44</sup> und das Ovarial-Karzinom<sup>45</sup>.

Bereits 1934 beschrieb Willis ein Phänomen, das er als „tumor-dormancy“ bezeichnete: nach der scheinbar kurativen Resektion eines Primärtumors kommt es nach langer Latenzzeit zum Auftreten von Metastasen.<sup>46</sup> Die Erklärung für diesen „Schlafzustand“, die Tumorzellen würden in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus verharren um später reaktiviert zu werden, konnte im Tierexperiment widerlegt werden.<sup>47</sup>

„Tumor-dormancy“ resultiert vielmehr aus einem Gleichgewicht zwischen hoher Proliferationsrate und hoher Apoptoserate.<sup>48</sup> Ein Zusammenhang zwischen Angiogenese bzw. deren Inhibition und „tumor-dormancy“ konnte hergestellt werden, als sich im Tierexperiment zeigte, dass derartige „dormant tumors“ über lange Zeit ohne Neovaskularisation verbleiben.<sup>49</sup>

Der Wechsel vom avaskulären zum vaskulären Stadium wurde als „switch to angiogenesis“ bezeichnet<sup>50</sup>, betrifft aber nicht alle Zellen eines Tumors, wodurch eine Heterogenität aus

Zellen mit angiogenem (4-10 %) und Zellen mit nicht-angiogenem Phänotyp entsteht.<sup>33,51</sup> Vermutlich lösen angiogene Peptide, die aus den Tumorzellen selbst, aus Makrophagen oder der extrazellulären Matrix stammen, diesen Schritt aus.<sup>52</sup>

### **1.2.3 Faktoren der Anti-Angiogenese**

Die Ergebnisse mehrerer tierexperimenteller Untersuchungen legten nahe, dass der angiogene Phänotyp eines Tumors aus der Bilanz angiogener und anti-angiogener Faktoren resultiert: Mäusen wurde subkutan eine Variante des Lewis lung carcinoma eingepflanzt. An der Implantationsstelle entwickelten sich Tumore mit einem Volumen zwischen 800 und 2000 mm<sup>3</sup>, in der Lunge traten Metastasen auf. Wurde der Primärtumor entfernt, kam es zu einer raschen Zunahme der makroskopisch nachweisbaren Metastasen. Da sich bei immundefizienten SCID-Mäusen ähnliche Ergebnisse erzielen ließen, konnte die Beteiligung einer immunologischen Komponente ausgeschlossen werden.

Die Metastasen der Tiere, denen der Primärtumor entfernt worden war, zeigten histologisch eine starke Neovaskularisation. Bei erhaltenem Primärtumor fanden sich mikroskopisch Lungenmetastasen: Der Primärtumor verhindert nicht, dass Tumorzellen die Lunge erreichen, hemmt jedoch die Tumorzellen in der Neovaskularisation und am Wachstum. Die Proliferationsrate der neovaskularisierten Metastasen war vergleichbar mit der nicht neovaskularisierter Metastasen, doch war ihre Apoptoserate um vieles geringer.

In weiteren Experimenten wurde Tieren, denen der Primärtumor entfernt worden war, Serum oder Urin von Tieren mit Primärtumor injiziert. Dies führte zu einer deutlichen Reduktion der Progression der Metastasen. Somit konnte die Vermutung, die Progression der Metastasen werde durch einen in Zirkulation befindlichen Inhibitor supprimiert, gestützt werden. Eine weitere Bestätigung brachte der Mouse-corneal-pocket-assay. Aus Serum und Urin von Tieren mit Primärtumor wurde ein Protein, das für die Inhibition der Angiogenese verantwortlich ist, isoliert. Dieses Protein mit einem Molekulargewicht von 38 kD, das in der Mikrosequenzanalyse eine 98 %-ige Homologie zu einem internen Fragment des Plasminogens ergab, wurde von den Autoren Angiostatin genannt.<sup>53</sup>

Warum Angiostatin Mikrometastasen am Wachstum hindert, nicht jedoch den Primärtumor, könnte durch die unterschiedliche Halbwertszeiten von Angiostatin (2,5 Tage) und VEGF (3 Minuten), der die Hauptrolle bei der Angiogenese spielt, erklärt werden: Im Bereich des Primärtumors ist die VEGF-Konzentration trotz kürzerer Halbwertszeit in Relation höher als die Angiostatin-Konzentration. Aufgrund seiner längeren Halbwertszeit ist jedoch Angiostatin in der Lage, in Metastasen die geringere VEGF-Konzentration zu antagonisieren.



Angiostatin inhibiert die Angiogenese, indem es spezifisch die Endothelzellproliferation und -migration hemmt. Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei Angiostatin um ein internes Fragment des Plasminogens, das die ersten vier „kringle structures“ beinhaltet.

Die Untersuchung der einzelnen Kringel (K) auf ihre Fähigkeit, die Endothelzellproliferation zu hemmen, ergab, dass K1-3 eine höhere inhibitorische Aktivität aufweist, als K1-4. Die inhibitorische Aktivität von K2 ist geringer als die von K1 oder K3.<sup>54</sup> K4, der nur eine geringe anti-proliferative Aktivität besitzt, hat jedoch die stärkste anti-migrative Wirkung.<sup>55</sup> Auf der Suche nach weiteren Anti-Angiogenen zeigte sich, dass auch die Kringel K1-5 anti-angiogene Wirkung haben<sup>56</sup> und dass K5, der durch Unterbrechung des Zellzyklus und durch Apoptose die Endothelzellproliferation hemmt, stärker anti-angiogen ist als Angiostatin.<sup>57,58</sup>

Neben dem Prostata- (PC-3)<sup>59</sup> und dem Pankreas-Karzinom (BxPC-3)<sup>60,61</sup> wurde in der Zwischenzeit bei einer Reihe anderer Tumorzell-Linien die Fähigkeit nachgewiesen, enzymatisch aus Plasminogen Angiostatin zu erzeugen<sup>62</sup>. Die Plasminogenaktivatoren t-PA und u-PA scheinen bei mehreren dieser Zell-Linien eine wichtige Rolle bei der Bildung von Angiostatin zu spielen.<sup>62,63</sup> Außerdem konnte eine Vielzahl von Enzymen gefunden werden, die in vitro bei der Angiostatin-Erzeugung beteiligt sind: Kathepsin D<sup>64</sup>, die Matrix-Metallo-Proteinase MMP-2<sup>65</sup>, MMP-3<sup>66</sup>, MMP-7<sup>67</sup>, MMP-9<sup>67</sup>, MMP-12<sup>68</sup>, Plasmin<sup>63,69</sup>, Plasmin-Thiolreduktase<sup>69,70</sup> und PSA<sup>71</sup>.

Der zweite tumorassoziierte Angiogenese-Inhibitor, der entdeckt wurde, war das Endostatin, ein 20 kD schweres Fragment des Kollagens XVIII.<sup>72</sup> Endostatin wirkt spezifisch auf Endothelzellen, indem es Apoptose-Inhibitoren- und Zell-Proliferations-Gene supprimiert. Seine Bedeutung liegt jedoch in einer ausgesprochen starken antimigrativen Wirkung.<sup>73,74</sup>

Seither wurde eine Vielzahl endogener Angiogenese-Inhibitoren gefunden. Auffällig war vor allem, dass die meisten von ihnen wie Angiostatin und Endostatin Spaltprodukte größerer Proteine sind: ein 16-kD-Fragment des Prolactins<sup>75</sup>, Serpin Antithrombin (Fragment des Antithrombins)<sup>76</sup>, Vasostatin (Fragment des Calreticulins)<sup>77</sup>, Restin (Fragment des Kollagens XV)<sup>78</sup>, Arresten (Fragment des Kollagens IV $\alpha$ 1)<sup>79</sup>, Canstatin (Fragment des Kollagens IV $\alpha$ 2)<sup>80</sup> und Tumstatin (Fragment des Kollagens IV $\alpha$ 3)<sup>81</sup>. Viele dieser Angiogenese-Inhibitoren sowie weitere synthetisch hergestellte Produkte befinden sich momentan in unterschiedlichen Phasen pharmakologischer Studien, im Hinblick auf ihren Einsatz in der Tumorbehandlung (vgl. Tab. 4).

**Tab. 4: Angiogenese-Inhibitoren in pharmakologischen Studien (nach Cao, 2001)<sup>82</sup>**

Name	Phase	Hersteller
Endothelzell-Inhibitoren		
TNP-470	II	TAP Pharmaceuticals
Endostatin	I	Entra Med
Squalamine	I/II	Magainin
Thalidomide	II	NCI/Celgene
Angiostatin	I	Entra Med
Matrix-Metallo-Proteinase-Inhibitoren		
Marimastat	III	British Biotech
BAY 12-9566	III	Bayer
AG3340	III	Agouron
Neovastat	III	Aeterna, Collagenex
Col-3	I	Bristol-Myers Squibb
BMS-275291	I	Wallingford
VEGF-Antagonisten		
Anti-VEGF Antikörper	III	NCI
PTK787/ZK22584	I/II	Novartis
SU-5416	I/II	Sugen
SU-66668	I	Sugen
Cytokine		
Interferon-2 $\alpha$	II/III	erhältlich
Interleukin-12	I/II	Genetics Institute
Anti-Integrine		
EMDI121974	I/II	Merck, Darmstadt
Vitaxin	II	Ixsys
Andere		
CAI	II	NCI
IM862	III	Cytran

## **2 Fragestellung**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, herauszufinden, ob das Maus-Modell auf den Menschen übertragbar ist und inwieweit auch im humanen Bereich anti-angiogene Substanzen mit dem Urin ausgeschieden werden. Um die ausgeschiedenen Substanzen auf ihre Fähigkeit, die Angiogenese zu inhibieren, zu untersuchen, wurde ein Zellkultur-Assay mit humanen mikrovaskulären Endothelzellen etabliert.

Da zu Beginn der Arbeit Angiostatin der am besten untersuchte Angiogenese-Inhibitor war, lag es nahe, nach diesem zu suchen. Diese Suche bei Patienten mit PCa durchzuführen, war durch klinische und experimentelle Daten begründet, die zeigten, dass PSA als Serinprotease in der Lage ist, aus Plasminogen proteolytisch Angiostatin bzw. Angiostatin-Spaltprodukte freizusetzen.<sup>71,83</sup>

Für die Klärung der Frage, ob es sich bei den im Urin ausgeschiedenen antiangiogenen Substanzen um Angiostatin handelt, wurde ein Western-Blot durchgeführt.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Untersuchungsmaterial**

##### **3.1.1 Herkunft**

Die Urinproben, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, stammen von einer Gruppe von zehn Patienten, die aufgrund eines PCa im Zeitraum von Februar 1999 bis April 2001 an der urologischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg prostatektomiert wurden. Das Alter der Patienten liegt zwischen 54 und 72 Jahren, der PSA-Wert beträgt zwischen 0,5 und 1996 µg/l.

Die Urinproben der gesunden Probanden stammen von drei Mitarbeiterinnen und sieben Mitarbeitern der urologischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg, die zwischen 25 und 42 Jahre alt sind.

Bei den PCa-Patienten wurde der Urin vor der Prostatektomie abgenommen. Alle Urinproben wurden als 24-Stunden-Urin gesammelt. Damit fließt bei jeder Probe eiweißreicher Morgenurin mit in die Untersuchung ein.

##### **3.1.2 Gewinnung und Aufbereitung**

Von den über einen Zeitraum von 24 Stunden gesammelten Urinproben wurde jeweils 1 Liter abgemessen. Die Proteinfällung erfolgte mit jeweils 650 g Ammoniumsulfat. Die Lösung wurde mit 13000 UPM 20 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, das Sediment mit 50 ml Aqua dest. resuspendiert. Diese Lösung wurde in einem Stericup mit einer Durapore Membran GV 0,22 µm (Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland) sterilfiltriert und über Nacht in einem Dialyseschlauch fließend gewässert. Anschließend erfolgte eine Konzentrierung durch Ultrafiltration mit Hilfe eines Centricon-YM-10-Systems (Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland) bei 5000 g für 30 Minuten. Die eine Hälfte des Konzentrats wurde für die Verwendung im Zellkultur-Assay bei -80°C eingefroren, die andere Hälfte wurde sofort weiterverarbeitet.

#### **3.2 Untersuchungsmethoden**

##### **3.2.1 Protein-A-Sepharose-System**

Um die Menge des aus dem Urin gewonnenen Proteins zu reduzieren und gleichzeitig die Konzentration des für uns interessanten Angiostatins zu erhöhen, bedienten wir uns des Hilfsmittels der Immunpräzipitation.

Hierbei werden spezifische Antikörper benutzt, um Protein-Antigene aus komplexen Proteinmischungen selektiv auszufällen.<sup>84,85</sup> Dazu wird im Fall des Protein-A- bzw. Protein-

G-Sepharose-Systems das Antigen mit einem Überschuss an Antikörpern in Immunkomplexen gebunden. Aufgrund der meist geringen Konzentration des Antigens präzipitieren die Immunkomplexe nicht. Die Präzipitation wird erreicht, indem die Immunkomplexe an bakterielle Ig-Rezeptoren (Protein A aus *Staphylococcus aureus* bzw. Protein G aus *Streptococcus*), die zuvor an Sepharose gekoppelt wurden, binden.<sup>86,87,88,89</sup>

Zunächst wurden 200 µl der Probe mit einem Zweifach-Immunpräzipitations-Puffer (2xIPP) im Verhältnis 1:1 gemischt (2xIPP: 1,76 g NaCl, 0,4 ml einer 0,5 M EDTA-Lösung und 10 ml einer 1 M Tris-HCl-Lösung wurden mit Aqua bidest. auf 100 ml aufgefüllt). Daraufhin wurden 100 µl der Protein-A-Sepharose-Lösung (rProtein A Sepharose Fast Flow, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland; Herstellung der gebrauchsfertigen Lösung nach beiliegender Anleitung) und 5 µl Angiostatin-Antikörper (Monoclonal Antibody Angiostatin Ab-2, Merck Biosciences GmbH, ehemals Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach, Deutschland) hinzugegeben und der ganze Ansatz 2 Stunden bei 4°C unter Drehbewegung inkubiert. Die Protein-A-Sepharose mit den gebundenen Immunkomplexen wurde anschließend bei 10000 g für 30 Sekunden zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Sediment mit ca. 500 µl Einfach-Immunpräzipitations-Puffer (1xIPP) im Vortex-Mixer resuspendiert und erneut zentrifugiert (1xIPP: 0,88 g NaCl, 0,2 ml einer 0,5 M EDTA-Lösung und 5 ml einer 1 M Tris-HCl-Lösung wurden mit Aqua bidest. auf 100 ml aufgefüllt). Dieser Waschvorgang wurde zweimal mit 1xIPP wiederholt, zum Abschluss wurde einmal mit PBS (PBS: 8,18 g NaCl, 0,15 g KCl, 1,38 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O und 0,20 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> wurden mit Aqua bidest. auf 1 Liter aufgefüllt, der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt) gewaschen. Das letzte Sediment wurde in 100 µl Proteinauftragspuffer (Roti-Load 1, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland) aufgenommen, 5 Minuten auf 100°C erhitzt und erneut zentrifugiert. Der Überstand (freies Antigen und Antikörper) wurde unmittelbar der SDS-PAGE zugeführt.

### **3.2.2 Säulenchromatographie**

Alternativ zur Immunpräzipitation versuchten wir, mithilfe der Säulenchromatographie das Proteingemisch aufzutrennen und Angiostatin zu isolieren.

Dazu wurden ca. 1 ml der Probe auf eine Superdex-75-gefüllte Säule (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) aufgetragen. Über einen Zeitraum von 2,5 Tagen wurden die Proteine mit Puffer aus der Säule ausgewaschen (Puffer: 20 mM Tris, 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0). Jeweils 3 ml des Eluats wurden in Cups aufgefangen. Der Inhalt der Cups, bei denen während der Eluation in der Photometrie ein „Peak“ zu sehen war, wurde

lyophilisiert und in Aqua dest. resuspendiert. Die so erhaltenen Proben wurden in der SDS-PAGE (vgl. 3.2.3) aufgetrennt. Proben, die Banden im Bereich von 40-50 kD bildeten und somit für Angiostatin in Frage kamen, wurden erneut der SDS-PAGE zugeführt und im Western-Blot untersucht. Unter den Banden, die im Bereich von 40-50 kD lagen, ließ sich keine im Western-Blot markieren. Wir gehen davon aus, dass Angiostatin aufgrund des von uns eingestellten pH-Wertes nicht aus der Säule ausgewaschen werden konnte. Daher verwendeten wir im Weiteren die Immunpräzipitation als Mittel der Wahl zur Isolierung von Angiostatin.

### **3.2.3 SDS-PAGE und Western-Blot**

Die Gelelektrophorese wurde mit einem 12,5%-igen Trenngel und einem 4%-igen Sammelgel durchgeführt. Für das Trenngel wurden 25 ml der Monomer-Solution (Rotiphorese Gel 30 37,5%, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland), 15 ml Running Gel Buffer (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8), 600 µl 10%-ige SDS-Lösung (SDS, Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, Deutschland), 19,1 ml Aqua bidest., 300 µl 10%-ige APS-Lösung (APS, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland) und 20 µl TEMED (TEMED, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland) verwendet, für das Sammelgel 2,66 ml Monomer-Solution, 5 ml Stacking Gel Buffer (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8), 200 µl 10%-ige SDS-Lösung, 12 ml Aqua bidest., 100 µl 10%-ige APS-Lösung und 10 µl TEMED.

Zu 30 µl der Proben wurden 10 µl Proteinauftragspuffer (Roti-Load 1, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland) hinzugegeben. Als Positivkontrolle wurde Angiostatin (Human Angiostatin Protein, Merck Biosciences GmbH, ehemals Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach, Deutschland) verwendet, wobei 15 µl Angiostatin mit 5 µl Proteinauftragspuffer gemischt wurden. Die Protein-Puffer-Gemische wurde 5 Minuten auf 90°C erhitzt und anschließend auf Eis gestellt. Als Marker wurde ein Protein-Standard (Prestained Precision Protein Standards Broad Range, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) verwendet.

Marker und Proben wurden auf das Gel aufgebracht. Der Laufpuffer für die Elektrophoresekammer wurde wie folgt hergestellt: 30,28 g Tris, 144,13g Glycin und 10 g SDS wurden mit Aqua bidest. auf 10 l aufgefüllt, der pH-Wert wurde auf 8,3 eingestellt. Die Elektrophorese wurde im Bereich des Sammelgels mit einer Spannung von 70 V, im Bereich des Trenngels mit einer Spannung von 150 V durchgeführt.

Sofort nach Beendigung der Elektrophorese wurde mit dem Gel ein Western-Blot durchgeführt. Hierzu wurde eine PVDF-Membran (Sequi-Blot PVDF Membrane, Bio-Rad

Laboratories GmbH, München, Deutschland) verwendet. Diese Membran wurde als Vorbereitung zunächst in Methanol getaucht und anschließend für 2-3 Minuten in Transferpuffer (Transferpuffer: 3,03 g Tris und 14,27 g Glycin werden mit Aqua bidest. auf 100 ml aufgefüllt, der pH-Wert auf 10 eingestellt; schließlich werden noch 200 ml Methanol und 700 ml Aqua bidest. hinzugegeben) nass gehalten. Gel und Membran wurden in die mit Transferpuffer gefüllte Blotting-Kammer gebracht und bei einer Spannung von 70 V für 1 Stunde geblottet.

Nach dem Blot-Vorgang wurde die Membran eine Stunde auf dem Schüttler in Blockierungslösung (Blockierungslösung: 2,5 g Magermilchpulver werden mit PBS/0,1% Tween-20 auf 100 ml aufgefüllt und gelöst) inkubiert. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper [Inkubationslösung 1: 0,1 g Magermilchpulver werden mit PBS/0,1% Tween-20 auf 10 ml aufgefüllt und gelöst, der Angiostatin-Antikörper (Monoclonal Antibody Angiostatin Ab-2, Merck Biosciences GmbH, ehemals Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach, Deutschland) wird darin 1:1000 verdünnt] über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler. Nach dreimaligem Waschvorgang (Waschlösung 1: 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA und 0,1% Triton X-100; pH 7,5) für jeweils fünf Minuten erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper [Inkubationslösung 2: : 0,1 g Magermilchpulver werden mit PBS/0,1% Tween-20 auf 10 ml aufgefüllt und gelöst, der für die Detektion notwendige zweite Antikörper (Anti-mouse IgG, peroxidase-linked species-specific whole antibody, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) wird 1:2000 darin verdünnt] über eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Im Anschluss wurde die Membran dreimal für jeweils fünf Minuten in Waschlösung 2 gewaschen (Waschlösung 2: 10 mM Tris, 1 M NaCl, 2 mM EDTA und 0,1% Triton X-100; pH 7,5).

Die Detektion erfolgte mithilfe von horseradish peroxidase (HRP), die an den zweiten Antikörper gebunden ist. Diese Peroxidase oxidiert das im Detektions-Reagenz (ECL Plus Western blotting detection reagents, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) enthaltene Lumigen PS-3 zu intermediären Acridinium-Estern, die unter Aussendung von Licht, wodurch die eingesetzten Röntgenfilme geschwärzt werden, weiterreagieren.

Dazu wurde gemäß Anleitung das gebrauchsfertige Detektions-Reagenz hergestellt und die Membran für 15 Minuten bei Raumtemperatur darin inkubiert. Das Reagenz wurde entfernt, die Membran mit Aqua dest. gespült, zwischen zwei Folien getrocknet und in der Dunkelkammer eine Minute zusammen mit einem Röntgenfilm in eine Röntgenkassette gesteckt. Anschließend wurde der Röntgenfilm entwickelt.

### **3.2.3.1 Angiostatinnachweis**

Um zu bestätigen, dass es sich bei dem von uns nachgewiesenen Protein um Angiostatin handelt, wurde eine Probe des Proteins Prof. Dr. Hoppe vom Theodor-Boveri-Institut der Universität Würzburg übergeben.

Dort wurde eine SDS-PAGE mit angeschlossenem Blot durchgeführt. Das Gel wurde mit Coomassie-Blue eingefärbt (Färbelösung: 50 mg Coomassie, 25 ml Methanol, 25 ml Aqua dest. und 6,25 ml Essigsäure). Die Bande, die sich im Bereich von ca. 40 kD anfärben ließ und im Blot ein positives Ergebnis zeigte, wurde aus dem Gel ausgeschnitten und sequenziert. Die Sequenzierung ergab, dass es sich bei dem von uns isolierten Protein um Angiostatin handelt.

### **3.2.4 Zellkultur-Assay**

Um das von uns isolierte Protein auf seine antiangiogene Eigenschaft hin zu untersuchen, wurden im Zellkultur-Assay Endothelzellen mit Urin-Konzentrat inkubiert. Bei den verwendeten Zellen handelte es sich um humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HDMEC-c, PromoCell, Heidelberg, Deutschland).

Diese Endothelzellen wurden zunächst in mehreren Zyklen in Zellkulturflaschen vermehrt. Die Zellkulturflaschen (Zellkulturflaschen, Nunc GmbH & Co KG, Wiesbaden, Deutschland) wurden im Brutschrank bei 37°C und 5,5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Für die „Zellfütterung“ wurde mit L-Gluthamin stabilisiertes, nach Earl's-gepuffertes Medium M199 (M199, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland) verwendet, das außerdem 10 % FCS (FCS, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland), 1 % Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep 10000 Einheiten, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland) und 1,1 ng/ml bFGF (human recombinant basic fibroblast growth factor, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) an Zusätzen enthielt.

Für die Zellpassage und Aufteilung auf mehrere Zellkulturflaschen sowie für die Bestimmung der Zellzahl vor der Einsaat in die 24-well-plates (Nunc GmbH & Co KG, Wiesbaden, Deutschland) wurde zunächst das Medium abgesaugt. Die Kulturflasche mit dem „Zellrasen“ wurde mit PBS (PBS: 8,18 g NaCl, 0,15 g KCl, 1,38 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O und 0,20 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> wurden mit Aqua bidest. auf einen Liter aufgefüllt, der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt) gespült.

Die Ablösung der Zellen vom Untergrund erfolgte durch Zugabe von ca. 2 ml Trypsin/EDTA (Trypsin/EDTA, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland). Die Reaktion des Trypsins wurde im Anschluss durch ca. 5 ml Medium abgestoppt. Das Medium mit den abgelösten Zellen wurde bei 1000 UPM für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig



abgesaugt, das Sediment mit 10 ml Medium resuspendiert. Für die Zellzählung wurden 50 µl Zellsuspension mit 50 µl Trypanblau gemischt und in einer Neubauer-Zählkammer von Hand unter dem Mikroskop ausgezählt. Für die Aufteilung der Zellen auf mehrere Kulturflaschen wurde die Zellsuspension mit Medium versetzt, dass pro neue Kulturflasche etwa 1 Mio. Zellen eingesät wurden. Für die Einsaat in die 24-well-plates wurde eine Verdünnung hergestellt, in der 1 ml Medium 20000 Zellen enthielt. Schließlich wurden in eine 24-well-plate 20000 Zellen pro well eingesät.

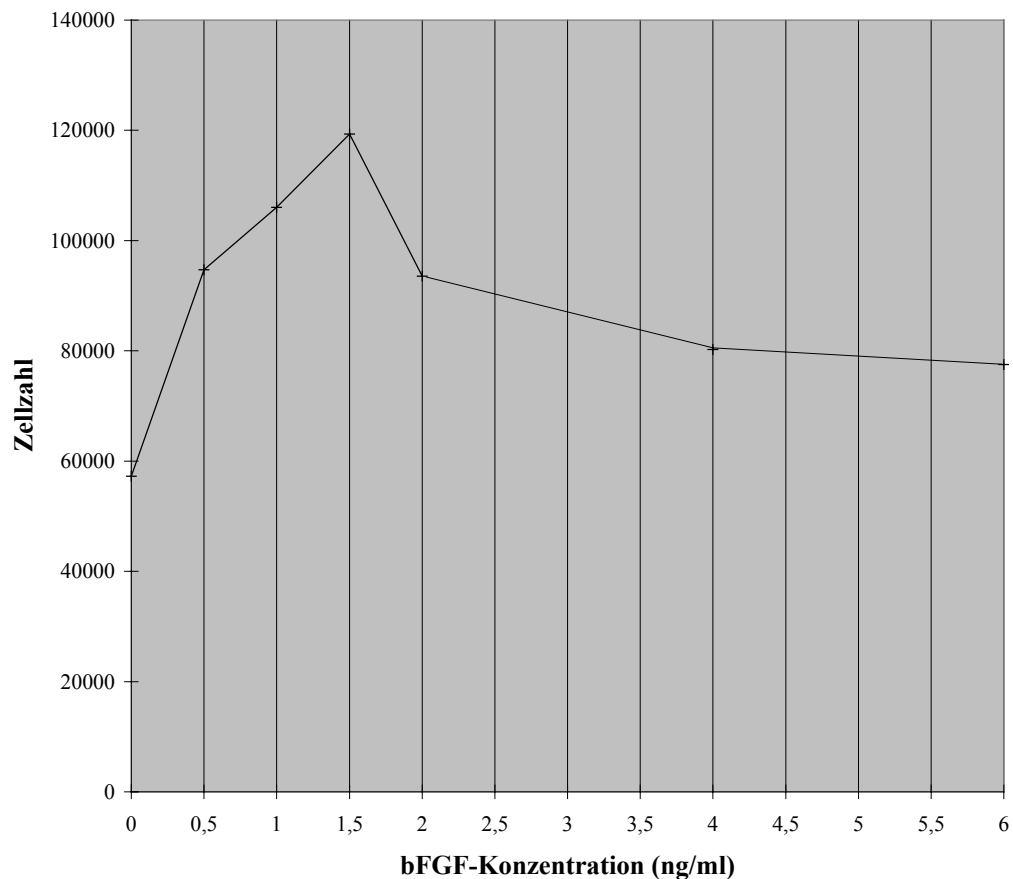
Am dritten Tag wurden 100 µl des Urinkonzentrats hinzugegeben. Als Positivprobe wurden 100 µl Angiostatin (Human Angiostatin Protein, Merck Biosciences GmbH, ehemals Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach, Deutschland), als Negativprobe 100 µl Aqua dest. verwendet. Jede Probe wurde in drei wells getestet.

Die Auszählung der 24-well-plates erfolgte am fünften Tag entsprechend dem oben dargestellten Vorgehen: die Zellen jedes wells wurden mit Trypsin/EDTA abgelöst, die Reaktion durch Zugabe von Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert und mit 500 µl Medium resuspendiert. 50 µl Suspension wurden mit 50 µl Trypanblau versetzt und von Hand in der Zählkammer ausgezählt.

#### **3.2.4.1 bFGF-Konzentration**

Bevor die Versuchsreihe unter Zugabe des von uns isolierten Angiostatins zu den Endothelzellkulturen begann, wurde in einem Vorversuch die bFGF-Konzentration für die optimalen Wachstumsbedingungen in unserem Zellkultur-System ermittelt (vgl. Abb. 2).

**Abb. 2: Abhängigkeit des Zellwachstums von der bFGF-Konzentration**



Dazu wurden in 24-well-plates 25000 Endothelzellen eingesät. Als Medium wurde mit L-Gluthamin stabilisiertes, nach Earl's-gepuffertes Medium M199 (M199, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland) verwendet, das wiederum 10 % FCS (FCS, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep 10000 Einheiten, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland), jedoch keinen bFGF enthielt.

bFGF (human recombinant basic fibroblast growth factor, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) wurde nach einer Anwachszeit von 24 Stunden in Konzentrationen von 0 bis 6 ng/ml zugegeben. Für jede Konzentration wurden drei wells angesetzt. Nach einer Inkubation von 72 Stunden erfolgte die Auszählung der wells von Hand nach dem oben beschriebenen Vorgehen. Von den Zellzahlen, die einer Konzentration zugehörig waren, wurde der Mittelwert gebildet. Die meisten Zellen und damit die besten Wachstumsbedingungen fanden sich bei einer bFGF-Konzentration von 1,5 ng/ml. Da bei den Testreihen mit Angiostatin nur jeweils 20000 Zellen eingesät wurden, wurde letztlich bei den

Versuchen eine bFGF-Konzentration von 1,1 ng/ml verwendet. Die weiteren Ergebnisse sind in Abb. 2 dargestellt.

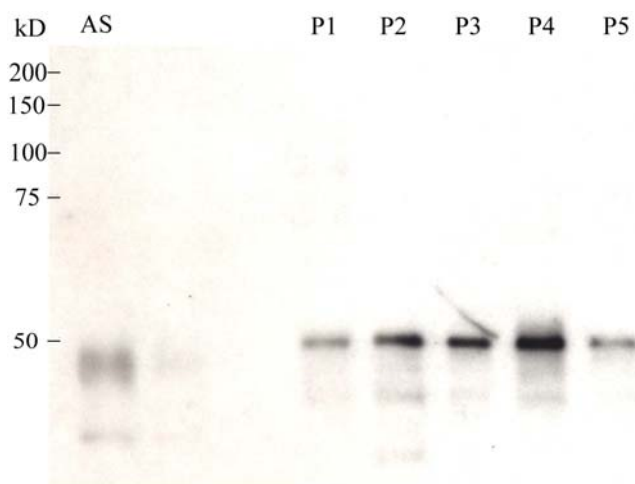
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Angiostatinnachweis im Western-Blot

#### 4.1.1 gesunde Probanden

Die Probanden, Mitarbeiter der Urologischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg, waren zwischen 25 und 42 Jahre alt (Mittelwert: 33,9 Jahre). Zum Zeitpunkt der Abgabe der Urinprobe ist bei keinem der Probanden eine Erkrankung bekannt.

Aus mehreren Untersuchungen ist bereits bekannt, dass sich auch im Urin gesunder Menschen Angiostatin in geringen Mengen nachweisen lässt.<sup>90,91</sup> Im Gegensatz zu diesen Untersuchungen, die die Menge des signifikant nachweisbaren Angiostatins („cut off“) bei 15 bzw. 16 µg/l Urin ansetzten, legten wir, da wir die Menge des vorhandenen Angiostatins nicht bestimmten, kein „cut off level“ fest. Als Nachweis für vorhandenes Angiostatin galt somit die Detektion im Western-Blot in Kombination mit der Protein-Sequenzierung (vgl. Abb. 3).



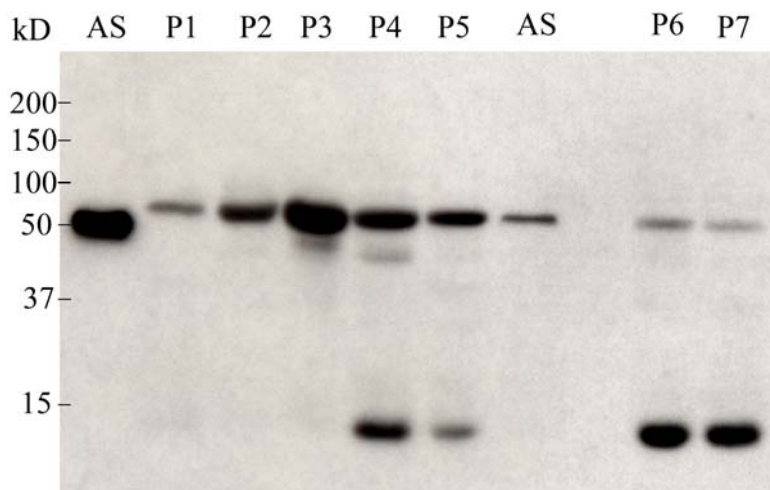
**Abb. 3: Western-Blot des Urins gesunder Probanden. AS: Positivkontrolle Angiostatin, P1-5: Probanden 1 bis 5**

Als Positivkontrolle wurden 15 µl Angiostatin (Human Angiostatin Protein, Merck Biosciences GmbH, ehemals Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach, Deutschland) verwendet. Die Banden der gesunden Probanden P1-5 lagen ebenso wie die Positivkontrolle Angiostatin im Bereich von 50 kD. Der endgültige Nachweis, dass es sich bei dem im Western-Blot markierten Proteine um Angiostatin handelt, erfolgte mithilfe einer Protein-Sequenzierung (vgl. 3.2.3.1).

Somit konnten wir bei allen zehn gesunden Probanden im Western-Blot Angiostatin bzw. Angiostatin-Spaltprodukte nachweisen. Aussagen über die Konzentrationen des Gesamtproteins bzw. des Angiostatins in einzelnen Proben ließen sich allein anhand der unterschiedlichen Größe der Banden nicht treffen.

#### 4.1.2 Patienten mit Prostatakarzinom

Das Alter der Patienten mit PCa zum Zeitpunkt der Behandlung an der Urologischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg betrug zwischen 54 und 72 Jahre (Mittelwert: 61,8 Jahre). Da wir, wie bereits erwähnt kein „cut off level“ festlegten und eine Detektion des Proteins Angiostatin im Western-Blot als Nachweis galt, fand sich auch bei allen PCa-Patienten Angiostatin im Urin (vgl. Abb. 4).



*Abb. 4: Western-Blot des Urins von Prostatakarzinom-Patienten. AS: Positivkontrolle Angiostatin, P1-7: Patienten 1 bis 7*

Als Positivkontrolle wurden 30 bzw. 15 µl Angiostatin (Human Angiostatin Protein, Merck Biosciences GmbH, ehemals Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach, Deutschland) verwendet.

Wiederum zeigten sich bei den Patientenproben P1-7 und bei den Positivkontrollen Banden im Bereich von 50 kD. Die Proben P3 und P4 zeigten außerdem eine weitere Bande im Bereich von 45 kD. Hierbei handelt es sich vermutlich um ein Angiostatin-Spaltprodukt, das in der Literatur bereits erwähnt wurde.<sup>71</sup> Die Struktur, Funktion und Herkunft des Proteins, dessen Bande sich im Bereich von 12 bis 15 kD im Verlauf der Versuche bei mehreren PCa-Patienten (P4-7) immer wieder zeigte, ist nicht bekannt. Auch bei den Patienten können von der Größe der Banden keine Rückschlüsse auf die Menge des vorhandenen Angiostatins gezogen werden, eine Konzentrationsbestimmung des Gesamtproteins im Urinkonzentrat erfolgte nicht. Die Nierenfunktion, die, wie bereits diskutiert<sup>91</sup>, großen Einfluss auf die Protein- und damit Angiostatin-Konzentration im Urin hat, war bei den von uns gewählten Patienten weitgehend normal.

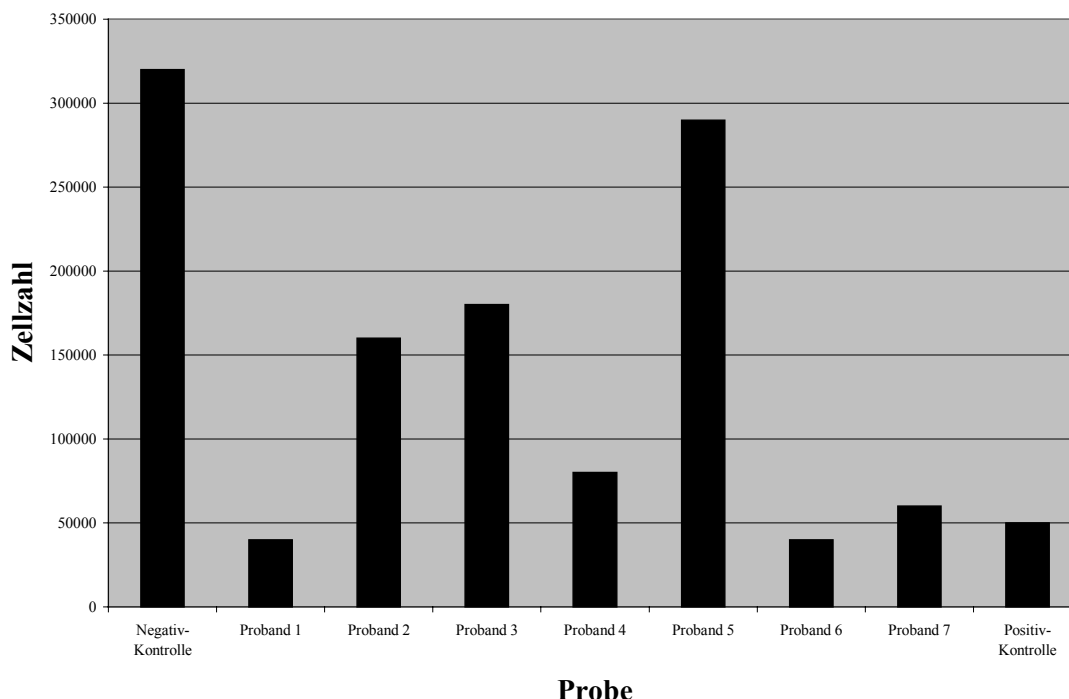
## 4.2 Wachstumshemmung im Endothelzellkultur-Assay

### 4.2.1 gesunde Probanden

Nach einer Anwachszeit der Zellen von zwei Tagen wurden am dritten Tag jeweils drei wells die Urinkonzentrate der gesunden Probanden, Angiostatin als Positiv- und Aqua dest. als Negativprobe zugesetzt. Die Auszählung der Zellen erfolgte am fünften Tag. Von den Zellzahlen, die einer Probe zugehörig waren, wurde der Mittelwert gebildet. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abb. 5 dargestellt.

Mit Ausnahme der Probe 5 (Mittelwert: 290000) wurde das Zellwachstum im Vergleich zur Negativ-Kontrolle, für die ein Mittelwert von 320000 Zellen ermittelt wurde, bei allen Proben deutlich gehemmt. Die Wachstumshemmung der Proben 1, 6 und 7 lag dabei im Bereich der Wachstumshemmung der Positiv-Kontrolle mit 100 µl Angiostatin (Mittelwert: 50000). Zelluntergänge z.B. durch toxische Wirkung des Urins konnten mithilfe der Mikroskopie ausgeschlossen werden.

**Abb. 5: Zellzahl unter Inkubation mit dem Urin gesunder Probanden**



Somit konnte bei erbrachtem Nachweis von Angiostatin und Angiostatin-Spaltprodukten im Western-Blot in 10 Proben für mindesten 9 von diesen Proben im Endothelzellkultur-Assay

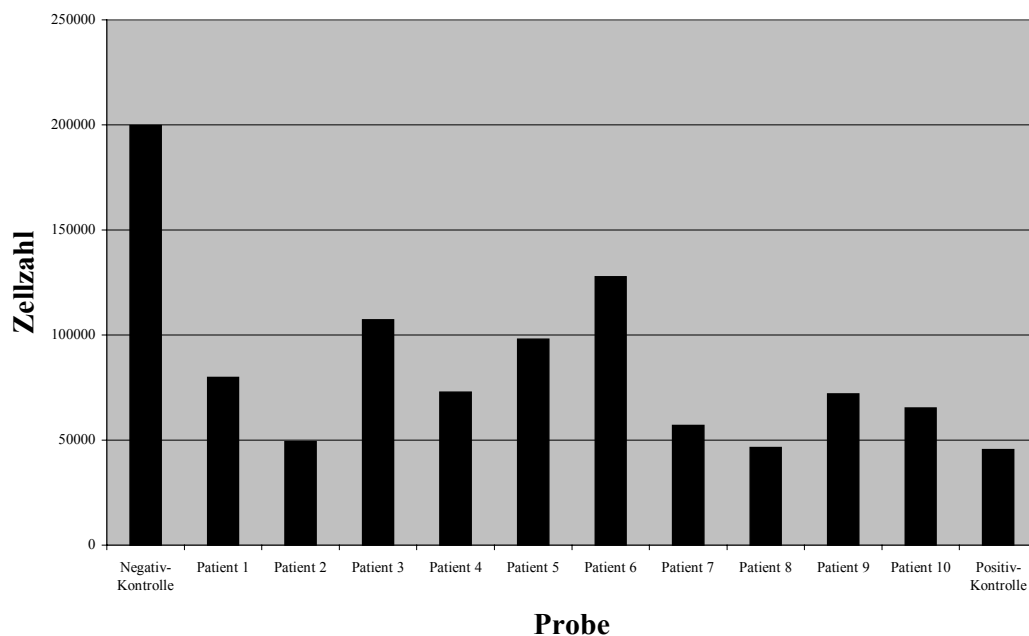
eine antiangiogene Wirkung ermittelt werden. Ob diese wachstumshemmende Wirkung auf Angiostatin oder seine Spaltprodukte zurückzuführen ist, ist nicht bekannt.

Daraus lässt sich schließen, dass auch gesunde Menschen anti-angiogene Proteine im Urin ausscheiden. Eine Korrelation der Proliferationshemmung mit dem Alter oder dem Geschlecht fanden wir bei unseren Probanden nicht.

#### 4.2.2 Patienten mit Prostatakarzinom

Die Ergebnisse für die Patienten wurden in gleicher Weise ermittelt wie die Daten der gesunden Probanden. Von den zugehörigen Zellzahlen wurde der Mittelwert gebildet. Jede der Proben zeigte eine deutliche Verminderung der Zellzahl im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (Mittelwert: 199750) und damit eine deutliche Inhibition des Endothelzellwachstums. Die Zellzahlen nach Inkubation mit den Proben 2, 7 und 8 lagen im Bereich der Positiv-Kontrolle mit 100 µl Angiostatin (Mittelwert: 45500). Die Ergebnisse werden in Abb. 6 dargestellt.

**Abb. 6: Zellzahl unter Inkubation mit dem Urin von Prostatakarzinom-Patienten**



Die Ergebnisse zeigen, dass bei nachgewiesenem Angiostatin/nachgewiesenen Angiostatin-Spaltprodukten im Zellkultur-Assay in jeder Probe der PCa-Patienten eine angiogenese-inhibitorische Wirkung nachweisbar ist.

Eine Korrelation dieser inhibitorischen Wirkung mit Alter, PSA-Wert, Tumorstadium oder Grading fand sich nicht. Ebenso wenig ließen sich, nicht zuletzt wegen der kleinen Fallzahlen in beiden Gruppen, Gesunde von Tumorträgern unterscheiden.



## **5 Diskussion**

### **5.1 Übertragbarkeit des Tiermodells auf den Menschen**

Eine Aufgabe unserer Untersuchungen war es, herauszufinden, ob – analog zum Nachweis anti-angiogener tumorassoziierter Proteine im Tiermodell – auch bei humanen Tumoren wie dem PCa Angiostatin nachweisbar ist.

O'Reilly fand heraus, dass Angiostatin nicht nur im Serum tumortragender Mäuse zirkuliert, sondern auch im Urin ausgeschieden wird.<sup>53</sup> Daher beschlossen wir, aufgrund der weniger invasiven Probengewinnung Urin als Untersuchungsmaterial zu verwenden.

Da wir bei allen von uns ausgewählten Patienten Angiostatin im Urin nachweisen konnten, kann man spekulieren, ob auch die Ergebnisse der Lewis-lung-carcinoma-tragenden Mäuse auf zumindest einige menschliche Tumore übertragen werden können, d.h. ob in Anlehnung an O'Reillys Versuche bei Eingriffen in das Gleichgewicht zwischen angiogenen und antiangiogenen Faktoren das Tumorwachstum unterdrückt oder im ungünstigen Fall das Metastasenwachstum gefördert werden kann.

O'Reillys Hypothese, dass ein Primärtumor einerseits die Angiogenese und damit das Wachstum im eigenen Kapillarnetz stimulieren kann, andererseits aber die Angiogenese im Kapillarnetz der Metastasen oder eines Zweittumors inhibieren kann<sup>92</sup>, würde, auf menschliche Tumore übertragen, bedeuten, dass es im ungünstigen Fall nach Exzision eines Primärtumors zum fulminanten Wachstum bereits bestehender Metastasen kommt: die Entfernung des proteolytisch wirksamen Tumors führt zur verminderten Freisetzung anti-angiogener Proteine in die Zirkulation, im Bereich der Metastasen entfällt somit die durch Angiogenese-Inhibitoren gesteigerte Apoptoserate von Endothelzellen. Im günstigen Fall wäre es aber möglich, mithilfe von Angiogenese-Inhibitoren das Tumorwachstum zu beschränken. Damit hätte man eine unterstützende Therapiemöglichkeit in der Hand oder müsste überhaupt nicht mehr operieren, da Tumor und Metastasen nicht weiterwachsen.

### **5.2 klinischer Einsatz von Angiogenese-Inhibitoren**

Mit der Isolierung des ersten Angiogenese-Inhibitors wurde deutlich, dass ein Eingreifen in das Gleichgewicht zwischen angiogenen und anti-angiogenen Faktoren möglicherweise eine neue Form der Krebstherapie bedeuten könnte.<sup>53</sup>

Aufbauend auf frühere Versuche behandelte Parangi Mäuse, die SV40-Tag-Onkogene trugen und damit die Eigenschaft hatten, Pankreas-Inselzell-Karzinome zu entwickeln (RIP1-Tag2), mit drei unterschiedlichen, anti-angiogen wirksamen Substanzen: AGM-1470 (TNP-470, ein synthetisches Analogon des Fumagillin), Minozyklin und Interferon  $\alpha/\beta$ . Es zeigte sich, dass

die Tumormasse auf etwa zehn Prozent im Vergleich zu unbehandelten Mäusen reduziert war, die Gefäßdichte wurde mehr als halbiert. Die Tumorzellproliferation wurde nicht beeinflusst, jedoch war die Apoptoserate in behandelten Mäusen etwa zweifach höher.<sup>93</sup>

Um die Wirksamkeit von Angiogenese-Inhibitoren auf die einzelnen Stadien des Tumorwachstums zu untersuchen, wurden vier Inhibitoren jeweils in unterschiedlichen Phasen verabreicht: AGM-1470, BB-94 (Batimastat, ein MMP-Inhibitor), Angiostatin und Endostatin.

In der ersten Phase (prevention trial), dem Übergang vom hyperplastischen Stadium zum soliden Tumor durch den „angiogenic switch“ konnte BB-94 die Häufigkeit des „angiogenic switch“ um 50 %, Endostatin um über 60 % reduzieren, während AGM-1470 und Angiostatin keine signifikanten Effekte zeigte.

Im „intervention trial“ (Mäuse, die bereits kleine solide Tumore tragen) konnte Angiostatin die Tumormasse um 60 %, AGM-1470 und BB-94 um über 80 % und Endostatin um fast 90 % reduzieren.

Im „regression trial“ sollten Mäuse mit großer Tumormasse, die kurz vor dem Tod (erwartete Lebenszeit weniger als zwei Wochen) standen, auf eine Tumorregression durch die Inhibitoren untersucht werden. Alle Substanzen konnten die Lebenszeit um mindestens zwei Wochen verlängern; AGM-1470 und eine Kombination aus Endostatin und Angiostatin konnte außerdem die Tumormasse verringern. Wiederum zeigte sich keine Beeinflussung der Tumorzellproliferation, jedoch eine Vermehrung der apoptotischen Tumorzellen um das Zwei- bis Dreifache.<sup>94,95</sup>

Diese Untersuchungen zeigten, dass, bis auf wenige Ausnahmen, Angiogenese-Inhibitoren in der Lage waren, die Tumormasse zu verringern, den Tumor auf die Größe des avaskulären Stadiums zu reduzieren, ihn jedoch nicht vollständig entfernen konnten. Daher liegen die Möglichkeiten der Angiogenese-Inhibitoren vermutlich vor allem in der Potenzierung parallel gegebener Chemotherapeutika durch kombinierte Verabreichung<sup>96,97,98</sup>: Somit wird nicht nur das Tumorzell-Kompartiment sondern auch das Endothelzell-Kompartiment beeinflusst.<sup>25</sup> Ein entscheidender Vorteil der Angiogenese-Inhibitoren als Tumorthapeutika ist die vergleichsweise geringe Toxizität und, zumindest bei direkten Angiogenese-Inhibitoren, ein Fehlen der, bei Chemotherapeutika so gefürchteten Resistenzbildung<sup>99</sup>:

Direkte Angiogenese-Inhibitoren (z.B. Endostatin) inhibieren die Motilität und Proliferation genetisch stabiler Endothelzellen und arbeiten damit unabhängig vom Tumorzell-Genom. Im Gegensatz dazu inhibieren indirekte Angiogenese-Inhibitoren (z.B. Anti-VEGF-Antikörper) ein Tumorzell-Produkt. Solange der Tumor lediglich dieses angiogene Protein exprimiert, ist

der Inhibitor wirksam. Sobald mutierte Tumorzellen in der Lage sind, andere angiogene Proteine (z.B. bFGF) zu produzieren, ist der Tumor resistent gegenüber diesem Inhibitor.<sup>100</sup>

Die Intention konventioneller Chemotherapeutika, möglichst viele Tumorzellen in möglichst kurzer Zeit abzutöten, sollte für Angiogenese-Inhibitoren neu überdacht werden: Angiogenese-Inhibitoren müssen, da sie den Tumor nur ins avaskuläre Stadium überführen, nicht jedoch abtöten, über einen langen Zeitraum (evtl. bis an das Lebensende) in kleinen Dosen ein- bis mehrmals am Tag gegeben werden.<sup>101</sup> Die zweite Einsatzmöglichkeit neben der Kombination mit konventionellen Chemotherapeutika wäre damit die langzeitliche Unterdrückung bereits bestehender Metastasen, vor allem wenn der Primärtumor entfernt wurde.

Hierin zeigen sich die Nachteile der Angiogenese-Inhibitoren für die klinische Anwendung: aufgrund der kurzen Halbwertszeit wiederholte Verabreichung durch Injektion ein- bis mehrmals am Tag, hohe zu verabreichende Dosen (vermutlich mehrere Gramm pro Tag) und damit verbundene hohe Kosten.

Obwohl einige der Angiogenese-Inhibitoren momentan Bestandteil pharmakologischer Studien sind (vgl. Tab. 4), ist gerade die Verfügbarkeit ausreichender Mengen aktiver Proteine ein Problem.

Um die Probleme der Verfügbarkeit in Zukunft lösen zu können, müssen mehrere Ansätze überdacht werden: Kombination unterschiedlicher Angiogenese-Inhibitoren untereinander oder mit konventionellen Tumorthérapien, Identifizierung und Isolierung hochwirksamer Angiogenese-Inhibitoren, anti-angiogene Gentherapie, Erhöhung der Inhibitor-Konzentration am Wirkort und eine Verlängerung der Halbwertszeit.<sup>82</sup>

### **5.3 Nachweis von Angiostatin bei Gesunden**

Bereits seit langer Zeit ist bekannt, dass Tumorstadium und Metastasierung von pro- und anti-angiogenen Faktoren beeinflusst und reguliert werden.<sup>29</sup> Mit Angiostatin, einem Spaltprodukt des Plasminogens, konnte zum ersten Mal ein tumorassoziiertes Angiogenese-Inhibitor aus dem Urin von Mäusen mit Lewis-lung-carcinoma isoliert werden.<sup>53</sup> Erst in letzter Zeit zeigten Untersuchungen, dass auch Gesunde, die als Vergleichsgruppen fungierten, in mehr oder weniger großem Umfang anti-angiogene Proteine mit dem Urin ausscheiden.<sup>90,91</sup>

Da wir bei allen unseren gesunden, willkürlich ausgewählten Probanden Angiostatin bzw. seine Spaltprodukte nachgewiesen haben, kann nun mit Sicherheit gesagt werden, dass anti-

angiogene Proteine unabhängig vom Vorhandensein maligner Tumoren physiologischerweise mit dem Urin ausgeschieden werden.

Dies wiederum bedeutet, dass Angiostatin nicht nur in der Tumorangiose eine Rolle spielt. Es muss vielmehr angenommen werden, dass Angiostatin als physiologischer Modulator der Angiose an dem Gleichgewicht zwischen angiogenen und anti-angiogenen Faktoren beteiligt ist und dass es ähnlich den Faktoren des Gerinnungssystems bei Bedarf aktiviert oder inaktiviert werden kann. Für eine Aktivierung im Bedarfsfall, wie sie auch die Gerinnungsfaktoren erfahren, spricht auch die Tatsache, dass viele anti-angiogene Proteine Fragmente größerer Proteine (z.B. Plasminogen, Kollagen XVIII oder Prolactin) sind und aus diesen durch proteolytische Enzyme gebildet werden können.

Dadurch wirft sich die Frage auf, ob im menschlichen Körper im Falle eines Gleichgewichts unbemerkt parallel Angiose und Antiangiose ablaufen, wie bei der Blutgerinnung Gerinnung und Lyse. Welche Rolle spielen außerdem die vielen anderen bekannten Anti-angiogene? Sind sie alle Faktoren einer physiologischen Gefäßbildung oder kommen einige von ihnen spezifisch bei unterschiedlichen Tumoren vor?

## **6 Zusammenfassung**

Die Angiogenese beschreibt einen entscheidenden Schritt für Tumorwachstum und Metastasierung. Die Tendenz, neue Blutgefäße zu bilden, wird durch das Gleichgewicht angiogener und nicht-angiogener Faktoren bestimmt. In einer Reihe eleganter tierexperimenteller Versuche gelang es O'Reilly erstmals einen tumorassoziierten Inhibitor der Angiogenese, den er Angiostatin nannte, nachzuweisen und zu isolieren.

Uns gelang es, im Western-Blot Angiostatin und Angiostatin-Spaltprodukte sowohl aus dem Urin von PCa-Patienten als auch aus dem Urin gesunder Probanden nachzuweisen und zu isolieren. Die anti-angiogene Wirksamkeit des von uns isolierten Proteins wurde im Endothelzellkultur-Assay bestätigt. Eine Differenzierung gesunder Personen von PCa-Patienten war aufgrund der kleinen Fallzahlen nicht möglich. Der Nachweis von Angiostatin bei Gesunden belegt aber, dass anti-angiogene Proteine unabhängig vom Vorhandensein maligner Tumore im Urin ausgeschieden werden. Es bleibt zu vermuten, dass Angiogenese-Inhibitoren ähnlich den Gerinnungsfaktoren bei Bedarf aktiviert und inaktiviert werden können. Der Angiogenese zugrunde liegende Mechanismen und beteiligte Faktoren sind Bestandteil intensiver Forschung. Unklar ist, ob Angiogenese-Inhibitoren in Zukunft in der Krebstherapie die Rolle spielen werden, die man ihnen bei ihrer Entdeckung zuschrieb.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
aFGF	acidic fibroblast growth factor
ASAP	atypical small acinar proliferation
bFGF	basic fibroblast growth factor
BPH	benigne Prostatahyperplasie
BPS	benignes Prostata-Syndrom
Ig	Immunglobulin
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
PAH	postatrophe Hyperplasie
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PCa	Prostatakarzinom
PD-ECGF	platelet-derived endothelial cell growth factor
PIN	prostatistische intraepitheliale Neoplasie
PSA	prostataspezifisches Antigen
Tab.	Tabelle
TGF	transforming growth factor
TNF	tumor necrosis factor
t-PA	tissue-type plasminogen activator
TRUS	transrektaler Ultraschall
TURP	transurethrale Resektion der Prostata
TVP	transvesikale Prostatektomie
u-PA	urokinase-type plasminogen activator
VEGF	vascular endothelial growth factor
VPF	vascular permeability factor, Synonym für VEGF

## 8 Literaturverzeichnis

- <sup>1</sup> Rutishauser G: Benigne Prostatahyperplasie. In: Wetterauer U, Rutishauser G, Sommerkamp H (Hrsg.): Urologie, Walter de Gruyter Verlag, Berlin, New York (1995): 181-193.
- <sup>2</sup> McNeal JE: Anatomy of the prostate: an historical survey of divergent views. *Prostate* (1980), 1: 3-13.
- <sup>3</sup> Weingärtner K: Angiogenese bei Prostatakarzinom und benigner Prostatahyperplasie. Habilitationsschrift, Würzburg (1999): 9.
- <sup>4</sup> Bartsch G: Benigne Prostatahyperplasie: Eine stromale Erkrankung. *Urologe A* (1989), 28: 321.
- <sup>5</sup> Mikuz G: Prostatahyperplasie. In: Böcker W, Denk H, Heitz PU (Hrsg.): Pathologie, Urban & Schwarzenberg Verlag, München, Wien, Baltimore (1997): 791-793.
- <sup>6</sup> Mikuz G: Prostatakarzinom. In: Böcker W, Denk H, Heitz PU (Hrsg.): Pathologie, Urban & Schwarzenberg Verlag, München, Wien, Baltimore (1997): 793-795.
- <sup>7</sup> Sommerkamp H: Prostatakarzinom. In: Wetterauer U, Rutishauser G, Sommerkamp H (Hrsg.): Urologie, Walter de Gruyter Verlag, Berlin, New York (1995): 225-234.
- <sup>8</sup> Carter BS, Bova GS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Isaacs WB, Walsh PC: Hereditary Prostate Cancer: Epidemiologic and Clinical Features. *J Urol* (1993), 150(3): 797-802.
- <sup>9</sup> Weingärtner K, Ramswamy A, Bittinger A, Gerharz EW, Vöge D, Riedmiller H: Anatomical basis for pelvic lymphadenectomy in prostate cancer: Results of an autopsy study and implications for the clinic. *J Urol* (1996), 156: 1969.
- <sup>10</sup> Wittekind Ch, Meyer HJ, Bootz F (Hrsg.): TNM Klassifikation maligner Tumoren, 6. Auflage, Springer Verlag, Berlin (2003): 172-175.
- <sup>11</sup> Hildebrandt H (Leitung): Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 257. Auflage, Walter de Gruyter Verlag, Berlin, New York (1994): 1247.

<sup>12</sup> Palmtag H, Goepel M, Berges R, Dreikorn K, Höfner K, Jonas U, Laval KU, Madersbacher S, Michel MC, Muschter R, Oelke M, Pientka L, Tschuschke C, Tunn U, Schalkhäuser K, Göckel-Beining B, Heidenreich A, Rübber H, Thon W, Thüroff J, Weidner W: Leitlinien der Deutschen Urologen zur Diagnostik des benignen Prostatasyndroms (BPS). *Urologe A* (2003), 42: 584-590.

<sup>13</sup> Miller K, Weißbach L (Hrsg.): Leitlinien zur Diagnostik von Prostatakarzinomen. *Urologe A* (1999), 38: 388-401.

<sup>14</sup> Catalona WJ, Richie JP, Ahmann FR, Scardino PT, Flanigan RC, deKernion JB, Ratloff TL, Kavoussi R, Dalkin BL: Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6630 men. *J Urol* (1994), 151: 1283-1290.

<sup>15</sup> Catalona WJ, Smith DS: 5-year tumor recurrence rates after anatomical radical retropubic prostatectomy for prostate cancer. *J Urol* (1994), 152: 1837-1842.

<sup>16</sup> Hammerer P, Huland H: Endosonographie der Prostata. *Urologe A* (1991), 30(6): 378-386.

<sup>17</sup> Lee F, Littrup PJ, Torp-Pedersen ST, Mettling C, McHugh TA, Gray JM, Kumasaka GH, McLeary RD: Prostate Cancer: comparison of transrectal US and digital rectal examination for screening. *Radiology* (1988), 168(2): 389-394.

<sup>18</sup> Miller K, Weißbach L (Hrsg.): Leitlinien zur Therapie von Prostatakarzinomen. *Urologe A* (1999), 38: 630-639.

<sup>19</sup> Kopecky AA, Laskowski TZ, Scott R: Radical retropubic prostatectomy in the treatment of prostatic carcinoma. *J Urol* (1970), 103: 641-644.

<sup>20</sup> Theiß M, Langer W, Hofmockel G, Frohmüller H: Radikale Prostatektomie als primäre Monotherapie bei kapselüberschreitendem Prostatakarzinom: 15-Jahres-Ergebnisse. *Urologe A* (1997), 36: 343-347.



- <sup>21</sup> Frohmüller H, Theiß M, Wirth M, Hofmockel G: 15-Jahres-Ergebnisse der radikalen Prostatektomie. *Urologe A* (1995), 34: 225-230.
- <sup>22</sup> Folkman J, Shing Y: Angiogenesis. *J Biol Chem* (1992), 267(16): 10931-10934.
- <sup>23</sup> Strohmeyer D, Strohmeyer T: Angiogenese: Grundlagen und Bedeutung bei urologischen Tumoren. *Urologe A* (1996), 35: 357-362.
- <sup>24</sup> Augustin HG, Braun K, Telemenakis I, Modlich U, Kuhn W: Ovarian angiogenesis: Phenotypic characterization of endothelial cells in a physiological model of blood vessel growth and regression. *Am J Pathol* (1995), 147(2): 339-351.
- <sup>25</sup> Folkman J: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* (1995), 1(1): 27-31.
- <sup>26</sup> Folkman J: What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?. *J Natl Cancer Inst* (1990), 82(1): 4-6.
- <sup>27</sup> Marme D: Tumor angiogenesis: the pivotal role of vascular endothelial growth factor. *World J Urol* (1996), 14(3): 166-174.
- <sup>28</sup> Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R: Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* (1991), 181(2): 902-906.
- <sup>29</sup> Folkman J: Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* (1971), 285: 1182-1186.
- <sup>30</sup> Folkman J: Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg* (1972), 175: 409-416.
- <sup>31</sup> Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* (1995), 146(5): 1029-1039.

- <sup>32</sup> Fidler IJ, Gersten DM, Hart IR: The biology of cancer invasion and metastasis. *Adv Cancer Res* (1978), 28: 149-250.
- <sup>33</sup> Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis – correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* (1991), 324(1): 1-8.
- <sup>34</sup> Folkman J: Angiogenesis and breast cancer. *J Clin Oncol* (1994), 12(3): 441-443.
- <sup>35</sup> Gasparini G, Harris AL: Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma: much more than a new prognostic tool. *J Clin Oncol* (1995), 13(3): 765-782.
- <sup>36</sup> Ellis LM, Fidler IJ: Angiogenesis and breast cancer metastasis. *Lancet* (1995), 346(8972): 388-390.
- <sup>37</sup> Wakui S, Furusato M, Itoh T, Sasaki H, Akiyama A, Kinoshita I, Asano K, Tokuda T, Aizawa S, Ushigome S: Tumour angiogenesis in prostatic carcinoma with and without bone marrow metastasis: a morphometric study. *J Pathol* (1992), 168(3): 257-262.
- <sup>38</sup> Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J: Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* (1993), 143(2): 401-409.
- <sup>39</sup> Brawer MK, Deering RE, Brown M, Preston SD, Bigler SA: Predictors of pathologic stage in prostatic carcinoma: The role of neovascularity. *Cancer* (1994), 73(3): 678-87.
- <sup>40</sup> Brawer MK: Quantitative microvessel density. A staging and prognostic marker for human prostatic carcinoma. *Cancer* (1996), 78(2): 345-349.
- <sup>41</sup> Barth PJ, Weingärtner K, Kohler HH, Bittinger A: Assessment of the vascularization in prostatic carcinoma: a morphometric investigation. *Hum Pathol* (1996), 27(12): 1306-1310.

- <sup>42</sup> Yamakazi K, Abe S, Takekawa H, Sukoh N, Watanabe N, Ogura S, Nakajima I, Isobe H, Inoue K, Kawakami Y: Tumor angiogenesis in human lung adenocarcinoma. *Cancer* (1994), 74(8): 2245-2250.
- <sup>43</sup> Angeletti CA, Lucchi M, Fontanini G, Mussi A, Chella A, Ribechini A, Vignati S, Bevilacqua G: Prognostic significance of tumoral angiogenesis in completely resected late stage lung carcinoma (stage IIIA-N2): Impact of adjuvant therapies in a subset of patients at high risk of recurrence. *Cancer* (1996), 78(3): 409-415.
- <sup>44</sup> Wiggins DL, Granai CO, Steinhoff MM, Calabresi P: Tumor angiogenesis as a prognostic factor in cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* (1995), 56(3): 353-356.
- <sup>45</sup> Hollingsworth HC, Kohn EC, Steinberg SM, Rothenberg ML, Merino MJ: Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma. *Am J Pathol* (1995), 147(1): 33-41.
- <sup>46</sup> Willis RA: Spread of tumours in the human body. London (1934): Butterworth & Co.
- <sup>47</sup> Murray C: Tumour dormancy: not so sleepy after all. *Nat Med* (1995), 1(2): 117-118.
- <sup>48</sup> Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J: Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* (1995), 1(2): 149-153.
- <sup>49</sup> Hanahan D, Folkman J: Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* (1996), 86(3): 353-364.
- <sup>50</sup> Folkman J: Tumor angiogenesis. In: Mendelsohn J et al.(Hrsg.): *The molecular basis of Cancer*, W. B. Saunders Company, Philadelphia (1995): 206.
- <sup>51</sup> Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D: Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* (1989), 339(6219): 58-61.
- <sup>52</sup> Folkman J: The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol* (1992), 3(2): 65-71.

<sup>53</sup> O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J: Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* (1994), 79(2): 315-328.

<sup>54</sup> Cao Y, Ji RW, Davidson D, Schaller J, Marti D, Söhdnel S, McCance SG, O'Reilly MS, Llinás M, Folkman J: Kringle domains of human angiostatin. *J Biol Chem* (1996), 271(46): 29461-29467.

<sup>55</sup> Ji, WR, Castellino FJ, Chang Y, Deford ME, Gray H, Villarreal X, Kondri ME, Marti DN, Llinás M, Schaller J, Kramer RA, Trail PA: Characterization of kringle domains of angiostatin as antagonists of endothelial cell migration, an important process in angiogenesis. *FASEB J* (1998), 12(15): 1731-1738.

<sup>56</sup> Cao R, Wu HL, Veitonmäki N, Linden P, Farnebo J, Shi GY, Cao Y: Suppression of angiogenesis and tumor growth by the inhibitor K1-5 generated by plasmin-mediated proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* (1999), 96: 5728-5733.

<sup>57</sup> Cao Y, Chen A, An SSA, Ji RW, Davidson D, Cao Y, Llinás M: Kringle 5 of plasminogen is a novel inhibitor of endothelial cell growth. *J Biol Chem* (1997), 272(36): 22924-22928.

<sup>58</sup> Lu H, Dhanabal M, Volk R, Waterman MJF, Ramchandran R, Knebelmann B, Segal M, Sukhatme VP: Kringle 5 causes cell cycle arrest and apoptosis of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* (1999), 258: 668-673.

<sup>59</sup> Gately S, Twardowski P, Stack MS, Patrick M, Boggio L, Cundiff DL, Schnaper HW, Madison L, Volpert O, Bouck N, Enghild J, Kwaan HC, Soff GA: Human prostate carcinoma cells express enzymatic activity that converts human plasminogen to the angiogenesis inhibitor, angiostatin. *Cancer Res* (1996), 56(21): 4887-4890.

<sup>60</sup> O'Mahony CA, Seidel A, Albo D, Chang H, Tuszynski GP, Berger DH: Angiostatin generation by human pancreatic cancer. *J Surg Res* (1998), 77(1): 55-58.

- <sup>61</sup> Kisker O, Onizuka S, Banyard J, Komiyama T, Becker CM, Achilles EG, Barnes CM, O'Reilly MS, Folkman J, Pirie-Shepherd SR: Generation of multiple angiogenesis inhibitors by human pancreatic cancer. *Cancer* (2001), 61: 7298-7304.
- <sup>62</sup> Westphal JR, Hullenaar RV, Geurts-Moespot A, Sweep FCJG, Verheuen JH, Bussemakers MMG, Askaa J, Clemmensen I, Eggermont AAM, Ruiter DJ, de Waal RMW: Angiostatin generation by human tumor cell lines: involvement of plasminogen activators. *Int J Cancer* (2000), 86: 760-767.
- <sup>63</sup> Gately S, Twardowski P, Stack MS, Cundiff DL, Grella D, Castellino FJ, Enghild J, Kwaan HC, Lee F, Kramer RA, Volpert O, Bouck N, Soff G: The mechanism of cancer-mediated conversion of plasminogen to the angiogenesis inhibitor angiostatin. *Proc Natl Acad Sci USA* (1997), 94: 10868-10872.
- <sup>64</sup> Morikawa W, Yamamoto K, Ishikawa S, Takemoto S, Ono M, Fukushi J, Naito S, Nozaki C, Iwanaga S, Kuwano M: Angiostatin generation by cathepsin D secreted by human prostate carcinoma cells. *J Biol Chem* (2000), 275(49): 38912-38920.
- <sup>65</sup> O'Reilly MS, Wiederschain D, Stetler-Stevenson WG, Folkman J, Moses MA: Regulation of angiostatin production by matrix metalloproteinase-2 in a model of concomitant resistance. *J Biol Chem* (1999), 274(41): 29568-29571.
- <sup>66</sup> Lijnen HR, Uguw F, Bini A, Collen D: Generation of angiostatin-like fragment from plasminogen by stromelysin-1 (MMP-3). *Biochemistry* (1998), 37: 4699-4702.
- <sup>67</sup> Patterson BC, SangQA: Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9). *J Biol Chem* (1997), 272(46): 28823-28825.
- <sup>68</sup> Dong Z, Kumar R, Yang X, Fidler IJ: Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma. *Cell* (1997), 88(6): 801-810.
- <sup>69</sup> Stathakis P, Fitzgerald M, Matthias LJ, Chesterman CN, Hogg PJ: Generation of angiostatin by reduction and proteolysis of plasmin. *J Biol Chem* (1997), 272(33): 20641-20645.

- <sup>70</sup> Stathakis P, Lay AJ, Fitzgerald M, Schlieker C, Matthias LJ, Hogg PJ: Angiostatin formation involves disulfide bond reduction and proteolysis in kringle 5 of plasmin. *J Biol Chem* (1999), 274(13): 8910-8916.
- <sup>71</sup> Heidtmann HH, Nettelbeck DM, Mingels A, Jager R, Welker HG, Kontermann RE: Generation of angiostatin-like fragments from plasminogen by prostate-specific antigen. *Br J Cancer* (1999), 81(8): 1269-1273.
- <sup>72</sup> O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J: Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* (1997), 88: 277-285.
- <sup>73</sup> Dhanabal M, Ramchandran R, Waterman MJF, Lu H, Knebelmann B, Segal M, Sukhatme VP: Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem* (1999), 274(17): 11721-11726.
- <sup>74</sup> Shichiri M, Hirata Y: Antiangiogenesis signals by endostatin. *FASEB J* (2001), 15: 1044-1053.
- <sup>75</sup> Clapp C, Martial JA, Guzman RC, Rentier-Delure F, Weiner RI: The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology* (1993), 133: 1292-1299.
- <sup>76</sup> O'Reilly MS, Pirie-Shepherd S, Lane WS, Folkman J: Antiangiogenic activity of the cleaved conformation of the serpin antithrombin. *Science* (1999), 285: 1926-1928.
- <sup>77</sup> Pike SE, Yao L, Jonse KD, Cherney B, Appella E, Sakaguchi K, Nakhasi H, Teruya-Feldstein, Wirth P, Gupta G, Tosato G: Vasostatin, a calreticulin fragment inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. *J Exp Med* (1998), 188: 2349-2356.
- <sup>78</sup> Ramchandran R, Dhanabal M, Volk R, Waterman WJ, Segal M, Lu H, Knebelman B, Sukhatme VP: Antiangiogenic activity of restin, NC10 domain of human collagen XV: comparison to endostatin. *Biochem Biophys Res Commun* (1999), 255: 735-739.

- <sup>79</sup> Colorado PC, Torre A, Kamphaus G, Maeshima Y, Hopfer H, Takahashi K, Volk R, Zamborsky ED, Herman S, Sarkar PK, Ericksen EM, Dhanabal M, Simons M, Post M, Kufe DW, Weichselbaum RR, Sukhatme VP, Kalluri R: Anti-angiogenic clues from vascular basement membrane collagen. *Cancer Res* (2000), 60: 2520-2526.
- <sup>80</sup> Kamphaus GD, Colorado PC, Panka DJ, Hopfer H, Ramchandran R, Torre A, Maeshima Y, Mier JW, Sukhatme VP, Kalluri R: Canstatin, a novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Biol Chem* (2000), 275: 1209-1215.
- <sup>81</sup> Maeshima Y, Colorado PC, Kalluri R: Two RGD-independent alpha vbeta 3 integrin binding sites on Tumstatin regulate distinct anti-tumor properties. *J Biol Chem* (2000), 275: 23745-23750.
- <sup>82</sup> Cao Y: Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications. *Int J Biochem Cell Biol* (2001), 33: 357-369.
- <sup>83</sup> Migita T, Oda Y, Naito S, Morikawa W, Kuwano M, Tsuneyoshi M: The accumulation of angiostatin-like fragments in human prostate carcinoma. *Clin Cancer Res* (2001), 7: 2750-2756.
- <sup>84</sup> Anderson DJ, Blobel G: Immunoprecipitation of proteins from cell-free translations. *Methods Enzymol* (1983), 96: 111-120.
- <sup>85</sup> Firestone GL, Winguth SD: Immunoprecipitation of proteins. *Methods Enzymol* (1990), 182: 688-700.
- <sup>86</sup> Kessler SW: Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A-antibody adsorbent: parameters of the interaction antibody-antigen complexes with protein A. *J Immunol* (1975), 115(6): 1617-1624.
- <sup>87</sup> Goding JW: Use of staphylococcal protein A as an immunological reagent. *J Immunol Methods* (1978), 20: 241-253.

- <sup>88</sup> Kessler SW: Use of protein A-bearing staphylococci for the immunoprecipitation and isolation of antigens from cells. *Methods Enzymol* (1981), 73(Pt B): 442-459.
- <sup>89</sup> Moks T, Abrahmsen L, Nilsson B, Hellman U, Sjoquist J, Uhlen M: Staphylococcal protein A consists of five IgG-binding domains. *Eur J Biochem* (1986), 156(3): 637-643.
- <sup>90</sup> Sten-Linder M, Linder C, Strander H, Munck-Wikland E, Wersäll P, Linder S, Wiman B: Angiostatin fragments in urine from patients with malignant disease. *Anticancer Res* (1999), 19: 3409-3414.
- <sup>91</sup> Cao Y, Veitonmäki N, Keough K, Cheng H, Lee LS, Cao Y, Zurakowski D: Elevated levels of urine angiostatin and plasminogen/plasmin in cancer patients. *Int J Mol Med* (2000), 5: 547-551.
- <sup>92</sup> O'Reilly MS, Rosenthal R, Sage EH, Smith S, Holmgren L, Moses M, Shing Y, Folkman J: The suppression of tumor metastases by a primary tumor. *Surg Forum* (1993), 44: 474-476.
- <sup>93</sup> Parangi S, O'Reilly MS, Christofori G, Holmgren L, Grosfeld J, Folkman J, Hanahan D: Antiangiogenic therapy of transgenic mice impairs de novo tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* (1996), 93: 2002-2007.
- <sup>94</sup> Bergers G, Javaherian K, Lo KM, Folkman J, Hanahan D: Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. *Science* (1999), 284: 808-812.
- <sup>95</sup> Hahnfeldt P, Panigrahy D, Folkman J, Hlatky L: Tumor development under angiogenic signaling: a dynamical theory of tumor growth, treatment response, and postvascular dormancy. *Cancer Res* (1999), 59: 4770-4775.
- <sup>96</sup> Teicher BA, Sotomayor EA, Huang ZD: Antiangiogenic agents potentiate cytotoxic cancer therapies against primary and metastatic disease. *Cancer Res* (1992), 52: 6702-6704.
- <sup>97</sup> Teicher BA, Holden SA, Ara G: Potentiation of cytotoxic cancer therapies by TNP-470 alone and with other anti-angiogenic agents. *Int J Cancer* (1994), 57: 920-925.



<sup>98</sup>Browder T, Butterfield CE, Kräling BM, Shi B, Marshall B, O'Reilly MS, Folkman J: Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res* (2000), 60: 1878-1886.

<sup>99</sup> Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS: Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* (1997), 390: 404-407.

<sup>100</sup> Folkman J: Looking for a good endothelial address. *Cancer Cell* (2002): 113-115.

<sup>101</sup> Zetter BR: Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu Rev Med* (1998), 49: 407-424.

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die das Zustandekommen dieser Arbeit ermöglicht haben und bei all jenen, die mich unterstützt haben.

Herrn Priv.-Doz. Dr. K. Weingärtner danke ich herzlich für die Überlassung des Themas. Durch seine Geduld und die Tatsache, dass er stets für meine Fragen und Anliegen ansprechbar war, war es mir möglich, selbständig zu arbeiten und einen Einblick in die Welt des wissenschaftlichen Arbeitens zugewinnen.

Herrn Prof. Dr. A. Marx danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Mein besonderer Dank gilt Frau Barbara Dexler, der Medizinisch-technischen Assistentin des wissenschaftlichen Labors der Urologischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg. Durch ihre große Erfahrung und ihr umfangreiches Wissen im Bereich der Laborarbeit sowie durch ihre herzliche und geduldige Unterstützung trug sie entscheidend zum Gelingen des experimentellen Teils bei.

Nicht zuletzt möchte ich in besonderem Maße meiner Verlobten und meiner Familie danken: die es mir ermöglicht haben, Medizin zu studieren und diese Dissertation anzufertigen. Ohne ihre aufbauenden Worte und ihren Rückhalt wäre ein Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Dafür ein herzliches Dankeschön!

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name	Bernhard Partzsch
Geburtsdatum	18. November 1975
Geburtsort	Neuburg/Donau
Konfession	katholisch
Familienstand	ledig

## Schulausbildung

09/1982 - 07/1986	Volksschule Oberhausen
09/1986 - 06/1995	Descartes-Gymnasium Neuburg/Donau Abschluss: Abitur, Note 1,5

## Zivildienst

07/1995 - 07/1996	Krankenpflege an den Kliniken St. Elisabeth Neuburg/Donau
-------------------	---

## Hochschulausbildung

10/1996 - 09/1998	Vorklinisches Studium an der Universität Regensburg
10/1998 - 09/2001	Klinisches Studium an der Universität Würzburg
10/2001 - 09/2002	Praktisches Jahr
10/2002	Abschluss des Studiums

## Praktische Erfahrung

03/1999 - 04/1999	Famulatur, Abteilung Chirurgie, Missionsärztliche Klinik Würzburg
09/1999 - 10/1999	Famulatur, Pathologisches Institut, Universität Würzburg
03/1999 - 04/1999	Famulatur, Abteilung Innere Medizin, Juliusspital Würzburg
03/2001 - 04/2001	Famulatur, Allgemeinmedizinische Praxis Dr. Heppner, Würzburg
10/2001 - 02/2002	1. Terial des Praktischen Jahres, Innere Medizin, Medizinische Universitätsklinik Würzburg
02/2002 - 06/2002	2. Terial des Praktischen Jahres, Pathologie, Pathologisches Institut der Universität Würzburg
06/2002 - 09/2002	3. Terial des Praktischen Jahres, Chirurgie, Chirurgische Universitätsklinik Würzburg

### **Beruflicher Werdegang**

05/2003 – 09/2004    Arzt im Praktikum in der Medizinischen Klinik II des Klinikums  
Ingolstadt

10/2004 – jetzt        Assistenzarzt in der Medizinischen Klinik II des Klinikums Ingolstadt

Ehekirchen, 12. Oktober 2004

Bernhard Partzsch