

## **2 Literaturübersicht**

### **2.1 Kolorektalkarzinom des Menschen**

Das kolorektale Karzinom ist in Deutschland mit einer Inzidenz von 25 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohnern und Jahr das häufigste Karzinom des Gastrointestinaltraktes des Menschen (8). Absolut gesehen ist es das zweithäufigste Karzinom sowohl des Mannes als auch der Frau. 12,4 % bzw. 16,2 % der Krebstodesfälle bei Männern bzw. Frauen sind auf ein Kolorektalkarzinom zurückzuführen, in der Statistik hinter dem Bronchialkarzinom bzw. Mammakarzinom liegend (8).

Ein häufig schwerwiegendes Problem stellt die hämatogene Fernmetastasierung der Primärtumoren in die Leber dar, der Verlauf und die Prognose der Erkrankung werden wesentlich durch das Vorhandensein bzw. Neuauftreten von Lebermetastasen bestimmt. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eines kolorektalen Karzinoms liegen bei 10 bis 30 % der Patienten synchron Lebermetastasen vor, und über 50 % der Patienten entwickeln im weiteren Verlauf der Erkrankung Lebermetastasen. (34, 52, 116). Aus Autopsiestatistiken ist zu entnehmen, dass 60-90 % der Patienten, die an einem kolorektalen Karzinom versterben, Lebermetastasen aufweisen (116, 27) und dass ein Viertel der Patienten mit Lebermetastasen an einem Leberausfall versterben (93).

### **2.2 Kolorektale Lebermetastasen**

Den Hauptweg der hämatogenen Metastasierung kolorektaler Karzinome in die Leber stellt die Pfortader dar (27). Die Feststellung, dass die Leber ein erstes Filterorgan für zirkulierende gastrointestinale Tumorzellen und somit ein Erstmanifestationsort für Metastasen darstellt, wurde bereits 1948 von WALTHER et al. postuliert (128). Der „Kaskadentheorie“ zu Folge findet zunächst keine weitere Metastasierung in andere Organe statt, und die Metastasen bleiben für längere Zeit lokal auf die Leber beschränkt (124).

NANKO et al. konnten bei intrahepatischen Makrometastasen ein invasives Wachstum in angrenzende Gefäße einschliesslich der Gallengänge nachweisen, das als Entstehung intrahepatischer Satellitenmetastasen anzusehen ist. Die Autoren definieren Rezidivmetastasen mit einem Durchmesser von bis zu einem Millimeter, die mindestens einen Millimeter von den intrahepatischen Makrometastasen entfernt sind, als Mikrometastasen (85). Nach der UICC (International Union Against Cancer) werden Mikrometastasen als Metastasen definiert, die 0,2 cm oder kleiner sind. Metastasen zeichnen sich durch ihre

Eigenschaften zur Proliferation oder Stromareaktion aus (119). Die Häufigkeit an Mikrometastasen sowie deren Abstand zu der Makrometastase korrelierten dabei mit dem Volumen der Makrometastase (85).

Klinisch sind diese okkulten Mikrometastasen mit Hilfe moderner bildgebender Verfahren (Sonographie, Computertomographie, Magnetresonanztomographie) nicht darstellbar, da der Nachweis fokaler Leberläsion beim Menschen erst ab einem Durchmesser von etwa einem Zentimeter gelingt (2).

Die mittlere Überlebenszeit von Patienten mit unbehandelten kolorektalen Lebermetastasen beträgt 3 bis 24 Monate (52, 25, 35, 111, 127) und die 5-Jahres-Überlebensrate wird mit 1 bis 3% angegeben (111, 47). Dabei sind prognoserelevante Faktoren für den Spontanverlauf von Lebermetastasen der prozentuale Anteil des Tumors am Lebergesamtvolumen (<25 % oder >25 %), der Differenzierungsgrad des Primärtumors (GI oder GIII), das Vorliegen extrahepatischer Metastasen und die Tumormanifestation mesenterialer Lymphknoten (111).

Therapeutische Konzepte zur Behandlung von Lebermetastasen, wie die systemische oder lokoregionäre Chemotherapie (56, 114) die lokoregionäre Chemoembolisation (10) in Verbindung mit der SIR Therapie (selective internal radiation) (38), die externe und interne Strahlentherapie (26, 108), die Desarterialisation der Leber (9), die Cryotherapie (19), die Alkoholinstillation (4, 63) und die Tumorperfusion mit erhitztem Blut (11) konnten jedoch die Prognose der Patienten nur unzureichend verbessern.

### **2.3 Standardbehandlung von Lebermetastasen**

Bei der Therapie kolorektaler Lebermetastasen ist derzeit die chirurgische Resektion das einzige Verfahren mit potentiell kurativer Intention (73). Unter Berücksichtigung prognoserelevanter Faktoren resultiert ein 5-Jahres Überleben von bis zu 38 % der Operierten (75, 105). Mittlerweile sogar ein 10-Jahres Überleben von bis zu 22 % (33).

Das schwerwiegendste klinische Problem aber bei der chirurgischen Resektion ist, dass trotz kompletter R0-Resektion der Lebermetastasen 40-50 % der Patienten ein intrahepatisches Tumorrezidiv erleiden (48, 90, 20, 106). Nach heutigem Kenntnisstand sind Mikrometastasen die Ursache, welche in bis zu 56 % der Fälle zum Zeitpunkt der Metastasen-Resektion intrahepatisch nachweisbar sind (32). Obwohl intrahepatische Tumorzellen als sogenannte „dormant cells“ (28) über Jahre klinisch inapparent sein können, werden annähernd 80 % der intrahepatischen Rezidive innerhalb der ersten zwei Jahre nach vorausgegangener chirurgischer Resektion klinisch manifest. Neben der deutlich verkürzten statistischen Tumorverdopplungszeit (76) spricht diese epidemiologische Beobachtung dafür, dass die

chirurgische Resektion selbst das Wachstum von Mikrometastasen beeinflusst. Experimentell ist der Effekt eines beschleunigten Tumorwachstums von Lebermetastasen im Zusammenhang mit einer chirurgischen Resektion wiederholt gezeigt worden (123, 23, 98, 109, 129). In den meisten Studien, die diesen Sachverhalt untersuchten, wurden Lebermetastasenmodelle verwendet, bei denen die Tumorzellen direkt in die Pfortader injiziert wurden. Hierbei konnte ein signifikant beschleunigtes Wachstum diffuser Lebermetastasen beobachtet werden, wenn gleichzeitig eine chirurgische Resektion von gesundem Leberparenchym durchgeführt wurde. Dieser Effekt war sowohl nachweisbar, wenn die intraportale Tumorzell-Injektion vor der Resektion (23) als auch danach erfolgte (129). Ein signifikant beschleunigtes Tumorwachstum war bereits nachweisbar, wenn lediglich 35 % des gesunden Parenchyms reseziert wurden (129).

Aufgrund dieser experimentellen Daten und der o.a. epidemiologischen Beobachtungen hinsichtlich der Entstehung von Rezidivmetastasen nach vorausgegangener chirurgischer Resektion humaner Lebermetastasen, begründet sich die Suche nach neuen alternativen Behandlungsverfahren zur Therapie kolorektaler Lebermetastasen.

## **2.4 Rolle der extrazellulären Matrix und MMPs bei der Metastasierung**

Die extrazelluläre Matrix (EZM) setzt sich im wesentlichen aus Kollagenen und strukturellen Glykoproteinen, Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen zusammen.

Kollagen ist ein extrazelluläres Protein, das aus unlöslichen Fasern mit grosser Zugfestigkeit aufgebaut ist. Diese Eigenschaften ermöglichen es dem Kollagen, seine Rolle als mechanisch am stärksten zu beanspruchende Komponente des Bindegewebes und fibröser Matrix zu übernehmen (125). Kollagen stellt nahezu 90 % der organischen Matrix dar. Die Familie der Kollagene wird in solche unterteilt, die Fibrillen bilden, und die nichtfibrillären Kollagene, zu denen die Basalmembran-, kurzkettigen und fibrillenassoziierten Kollagene zählen. Die Haupttypen I, II und III (90 % aller Körper-Kollagene) sind die interstitiellen Kollagene, die durch Parallelanlagerung Fibrillen bilden. Jeweils drei sog.  $\alpha$ -Ketten lagern sich zu einer Tripelhelix zusammen. Andere Kollagene besitzen davon abweichende Strukturen.

Typ IV-Kollagen ist für Basalmembranen spezifisch, d.h. für die extrazellulären Strukturen, die unter den meisten Epithel- und Endothelzellschichten liegen oder Muskeln, Nerven und glatte Muskelzellen umgeben. Ihre Funktion liegt in der Erhaltung der Architektur der Zellschichten, als Molekularsieb, als Barriere für den Durchtritt von Entzündungs- oder Tumorzellen und als Substrat für die Zelladhäsion, -wachstum und Differenzierung.

Wahrscheinlich werden die einzelnen Funktionen durch die unterschiedlichen Typ IV- $\alpha$ -Ketten vermittelt. Die Fibrillen lagern sich nicht parallel zueinander an, sondern bilden geflechtartige Strukturen, das sog. Kollagen Typ IV-Netzwerk (66).

Über ihre architekturelle Funktion als Gerüst und Leitstruktur hinaus beeinflusst die EZM multiple weitere biochemische Prozesse, wie die Proliferation, Differenzierung und das Migrationsverhalten von Zellen. Die Synthese und Degradation der EZM selbst wird durch ein kompliziertes Zusammenspiel gegensätzlicher Enzyme und Inhibitoren reguliert. Dabei wird die Degradation von EZM hauptsächlich über Matrixmetalloproteinasen (MMPs) vermittelt, welche wiederum durch physiologische Inhibitoren (Tissue Inhibitors of Matrixmetalloproteinasen = TIMPs) in ihrer Aktivität kontrolliert werden (31). Wobei die TIMPs nicht nur die Invasion, sondern auch das Zellwachstum regulieren (45).

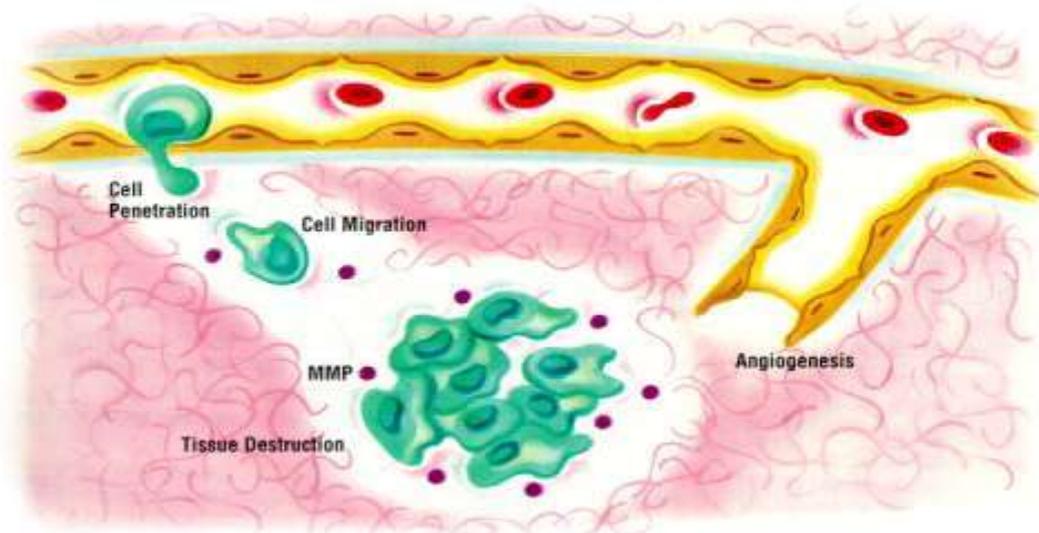
Eine entscheidende Rolle spielt also die differenzierte Regulation der EZM bei der Metastasierung und Invasion von Tumorzellen (54, 83, 50, 41), wobei MMPs in einer Vielzahl von malignen Tumoren vermehrt exprimiert werden und diese vermehrte Expression mit einer Tumoraggressivität und erhöhten Metastasierungspotential assoziiert ist (18, 55, 99, 57). Beispielsweise zeigen Untersuchungen an Patienten mit kolorektalem Karzinom, dass eine erhöhte mRNA-Expression von MMP-1 im Tumor mit einer schlechteren Prognose in Bezug auf das Überleben verbunden ist (46). Andere Untersuchungen am Menschen zeigten, dass beim kolorektalen Karzinom eine erhöhte Expression von MMP-2 und -9 im Primärtumor mit einer vermehrten Lebermetastasierung assoziiert ist (126). Aufgrund dieser onkologischen Bedeutung der EZM bestand grosses Interesse in Design und Auswertung von MMP-Inhibitoren als onkologisches Therapeutikum (24, 130, 14). Es wurden verschiedene synthetische MMP-Inhibitoren entwickelt, welche bereits bei unterschiedlichen Tumorerkrankungen erfolgreich therapeutisch eingesetzt werden konnten (107, 134).

MMPs	Beschreibender Name	MMP Familie	Substrat
MMP-1	Collagenase-1	Kollagenasen	Kollagene Typ I, II, III, VII, X
MMP-2	Gelatinase A	Gelatinasen	Gelatin Typ I, IV, V, X, Laminin V
MMP-3	Stromelysin 1	Stromelysine	Kollagene Typ III, IV, IX, Gelatin, Laminin, Proteoglykane
MMP-7	Matrilysin	Stromelysine	Gelatin, Fibronectin
MMP-8	Collagenase-2	Kollagenasen	Kollagene Typ I, II, III, VII, X
MMP-9	Gelatinase B	Gelatinasen	Gelatin Typ I, IV, V, X, Laminin V
MMP-10	Stromelysin 2	Stromelysine	Kollagene Typ III, IV, IX, Gelatin, Laminin, Proteoglykane
MMP-11	Stromelysin 3	Stromelysine	$\alpha$ -1-Antiprotease
MMP-12	Metalloelastase	Stromelysine	Elastin
MMP-13	Collagenase-3	Kollagenasen	Kollagene Typ I, II, III, VII, X
MMP-14	MT1-MMP	membrane-type MMPs	pro-MMP-2, Gelatin, Kollagene
MMP-15	MT2-MMP	membrane-type MMPs	pro-MMP-2
MMP-16	MT3-MMP	membrane-type MMPs	pro-MMP-2
MMP-17	MT4-MMP	membrane-type MMPs	unbekannt
MMP-18	Collagenase-4 (no human homologue)	Kollagenasen	fibrilläre Kollagene
MMP-19	RASI-1, MMP-18 <sup>a</sup>	Kollagenasen	Gelatin
MMP-20	Enamelysin	nicht klassifiziert	unbekannt
MMP-21	Homologue of Xenopus XMMP	nicht klassifiziert	unbekannt
MMP-23	Cystein array MMP	membrane-type II	unbekannt
MMP-24	MT5-MMP	membrane-type MMPs	unbekannt
MMP-25	MT6-MMP	membrane-type MMPs	unbekannt
MMP-26	Matrilysin 2	Stromelysine	unbekannt
MMP-27	keinen	nicht klassifiziert	unbekannt
MMP-28	Epilysin	nicht klassifiziert	unbekannt

**Tabelle 1:** Diese Tabelle zeigt die Klassifikation aller bisher bekannten MMPs mit ihren Synonymen, Familien, sowie ihrer Substrate (80, 46, 54, 88). Im humanen kolorektalen Tumor werden hauptsächlich MMP-1, -2, -3, -7, -9 und -11 exprimiert (88).

TIMPs	Spezies	Inhibition von MMPs / Bindung an proMMPs	Effekte in versch. Stadien der Tumor Progression und Promotion
TIMP-1	Mensch, Kaninchen, Maus, Ratte, Rind, Schaf, Affe	+ / Progelatinase B (proMMP-9)	Hemmung von Matrigel/ECM Invasion und des Wachstums von Endothelzellen in vitro, experimenteller Metastasierung und des Wachstums des Primärtumors in vivo, sowie etablierter Metastasen und der Angiogenese in vivo
TIMP-2	Mensch, Kaninchen, Maus, Ratte, Rind, Schaf	+ / Progelatinase A (proMMP-2)	Hemmung von Matrigel/ECM Invasion und lokaler Invasion in vitro, des Wachstums von Tumorzellen in Kollagengel und Endothelzellen in vitro, des Wachstums von Primärtumoren und der Angiogenese in vivo
TIMP-3	Mensch, Maus, Ratte, Huhn	+ / Progelatinase A+B (proMMP-2 und -9)	Hemmung des Wachstums von Primärtumoren und der Angiogenese in vivo
TIMP-4	Mensch, Maus	+ / Progelatinase A (proMMP-2)	Hemmung des Wachstums von Tumorzellen

**Tabelle 2:** Die oben aufgeführte Tabelle zeigt die vier Mitglieder der TIMP Familie (Tissue Inhibitors of Matrixmetalloproteinasen), welche bisher in versch. Spezies charakterisiert wurden mit ihren jeweiligen Effekten auf die Tumorentwicklung (45, 61).



**Abbildung 1:** Diese Abbildung zeigt, wie die Tumorzellen in der Blutbahn angeschwemmt werden, diese dann mit Hilfe von MMPs verlassen und in das Gewebe eindringen. Dargestellt ist ausserdem die Bildung von neuen Blutgefässen (Angiogenese), welche notwendig sind, die neugebildeten Tumorzellen mit Nährstoffen zu versorgen und damit eine Vergrößerung des Tumors ermöglichen (Quelle: R&D Systems).

## 2.5 Aktinonin und andere MMP-Inhibitoren

TIMPs sind ein physiologischer Kontrollmechanismus, um die Funktion von MMPs zu regulieren. Studien mit TIMP Molekülen bereiteten die Grundlage für die Entwicklung von synthetischen MMP-Inhibitoren für eine onkologische Therapie (54).

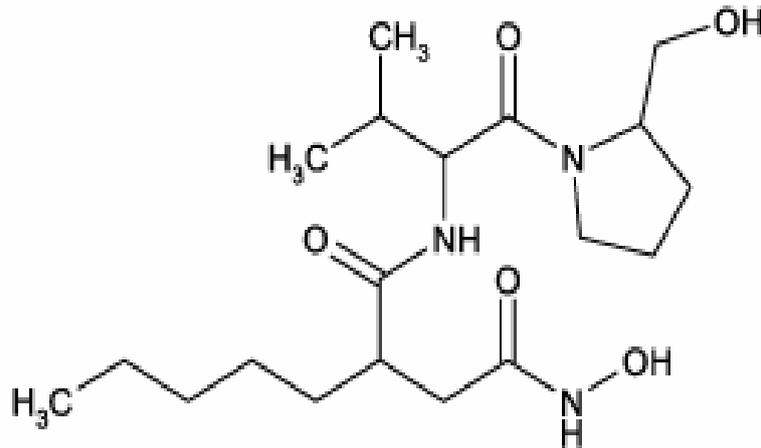
Experimente mit rekombinantem TIMP-1 haben gezeigt, dass rTIMP-1 die Invasion von Tumorzellen durch die amniotische Membran hemmt (3). Bei Mäusen, denen metastasierende B16 Melanomzellen injiziert wurden, hemmte rTIMP-1 die Formation von Lungenmetastasen (3). Mit einer Änderung des MMP-TIMP-Verhältnisses, könnte also die invasive und metastasierende Fähigkeit von Tumorzellen geändert werden.

Zwei der Prototypen der MMP-Inhibitoren sind Batimastat<sup>®</sup> und Marimastat<sup>®</sup>. Beide besitzen eine hohe Aktivität gegen die meisten MMPs (54).

1964 entdeckten Ollis et al. einen antibiotischen Effekt von Aktinonin (91) und 1985 wurde von Umezawa et al. die Funktion als Aminopeptidase N (APN)-Inhibitor nachgewiesen (122). Anti-Aminopeptidase N, fähig die Aminopeptidaseaktivität zu hemmen, kann die Degradation und Invasion von EZM durch Tumorzellen unterdrücken (103).

In vitro Versuche zeigten ausser einem inhibitorischen Effekt auf Aminopeptidase N, einen stark hemmenden Effekt von Aktinonin auf MMP-2 und MMP-9 (36).

Darüber hinaus zeigte Aktinonin sich *in vitro* cytotoxisch gegenüber Tumorzelllinien. Es bewies antiproliferative Effekte auf humane und mäuseartige Leukämie- und Lymphomzellen (133). Auch ein analgetischer Effekt liess sich dem Aktinonin nachweisen – als potenter Inhibitor von Enkephalin abbauenden Enzymen (42). Dies bestätigten auch Branislav et al. Sie fanden heraus, dass Aktinonin einige Enzyme die an der Hydrolyse von Enkephalinen beteiligt sind, beeinflusst, und somit die Degradation der Enkephaline verhindert (51).



**Abbildung 2: Aktinonin** = 3-[[1-[(2-(Hydroxymethyl)-1-pyrrolidinyl)carbonyl]-2-methylpropyl] carbamoyl] octanohydroxamic acid.

Peptid, Antibiotikum des Actinomyceten-Stamms Streptomyces.

(Quelle: www.alexis-corp.com)