

6 Diskussion

6.1 RT-PCR (Expression von MMPs in humanen und Rattentumorzelllinien)

Zur Überprüfung des Expressionsprofils von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und deren natürlichen Inhibitoren (TIMPs = tissue inhibitors of metalloproteinases) bei den CC 531-Tumorzellen wurde eine RT-PCR durchgeführt. Hierfür wurde zuerst RNA aus den Tumorzellen isoliert, mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und anschliessend eine PCR mit genspezifischen Primern durchgeführt. Ausgewertet wurde das Ergebnis mit Hilfe einer Gelelektrophorese.

Das Ergebnis zeigte, dass die Rattentumorzelllinie CC 531 MMP-9 und TIMP-1 exprimiert, jedoch nicht MMP-2.

MMP-2 wird aber im humanen Kolorektalkarzinom exprimiert. So wiesen zum Beispiel Grigioni et al. mittels Immunhistochemie und in situ Hybridisierung die Präsenz von Gelatinase A (MMP-2) und MMP-2 messenger RNA (mRNA) in 30 malignen Tumoren, darunter 10 Kolorektalkarzinome, nach. Exprimiert wurden MMP-2 und MMP-2 mRNA sowohl in neoplastischen Epithelzellen, als auch in Bindegewebszellen (Stromazellen), was auf eine spezifische Rolle der Bindegewebszellen in der Tumorzellinvasion schliessen lässt (40).

In einer anderen Studie wurde MMP-2 mRNA hauptsächlich in den Mesenchymalzellen gefunden, obwohl man eigentlich die Lokalisation dieser überwiegend in Tumorepithelzellen erwartet hatte. Man nahm daher an, dass Bindegewebszellen in der Lage sind Metalloproteinasen zu synthetisieren, die sich zusammen mit den neoplastischen Epithelzellen an Gewebeumbildung und Zerstörung der Basalmembran aktiv beteiligen (95).

Dies bestätigten auch Pyke et al., die mittels in situ Hybridisierung 2 Typ-IV-Kollagenasen im humanen Kolorektalkarzinom nachwiesen. Auch hier befand sich die messenger-RNA hauptsächlich im Stroma, welches das invasive Tumorgewebe umgab (96).

Auch MMP-9 wird im humanen Kolorektalkarzinom exprimiert. Mittels Northern blot und Western blot wurde eine vermehrte Expression von MMP-9 im Kolorektalkarzinom nachgewiesen und mittels in situ Hybridisierung und Immunhistochemie konnte nachgewiesen werden, dass die MMP-9 mRNA im Tumorstroma synthetisiert wird. Die Produktion von MMP-9 wird also möglicherweise durch Interaktion der Tumor-Bindegewebszellen kontrolliert (137).

Eine andere Studie berichtet, dass die Expression von MMP-9 Rezeptoren, welche in der Tumorzellinvasion und Metastasierung involviert sind, überwiegend von Immun- und Entzündungszellen im humanen Kolorektalkarzinom exprimiert werden und der Grad der Expression sich umgekehrt zur Lebermetastasierung und infiltrativen Wachstum verhält (115).

Desweiteren findet man im humanen Kolorektalkarzinom MMP-1 im Stroma (82), MMP-3 (Stromelysin-1) ebenfalls im Stroma (37), MMP-7 (Matrilysin) im Tumorepithel (74) und zuletzt noch MMP-11 (Stromelysin-3) im Stroma, dessen Expression allerdings nur tumor-induziert, aber kein tumorspezifisches Phänomen zu sein scheint (118).

MMP-2 und -9 sind ausserhalb des Kolorektalkarzinoms noch in weiteren humanen Tumoren zu finden. So z.B. im Mammar- (100, 22, 94, 101, 60, 1, 89), Lungen- (15, 84, 58, 86, 110, 120, 16), Prostata- (132, 92, 112, 113, 79, 43), Pankreas- (59, 12, 39) und Ovarientumor (136, 87, 30).

Das Substrat der Gelatinasen MMP-2 (Gelatinase A) und MMP-9 (Gelatinase B) sind Typ-IV und V-Kollagene. Typ-IV-Kollagen ist ein für die Basalmembran spezifisches Kollagen, d.h. für die extrazellulären Strukturen. Ihre Funktion liegt in der Erhaltung der Architektur von Zellschichten, als Molekularsieb, als Barriere für den Durchtritt von Entzündungs- oder Tumorzellen und als Substrat für die Zelladhäsion, -wachstum und Differenzierung (66).

Über Aktinonin ist bekannt, dass es Aminopeptidase N, MMP-2 und -9 inhibiert (36). Es sollte folglich in der Lage sein den Matrixabbau, die Invasion der CC 531-Tumorzellen, sowie deren Metastasierung zu hemmen.

6.2 Matrigel (in vitro Studien von MMP-Inhibitoren)

Um vorab die Wirksamkeit des MMP-Inhibitors Aktinonin zu überprüfen, wurde ein Matrigelassay durchgeführt.

Dieses Matrigel, welches ein Basalmembranartiges Gel darstellt, wird vom Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)-Maustumor gebildet und enthält Kollagen-IV, Laminin, Proteoglykane, matrixabbauende Enzyme, deren Inhibitoren sowie Wachstumsfaktoren. Das Funktionsprinzip des Assays beruht auf der Migration der Tumorzellen durch das Matrigel, welche durch einen Serumkonzentrationsgradienten ausgelöst wird. Das Invasionsverhalten der Tumorzellen sollte von dem MMP-Inhibitor Aktinonin gehemmt werden. Die Auswertung erfolgte durch das Auszählen der Zellen im Filter, welche durch das Gel diffundierten.

Um sicher zu gehen, dass die Zellen nicht aus anderen Gründen, wie z.B. Zelltod, nicht durch den Filter diffundierten, wurde vorher zusätzlich die Vitalität der CC 531-Zellen überprüft.

Dies ergab, dass die Vitalität der Zellen in keinsten Weise durch Aktinonin beeinflusst wurde. Sie betrug selbst bei der höchsten Konzentration von Aktinonin (100 µg/ml) nach 24 Stunden noch über 90 %.

Im Invasionsassay zeigte sich allerdings eine deutliche Wirkung von Aktinonin. Mit steigender Konzentration von Aktinonin nahm die Zellzahl ab, die durch das Gel diffundierten. Bei einer Endkonzentration von 100 µg Aktinonin / ml kamen nur noch 28,4 % der Gesamtzellzahl durch das Gel, was bedeutet, dass Aktinonin die Tumorzellinvasion der CC 531-Zellen um 71,6 % senkte. Aus diesem Ergebnis lässt sich also schließen, dass Aktinonin einen stark inhibitorischen Effekt auf die Metastasierung ausübt. Zwar bewirkt es kein 100 %iges Absinken der Tumorzellinvasion, aber doch immerhin eine wesentliche Verminderung. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die Zellinvasion und -migration durch koordinierte Adhäsion als auch proteolytische Interaktion mit dem Substrat der extrazellulären Matrix (hauptsächlich fibrilläre Kollagene) nicht nur von MMPs abhängig ist, sondern auch von serine Proteasen, Cathepsine und andere Proteasen. Weiterhin wurde in einer Studie herausgefunden, dass die Tumorzellen über einen Kompensationsmechanismus verfügen. Fünf pharmakologische Inhibitoren wurden eingesetzt, um verschiedene Klassen von Proteasen zu hemmen. Durch Übergang in eine flexible amoeboidartige Form resultierte eine proteaseunabhängige Migration der proteolytisch potenten HT-1080 Fibrosarkomzellen und MDA-MB-231 Karzinomzellen (131).

Somit kann man also sagen, dass Aktinonin ein vielversprechendes Therapeutikum in der Onkologie darstellen könnte.

Eine *in vitro* Studie über Aktinonin am metastasierenden und nicht-metastasierenden Maus-Mammartumor (TPDMT-4) zeigte, dass der Inhibitor die Zellproliferation der Tumorzellen, als auch die Aktivität der Gelatinasen / Typ-IV-Kollagenasen hemmte (104). Da bekannt ist, dass Tumorzellen MMPs exprimieren, und dass der Grad der Proteaseaktivität mit der Invasivität und dem Metastasierungsbestreben des Tumors korrelieren (71, 64, 65), ist es also durchaus wahrscheinlich, dass Aktinonin das Tumorwachstum infolge Hemmung der Typ-IV-Kollagenasen unterdrückt und somit einen vielversprechenden Ansatz in der onkologischen Therapie darstellt.

Desweiteren wurde in einer *in vitro* Studie nachgewiesen, dass Aktinonin das Wachstum von NB 4 und HL 60 humanen Zelllinien und AKR Maus-Leukämiezellen hemmt und erwies sich darüber hinaus auch als zytotoxisch gegenüber diesen Tumorzelllinien (133).

Bei einem *in vitro* Versuch mit humanen metastasierenden HT 1080 Fibrosarkomzellen erwies sich Aktinonin als effektiver Inhibitor gegen die Degradation der Matrix und der

Zellinvasion, infolge seines starken inhibitorischen Effekts auf Aminopeptidase N, MMP-2 und -9 (36).

Zahlreiche andere Publikationen bestätigen diesen Effekt der Inhibition der Metastasierung mit Hilfe anderer MMP-Inhibitoren.

So zeigten zum Beispiel Jia et al., dass die synthetischen MMP-Inhibitoren MAG-283 (gegen MMP-1 und -2), KI (gegen MMP-9) und YU-224 (gegen MMP-1, -2 und -9) die Typ-I-Kollagen Degradation hemmten und die Zellinvasion durch Typ-IV-Kollagen blockierten (53). Dieses Ergebnis bestätigt wieder die enorme Wichtigkeit der kollagenabbauenden MMPs während der Initiation der Angiogenese.

In einer weiteren Studie wurde der selektive Cyclooxygenase-2 (COX-2) Inhibitor JTE-522 untersucht. Die Expression von COX-2 beim Kolorektalkarzinom ist eng mit der Lebermetastasierung und dem Überlebenserfolg gekoppelt. Mittels Western blot und RT-PCR wurde der Effekt von JTE-522 auf das Tumorwachstum und/oder Lebermetastasen überprüft. Es zeigte sich, dass der Inhibitor der Lebermetastasierung vorbeugt, indem er die Expression von VEGF (vascular endothelial growth factor) unterdrückt (134). Auch nichtsteroidale entzündungshemmende Mittel (NSAIDs = nonsteroidal anti-inflammatory drugs) haben gezeigt, dass sie das Risiko und die Mortalitätsrate vom Kolorektalkarzinom reduzieren, indem sie die Aktivität der Cyclooxygenase (COX) hemmen. Bei Versuchen mit dem selektiven COX-2-Inhibitor NS-398 stellte sich heraus, dass die Zellproliferation von stark invasiven Maus-Kolorektalkarzinomzelllinien (MC-26) um 35 % zurück ging und die Zellmigration durch Matrigel nach 24 Stunden zu 60 % gehemmt wurde. Die Enzymaktivität von MMP-2 und -9, zweier Enzyme, die die Zellinvasion durch Abbau der extrazellulären Matrix erleichtern, nahm durch NS-398 zu 25-30 % ab (135).

Rabbani et al. untersuchten den synthetischen MMP-Inhibitor A-177430 *in vitro* und kamen ebenso zu dem Ergebnis, dass das Tumorwachstum und die Metastasierung durch MMP-Inhibitoren geblockt werden, indem sie den Abbau der extrazellulären Matrix hemmen (97).

Auch Bisphosphonate zeigen einen inhibitorischen Effekt auf MMPs. Die Arbeitsgruppe von Teronen et al. wies nach, dass MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -12, -13 und -14 gehemmt wurden. Zusätzlich nahm die Invasion von malignen Melanomzellen (C8161) und Fibrosarkomzellen (HT1080) durch eine künstliche Basalmembran (Matrigel) wesentlich ab (117).

Den synthetischen MMP-Inhibitoren Batimastat (BB-94) und Marimastat (BB-2516) wurde in einer Studie ein zytostatischer Effekt nachgewiesen, ohne dabei zytotoxisch zu sein und ausserdem reduzierten sie die Invasion von humanen malignen Gliomzellen effektiv (121). In einer weiteren Studie wurde dem Batimastat *in vitro* ebenfalls eine Reduzierung der Zellinvasion von Kolonkarzinomzellen von Ratten der Zelllinie DHD/K12 nachgewiesen. Auf

die Zellproliferation von DHD/K12 nahm Batimastat jedoch keinen Einfluss. Ein direkter toxischer Effekt war somit nicht zu beobachten (5).

Eine andere Gruppe von Breuer et al. untersuchte an drei in vitro Modellen Carbamoylphosphonate, eine neue Klasse von MMP-Inhibitoren. Die meisten zeigten eine Selektivität für MMP-2. Optimale Aktivität gegen MMP-2 zeigten N-Cyclopentylcarbamoylphosphorsäure. N,N-Dialkylcarbamoylphosphorsäuren hingegen zeigten wenig bis gar keine Aktivität. Toxische Effekte wurden hingegen weder in vitro noch in vivo beobachtet (13).

Eine weitere Gruppe der MMP-Inhibitoren stellen die Tetrazykline (TTC) dar. Moses et al. fanden heraus, dass durch das Eintauchen in eine TTC-Lösung die Degradation der Kollagenmembran aufgehalten wird. Dies zeigten sie an Clostridien Kollagenase- und humanen Knochenzelllinien-Assays (81).

Levin et al. wiesen in vitro einen inhibitorischen Effekt von Anthranilsäurederivate gegen MMP-1, -9 und -13 nach. Piperazin war ein potenter, selektiver Inhibitor von MMP-9 und -13 (62).

Matsucka et al. überprüften den MMP-Inhibitor R-94138. Er hemmt spezifisch die Aktivität von MMP-2 und -9. Der in vitro Versuch erfolgte mittels Kolorektalkarzinomzellen und Gasterkarzinomzellen. R-94138 hemmte signifikant die Invasivität von allen Zelllinien durch die extrazelluläre Matrix (72).

Bei einer Untersuchung in vitro vom Matrilysin Antisense Oligonukleotid (AS-1) stellte sich heraus, dass AS-1 die Zellinvasion von humanen Kolonkarzinomzellen (CaR-1) durch die Basalmembran um 50 % reduzierte. Im Kolorektalkarzinom wird Matrilysin (MMP-7) meist von den Tumorzellen selbst produziert. Ein Zufalls-Kontroll Oligonukleotid (CL-1), mit der gleichen Länge und GC Inhalt hingegen, zeigte keinerlei inhibitorischen Effekt (78).

Maquoi et al. verglichen die Wirksamkeit eines selektiven (Ro-28-2653, gegen MMP-2 und -9) mit einem Breitspektrum MMP-Inhibitor (BB-94). Dieser Vergleich brachte das Ergebnis, dass der selektive Inhibitor ein potenteres „Antitumormittel“ ist im Gegensatz zum Breitspektrum-inhibitor, der die MMP-Expression erhöhte und die Angiogenese förderte (70). Desweiteren wiesen Maquoi et al. dem synthetischen Breitspektrum MMP-Inhibitor GT 129471 nach, dass er die Invasivität von HT 1080 Zellen in vitro durch Typ-IV-Kollagene wesentlich reduzierte. Parallel dazu wurde auch die pro-MMP-2 Aktivität komplett gehemmt. Wohingegen die Sekretion von pro-MMP-9 stark anstieg (69).

Einen weiteren selektiven MMP-Inhibitor stellt MMI-166 dar. In einer Studie fand man heraus, dass es sich hierbei zwar um einen selektiven MMP-2, -9 und -14 -Inhibitor handelt, er aber in vitro keinen Effekt auf das Tumorstadium hatte (68).

Auch ein entzündungshemmender Effekt konnte bei MMP-Inhibitoren nachgewiesen werden. Und zwar wurde am Beispiel der MMP-Inhibitoren BB-1101 und RO111-3456 gezeigt, dass diese den Zellzyklus von Mesangiumzellen stoppen mit nachfolgender Apoptose (21).

Eine in vitro Studie mit humanen Granulozyten zeigte, dass die MMP-Inhibitoren BB-3103, Ro31-9790 und alpha (2)-macroglobulin (letzteres spezifisch gegen MMP-9) nicht die Migration der Granulozyten durch ein Matrigel beeinflussten (29).

MMP-Inhibitoren scheinen also keinen immunsuppressiven Effekt auszuüben.

Insgesamt scheinen die MMP-Inhibitoren für die onkologische Therapie ein vielversprechender Ansatz zu sein.

6.3 Aktinonin (in vivo Wirksamkeit von MMP-Inhibitoren)

Naturgemäss konnten die zur Überprüfung der aufgestellten Fragestellung notwendigen experimentellen Untersuchungen nicht an menschlichen Lebertumoren durchgeführt werden, so dass ein in vivo Tumormodell gewählt wurde.

Ein geeignetes Lebermetastasenmodell sollte eine natürliche hämatogene Streuung eines Primärherdes (Kolorektalkarzinom) nachahmen. Im Rahmen von Vorversuchen ist hierzu ein Lebermetastasenmodell der Ratte entwickelt und etabliert worden, das diese Voraussetzungen erfüllt. Dieses von uns als diffuses Tumorimplantationsmodell bezeichnete Tiermodell (Material und Methoden, Punkt 4.2.3) ermöglichte die Untersuchung indirekter, sekundärer Effekte von Therapieverfahren auf die Metastasierung und Manifestation intraportal applizierter Tumorzellen. Dies ermöglichte den Einfluss unterschiedlicher Therapiemassnahmen (Aktinonin / Scheinbehandlung), auf Metastasierung und Manifestation portalvenös injizierter Tumorzellen quantitativ zu erfassen. Derartige Daten sind in einem in vitro Ansatz nicht zu erheben, weshalb ein in vivo Versuch unerlässlich war.

Wägt man dies ab gegen die beabsichtigte Einführung von MMP-Inhibitoren in der Behandlung von Lebermetastasen, die Patienten eine deutliche Verlängerung ihrer rückfallfreien Überlebenszeit nach ihrer Operation, vielleicht sogar eine Heilung verschaffen könnte, ist aus dieser Sicht der beschriebene Tierversuch ethisch vertretbar.

Insgesamt 14 männliche WAG-Ratten wurden mittels Tumorzellsuspensionsverfahren die CC 531-Zellen portalvenös injiziert. Nach dem Zufallsprinzip wurden die Tiere in zwei Gruppen geteilt. Gruppe I, die Behandlungsgruppe mit 8 Tieren, wurde mit dem MMP-Inhibitor Aktinonin, bei einer Dosierung von 0,1 ml pro kg Körpergewicht, über 5 Tage intraperitoneal behandelt. Gruppe II, die Kontrollgruppe mit 6 Tieren, wurde lediglich mit der

Vehikel-Lösung (NaCl, 0,9 %), ebenfalls intraperitoneal über 5 Tage, behandelt. 14 Tage nach dieser Behandlung wurden die Tiere euthanasiert zur Probenentnahme. Die Auswertung des Tumor replacements in der Leber erfolgte mittels Schätzung zwei voneinander unabhängiger Personen.

Bei der Behandlungsgruppe bewegte sich der Anteil der von Tumorgewebe ersetzten Leber im Bereich 0-10 %, bei der Kontrollgruppe im Bereich 10-90 %. Im Mittel ergab sich für Gruppe I ein Tumor replacement von 6,88 % und für Gruppe II 52,50 %, was einen signifikanten Unterschied der beiden darstellt.

Anhand des Tumor replacements kann dem Aktinonin auch in vivo eine enorme Wirksamkeit zugeschrieben werden. Auch am Lebergewicht war ein Unterschied zwischen den Gruppen zu erkennen. So betrug das Lebergewicht der Gruppe I im Mittel 11,91 g und das relative Lebergewicht im Mittel 4,12 %. Das der Gruppe II im Mittel 18,83 g und das relative Lebergewicht im Mittel 6,33 %. Dies erklärt sich durch das schwerere, weisse Tumorgewebe im Gegensatz zum gesunden, leichteren Lebergewebe. Wenn man bedenkt, dass das physiologische relative Lebergewicht von Ratten bei etwa 4,15 % liegt, kann man durchaus von einer pathologischen Veränderung des Lebergewichts der Kontrollgruppe sprechen.

Das Peritoneum wurde ausserdem auf Karzinosen überprüft. In keiner der beiden Gruppen konnten jedoch 14 Tage postinterventionell Peritonealkarzinosen festgestellt werden.

Desweiteren wurden Gewicht und Gewichtsverlauf der Tiere dokumentiert. Am Körpergewicht der Ratten lässt sich kein erheblicher Unterscheid erkennen. So beträgt das Körpergewicht der Gruppe I im Mittel 288,13 g und der Gruppe II im Mittel 291,67 g. Jedoch zeigt der Gewichtsverlauf, dass das Körpergewicht der Kontrolltiere in den letzten Tagen rascher zunimmt (im Mittel um 14 g) als bei der Behandlungsgruppe (im Mittel um 7 g). Insgesamt entspricht der Gewichtsverlauf den Erwartungen bei einer Tumormanifestation: rascher Abfall des Körpergewichtes in den ersten Tagen und danach ein stetiger Anstieg des Körpergewichtes mit zunehmendem Tumorwachstum.

In einer Studie, bei der Mäuse nach der Transplantation von AKR Leukämiezellen mit Aktinonin behandelt wurden, stellte sich ebenfalls heraus, dass das Tumorwachstum im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert war und ausserdem die Überlebensrate der Tiere verlängert wurde (133).

Bei einem Kolonadenokarzinommodell der Maus zeigte der MMP-Inhibitor KB-R7785 ähnliche Wirkung in vivo. Er unterdrückte das Tumorwachstum um 88,2 % und die Anzahl an Metastasen um 85,8 % im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Tatsache, dass KB-R7785 frühzeitig in die Angiogenese und Metastasierung eingreift, lässt darauf schliessen, dass

MMP-Inhibitoren sowohl primäres, als auch sekundäres Tumorwachstum kontrollieren könnten (67).

Über Inhibition der Cyclooxygenase (COX) -aktivität hemmte NS-398 (ein selektiver COX-2-Inhibitor) das Tumorwachstum von MC-26 Zellen (hochinvasive Maus-Kolorektalzelllinie) in vivo und verzögerte die Entwicklung von Lebermetastasen (135).

MMI-166, ein selektiver MMP-Inhibitor, verringerte die Lebermetastasierung von C-1H humanem Kolonkarzinom um 63 % und erhöhte ebenfalls die Überlebenszeit von den behandelten Mäusen (68). Eine andere Studie besagt, dass je selektiver die MMP-Inhibitoren sich in vitro gegen MMP-9 zeigten, desto effizienter waren sie gegen Lebermetastasen in vivo (6). Der spezifische MMP-2 und -9 MMP-Inhibitor R-94138 wurde in vivo an Gasterkarzinom-, sowie Kolorektalkarzinomzelllinien auf Lymphknotenmetastasen getestet und zeigte einen signifikanten Rückgang bezüglich Ausbildung der Metastasen. (72).

Der MMP-Inhibitor Batimastat beugte in vivo ebenfalls der Lebermetastasierung sowie der Entwicklung von Peritonealkarzinosen vor und verlängerte das Überleben der Ratten (5).

In einem Ratten-Prostatatumormodell wurde der synthetische MMP-Inhibitor A-177430 überprüft. In vivo zeigte er eine dosisabhängige Verringerung des Tumolvolumens im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Bei der Maximumdosis von 100 mg pro kg pro Tag stellte sich ein kompletter Stillstand des Tumorwachstums ein und verhinderte die Entwicklung von Metastasen in der Lunge, ohne irgendwelche Nebenwirkungen (97).