Aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. G. Sauter

Matrix Metalloproteinase 14 (MMP14) Expression in menschlichen Neoplasien: Eine Gewebearray-Untersuchung an 3555 Tumoren

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt

> von Jakob Michael Keimer aus Dortmund

> > Hamburg, 2007

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. med. G. Sauter Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Prof. Dr. med. H. Heinzer Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: Prof. Dr. med. C. Bokemeyer Meinen Eltern gewidmet.

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ADC	Adenokarzinom
AML	akute myeloische Leukämie
AS	Aminosäure
Са	Karzinom
са	circa
CIN	Zervikale intraepitheliale Neoplasie
cm	Zentimeter
CML	chronische myeloische Leukämie
DAB	diaminobenzidine
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	epidermal growth factor receptor
ER	Östrogen Rezeptor
et al.	und andere
EU	Europäische Union
EZM	extrazelluläre Matrix
FDA	Food and Drug Administration
FISH	Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung
GPI-Anker	Glykosylphosphatidylinositol-Anker
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER-2	Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
HNO	Hals-Nasen-Ohren
HNSCC	head and neck squamous cell carcinomas
HGSIL	high grade squamous intraepithelial lesions
IHC	Immunhistochemie
IPMN	intraduktale papilläre muzinöse Neoplasien
IRS	immunreaktiver Score
LGSIL	low grade squamous intraepithelial lesions
m	männlich
MALT	mucosa associated lymphoid tissue
mg	Milligramm
ml	Milliliter

mm	Millimeter
MMP	Matrix Metalloproteinase
MMPI	Matrix Metalloproteinase Inhibitor(en)
MPNST	maligner peripherer Nervenscheiden-Tumor
MTA	Multi- Tumor Array
MT-MMP	membrane type matrix metalloproteinase
NEPT	neuroendokrine Pankreastumoren
NOS	not other specified
NSCLC	non small cell lung cancer
PR	Progesteron Rezeptor
рН	potentia Hydrogenii
RECK	reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs
RNA	Ribonukleinsäure
SPSS	Statistical Product and Service Solutions
SQCC	squamous cell carcinomas
TBS-Puffer	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TCC	transitional cell carcinoma
TGF	transforming growth factor
TIMP	tissue inhibitors of matrix metalloproteinases
ТМА	tissue micro array
TNM	tumor, nodes, metastasis
w	weiblich
ZNS	Zentrales Nervensystem
μm	Mikrometer

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: MMP14-Domänenstruktur
- Abbildung 2: links TMA-Stanzgerät, rechts TMA-Block Detailaufnahme
- Abbildung 3: Tumor-Array-Herstellung
- Abbildung 4: Multitumor TMA aus Hamburg
- Abbildung 5: Gesamtaufnahme eines MTA (HE-Schnitt)
- Abbildung 6: Intensität der MMP14-Immunfärbung am Beispiel von
- Adenokarzinomen der Lunge
- Abbildung 7: Mamma, Phylloides Tumor
- Abbildung 8: Pankreas, Adenokarzinom
- Abbildung 9: Ovar, endometriales Karzinom
- Abbildung 10: Gallenblase, Adenokarzinom
- Abbildung 11: Lunge, Adenokarzinom
- Abbildung 12: Mamma, duktales Karzinom
- Abbildung 13: Häufigkeit und Stärke der MMP14 Expression in IHC positiven Tumortypen
- Abbildung 14: postoperatives Überleben bei Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus
- Abbildung 15: postoperatives Überleben bei Adenokarzinomen des Ösophagus
- Abbildung 16: postoperatives Überleben bei duktalen Adenokarzinomen des Pankreas

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Kontrollgewebe		
Tabelle 2:	Zusammensetzung der Multi- Tumor TMAs aus Basel und		
	Hamburg		
Tabelle 3:	Zusammensetzung Prognose TMA Ösophagus und Pankreas		
Tabelle 4:	MMP14 IHC Resultat		
Tabelle 5:	Tumortypen mit membranöser MMP14-Expression		
Tabelle 6:	Tumortypen ohne membranöse MMP14-Expression		
Tabelle 7:	MMP14 in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus		
Tabelle 8:	MMP14 in Adenokarzinomen des Ösophagus		
Tabelle 9:	MMP14 in duktalen Adenokarzinomen des Pankreas		
Tabelle 10:	MMP14-Expression in IHC-Studien		

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Material und Methode	7
	2.1 TMA Herstellung	7
	2.2 MTA- Multi Tumor Array	9
	2.3 Prognose TMA	15
	2.3.1 Allgemeines	15
	2.3.2 Ösophagus Prognose-TMA	15
	2.3.3 Pankreas Prognose-TMA	15
	2.4 Immunhistochemie	17
	2.4.1 Protokoll	17
	2.4.2 Auswertung	18
	2.5 Statistik	20
3	Resultate	21
	3.1 Multi-Tumor Array	21
	3.2 Ösophagus Prognose-TMA	30
	3.3 Pankreas Prognose-TMA	33
4	Diskussion	35
5	Zusammenfassung	45
6	Literatur	47
7	Danksagung	62
8	Lebenslauf	63
9	Erklärung	65

1 Einleitung

Matrix Metalloproteinasen (MMP) sind zink-abhängige Endopeptidasen, die für den Auf-, Um- und Abbau der extrazellulären Matrix (EZM) verantwortlich sind. Dies geschieht durch Aufspaltung nahezu aller Bestandteile der EZM, zu der als Hauptkomponenten Faserproteine wie Elastin und Kollagen, Proteoglykane und Anheftungsproteine wie Fibronektin und Laminin zählen. Bis 2007 waren 25 verschiedene Varianten identifiziert [1].

Die Gruppe der Matrix Metalloproteinasen kann man entsprechend ihrer Substratspezifität in fünf Subfamilien einteilen [2]: Kollagenasen, Stromelysine, Gelatinasen und Proteinasen, die diffus in die Extrazellularmembran durch entsprechende Zellen sezerniert werden. Die fünfte Untergruppe wird von den membranständigen Matrix Metalloproteinasen (MT-MMP, membrane type MMP) gebildet, wobei das katalytische Zentrum des Enzyms in den extrazellulären Raum ragt [3, 4]. Anhand der Verankerung in der Zellmembran werden die MT-MMPs wiederum in zwei Untergruppen unterteilt: Einerseits die Gruppe der Typ I membranständigen MMPs und zum anderen die Gruppe, die über einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) mit der Zellmembran verbunden ist [5-7].

Die Blockierung aktiver MMPs erfolgt im Verhältnis 1:1 durch so genannte TIMPs, Gewebeinhibitoren der Matrix-Metalloproteinasen (engl. "Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases", TIMP). Dadurch wird der fein balancierte Zusammenhang von Auf- und Abbaureaktionen von Komponenten der EZM aufrechterhalten. Die hochspezifischen TIMPs werden von Bindegewebszellen sezerniert und hemmen die Aktivität der MMPs durch gezielte Bindung an deren katalytischen Zentren. Dadurch kann die Umstrukturierung des Gewebes durch MMPs moduliert werden. Bislang sind vier verschiedene TIMPs (TIMP 1-4) bekannt [8], die bis auf die Matrixassoziierte TIMP-3 als diffusionsfähige Proteine sezerniert werden [9]. Als Hauptinhibitoren sind neben den TIMPs das alpha2-makroglobulin und das membrangebundene Glykoprotein RECK als endogene Inhibitoren zu nennen [8-12].

1

MMPs besitzen vielfältige biologische Bedeutungen. In erster Linie gehört die physiologische Entwicklung und Umgestaltung der extrazellulären Matrix zu den Eigenschaften von MMPs. Die Umstrukturierung der EZM beinhaltet aber auch das Potenzial, pathologische Prozesse hervorzurufen und zu fördern. So unterstützen einige MMPs die Angiogenese. Die Bildung neuer Blutgefäße mit dem Ziel gesteigerter Blutversorgung spielt eine bedeutende Rolle in Wundheilungsprozessen [13-15], ist aber auch Voraussetzung für die Expansion von Tumoren [16-18]. Neben der Angiogenese haben MMPs Einfluß auf weitere Faktoren, die die Tumorprogression essentiell begünstigen. Unter anderem fördern MMPs die Tumorgröße durch Freisetzen von z.B. TGF-alpha (transforming growth factor) [19] und begünstigen die Invasion und Metastasierung von Tumoren mittels Degradierung der umgebenden EZM Barriere [20-25]. Offenbar aufgrund derartiger Eigenschaften werden MMPs in vielen Tumoren exprimiert [26, 27].

Matrix Metalloproteinasen stellen potenzielle Therapieziele dar. Es sind zurzeit mehrere Medikamente Gegenstand der Forschung, die als MMP-Inhibitoren (MMPI) bezeichnet werden. Hierzu zählen zum Beispiel Breitspektrum MMPI wie Batimastat (BB-94), Prinomastat (AG-3340), Marimastat (BB-2516), deren Ergebnisse hinsichtlich der Tumorprogression in präklinischen Studien größtenteils positiv ausfielen [28-31]. Die klinischen Studien allerdings verfehlten teilweise das Ziel der Tumorrepression, und einige Patienten erlitten Nebenwirkungen [32, 33], sodass bisher für keinen dieser synthetischen MMPI eine offizielle Zulassung besteht. Uberdies wurde die Weiterentwicklung von Batimastat (BB-94) eingestellt, da dieses Präparat keine orale Verfügbarkeit aufweist. Inzwischen ist man dazu übergegangen, statt Breitband MMPI hoch selektive MMPI zu entwickeln, bei denen in ersten Tiermodellen positive Ergebnisse registriert wurden. Von besonderem Interesse könnte hier MMP14 sein. So zeigte Ro 28-2653, ein MMP-Inhibitor (MMPI) der Firma Roche mit hoher Affinität zu MMP14, eine Abnahme des Tumorwachstums in mit Prostatakarzinomzellen infizierten Ratten. Entsprechend zur Dosierung reduzierte sich das Tumorgewicht um bis zu 90%. Außerdem konnte unter oraler Behandlung mit Ro 28-2653 das Gesamtüberleben der Tiere verlängert

2

werden [34]. Weitere präklinische Studien zeigen, dass Ro 28-2653 antiangiogenetische Effekte aufweist und das Tumorwachstum behindert. Außerdem findet sich bisher kein Anhalt für mögliche Nebenwirkungen, die das therapeutische Potenzial behindern [35]. Klinische Studien bezüglich der therapeutischen Wirkung von Ro 28-2653 sind bisher nicht durchgeführt worden, aber aufgrund der positiven Ergebnisse in Tiermodellen ist damit in naher Zukunft zu rechnen. Daher stellt sich die Frage, wer von einer zukünftigen Therapie mit Ro 28-2653 profitieren würde.

Eines der bevorzugten Ziele von Ro 28-2653 ist MMP14, oder auch MT1-MMP (MT-MMP, membrane type MMP) [36]. MMP14 ist die von Sato et al. 1994 erstidentifizierte membrangebundene MMP [5].

Hinsichtlich der Domänenstruktur besteht MMP14 wie alle Matrix Metalloproteinasen aus folgenden charakteristischen Hauptbestandteilen [5, 37]: einer Signalpeptidgruppe aus 20 Aminosäuren, einer Propeptidgruppe aus 111 Aminosäuren und einer n-terminalen katalytischen Gruppe aus 174 AS.



Abbildung 1: MMP14-Domänenstruktur

Zusätzlich besitzt MMP14 eine c-terminale hämopexin- ähnliche Domäne (215 AS), die durch eine so genannte Hinge Region (33 AS) mit der katalytischen Gruppe verbunden ist [5, 20, 38-40]. Außerdem findet sich eine transmembranöse Domäne (24 AS) und eine zytoplasmatische Domäne (20 AS), mit denen MMP14 in der Zellmembran verankert ist [41, 42]. Daher auch die Bezeichnung MT-MMP (membrane type) [6, 43].

Da MMP14 in Form einer pro-MMP, also eines inaktiven Zymogens gebildet wird und einer separaten Aktivierung bedarf [44, 45], befindet sich als weiterer

Bestandteil der Domänenstruktur zwischen der Propeptidgruppe und der katalytischen Gruppe eine Erkennungssequenz für Furin oder Furin-ähnliche Proteasen [46, 47]. Furin ist für die proteolytische Spaltung des Propeptids im Golgi-Apparat verantwortlich und kann somit die Aktivierung von MMP14 bewirken [48, 49]. Abbildung 1 zeigt eine schematische Darstellung der Domänenstruktur von MMP14.

Auf der Oberfläche wird MMP14 als aktive Protease exprimiert und ist in der Lage, pro-MMP2 zu MMP2 zu aktivieren [5, 50]. Diese Aktivierung ist für den Einfluß von MMP14 auf die Tumorgenese von Bedeutung. Des Weiteren werden folgende Substrate von MMP14 umgesetzt: Kollagentyp I, II, III [51], Fibrin [18], Gelatin [52], Fibronektin [53], Laminin [54, 55], pro-MMP13 [56], CD44 [57], Tumor Nekrose Faktor Alpha (TNF-Alpha)und Interleukin 8 [58]. Zusammen mit der Erstbeschreibung von MMP14 im Jahre 1994 berichtet die Arbeitsgruppe um Sato von MMP14-Expression in Lungenkarzinomzellen. Die erhöhte Expression von MMP14 korreliert hier mit der bereits oben erwähnten Aktivierung von MMP2 durch MMP14 [5].

Bis heute sind zahlreiche Untersuchungen durchgeführt worden, bei denen eine MMP14–Expression (und eine häufig korrelierende MMP2-Aktivierung) in verschiedenen Tumortypen beobachtet wurde: malignes Melanom [59-67], Fibrosarkom [68-70], Plattenepithelkarzinom des Kopfes und Halses (Head and Neck, HNSCC) [71-81], Lungenkarzinom [5, 23, 82-90], Prostatakarzinom [91-94], Magenkarzinom [95-104], Pankreaskarzinom [105-110], Leberkarzinom [105, 106, 111-123], Mammakarzinom [71, 86, 124-142], Harnblasenkarzinom [143, 144], Tumoren der Schilddrüse [145-147], Ovarialkarzinom [148-161], Zervixkarzinom [162-168], ZNS Tumoren [169-177], kolorektales Karzinom [71, 100, 178-187], Tumoren der Haut [188, 189], Osteosarkom [190, 191], Knorpeltumoren [192, 193], Urothelkarzinom [194-196], Neuroblastom [197], Nebennierenrinden-Ca [198], Larynx-Ca [74, 199-202], Rhabdomyosarkom [203], Nierenkarzinom [204, 205], Karzinoid Tumoren [206], Nephroblastom (Wilms Tumor) [207], Dermatofibrosarkoma protuberans [208], Dermatofibrom [208], Merkel-Zell Tumor [206], Ösophagus-Ca [209-212], Endometrium-Ca

[213], Thymom [214], Tumoren der Speicheldrüsen [215], maligner peripherer Nervenscheiden-Tumor (MPNST) [216], Schwannom [216], Neurofibrom [216].

Sofern mehrere Studien zu derselben Tumorentität erfasst sind, herrschen nahezu immer unterschiedliche Angaben bezüglich der prozentualen Expression. Diese wird zum Beispiel in duktalen Pankreaskarzinomen mit Werten zwischen 67% und 100% dokumentiert [105, 106, 108, 110], in Ovarialkarzinomen variiert sie zwischen 22% und 100% [148, 149, 152, 156, 161]. Große Expressionsdifferenzen mit einer Spanne von 59% bis 100% verzeichnen auch die einzelnen Studien des hepatozellulären Karzinoms [113, 115, 117, 118]. Besonders signifikant zeigt sich der Abstand auch in den Ergebnissen von MMP14-Expression im Mamma-Ca [124, 125, 129, 131, 138] und kolorektalem Karzinom [100, 178-180, 182, 183, 187]. Hier schwanken die Angaben jeweils zwischen 22% und 100%.

Nicht allein diese Diskrepanzen innerhalb der Expressionsstärke gleicher Tumorentitäten veranlassen zu weiterführenden Untersuchungen. Vielmehr kann nach ausführlicher Recherche bisher durchgeführter Studien festgestellt werden, dass bis zum heutigen Zeitpunkt einige Tumorentitäten bisher noch nie auf die Expression von MMP14 immunhistochemisch untersucht worden sind. In der Literatur lassen sich zum Beispiel keine Abhandlungen über folgende Tumorentitäten hinsichtlich ihrer MMP14-Expression finden: Phylloides Tumor der Mamma, Gallenblasen-Ca, Dünndarmkarzinom, Phäochromozytom, Onkozytom, Peniskarzinom, Nebennierentumor, Paragangliom, Meningeom, Liposarkom, Leiomyom, Leiomyosarkom.

Um zu bestimmen an welchen Tumorarten Medikamente wie Ro 28-2653 am besten eingesetzt werden könnten, sollte eine große Zahl von vielen verschiedenen Tumortypen unter standardisierten Bedingungen untersucht werden. Mit über 3500 Gewebeproben und der Anzahl von mehr als 120 verschiedenen Tumorentitäten wurde in dieser Doktorarbeit eine bisher in diesem Umfang noch nicht durchgeführte Studie zu MMP14 vorgenommen.

5

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die molekulare Epidemiologie von MMP14 im normalen und neoplastischen (Tumor-) Gewebe zu analysieren.

2 Material und Methode

2.1 TMA Herstellung

Die am Institut für Pathologie in Basel entwickelte Gewebearray-Technik (tissue micro array, TMA) wurde zur Zusammenstellung der Tumorgewebe genutzt. Mithilfe des Tissue Micro Array- Verfahrens können hunderte archivierte, in Paraffin eingebettete Tumorproben in einem einzigen, neuen Paraffinblock angeordnet werden [217, 218].

Von jedem einzelnen archivierten Paraffinblock (auch als "Spenderblock" bezeichnet) wird ein HE-Schnitt angefertigt, um die Tumorregion zu umgrenzen. Aus diesem definierten Bereich werden im Durchmesser 0,6 mm messende Biopsien entnommen. Dies geschieht unter Anwendung eines Array-Stanzgerätes (Abb. 2), das über einen 0,6 mm messenden Bohrer und einen an der Spitze geschärften Hohlzylinder verfügt. Der Aufbau des Array-Stanzgerätes ermöglicht das Ausstanzen der Tumorbiopsie aus dem "Spenderblock" und das anschließende Einfügen der Biopsie in vorgefertigte Löcher im Empfängerblock [219].



Abbildung 2: links TMA-Stanzgerät, rechts TMA-Block Detailaufnahme



Abbildung 3: Tumor-Array-Herstellung. Das Instrument besteht aus einem dünnen, an der Spitze geschärften Hohlzylinder (innerer Durchmesser ca. 600 μ m), welcher in einem X-Y-Achsen-Präzisionsgerät gehalten wird. Ein genau in den Hohlzylinder passender Stahldraht ermöglicht das Ausstossen von Gewebestücken in mit einem Bohrer (äusserer Durchmesser ca. 600 μ m) vorgefertigte Löcher im Empfängerblock (Tumor-Array). Ein verstellbarer "Eindring-Stopper" sichert eine konstante Länge von Zylindern und vorgefertigten Löchern im Empfängerblock. Bis zu tausend Gewebezylinder können in einen 20 x 40 mm messenden Empfänger-Paraffinblock eingebracht werden. (*Quelle*: Dissertation Yvonne Forster-Schnyder: Epidemiologie der Calretininexpression in normalen und neoplastischen Geweben: Eine Gewebearray Untersuchung an 4987 Gewebeproben, Medizinische Fakultät, Universität Basel, 2003)

Bis zu 200 Schnitte können von einem TMA-Block angefertigt werden und immunhistochemischer, DNA- oder RNA-Untersuchungen unterzogen werden. Um die Anzahl der TMA-Schnitte weiter zu erhöhen können mehrere Biopsien aus den "Spenderblöcken" entnommen werden. Die Gewebeproben werden auf unterschiedlichen "Empfängerblöcken" an identischen Koordinaten positioniert. Somit können von einem Tumorkollektiv mehrere tausend TMA-Schnitte hergestellt werden.

2.2 MTA- Multi Tumor Array

Zur Erstellung eines Multi- Tumor Arrays wurden 3923 in Paraffin eingebettete Tumoren aus den verschiedenen Archiven des Instituts für Pathologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf herausgesucht. Die eigentliche Herstellung eines Tissue Micro Arrays ist in Kapitel 2.1 beschrieben.

Der Array setzt sich aus mehr als 100 verschiedenen Tumorentitäten zusammen und enthält zusätzlich als Kontrolle weitere 600 Spots, bestehend aus 14 Normalgewebetypen. Die genaue Zusammensetzung und Anzahl der Kontrollgewebe ist in Tabelle 1 für die einzelnen TMA Blöcke dargestellt.

TMA Block	Normalgewebe (Anzahl)
А	Herz (2), Niere (5), Lunge (2), Kolonmukosa (2), Endometrium
	(2), Prostata (2), Lymphknoten (LK) (2), Quergestreifte
	Muskulatur (QM) (2), Haut (2)
В	Herz (2), Niere (2), Lunge (2), Kolonmukosa (5), Endometrium
	(2), Prostata (2), LK (2), QM (2), Haut (2), Leber (5),
	Ösophagus (5), Analhaut (5), Dünndarm (5), Magen (5).
С	Herz (2), Niere (2), Lunge (2), Kolonmukosa (2), Prostata (2),
	LK (2), QM (2), Haut (2), Endometrium (2), Schilddrüse (5),
	Thymus (5), Mundboden (5), Larynx (5), Gehirn (5).
D	Herz (2), Niere (2), Lunge (2), Kolonmukosa (2), Endometrium
	(2), Prostata (2), LK (2), QM (2), Haut (5), Nebenniere (5),
	Harnblase (5).
E	LK (10), Lunge (10), Gallenblase (10), Pankreas (10), Herz (2),
	Niere (2), Kolonmukosa (2), Endometrium (2), Prostata (2), QM
	(2), Haut (2), Sehnenscheiden (4).
F	Speicheldrüse (10), Herz (2), Niere (2), Lunge (2),
	Kolonmukosa (2), Endometrium (2), Prostata (2), LK (2), QM
	(2), Haut (2).
G	Herz (2), Niere (2), Lunge (2), Kolonmukosa (2), Endometrium
	(2), Prostata (2), LK (2), QM (2), Haut (2).
Н	Herz (2), Niere (2), Lunge (2), Kolonmukosa (2), Prostata (2),
	LK (2), QM (2), Haut (2).

Tabelle 1: Kontrollgewebe

Die Tumorentitäten verteilen sich auf 8 Array-Blöcke, welche jeweils zwischen 509 und 611 Spots enthalten. Abbildung 4 zeigt die 8 Array-Blöcke und Abbildung 5 stellt einen HE-Schnitt eines der Blöcke dar. Eine Auflistung der verwendeten Tumortypen findet sich in Tabelle 2.

Bereits zu Beginn des Projektes stand ein dem Hamburger- TMA ähnlicher MTA der Uniklinik Basel zur Verfügung. Dieser TMA wurde aus organisatorischen Gründen anstelle des in Hamburg erstellten TMA für die immunhistochemische Untersuchung genutzt. Die genaue Zusammensetzung des verwendeten TMAs ist in Tabelle 2 und im Kapitel Resultate beschrieben.



Abbildung 4: Multitumor TMA aus Hamburg



Abbildung 5: Gesamtaufnahme eines MTA (HE-Schnitt)

Tumortyp	Anzahl Fälle Basel	Anzahl Fälle Hamburg
Hauttumoren		
Malignes Melanom	50	37
Basaliom	50	67
Benigne Naevi	50	59
Haut, Plattenepithelkarzinom	51	51
Merkelzell-Karzinom	6	6
Pilomatrixom	-	48
Basalzelladenom		37
Haut, benigner Appendix Tumor	32	
Tumoren der Atemwege		
Lunge, Plattenepithelkarzinom	50	59
Lunge Adenokarzinom	50	71
Lunge Bronchioalveoläres Karzinom		15
Lunge kleinzelliges Karzinom	50	15
Lunge undifferenziert großzelliges	50	/8
Karzinom	30	40
Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom		14
Larynx, Plattenepithelkarzinom	50	57
Mundhöhle, Plattenepithelkarzinom	50	54
Malignes Mesotheliom	28	28
Pharynx, lymphoepitheliales Karzinom	5	5
Gynäkologische Tumoren		
Mamma, duktales Karzinom	50	62
Mamma, lobuläres Karzinom	50	65
Mamma, medulläres Karzinom	30	64
Mamma, muzinöses Karzinom	29	61
Mamma, tubuläres Karzinom	29	60
Mamma, Phylloides Tumor	13	48
Mamma, kribriformes Karzinom	9	26
Mamma, apokrines Karzinom	3	17
Ovar, serös papilläres Karzinom	50	63
Ovar endometriales Karzinom	50	22
Ovar, muzinöses Karzinom	21	46
Ovar Brenner Tumor	9	45
Ovar Dysgerminom	2	10
Ovar Gonadoblastom	1	
Ovar Dottersacktumor	1	
Ovar undifferenziertes Karzinom	1	
Teratome des Ovars	•	60
Vagina Plattenenithelkarzinom	5	22
Vulva Plattenenithelkarzinom	15	61
Endometrium endometriales Karzinom	40	60
Endometrium, endometriales Karzinom	24	59
Endometriales Stromasarkom	24	50
Lindomethales Stromasarkom	4	
Uterus, Zervix, CIN III	50	()
Uterus, Zervix, PlattenepitneikarZinom	50	03
Uterus, Zervix, Adenosaruamäs	3	48
	/	3
	0	
	50	
Penis Karzinom	50	46

 Tabelle 2: Zusammensetzung der Multi- Tumor TMAs aus Basel und Hamburg

Tumortyp	Anzahl Fälle	Anzahl Fälle
Onkozytom dar Niara	<u> </u>	Landurg
Heden Sominam	10 E0	02
Hoden, Seminom	57	72
Hoden, Toratom	57	40
Hoden, relation	0	
Irothol Karzinom (nTa)	50	62
Urothol Karzinom (pT2 4)	50	60
Harphlaso Diattononitholkarzinom	10	00
Hamblase, Flattenepitierkaizinom	5	
Harnblase, Kielitzelityes Karzinom	0	
Hamplase, invertiertes Papillom	1	
Prostata unbehandeltes Karzinom	60	
Prostata, undenandentes Karzinom	50	
Niere klarzelliges Karzinom	50	68
Niere, nanilläres Karzinom	50	21
Niere, andere Tumoren	50	0
Niere, chromonhobes Karzinom	17	56
Urethol, andero Tumoron	17	10
Endekrine Tumeren		10
	17	65
Daragangliom	47	26
Karzinoid Tumoren	10	30
Nebennierenrinden Karzinem	47	40
Nebennierenrinden Adenem	15	0
Dhäochromozytom	20	21 64
Schilddrüse, nanilläres Karzinom	40	54
Schilddrüse, follikuläres Karzinom	50	/9
Schilddrüse, ananlastisches Karzinom	7	40
Schilddrüse, medulläres Karzinom	9	21
Nebenschilddrüse Adenom	30	
Nebenschilddrüse Karzinom	2	
Gastrointestinale Tumoren	2	
Kolon-Adenom geringe Dysplasie	49	56
Kolon-Adenom, mässige Dysplasie	50	
Kolon-Adenom, schwere Dysplasie	50	40
Kolon, Adenokarzinom	50	60
Gallenblase, Adenokarzinom	32	30
Magen, intestinales Adenokarzinom	50	62
Magen, diffuses Adenokarzinom	26	56
Hepatozelluläres Karzinom	50	55
Speicheldrüse. Zvlindrom	55	
Speicheldrüse, Ewing-Sarkom	1	
Speicheldrüse, kleinzelliges Karzinom	1	
Speicheldrüse, Plattenepithelkarzinom	2	
Speicheldrüse, unklassifiziertes Karzinom	1	
Speicheldrüse, undifferenziertes Karzinom	6	
Speicheldrüse, Adenokarzinom	3	
Speicheldrüse, Azinuszellkarzinom	13	
Speicheldrüse, pleomorphes Adenom	50	61
Speicheldrüse, Mucoepidermoid Karzinom	7	46
Warthin-Tumor	30	57
Dünndarm-Karzinom	12	22
Anal, Plattenepithelkarzinom	5	18

Tumortyp	Anzahl Fälle	Anzahl Fälle
	Basel	Hamburg
Pankreas, Adenokarzinom, Papille		29
Pankreas, neuroendokrines Karzinom		20
Pankreas, duktales Adenokarzinom	50	56
Ösophagus, Plattenepithelkarzinom	37	60
Ösophagus, Adenokarzinom	9	60
Ösophagus, kleinzelliges Karzinom	1	
Gastrointestinale Stromatumoren	31	46
Hämatologische Neoplasien		
Thymom	24	57
Hodgkin-Lymphom	55	43
Non-Hodgkin-Lymphom	54	9
MALT Lymphom	50	
AML	1	
CML	5	
ZNS Tumoren		
Astrozytom	50	49
Oligodendrogliom	30	28
Medulloblastom	5	4
Ependymom	12	10
Neuroblastom		51
Neurofibrom	43	60
Meningeom	50	
Craniopharyngeom	8	
Glioblastoma multiforme	50	
Esthesioneuroblastom	3	
Optikusgliom	1	
Weichteiltumoren		
Angiosarkom	4	7
Angiomyolipom	1	
Lipom	30	
benignes Histiozytom	30	
Chondrosarkom		5
Karzinosarkom		38
Stromasarkom		13
Leiomyosarkom	40	28
Liposarkom	30	16
Leiomyom	61	27
Rhabdomyosarkom	14	
Fibrosarkom	9	
Synovialsarkom	4	
alveoläres Sarkom	1	
epitheloides Sarkom	2	
epitheloides Hämangiom	1	
Glomustumor	12	
kapilläres Hämangiom	30	
Kaposi Sarkom	30	
Ganglioneurom	7	
Primitiv neuroektodermaler Tumor	18	
Dermatofibrosarkoma protuberans	4	5
Desmoid-Fibromatose		9
Adenomatoidtumor	10	
Granularzelltumor	8	8
Hämangioperizytom	13	7

Tumortyp	Anzahl Fälle Basel	Anzahl Fälle Hamburg
maligner peripherer Nervenscheiden-Tumor	12	14
Schwannom	50	
Sarkom high-grade NOS	30	25
Riesenzell-Sehnenscheiden Tumor	36	40
Kontrollen		600
Anzahl aller Spots	3555	4523

2.3 Prognose TMA

2.3.1 Allgemeines

Die Prognose TMAs mit Ösophagus- und Pankreaskarzinomen standen aus früheren, am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf verfassten Arbeiten zur Verfügung [221], [238].

2.3.2 Ösophagus Prognose-TMA

Der Ösophagus Prognose TMA beinhaltet 299 Primärtumoren des Ösophagus, operiert in der Abteilung für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf in den Jahren zwischen 1992 und 2004. Das mittlere Alter der Patienten betrug 62 Jahre (von 34-92 Jahre) und die durchschnittliche postoperative Überlebenszeit 23,15 Monate (von 1-142 Monate). Ausgewertet wurden Adeno- und Plattenepithelkarzinome des Ösophagus. Die Zusammensetzung des TMAs ist in Tabelle 3 dargestellt.

2.3.3 Pankreas Prognose-TMA

Der Pankreas Prognose TMA umfasst 357 verschiedene Primärtumoren des Pankreas, darunter 213 duktale Adenokarzinome, operiert in der Abteilung für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf in den Jahren zwischen 1993 und 2005. Lediglich Patienten mit duktalen Adenokarzinomen des Pankreas wurden in diese Studie eingeschlossen. Das mittlere Alter dieser Patienten wurde mit 63,3 Jahre (von 33-88 Jahre) und die durchschnittliche postoperative Überlebenszeit für duktale Adenokarzinome mit 19,21 Monate (von 1-109 Monate) beziffert. Weitere klinische Daten dieser Patienten sind Tabelle 3 zu entnehmen.

		Oesophagus, Plattenepithelkarzinom	Oesophagus, Adenokarzinom	Pankreas, duktales ADC
Anzahl	n	163	129	213
Geschlecht	w	42	22	96
	m	121	107	117
pT Stadium	pT1	24	24	7
	pT2	38	46	57
	pT3	89	55	135
	pT4	11	4	9
nN. Stadium	- DNO	67	24	76
pin Stadium	рио рыл	0/	34	10
	рит	54	54	132
pM Stadium	pM0	142	96	201
	pM1	20	33	11
Grad	G1	4	1	10
	G2	113	50	95
	G3	45	77	105
Resektion	R0	130	100	88
	R1	26	18	24
	R2	7	8	0

Tabelle 3: Zusammensetzung Prognose TMA Ösophagus und Pankreas

2.4 Immunhistochemie

2.4.1 Protokoll

Es wurden 4 µm dicke Schnitte der TMA-Blöcke angefertigt und auf einen Objektträger aufgebracht. Diese Objektträger wurden zunächst mindestens 1 Stunde in Xylol, anschließend in absteigender Alkoholreihe (Isopropylalkohol 100%, Ethanol 96%, Ethanol 70%) bis zu destilliertem Wasser entparaffiniert. Zum Abschluß der Objektträgervorbereitung wurden die TMA-Schnitte 5 Minuten im TBS-Puffer (Tris gepufferte Kochsalzlösung) abgespült.

Für die vorliegende Arbeit wurde der polyklonale, in Kaninchen produzierte MMP14-Antikörper (ab3644) der Firma Abcam Ltd. (Cambridge, UK) verwendet. Die TMA-Schnitte wurden zur Vorbehandlung 5 Minuten in Citratpuffer (pH 7,8) autoklaviert und anschließend 5 Minuten im TBS-Puffer gespült.

Zur Verhinderung falsch positiver Ergebnisse wurde die endogene Peroxidase blockiert. Hierzu wurde das Präparat mit 3%igem Wasserstoffperoxid in Methanol inkubiert und zweimal je 5 Minuten im TBS-Puffer gespült.

Im nächsten Schritt wurde der Antikörper in einer Verdünnung von 1:450 (entsprechend einer Konzentration von 0,450 mg/ml) in solcher Menge appliziert, dass die Objektträger ausreichend bedeckt waren. Die TMA-Blöcke wurden 5 Minuten im TBS-Puffer gespült und mit EnVision Polymer-HRP Rabbit (Dako K4003) für 30 Minuten bei 30°C versehen und anschließend wieder mit TBS-Puffer zweimal je 5 Minuten abgespült.

Abschließend wurden die Objektträger bei Raumtemperatur für 10 Minuten mit DAB-Chromogen (Liquid DAB DAKO K3468) inkubiert. Bevor diese Applikation erfolgte - und ebenso nach Inkubation - wurden die TMA-Blöcke mit destilliertem Wasser für je 5 Minuten gespült. Die letzten Schritte umfassten das Applizieren von Haemalaun für 1 Minute, das 5minütige Bläuen mit Leitungswasser, das Entwässern über die aufsteigende Alkoholreihe bis Xylol und schließlich das Eindeckeln der Objektträger.

2.4.2 Auswertung

Um eine maximale Standardisierung der Auswertung zu erreichen, wurden alle Gewebespots von derselben Person innerhalb von ca. 10 Stunden ausgewertet. Für alle Gewebespots wurde der Anteil der MMP14 positiven Tumorzellen, sowie die Intensität der immunhistochemischen Färbung gemäß einer Skala von 0 (keine Färbung) über 1+, 2+ bis 3+ (starke Färbung) bestimmt. Lediglich die membranöse Positivität wurde beurteilt. Aus diesen Parametern wurde das abschließende Resultat für die Expressionsstärke nach den Kriterien in Tabelle 4 erstellt. Diese Kriterien entsprechen den routinemäßig verwendeten Standardkriterien des Instituts für Pathologie im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

Resultat	Färbeintensität	% positiver Tumorzellen
Negativ	0	0
Schwach positiv	1+	<80%
	2+	≤20
Moderat positiv	1+	≥80%
	2+	>20% und <80%
	3+	≤20%
Stark positiv	2+	≥80%
	3+	>20

Tabelle 4: MMP14 IHC Resultat

Abbildung 6 gibt die Intensitätsgrade am Beispiel von negativer und stark positiver Anfärbung von Adenokarzinomen der Lunge wieder.



Abbildung 6: Intensität der MMP14-Immunfärbung am Beispiel von Adenokarzinomen der Lunge. Gewebespots (Ø 0,6mm) eines (A) MMP14-negativen, (B) stark positiven Tumors.

2.5 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit SPSS für Windows (Version 13.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt.

Mehrfelder-Tests und Chi-Quadrat-Tests (Fisher's Exakt Test) wurden verwendet, um die Beziehung zwischen dem histologischen Tumortyp, Differenzierungsgrad, Stadium und der MMP14 Expression zu untersuchen. Überlebenskurven wurden nach der Methode von Kaplan-Meier hergestellt, wobei statistische Unterschiede mit dem Log-Rank-Test ermittelt wurden. Für diese Untersuchung wurden die Patienten zum Zeitpunkt ihrer letzten klinischen Kontrolle zensiert.

3 Resultate

3.1 Multi-Tumor Array

Die immunhistochemische Analyse von MMP14 war in 3108/3555 (87,4%) der auf dem Multi-Tumorarray vorhandenen Tumoren durchführbar. Bei insgesamt 447 Tumorgeweben konnte kein Ergebnis erzielt werden, weil entweder keine Tumorzellen im Gewebespot vorhanden waren (262), oder weil der Gewebespot auf dem Präparat fehlte (185). Insgesamt zeigten 554 von 3108 (17,8%) auswertbaren Tumorgeweben eine membranöse Anfärbung mit dem anti-MMP14 Antikörper. In einigen Fällen war zusätzlich zur Membranfärbung auch das Zytoplasma diffus positiv. Beispiele für auf den TMA gestanzte Tumorentitäten sind in Abbildung 7 bis 12 dargestellt. Sämtliche dieser Abbildungen zeigen eine stark positive Anfärbung.



Abbildung 7: Mamma, Phylloides Tumor



Abbildung 8: Pankreas, Adenokarzinom



Abbildung 9: Ovar, endometriales Karzinom



Abbildung 10: Gallenblase, Adenokarzinom



Abbildung 11: Lunge, Adenokarzinom



Abbildung 12: Mamma, duktales Karzinom

Alle Tumortypen mit membranöser Positivität sind in Tabelle 5 zusammengefaßt. Am häufigsten konnte MMP14 Expression in lobulären Mammakarzinomen (79%), nicht-invasiven Urothel-Karzinomen (pTa) (78%), duktalen Mammakarzinomen (76%), malignen Mesotheliomen (72%), Adenolymphomen der Speicheldrüse (71%), muzinösen Mammakarzinomen (70%), serösen Ovarialkarzinomen (68%), endometrialen Ovarialkarzinomen (67%), Adenokarzinomen der Lunge (60%) und Adenokarzinomen des Pankreas (60%) nachgewiesen werden. Starke Expression wurde vor allem im lobulären Mammakarzinom (50% starke Expression), duktalen Mammakarzinom (42%), tubulären Mammakarzinom (42%), muzinösen Mammakarzinom (35%), in Adenokarzinomen des Pankreas (33%),Adenolymphomen der Speicheldrüse (32%), malignen Mesotheliomen (32%), phylloiden Tumoren der Mamma (25%), Thymomen (23%) und Urothel-Karzinomen (pTa) (23%) gefunden. In dieser Auflistung sind nur solche Tumortypen berücksichtigt, von denen mindestens 10 Gewebeproben auswertbar waren. Zusätzlich gibt Abbildung 13 die Häufigkeit und Stärke der MMP14 Expression wieder.

24

Tumorentität moderat schwach stark n auswertbar (%) (%) (%) Hauttumoren Haut, Plattenepithelkarzinom 44 0.0 2.3 0.0 30 13.3 Haut, benigner Appendix Tumor 6.7 10.0 Tumoren der Atemwege Pharynx, lymphoepitheliales 5 20.0 0.0 0.0 Karzinom Mundhöhle. 48 8.3 0.0 0.0 Plattenepithelkarzinom Larynx, Plattenepithelkarzinom 45 6.7 6.7 0.0 Lunge, Plattenepithelkarzinom 49 24.5 16.3 2.0 Lunge, Adenokarzinom 48 22.9 16.7 20.8 Lunge, undifferenziert 15.2 10.9 6.5 46 aroßzelliges Karzinom Lunge, kleinzelliges Karzinom 45 4.4 4.4 0.0 24.0 32.0 Malignes Mesotheliom 25 16.0 Gynäkologische Tumoren 45 4.4 28.9 42.2 Mamma, duktales Karzinom Mamma, lobuläres Karzinom 42 2.4 26.2 50.0 7.4 18.5 3.7 Mamma, medulläres Karzinom 27 Mamma, tubuläres Karzinom 24 4.2 8.3 41.7 34.8 Mamma, muzinöses Karzinom 23 4.3 30.4 Mamma, apokrines Karzinom 3 0.0 0.0 33.3 Mamma, kribriformes Karzinom 6 16.7 0.0 0.0 12 0.0 0.0 25.0 Mamma, Phylloides Tumor Ovar, serös papilläres Karzinom 44 13.6 34.1 20.5 Ovar, muzinöses Karzinom 16 12.5 37.5 0.0 45 31.1 26.7 8.9 Ovar, endometriales Karzinom 33.3 **Ovar, Brenner Tumor** 6 0.0 0.0 Vulva, Plattenepithelkarzinom 40 0.0 2.5 2.5 Uterus, Cervix, CIN III 22 0.0 13.6 0.0 Uterus, Cervix, 38 13.2 10.5 2.6 Plattenepithelkarzinom Uterus, Cervix, Adenokarzinom 0.0 33.3 33.3 3 Endometrium, endometriales 48 14.6 20.8 10.4 Karzinom Endometrium, seröses Karzinom 20 10.0 20.0 5.0 Gastrointestinale Tumoren 28 14.3 25.0 32.1 Warthin-Tumor Speicheldrüse, pleomorphes 7.3 7.3 41 4.9 Adenom Speicheldrüse, Zylindrom 50 10.0 14.0 2.0 Speicheldrüse, 1 100.0 0.0 0.0 Mucoepidermoidkarzinom Speicheldrüse, Adenokarzinom 2 0.0 0.0 50.0 Speicheldrüse, 10 0.0 0.0 10.0 Azinuszellkarzinom Ösophagus, Adenokarzinom 14.3 0.0 0.0 7 Ösophagus, 5.7 11.4 35 0.0 Plattenepithelkarzinom 9.5 Magen, diffuses Adenokarzinom 21 28.6 0.0 Magen, intestinales 40 7.5 15.0 7.5

 Tabelle 5:
 Tumortypen mit membranöser MMP14-Expression

Tumorentität	n auswertbar	schwach (%)	moderat	stark (%)
Adenokarzinom	adorrentibar	(70)	(70)	(70)
Dünndarm, Adenokarzinom	10	10.0	10.0	10.0
Kolon-Adenom, geringe Dysplasie	43	0.0	0.0	2.3
Kolon, Adenokarzinom	44	4.5	4.5	0.0
Gallenblase, Adenokarzinom	28	3.6	21.4	10.7
Pankreas, duktales Adenokarzinom	48	2.1	25.0	33.3
Urogenitaltrakt Tumoren				
Niere, papilläres Karzinom	39	5.1	10.3	2.6
Niere, chromophobes Karzinom	11	9.1	0.0	9.1
Urothel-Karzinom (pTa)	40	20.0	35.0	22.5
Urothel-Karzinom (pT2-4)	38	13.2	13.2	7.9
Harnblase, sarkomatoides Karzinom	6	16.7	0.0	0.0
Prostata, unbehandeltes Karzinom	52	15.4	7.7	0.0
Prostata, hormon-refraktäres Karzinom	41	0.0	14.6	2.4
Hoden, Nicht-Seminom	45	2.2	2.2	0.0
Hoden, Teratom	6	0.0	0.0	16.7
Endokrine Tumoren				
Schilddrüsen-Adenom	44	4.5	0.0	0.0
Schilddrüse, follikuläres Karzinom	45	2.2	2.2	4.4
Schilddrüse, papilläres Karzinom	37	0.0	5.4	5.4
Hämatologische Neoplasien				
Thymom	22	4.5	18.2	22.7
ZNS Tumoren				
Glioblastoma multiforme	47	2.1	0.0	0.0
Weichteiltumore				
Lipom	28	17.9	0.0	0.0
Adenomatoid-Tumor	10	0.0	0.0	10.0



Abbildung 13: Häufigkeit und Stärke der MMP14 Expression in IHC positiven Tumortypen

Tumortypen ohne membranöse MMP14 Expression und deren auswertbare Anzahl sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tumorentität	n auswertbar		
Hauttumoren			
Malignes Melanom	48		
Basaliom	47		
Benigne Naevi	40		
Merkelzell-Karzinom	4		
Gynäkologische Tumoren			
Ovar, Dysgerminom	2		
Ovar, Gonadoblastom	1		
Ovar, Dottersacktumor	1		
Ovar, undifferenziertes Karzinom	1		
Vagina, Plattenepithelkarzinom	5		
Endometriales Stromasarkom	4		
Uterus, Karzinosarkom	6		
Urogenitaltrakt Tumoren			
Penis Karzinom	41		
Onkozytom der Niere	9		
Hoden, Seminom	49		
Hoden, gemischter Tumor	2		
Harnblase, Plattenepithelkarzinom	7		
Harnblase, kleinzelliges Karzinom	3		
Harnblase, invertiertes Papillom	1		
Niere, klarzelliges Karzinom	43		
Endokrine Tumoren			
Paragangliom	9		
Karzinoid Tumoren	42		
Nebennierenrinden-Karzinom	6		
Nebennierenrinden-Adenom	15		
Phäochromozytom	29		
Schilddrüse, anaplastisches Karzinom	5		
Schilddrüse, medulläres Karzinom	8		
Nebenschilddrüse, Adenom	26		
Nebenschilddrüse, Karzinom	2		
Gastrointestinale Tumoren			
Kolon-Adenom, mässige Dysplasie	42		
Kolon-Adenom, starke Dysplasie	45		
Hepatozelluläres Karzinom	38		
Speicheldrüse, Ewing-Sarkom	1		
Speicheldrüse, kleinzelliges Karzinom	1		
Speicheldrüse, Plattenepithelkarzinom	2		
Speicheldrüse, unklassifiziertes Karzinom	1		
Speicheldrüse, undifferenziertes	6		
Anal. Plattenepithelkarzinom	4		
Ösophagus, kleinzelliges Karzinom	1		
Gastrointestinale Stromatumoren	27		

 Tabelle 6: Tumortypen ohne membranöse MMP14-Expression
Tumorentität	n auswertbar
Hämatologische Neoplasien	
Hodgkin-Lymphom	50
Non-Hodgkin-Lymphom	47
MALT Lymphom	47
AML	1
CML	5
ZNS Tumoren	
Astrozytom	39
Oligodendrogliom	22
Medulloblastom	4
Ependymom	12
Neurofibrom	32
Meningeom	45
Craniopharyngeom	7
Esthesioneuroblastom	2
Optikusgliom	1
Weichteiltumoren	
Angiosarkom	4
Angiomyolipom	1
benignes Histiozytom	24
Leiomyosarkom	37
Liposarkom	20
Leiomyom	58
Rhabdomyosarkom	12
Fibrosarkom	8
Synovialsarkom	4
alveoläres Sarkom	1
epitheloides Sarkom	2
epitheloides Hämangiom	1
Glomustumor	9
kapilläres Hämangiom	28
Kaposi Sarkom	28
Ganglioneurom	3
Primitiv neuroektodermaler Tumor	17
Dermatofibrosarkoma protuberans	4
Granularzelltumor	6
Hämangioperizytom	10
maligner peripherer Nervenscheiden- Tumor	9
Schwannom	44
Sarkom high-grade NOS	27
Riesenzell-Sehnenscheiden Tumor	34

3.2 Ösophagus Prognose-TMA

MMP14-Expression wurde in 49/159 (30.9%) auswertbaren Plattenepithel-Ca und in 78/121 (64,5%) Adenokarzinomen des Ösophagus gefunden. Von den Plattenepithelkarzinomen zeigten 25,2% eine schwache und 5,7% eine mittelstarke Expression. Bei den Adenokarzinomen wurde in 2,5% der Fälle eine starke Expression, in 9,9% eine moderate, und in 52,1% eine schwache MMP14 Expression beobachtet. In beiden Tumortypen fand sich keine eindeutige Beziehung zwischen MMP14-Expression und TNM-Status (Tabelle 7 und 8) oder Prognose (Abbildung 14 und 15).

Bei Adenokarzinomen des Ösophagus war der Anstieg negativer Fälle von G2 zu G3 statistisch signifikant (p=0,031).

			MMP14 IHC Ö	MMP14 IHC Ösophagus Plattenepithel-Ca				
		n	n auswertbar	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	P Wert
Histologie	SQCC	163	159	69.2	25.2	5.7	0.0	
pT Stadium (SQCC)	pT1	24	24	58.3	33.3	8.3	0.0	0.379
	pT2	38	36	61.1	36.1	2.8	0.0	
	pT3	89	87	73.6	19.5	6.9	0.0	
	pT4	11	11	81.8	18.2	0.0	0.0	
pN Stadium (SQCC)	pN0	67	65	67.7	27.7	4.6	0.0	0.751
	pN1	94	93	71.0	22.6	6.5	0.0	
pM Stadium (SQCC)	pM0	142	138	68.1	26.8	5.1	0.0	0.325
	pM1	20	20	75.0	15.0	10.0	0.0	
Grad (SQCC)	G1	4	4	100	0.0	0.0	0.0	0.852
	G2	113	109	67.0	26.6	6.4	0.0	
	G3	45	45	71.1	24.4	4.4	0.0	
Resektion (SQCC)	R0	130	126	68.3	27.0	4.8	0.0	0.471
	R1	26	26	73.1	15.4	11.5	0.0	
	R2	7	7	71.4	28.6	0.0	0.0	

Tabelle 7: MMP14 in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus

Der P Wert wurde mit Fishers Exakt Test berechnet.



Abbildung 14: postoperatives Überleben bei Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus

			MMP14 IHC Ö	sophagu	s Adeno-Ca	a		
		n	n auswertbar	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	P Wert
Histologie	ADC	129	121	35.5	52.1	9.9	2.5	
pT Stadium (ADC)	pT1	24	22	22.7	68.2	9.1	0.0	0.611
	pT2	46	42	33.3	50.0	11.9	4.8	
	pT3	55	53	43.4	47.2	7.5	1.9	
	pT4	4	4	25.0	50.0	25.0	0.0	
pN Stadium (ADC)	pN0	34	32	31.3	59.4	6.3	3.1	0.696
	pN1	94	89	37.1	49.4	11.2	2.2	
pM Stadium (ADC)	pM0	96	91	30.8	57.1	8.8	3.3	0.128
	pM1	33	30	50.0	36.7	13.3	0.0	
Grad (ADC)	G1	1	1	100	0.0	0.0	0.0	0.031
	G2	50	46	19.6	65.2	10.9	4.3	
	G3	77	74	44.6	44.6	9.5	1.4	
Resektion (ADC)	R0	100	96	35.4	54.2	8.3	2.1	0.555
	R1	18	16	31.3	56.3	6.3	6.3	
	R2	8	7	57.1	28.6	14.3	0.0	

Tabelle 8: MMP14 in Adenokarzinomen des Ösophagus

Der P Wert wurde mit Fishers Exakt Test berechnet.



Abbildung 15: postoperatives Überleben bei Adenokarzinomen des Ösophagus

3.3 Pankreas Prognose-TMA

Insgesamt waren 167/213 (78,4%) der Pankreastumoren auswertbar, wobei 40,7% eine schwache, 25,1% eine moderate und 12,6% eine starke MMP14-Expression aufwiesen. Eine starke MMP14 Expression war mit einem fortgeschrittenem Tumorstadium (p=0,867) und hohem Malignitätsgrad (p=0,789) assoziiert.

			MMP14 IHC Pankreas duktales Adeno-Ca					
		n	n auswertbar	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	P Wert
Histologie	duktales ADC	213	167	21.6	40.7	25.1	12.6	
pT Stadium (duktales ADC)	pT1	7	5	40.0	40.0	20.0	0.0	0.867
	pT2	57	42	14.3	40.5	26.2	19.0	
	pT3	135	107	21.5	42.1	25.2	11.2	
	pT4	9	9	33.3	33.3	22.2	11.1	
pN Stadium (duktales ADC)	pN0	76	59	23.7	40.7	27.1	8.5	0.616
	pN1	132	104	20.2	41.3	23.1	15.4	
Grad (duktales ADC)	G1	10	7	14.3	57.1	14.3	14.3	0.789
	G2	95	78	25.6	34.6	26.9	12.8	
	G3	105	79	19.0	45.6	24.1	11.4	
Resektion (duktales ADC)	R0	88	67	28.4	34.3	25.4	11.9	0.456
	R1	24	21	28.6	23.8	42.9	4.8	

Tabelle 9: MMP14 in duktalen Adenokarzinomen des Pankreas

Der P Wert wurde mit Fishers Exakt Test berechnet.



Abbildung 16: postoperatives Überleben bei duktalen Adenokarzinomen des Pankreas

4 Diskussion

Die vorliegende Untersuchung zeigt, dass MMP14 häufig in menschlichen Tumoren exprimiert wird und bestätigt so die mögliche klinische Bedeutung von MMP14 als Therapieziel für neue, anti-MMP14 Medikamente (wie zum Beispiel Ro 28-2653).

Von den über 120 verschiedenen Tumortypen zeigten knapp die Hälfte (n=59) zumindest in einigen untersuchten Gewebeproben MMP14 Expression. Insgesamt waren rund 20% aller untersuchten Gewebeproben MMP14 positiv. Vor allem in Mammakarzinomen (je nach Subentität zwischen 70% und 79%) konnte eine häufige (und oft auch starke) membranöse MMP14 Positivität detektiert werden. Diese Befunde stimmen gut mit bereits publizierten Daten überein. So wurde in mehreren Studien zum Mammakarzinom häufige (22-100%) MMP14 Positivität beschrieben [124, 125, 129, 131, 138].

Obwohl MMP14 seit 1994 vielfach in humanen Tumoren untersucht worden ist, liefern unsere Daten wesentliche neue Erkenntnisse. In Tabelle 10 (ab Seite 41) ist ein Großteil der bereits publizierten Studien mit MMP14-Expression aufgelistet, in denen Immunhistochemie angewendet worden war. Hier wird deutlich, dass sich trotz (oder gerade wegen) der Vielzahl an durchgeführten Untersuchungen keine eindeutige Aussage hinsichtlich der Häufigkeit der MMP14-Expression in menschlichen Tumoren erkennen lässt. Beispiele Studien besonders Datenlagen diskrepanter zeigen sich in zum Mammakarzinom [124, 125, 129, 131, 138], kolorektalem Karzinom [100, 178-180, 182, 183, 187] und zu Ovarialkarzinomen [148, 149, 152, 156, 161] mit positiver Expression jeweils zwischen 22% und 100%. Weitere unterschiedliche Ergebnisse offenbaren auch Untersuchungen bezüglich der MMP14-Expression in duktalen Pankreaskarzinomen (zwischen 67% und 100%) [105, 106, 108, 110], sowie Studien, die die MMP14-Expression in hepatozellulären Karzinomen mit Werten von 59% bis 100% quantifizieren [113, 115, 117, 118].

Im Gegensatz zu den meist widersprüchlichen Ergebnissen in bisherigen Studien entstand in dieser Arbeit erstmals eine vergleichende Untersuchung, die die relative Bedeutung von MMP14 in verschiedenen Tumoren werten kann. Dabei zeigt sich, dass viele wichtige Tumorarten wie z.B. Lungenkarzinome (insbesondere Adenokarzinome), Mammakarzinome, Pankreaskarzinome und maligne Mesotheliome häufig eine hohe MMP14 Expression aufweisen. Hierbei handelt es sich um oftmals auftretende maligne Neoplasien, die aufgrund ihres besonders aggressiven Wachstums generell mit einer schlechten Prognose assoziiert sind. Somit wären diese Tumoren sicher beste Ziele für eine Therapie mit MMP-Inhibitoren. Das bereits erwähnte Präparat Ro 28-2653, ein oral verfügbarer, selektiver MMP14-Inhibitor, hat bisher in Tierversuchen mittels Hemmuna der Angiogenese und der Tumorinvasion bewerkenswerte Ergebnisse gezeigt. So untersuchte die Arbeitsgruppe um Lein 2002 den therapeutischen Effekt von Ro 28-2653 an 148 Ratten, denen Prostatakarzinomzellen injiziert wurden. Nach täglicher oraler Gabe von Ro 28-2653 in unterschiedlicher Dosierung über 15-20 Tage vermerkte man neben einer deutlichen Abnahme des Tumorgewichts auch eine signifikante Zunahme der Uberlebensdauer der Tiere [34]. Zudem beschrieben Maquoi et al. das Ausbleiben von Nebenwirkungen bei Einsatz von Ro 28-2653 [35].

Andere wichtige Tumoren exprimieren MMP14 weniger häufig als erwartet. In mehreren Abhandlungen über die MMP14 Expression in kolorektalen Karzinomen wurde eine Positivität von 100% festgestellt [100, 180]. Im Gegensatz dazu konnte in unserer Untersuchung nur eine vergleichsweise geringe Häufigkeit (9%) festgestellt werden. Diese Diskrepanz lässt sich eventuell durch einen typischen Immunhistochemie- Artefakt erklären. Die Schleimbildung in Becherzellen führt dazu, dass bei vielen Zellen von kolorektalen Karzinomen das Zytoplasma an den Zellrand gepresst wird. Die anschließend durchgeführte Untersuchung auf die Expression von MMP14 mag den Eindruck erwecken, dass eine membranöse Färbung vorliegt. Allerdings handelt es sich hier um eine pseudomembranöse Färbung in Becherzellen. Unser Befund ist daher insofern bedeutend, als dieser wichtige Tumortyp nach unserer Interpretation als Therapie-Indikation wenig geeignet scheint.

Gleiches gilt für das Prostatakarzinom. Die in Tabelle 10 aufgeführte Studie von Upadhyay et al. [93] hat in diesem häufigen und bedeutsamen Tumortyp einen Wert von 78% positiven Fällen ergeben. Unsere Untersuchung zeigt aber eine

vergleichsweise geringe Expression von MMP14 in Prostatakarzinomzellen. MMP14 Positivität wurde lediglich in 23,1% der Gewebefragmente des unbehandelten Prostatakarzinoms detektiert. Des Weiteren wurde keine Steigerung der MMP14 Expressionsrate in hormon-refraktären Prostatakarzinomgeweben gemessen (17%). Auch wenn dieses häufige Endstadium der Prostatakarzinom Erkrankung besonders von einer anti-MMP-Therapie profitieren könnte, lassen unsere Ergebnisse vermuten, dass das Prostatakarzinom wohl keine optimale Indikation zur Therapie mit MMP-Inhibitoren darstellen würde.

In der Literatur wird über weitere Tumorentitäten berichtet, die eine deutlich höhere Rate positiver Färbungen zeigen sollen als in unserer Studie gefunden. Hierzu zählen unter anderem Magen-Ca, hepatozelluläres Karzinom, Ovarialkarzinom, malignes Melanom, Endometrium-Ca sowie Karzinome und Adenome der Schilddrüse. Diese Diskrepanzen sind sehr wahrscheinlich in der uneinheitlichen Durchführung der immunhistochemischen Methode begründet. Der Gebrauch unterschiedlicher Antikörper war auffällig. So wurde in der Arbeitsgruppe um Di Nezza [213] ein monoklonaler, in Mäusen produzierter Antikörper Firma Oncogene (USA) der Research Products zur immunhistochemischen Uberprüfung von MMP14-Expression in Endometriumkarzinomen verwendet, wohingegen Sier et al. [167] einen polyklonalen, in Kaninchen hergestellten Antikörper der Firma TNO-PG (Niederlande) zur Auswertung von MMP14-Expression in Zervixkarzinomen benutzten. Auch in Studien zur Untersuchung derselben Tumorentität kamen unterschiedliche Antikörper zum Einsatz [148, 156]. Insgesamt wurden für MMP14 Studien mehr als zehn verschiedene Antikörper mit einer beträchtlichen Anzahl an unterschiedlichen Protokollen verwendet. Auch bezüglich der Auswertung gab es keinen Konsensus. Die Definition für MMP14 positive Expression ist inhomogen. In einigen Studien ist bereits eine Anzahl von 1% positiv gefärbter Tumorzellen ausreichend, um eine positive MMP14 Expression zu dokumentieren [72, 118, 131, 167, 214], wobei andere Autoren eine Positivität erst ab 5% [77, 193], 10% [88, 149, 178, 179, 208], 20% [129] oder 50% [78, 79] gefärbter Zellen definieren.

Diese Befunde machen viele Probleme der Immunhistochemie deutlich. Es ist insgesamt bemerkenswert, dass für eine derart bedeutende diagnostische Methode nicht mehr Standardisierung besteht. Die gängigen Verhältnisse bei der routinemässigen Bestimmung von HER-2, Östrogen- und Progesteronrezeptoren in Mammakarzinomen sind geradezu exemplarisch für die Problematik der IHC-basierenden Diagnostik.

HER-2 ist ein Onkogen, das in Mammakarzinomen exprimiert wird und in Patientinnen mit metastasiertem Mamma-Ca als Angriffspunkt für das Medikament Trastuzumab (Herceptin®) dient. Die Anwendung von Herceptin® bedarf einer vorab durchgeführten Bestimmung der HER-2 Expression mittels IHC (und ggf. FISH, Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung). Die von der FDA (Food and Drug Administration, USA) zugelassene immunhistochemische Analyse von HER-2 verspricht durch die standardisierte Durchführung und Auswertung einer erprobten Methode (HercepTest® der Firma DAKO) zumindest theoretisch ein einheitliches Ergebnis.

Komplett anders ist die "Rechtslage" bei der Bestimmung der Östrogen- und Progesteronrezeptoren (ER, estrogen receptor, PR, progesteron receptor). Für die Hormonrezeptorbestimmung, die bereits seit Ende der `70er Jahre in der Diagnostik etabliert ist und für das invasive Mammakarzinom obligat durchgeführt wird, bestehen nämlich keinerlei regulatorische Bestimmungen. Dementsprechend werden weltweit eine unüberschaubare Anzahl verschiedener Antikörper verwendet, oftmals mit individuellen Protokollen, die somit zusätzlich in Verdünnung und Inkubationszeit und -temperatur variieren. Eine weitere Ursache für Unklarheiten liegt in der Verwendung unterschiedlicher Scoring-Methoden für die Hormonrezeptoren. So definiert zum Beispiel der in Deutschland übliche immunreaktive Score (IRS) nach Remmele und Stegner [222] aus dem Jahre 1987 die Hormonrezeptor-Positivität (% Grenzwert) anders als der St. Gallen Konsens 2001 [223]. Letztgenannter sieht die Hormonrezeptor-Positivität und somit ein mögliches Ansprechen auf eine endokrine Therapie erst gegeben, wenn mehr als 10% der Tumorzellkerne eine Anfärbbarkeit für den Östrogenrezeptor und/oder den Progesteronrezeptor zeigen. Der immunreaktive Score hingegen wertet eine Färbereaktion schon bei weniger als 10% der angefärbten Kerne als positiv.

Diese Fakten verdeutlichen, dass die zum Teil stark unterschiedlichen Ergebnisse aus vielen früheren IHC-Studien in erster Linie auf methodische Unterschiede zurückzuführen sind und nicht wirklich zwingend biologische Variabilität aufzeigen. Aus diesem Grund ist es schwierig, aus den Daten der Literatur eine Ubersicht über die Expression eines Proteins in verschiedenen Tumoren zu gewinnen. Große TMA-Studien sind hingegen hervorragend für vergleichende Studien geeignet. TMA-Studien sind hochgradig standardisiert, werden doch alle Tumoren zur selben Zeit, mit denselben Reagenzien, und unter denselben Versuchsbedingungen analysiert. Allerdings wurden für die vorliegende Studie nur 0,6 mm große Areale pro Tumor untersucht. Auch wenn das gestanzte Areal vorher repräsentativ ausgewählt wurde, mag das auf den ersten Blick als ein sehr kleiner Ausschnitt gelten. Dabei wird allerdings übersehen, dass auch bei immunhistochemischer Untersuchung eines Großschnitts nur ein verschwindend kleiner Anteil eines Tumors analysiert wird. Im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf ist es zum Beispiel Standard, Prostaten komplett aufzuarbeiten. Die vollständige Prostata wird in 0,3 cm dicke Fragmente geschnitten und in Kapseln platziert. Letztendlich werden 3 µm dicke Schnitte auf den Objektträger aufgetragen. Dies führt aber zur Analyse von lediglich 0,1% der gesamten Prostata. Im Vergleich zu anderen Tumortypen ist das Vorgehen zur Prostata Analyse sehr präzise. So werden zum Beispiel aus Kolonkarzinomgewebe nur einzelne repräsentative Areale entnommen. Die Folge ist ein noch geringerer Prozentsatz, der offenbar aber dennoch Aussagen zu Diagnose und Prognose zulässt. Gleiches gilt für die Anwendung von Multi-Tumor Arrays. Natürlich birgt das TMA-Verfahren die Gefahr des Ausstanzens eines Bereiches, der für den jeweiligen Tumor nicht signifikant ist. Wie oben geschildert besteht dieses Risiko allerdings für sämtliche Formen der Tumorgewebeuntersuchung und wird durch die Vielzahl der untersuchten Tumoren statistisch kompensiert. Gerade die konzentrierte Darstellung von bis zu 1000 Gewebespots auf einem einzigen Objektträger erlaubt dem Pathologen eine zeitnahe Auswertung. Durch diese rasche Auswertung der großen Anzahl von Gewebeproben wird auch die Intra-Observer-Variabilität maximal gering gehalten.

Diskussion

Frühere TMA Untersuchungen haben gezeigt, dass die Methode gut zur Identifikation von molekularen Prognosemarkern geeignet ist [221, 224-229]. Insbesondere wurden alle bisher etablierten Prognosefaktoren beim Mammakarzinom (Östrogenrezeptor, Progesteronrezeptor, p16, EGFR, Ki67, p53) auch an TMAs reproduziert [230, 231]. Andere Beispiele von an TMA identifizierten bekannten Prognosemarkern sind Vimentin beim Nieren-Ca [232, 233], p53 und Ki67 bei Harnblasen-Ca [234, 235] und p53 beim Prostata-Ca [236]. Der in dieser Studie an insgesamt 292 Ösophaguskarzinomen und 213 Pankreastumoren nicht gelungene Nachweis einer Prognoserelevanz von MMP14 spricht aber gegen eine klinische Bedeutung dieses Markers außerhalb eines möglichen Einsatzes als Therapieziel. Die untersuchte Fallzahl ist aber für eine definitive Aussage eher zu klein. Einzige signifikante klinisch-pathologische Assoziation war ein Bezug der MMP14 Expression zum Differenzierungsgrad beim Adenokarzinom des Ösophagus. Bei fehlendem Bezug zu Tumorstadien, sowie Prognose könnte dieses statistisch signifikante Resultat am ehesten ein Zufallsprodukt basierend auf der hohen Zahl durchgeführter statistischer Untersuchungen darstellen.

Zusammenfassend zeigt die Untersuchung, dass die Häufigkeit der MMP14 Expression in humanen Geweben aufgrund der inhärenten Probleme der IHC-Technik vermutlich nicht aus der existierenden Literatur abgeleitet werden kann. Im Gegensatz dazu ist es durch den Einsatz der TMA-Technik gelungen, eine Rangliste des MMP14 Expressionsniveaus in fast allen menschlichen Tumortypen zu erstellen. Besonders häufig kommt MMP14 bei lobulären Mammakarzinomen, nicht-invasiven Urothel-Karzinomen, duktalen Mammakarzinomen und malignen Mesotheliomen vor. Diese Liste kann nun als Ausgangspunkt dienen, um weiterführende Analysen zu MMP14 Inhibitoren – einschließlich funktioneller und klinischer Studien – in besonders viel versprechenden Tumortypen durchzuführen.

Tumorentitität	Autor	n pos/n ges	Subentität	% pos	Kompartime nt
Magen-Ca	Nomura [95]	28/46		61	teilweise membranös
	Mori [96]	15/15		100	teilweise membranös
	Ohtani [100]	19/19		100	
HCC	Ou [115]	120/136		88	
	Giannelli [113]	40/40		100	Membran
	Ogata [118]	22/37		59	
	Harada [117]	25/25		100	
Pankreas-Ca, duktal	Määttä [106]	8/8		100	
	Imamura [105]	9/12		75	
	Ottaviano [110]	61/61		100	
	Yamamoto [108]	47/70		67	
Mamma-Ca	Ishigaki [124]	103/183		56	
	Mylona [129]	69/175 39/175		39 22	Membran, Zytoplasma
	Jones [131]	112/114 78/114		98 68	Membran, Zytoplasma
	Ueno [125]	32/32		100	teilweise membranös
	Yao [138]	24/46		52	
Ovarial-Ca	Kamat [148]	90/90		100	Epithel
	Barbolina [149]	113/149 56/77 33/45 17/18 7/9	Insgesamt serös endometroid klarzellig muzinös	76 73 73 94 78	
	Lin [152]	34/77	muzinos	44	Epithel
	Sood [156]	78/78		100	Epithel
	Torng [161]	xx/35 xx/49	endometroid	22 78	Zytoplasma
Zervix-Ca	Sier [167]	30/30		100	
	Sheu [166]	25/31 2/23 1/8	Plattenepithel HGSIL LGSIL	81 9 13	

Tabelle 10: MMP14-Expression in IHC-Studien

Tumorentitität	Autor	n pos/n ges	Subentität	% pos	Kompartime nt
Endometrium-Ca	Di Nezza [213]	20/29		69	
Kolorektales Ca	Schwandner [178]	46/94		49	Zytoplasma
	Ohtani [100]	20/20		100	
	Kikuchi [179]	33/92		36	überwiegend Zytoplasma
	Bendardaf [180]	49/49		100	
	Ngan [182]	31/140		22	Zytoplasma
	Masaki [187]	14/51		27	Zytoplasma
Prostata-Ca	Upadhyay [93]	39/50		78	Epithel
Osteosarkom	Uchibori [190]	21/47		45	Membran, Zytoplasma
Neuroblastom	Sakakibara [197]	16/19		84	
Schilddrüsen-Ca	Nakamura [145]	26/26	papillär	100	
	Cho Mar [146]	18/21	follikulär	86	Membran, Zytoplasma
Schilddrüsen- Adenom	Cho Mar [146]	15/19	follikulär	79	Membran, Zytoplasma
	Nakamura [145]	0/9	follikulär	0	
ZNS Tumoren	Nakada [170]	17/17	Glioblastom	100	
	Lampert [175]	5/5 4/4 3/3	Astrozytom Glioblastom Medulloblastom	100 100 100	Membran
	Guo [173]	31/31 17/19	Glioblastom Astrozytome (Subtypen)	100 89	
		7/7	Oligodendrogliom	100	
	Munaut [177]	xx/20	Glioblastom	xx	Zytoplasma
Lungen-Ca	Yamamura [84] Michael [99]	89/89	NSCLC, davon: 40 Adeno-Ca, 38 Plattenepithel-Ca, 10 großzellige, 1 adenosquamöses kleinzelligos	100	Zytoplasma
		37740	Karzinom	02	
Karzinome des Kopfes und Halses	rosnizaki [74]	4/6 4/5 4/4 3/3	Maxilla Mundhöhle Hypopharynx Tonsillen	67 80 100	

Tumorentitität	Autor	n pos/n ges	Subentität	% pos	Kompartime nt
		9/9	Larynx	100	
	Kurahara [72]	42/55	Plattenepithel- Karzinome der Mundhöhle	76	
	Yoshizaki [78]	18/51	Plattenepithel-Ca der Zunge	35	
	Shimada [76]	23/24	Plattenepithel- Karzinome der Mundhöble	96	
	Imanishi [77]	45/65	Plattenepithel- Karzinome des Kopfes und Halses	69	
	Myoung [79]	21/46	Plattenepithel- Karzinome der Mundhöhle	46	
	Katayama [80]	40/53	Plattenepithel- Karzinome der Mundhöhle	75	Membran, Zytoplasma
	Kumamoto [81]	40/40	Ameloblastischer Tumor	100	Membran, Zytoplasma
Ösophagus-Ca	Etoh [211]	22/35		63	
	Ohashi [210]	78/142	Insgesamt 4/30 intramukös 39/75 submukös 35/37 Adventitia	55 13 52 95	
	Yamashita [212]	6/10		60	
Malignes Melanom	Kanekura [65]	15/28		54	Zytoplasma
Schwannom	Nabeshima [216]	1/14		7	
Neurofibrom	Nabeshima [216]	1/14		7	
Nervenscheiden- Tumor, maligne (MPNST)	Nabeshima [216]	7/12		58	
Speicheldrüsen- Ca	Kayano [215]	6/9 6/9	Mukoepidermoid adenoidzystisch	67 67	
Thymom	Takahashi [214]	4/5 49/57	Adeno-Ca	80 86	
Knorpeltumoren	Sakamoto [193]	8/10 32/34 4/5 5/8 4/7 0/7	Enchondrom Chondrosarkom Chondrosarkom (klarzellig) Chondrosarkom (entdifferenziert) Chondrosarkom (mesenchymal) Ewing-Sarkom	80 94 80 63 57 0	Zytoplasma
Kaposi-Sarkom	Pantanowitz [237]	0/9	HISTIOZYTOM	0	

Tumorentitität	Autor	n pos/n ges	Subentität	% pos	Kompartime nt
Dermatofibrom	Weinrach [208]	27/46		59	
Merkel-Zell-Ca, neuroendokriner Hauttumor	Massi [206]	11/23		48	Zytoplasma

(xx = der entsprechende Wert ist aus der angegebenen Studie nicht ersichtlich)

5 Zusammenfassung

Matrix Metalloproteinase 14 (MMP14) ist eine Endopeptidase mit Funktion bei Angiogenese und Umstrukturierung der extrazellulären Matrix und kann daher als mögliches Therapieziel für Medikamente wie Ro 28-2653 gesehen werden. Infolgedessen besteht großes Interesse an einer Untersuchung, die zeigt, in welchen Tumortypen MMP14 besonders oft und in hoher Expressionsstärke zu finden ist. Die bisher durchgeführten Studien bezüglich der Expression von MMP14 beschränken sich allerdings auf kleine Tumorkollektive und sind zudem vielfach widersprüchlich. Mit der immunhistochemischen Untersuchung unseres Multi-Tumor Arrays aus insgesamt 3555 Gewebespots, die mehr als 120 verschiedene Tumorentitäten und 14 unterschiedliche Normalgewebetypen vereinen, gelang ein umfassender Überblick über die Expression von MMP14. Erzielt wurde das Ergebnis in einem perfekt standardisierten Verfahren. Die TMA-Technik ermöglicht die Durchführung der Immunhistochemie nach standardisierten Protokollen, also mit für alle Proben identischen Reagenzien und Konzentrationen, sowie die Auswertung sämtlicher Gewebeproben an lediglich einem Tag.

Insgesamt 3108/3555 (87,4%) der auf dem Multi-Tumorarray vorhandenen Tumoren waren auswertbar und bei insgesamt 554 von 3108 (17.8%) konnte eine membranöse Anfärbung mit dem anti-MMP14 Antikörper registriert werden. Positive Befunde waren besonders häufig bei lobulären Mammakarzinomen (79%), nicht-invasiven Urothel-Karzinomen (78%), duktalen Mammakarzinomen (76%), malignen Mesotheliomen (72%), Adenolymphomen der Speicheldrüse (71%) und muzinösen Mammakarzinomen (70%).

Zusätzlich zum Multi-Tumor Array wurde die Expression von MMP14 auch an Prognose-TMAs des Ösophagus (n=292) und Pankreas (n=213) untersucht. Weder im duktalen Adenokarzinom des Pankreas noch im Plattenepithelkarzinom und Adenokarzinom des Ösophagus fand sich ein relevanter Zusammenhang zwischen MMP14-Expression und Differenzierung, TNM-Stadium oder Patientenprognose. Dies spricht gegen eine Rolle von MMP14 für die Progression dieser Tumoren.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass MMP14 aufgrund der gezeigten Präsenz in mehreren Tumorarten, wie den duktalen Mammakarzinomen,

Adenokarzinomen der Lunge und serösen Ovarialkarzinomen als Therapieziel in Frage kommen sollte.

6 Literatur

- 1. Greenlee, K.J., Z. Werb, and F. Kheradmand, *Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted.* Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 69-98.
- 2. Kleiner, D.E. and W.G. Stetler-Stevenson, *Matrix metalloproteinases and metastasis.* Cancer Chemother Pharmacol, 1999. **43 Suppl**: p. S42-51.
- 3. Visse, R. and H. Nagase, *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors* of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. Circ Res, 2003. **92**(8): p. 827-39.
- 4. Seiki, M., *Membrane-type matrix metalloproteinases*. Apmis, 1999. **107**(1): p. 137-43.
- 5. Sato, H., et al., A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. Nature, 1994. **370**(6484): p. 61-5.
- 6. Takino, T., et al., *Identification of the second membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP-2) gene from a human placenta cDNA library. MT-MMPs form a unique membrane-type subclass in the MMP family.* J Biol Chem, 1995. **270**(39): p. 23013-20.
- 7. Kojima, S., et al., *Membrane-type 6 matrix metalloproteinase (MT6-MMP, MMP-25) is the second glycosyl-phosphatidyl inositol (GPI)-anchored MMP.* FEBS Lett, 2000. **480**(2-3): p. 142-6.
- 8. Baker, A.H., D.R. Edwards, and G. Murphy, *Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 19): p. 3719-27.
- 9. Takahashi, C., et al., *Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(22): p. 13221-6.
- Troeberg, L., et al., E. coli expression of TIMP-4 and comparative kinetic studies with TIMP-1 and TIMP-2: insights into the interactions of TIMPs and matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A). Biochemistry, 2002.
 41(50): p. 15025-35.
- 11. Correa, T.C., et al., *Downregulation of the RECK-tumor and metastasis suppressor gene in glioma invasiveness.* J Cell Biochem, 2006. **99**(1): p. 156-67.
- Oh, J., et al., *The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis*. Cell, 2001. **107**(6): p. 789-800.
- Steffensen, B., L. Hakkinen, and H. Larjava, Proteolytic events of woundhealing--coordinated interactions among matrix metalloproteinases (MMPs), integrins, and extracellular matrix molecules. Crit Rev Oral Biol Med, 2001. 12(5): p. 373-98.
- Madlener, M., W.C. Parks, and S. Werner, Matrix metalloproteinases (MMPs) and their physiological inhibitors (TIMPs) are differentially expressed during excisional skin wound repair. Exp Cell Res, 1998. 242(1): p. 201-10.
- 15. Parks, W.C., *Matrix metalloproteinases in repair.* Wound Repair Regen, 1999. **7**(6): p. 423-32.
- 16. Sivakumar, B., L.E. Harry, and E.M. Paleolog, *Modulating angiogenesis:* more vs less. Jama, 2004. **292**(8): p. 972-7.

- Chun, T.H., et al., *MT1-MMP-dependent neovessel formation within the confines of the three-dimensional extracellular matrix.* J Cell Biol, 2004. 167(4): p. 757-67.
- 18. Hiraoka, N., et al., *Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins.* Cell, 1998. **95**(3): p. 365-77.
- 19. Peschon, J.J., et al., *An essential role for ectodomain shedding in mammalian development.* Science, 1998. **282**(5392): p. 1281-4.
- 20. Itoh, Y. and H. Nagase, *Matrix metalloproteinases in cancer.* Essays Biochem, 2002. **38**: p. 21-36.
- 21. Itoh, T., et al., *Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice.* Cancer Res, 1998. **58**(5): p. 1048-51.
- 22. Itoh, T., et al., *Experimental metastasis is suppressed in MMP-9-deficient mice.* Clin Exp Metastasis, 1999. **17**(2): p. 177-81.
- Tsunezuka, Y., et al., Expression of membrane-type matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP) in tumor cells enhances pulmonary metastasis in an experimental metastasis assay. Cancer Res, 1996.
 56(24): p. 5678-83.
- 24. Ahonen, M., A.H. Baker, and V.M. Kahari, *Adenovirus-mediated gene delivery of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 inhibits invasion and induces apoptosis in melanoma cells.* Cancer Res, 1998. **58**(11): p. 2310-5.
- Bourguignon, L.Y., et al., CD44v(3,8-10) is involved in cytoskeletonmediated tumor cell migration and matrix metalloproteinase (MMP-9) association in metastatic breast cancer cells. J Cell Physiol, 1998.
 176(1): p. 206-15.
- 26. Egeblad, M. and Z. Werb, *New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression.* Nat Rev Cancer, 2002. **2**(3): p. 161-74.
- 27. Stetler-Stevenson, W.G. and A.E. Yu, *Proteases in invasion: matrix metalloproteinases.* Semin Cancer Biol, 2001. **11**(2): p. 143-52.
- 28. Shalinsky, D.R., et al., *Marked antiangiogenic and antitumor efficacy of* AG3340 in chemoresistant human non-small cell lung cancer tumors: single agent and combination chemotherapy studies. Clin Cancer Res, 1999. **5**(7): p. 1905-17.
- 29. Bu, W., et al., *Effects of matrix metalloproteinase inhibitor BB-94 on liver cancer growth and metastasis in a patient-like orthotopic model LCI-D20.* Hepatogastroenterology, 1998. **45**(22): p. 1056-61.
- 30. Giavazzi, R., et al., *Batimastat, a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases, potentiates the antitumor activity of cisplatin in ovarian carcinoma xenografts.* Clin Cancer Res, 1998. **4**(4): p. 985-92.
- 31. Maekawa, K., et al., *Inhibition of cervical lymph node metastasis by* marimastat (BB-2516) in an orthotopic oral squamous cell carcinoma implantation model. Clin Exp Metastasis, 2002. **19**(6): p. 513-8.
- 32. Bissett, D., et al., *Phase III study of matrix metalloproteinase inhibitor prinomastat in non-small-cell lung cancer.* J Clin Oncol, 2005. **23**(4): p. 842-9.
- 33. Sparano, J.A., et al., Randomized phase III trial of marimastat versus placebo in patients with metastatic breast cancer who have responding or stable disease after first-line chemotherapy: Eastern Cooperative Oncology Group trial E2196. J Clin Oncol, 2004. **22**(23): p. 4683-90.

- 34. Lein, M., et al., *The new synthetic matrix metalloproteinase inhibitor* (Roche 28-2653) reduces tumor growth and prolongs survival in a prostate cancer standard rat model. Oncogene, 2002. **21**(13): p. 2089-96.
- 35. Maquoi, E., et al., *Anti-invasive, antitumoral, and antiangiogenic efficacy* of a pyrimidine-2,4,6-trione derivative, an orally active and selective matrix metalloproteinases inhibitor. Clin Cancer Res, 2004. **10**(12 Pt 1): p. 4038-47.
- 36. Luo, X.H., et al., *Recombinant matrix metalloproteinase-14 catalytic domain induces apoptosis in human osteoblastic SaOS-2 cells.* J Endocrinol Invest, 2003. **26**(11): p. 1111-6.
- 37. Bode, W., *Structural basis of matrix metalloproteinase function.* Biochem Soc Symp, 2003(70): p. 1-14.
- 38. Seiki, M., *Membrane-type 1 matrix metalloproteinase: a key enzyme for tumor invasion.* Cancer Lett, 2003. **194**(1): p. 1-11.
- 39. Zucker, S., et al., *Membrane type-matrix metalloproteinases (MT-MMP)*. Curr Top Dev Biol, 2003. **54**: p. 1-74.
- 40. Brinckerhoff, C.E. and L.M. Matrisian, *Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(3): p. 207-14.
- 41. Cao, J., et al., *The C-terminal region of membrane type matrix metalloproteinase is a functional transmembrane domain required for pro-gelatinase A activation.* J Biol Chem, 1995. **270**(2): p. 801-5.
- 42. Strongin, A.Y., et al., *Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease.* J Biol Chem, 1995. **270**(10): p. 5331-8.
- 43. Will, H. and B. Hinzmann, *cDNA* sequence and *mRNA* tissue distribution of a novel human matrix metalloproteinase with a potential transmembrane segment. Eur J Biochem, 1995. **231**(3): p. 602-8.
- 44. Nagase, H., *Activation mechanisms of matrix metalloproteinases*. Biol Chem, 1997. **378**(3-4): p. 151-60.
- 45. Guo, C., et al., *Paradigmatic identification of MMP-2 and MT1-MMP activation systems in cardiac fibroblasts cultured as a monolayer*. J Cell Biochem, 2005. **94**(3): p. 446-59.
- 46. Sato, H., et al., Activation of a recombinant membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2. FEBS Lett, 1996. **393**(1): p. 101-4.
- 47. Yana, I. and S.J. Weiss, *Regulation of membrane type-1 matrix metalloproteinase activation by proprotein convertases.* Mol Biol Cell, 2000. **11**(7): p. 2387-401.
- 48. Mazzone, M., et al., Intracellular processing and activation of membrane type 1 matrix metalloprotease depends on its partitioning into lipid domains. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 26): p. 6275-87.
- 49. Bassi, D.E., et al., *Elevated furin expression in aggressive human head and neck tumors and tumor cell lines.* Mol Carcinog, 2001. **31**(4): p. 224-32.
- Wu, Y.I., et al., Glycosylation broadens the substrate profile of membrane type 1 matrix metalloproteinase. J Biol Chem, 2004. 279(9): p. 8278-89.

- 51. Ohuchi, E., et al., *Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules.* J Biol Chem, 1997. **272**(4): p. 2446-51.
- 52. Imai, K., et al., *Membrane-type matrix metalloproteinase 1 is a gelatinolytic enzyme and is secreted in a complex with tissue inhibitor of metalloproteinases 2.* Cancer Res, 1996. **56**(12): p. 2707-10.
- 53. d'Ortho, M.P., et al., *Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases.* Eur J Biochem, 1997. **250**(3): p. 751-7.
- 54. Koshikawa, N., et al., *Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5.* J Cell Biol, 2000. **148**(3): p. 615-24.
- Koshikawa, N., et al., Proteolytic processing of laminin-5 by MT1-MMP in tissues and its effects on epithelial cell morphology. Faseb J, 2004.
 18(2): p. 364-6.
- 56. Cowell, S., et al., Induction of matrix metalloproteinase activation cascades based on membrane-type 1 matrix metalloproteinase: associated activation of gelatinase A, gelatinase B and collagenase 3. Biochem J, 1998. **331 (Pt 2)**: p. 453-8.
- 57. Kajita, M., et al., *Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration.* J Cell Biol, 2001. **153**(5): p. 893-904.
- 58. Tam, E.M., et al., *Membrane protease proteomics: Isotope-coded affinity tag MS identification of undescribed MT1-matrix metalloproteinase substrates.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(18): p. 6917-22.
- 59. Kurschat, P., et al., *Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2* regulates matrix metalloproteinase-2 activation by modulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase activity in high and low invasive melanoma cell lines. J Biol Chem, 1999. **274**(30): p. 21056-62.
- 60. Hofmann, U.B., et al., *Expression of matrix metalloproteinases in the microenvironment of spontaneous and experimental melanoma metastases reflects the requirements for tumor formation.* Cancer Res, 2003. **63**(23): p. 8221-5.
- 61. Sounni, N.E., et al., *Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) in A2058 melanoma cells is associated with MMP-2 activation and increased tumor growth and vascularization.* Int J Cancer, 2002. **98**(1): p. 23-8.
- 62. Ohnishi, Y., S. Tajima, and A. Ishibashi, *Coordinate expression of membrane type-matrix metalloproteinases-2 and 3 (MT2-MMP and MT3-MMP) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in primary and metastatic melanoma cells.* Eur J Dermatol, 2001. **11**(5): p. 420-3.
- 63. Hofmann, U.B., et al., *Expression of integrin alpha(v)beta(3) correlates* with activation of membrane-type matrix metalloproteinase-1 (*MT1-MMP*) and matrix metalloproteinase-2 (*MMP-2*) in human melanoma cells in vitro and in vivo. Int J Cancer, 2000. **87**(1): p. 12-9.
- 64. Banerji, A., et al., *Cell membrane-associated MT1-MMP-dependent activation of pro-MMP-2 in A375 melanoma cells.* J Environ Pathol Toxicol Oncol, 2005. **24**(1): p. 3-17.
- 65. Kanekura, T., X. Chen, and T. Kanzaki, *Basigin (CD147) is expressed on melanoma cells and induces tumor cell invasion by stimulating production of matrix metalloproteinases by fibroblasts.* Int J Cancer, 2002. **99**(4): p. 520-8.

- Hofmann, U.B., et al., Stromal cells as the major source for matrix metalloproteinase-2 in cutaneous melanoma. Arch Dermatol Res, 2005. 297(4): p. 154-60.
- 67. Hofmann, U.B., et al., *Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and its co-localization with membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) correlate with melanoma progression.* J Pathol, 2000. **191**(3): p. 245-56.
- 68. Lehti, K., et al., *Proteolytic processing of membrane-type-1 matrix metalloproteinase is associated with gelatinase A activation at the cell surface.* Biochem J, 1998. **334 (Pt 2)**: p. 345-53.
- 69. Stanton, H., et al., *The activation of ProMMP-2 (gelatinase A) by HT1080 fibrosarcoma cells is promoted by culture on a fibronectin substrate and is concomitant with an increase in processing of MT1-MMP (MMP-14) to a 45 kDa form.* J Cell Sci, 1998. **111 (Pt 18)**: p. 2789-98.
- Habelhah, H., et al., Increased E1AF expression in mouse fibrosarcoma promotes metastasis through induction of MT1-MMP expression. Oncogene, 1999. 18(9): p. 1771-6.
- 71. Okada, A., et al., *Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP)* gene is expressed in stromal cells of human colon, breast, and head and neck carcinomas. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(7): p. 2730-4.
- 72. Kurahara, S., et al., *Expression of MMPS, MT-MMP, and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumor invasion and metastasis.* Head Neck, 1999. **21**(7): p. 627-38.
- Birkedal-Hansen, B., et al., *MMP and TIMP gene expression in head and neck squamous cell carcinomas and adjacent tissues.* Oral Dis, 2000.
 6(6): p. 376-82.
- 74. Yoshizaki, T., et al., *Increased expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase in head and neck carcinoma.* Cancer, 1997. **79**(1): p. 139-44.
- 75. Dasgupta, S., et al., *Tumor metastasis in an orthotopic murine model of head and neck cancer: possible role of TGF-beta 1 secreted by the tumor cells.* J Cell Biochem, 2006. **97**(5): p. 1036-51.
- 76. Shimada, T., et al., Enhanced production and activation of progelatinase A mediated by membrane-type 1 matrix metalloproteinase in human oral squamous cell carcinomas: implications for lymph node metastasis. Clin Exp Metastasis, 2000. **18**(2): p. 179-88.
- 77. Imanishi, Y., et al., *Clinical significance of expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase and matrix metalloproteinase-2 in human head and neck squamous cell carcinoma.* Hum Pathol, 2000. **31**(8): p. 895-904.
- 78. Yoshizaki, T., et al., *Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 correlates with activation of matrix metalloproteinase-2 and predicts poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma*. Int J Cancer, 2001. **95**(1): p. 44-50.
- Myoung, H., et al., *Expression of membrane type I-matrix* metalloproteinase in oral squamous cell carcinoma. Cancer Lett, 2002. 185(2): p. 201-9.
- 80. Katayama, A., et al., *Expressions of matrix metalloproteinases in early*stage oral squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastases and prognosis. Clin Cancer Res, 2004. **10**(2): p. 634-40.

- 81. Kumamoto, H. and K. Ooya, *Immunohistochemical detection of MT1-MMP, RECK, and EMMPRIN in ameloblastic tumors.* J Oral Pathol Med, 2006. **35**(6): p. 345-51.
- 82. Tokuraku, M., et al., Activation of the precursor of gelatinase A/72 kDa type IV collagenase/MMP-2 in lung carcinomas correlates with the expression of membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) and with lymph node metastasis. Int J Cancer, 1995. **64**(5): p. 355-9.
- 83. Tokuraku, M., et al., [Expression of membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) and activation of MMP-2 in lung cancer]. Nippon Rinsho, 1995. **53**(7): p. 1822-6.
- 84. Yamamura, T., et al., *Expression of membrane-type-1-matrix metalloproteinase and metalloproteinase-2 in nonsmall cell lung carcinomas.* Lung Cancer, 2002. **35**(3): p. 249-55.
- 85. Nawrocki, B., et al., *Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human bronchopulmonary carcinomas: quantificative and morphological analyses.* Int J Cancer, 1997. **72**(4): p. 556-64.
- 86. Polette, M., et al., *MT-MMP expression and localisation in human lung and breast cancers.* Virchows Arch, 1996. **428**(1): p. 29-35.
- 87. Kettunen, E., et al., *Differentially expressed genes in nonsmall cell lung cancer: expression profiling of cancer-related genes in squamous cell lung cancer.* Cancer Genet Cytogenet, 2004. **149**(2): p. 98-106.
- 88. Michael, M., et al., *Expression and prognostic significance of metalloproteinases and their tissue inhibitors in patients with small-cell lung cancer.* J Clin Oncol, 1999. **17**(6): p. 1802-8.
- 89. Okudera, K., et al., *Small adenocarcinoma of the lung: prognostic significance of central fibrosis chiefly because of its association with angiogenesis and lymphangiogenesis.* Pathol Int, 2006. **56**(9): p. 494-502.
- 90. Cho, N.H., et al., *MMP expression profiling in recurred stage IB lung cancer.* Oncogene, 2004. **23**(3): p. 845-51.
- Cardillo, M.R., F. Di Silverio, and V. Gentile, *Quantitative immunohistochemical and in situ hybridization analysis of metalloproteinases in prostate cancer.* Anticancer Res, 2006. 26(2A): p. 973-82.
- 92. Cao, J., et al., *Membrane type 1-matrix metalloproteinase promotes human prostate cancer invasion and metastasis.* Thromb Haemost, 2005. **93**(4): p. 770-8.
- 93. Upadhyay, J., et al., *Membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and MMP-2 immunolocalization in human prostate: change in cellular localization associated with high-grade prostatic intraepithelial neoplasia.* Clin Cancer Res, 1999. **5**(12): p. 4105-10.
- 94. Bair, E.L., et al., Membrane type 1 matrix metalloprotease cleaves laminin-10 and promotes prostate cancer cell migration. Neoplasia, 2005. 7(4): p. 380-9.
- Nomura, H., et al., *Expression of membrane-type matrix* metalloproteinase in human gastric carcinomas. Cancer Res, 1995.
 55(15): p. 3263-6.
- 96. Mori, M., et al., *Analysis of MT1-MMP and MMP2 expression in human gastric cancers.* Int J Cancer, 1997. **74**(3): p. 316-21.

- 97. Yoshikawa, T., et al., *Expression of MMP-7 and MT1-MMP in peritoneal dissemination of gastric cancer.* Hepatogastroenterology, 2006. **53**(72): p. 964-7.
- 98. Shim, K.N., et al., *Clinical significance of tissue levels of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in gastric cancer.* J Gastroenterol, 2007. **42**(2): p. 120-8.
- 99. Bando, E., et al., *Immunohistochemical study of MT-MMP tissue status in gastric carcinoma and correlation with survival analyzed by univariate and multivariate analysis.* Oncol Rep, 1998. **5**(6): p. 1483-8.
- 100. Ohtani, H., et al., *Dual over-expression pattern of membrane-type metalloproteinase-1 in cancer and stromal cells in human gastrointestinal carcinoma revealed by in situ hybridization and immunoelectron microscopy.* Int J Cancer, 1996. **68**(5): p. 565-70.
- 101. Caenazzo, C., et al., Augmented membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP):MMP-2 messenger RNA ratio in gastric carcinomas with poor prognosis. Clin Cancer Res, 1998. **4**(9): p. 2179-86.
- 102. El-Rifai, W., et al., *Expression profiling of gastric adenocarcinoma using cDNA array.* Int J Cancer, 2001. **92**(6): p. 832-8.
- 103. Elnemr, A., et al., *Expression of collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) in human gastric cancer.* Gastric Cancer, 2003. **6**(1): p. 30-8.
- 104. Yokoyama, T., et al., *Differences between scirrhous and non-scirrhous human gastric carcinomas from the aspect of proMMP-2 activation regulated by TIMP-3.* Clin Exp Metastasis, 2004. **21**(3): p. 223-33.
- 105. Imamura, T., et al., *Expression of membrane-type matrix metalloproteinase-1 in human pancreatic adenocarcinomas.* J Cancer Res Clin Oncol, 1998. **124**(2): p. 65-72.
- 106. Maatta, M., et al., *Differential expression of matrix metalloproteinase* (*MMP*)-2, *MMP-9*, and membrane type 1-MMP in hepatocellular and pancreatic adenocarcinoma: implications for tumor progression and clinical prognosis. Clin Cancer Res, 2000. **6**(7): p. 2726-34.
- 107. Kitamura, N., et al., *High collagenolytic activity in spontaneously highly metastatic variants derived from a human pancreatic cancer cell line (SUIT-2) in nude mice.* Clin Exp Metastasis, 2000. **18**(7): p. 561-71.
- Yamamoto, H., et al., Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human pancreatic adenocarcinomas: clinicopathologic and prognostic significance of matrilysin expression. J Clin Oncol, 2001. 19(4): p. 1118-27.
- Iki, K., et al., Expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2), membrane-type 1 MMP and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 and activation of proMMP-2 in pancreatic duct adenocarcinomas in hamsters treated with N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine. Carcinogenesis, 1999.
 20(7): p. 1323-9.
- Ottaviano, A.J., et al., Extracellular matrix-mediated membrane-type 1 matrix metalloproteinase expression in pancreatic ductal cells is regulated by transforming growth factor-beta1. Cancer Res, 2006.
 66(14): p. 7032-40.
- Liapis, G., et al., Effect of the different phosphorylated Smad2 protein localizations on the invasive breast carcinoma phenotype. Apmis, 2007. 115(2): p. 104-14.

- 112. Yamamoto, H., et al., *Relation of enhanced secretion of active matrix metalloproteinases with tumor spread in human hepatocellular carcinoma.* Gastroenterology, 1997. **112**(4): p. 1290-6.
- 113. Giannelli, G., et al., *Clinical role of MMP-2/TIMP-2 imbalance in hepatocellular carcinoma.* Int J Cancer, 2002. **97**(4): p. 425-31.
- 114. Ogasawara, S., et al., *Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in cultured hepatocellular carcinoma (HCC) cells and surgically resected HCC tissues.* Oncol Rep, 2005. **13**(6): p. 1043-8.
- 115. Ou, D.P., et al., *The hepatitis B virus X protein promotes hepatocellular carcinoma metastasis by upregulation of matrix metalloproteinases.* Int J Cancer, 2007. **120**(6): p. 1208-14.
- 116. Theret, N., et al., *Differential expression and origin of membrane-type 1* and 2 matrix metalloproteinases (*MT-MMPs*) in association with *MMP2* activation in injured human livers. Am J Pathol, 1998. **153**(3): p. 945-54.
- 117. Harada, T., et al., *Membrane-type matrix metalloproteinase-1(MT1-MTP)* gene is overexpressed in highly invasive hepatocellular carcinomas. J Hepatol, 1998. **28**(2): p. 231-9.
- Ogata, R., et al., Increased expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase and matrix metalloproteinase-2 with tumor dedifferentiation in hepatocellular carcinomas. Hum Pathol, 1999. 30(4): p. 443-50.
- 119. Ip, Y.C., et al., *Mechanism of metastasis by membrane type 1-matrix metalloproteinase in hepatocellular carcinoma.* World J Gastroenterol, 2005. **11**(40): p. 6269-76.
- 120. Kim, J.H., et al., Analysis of matrix metalloproteinase mRNAs expressed in hepatocellular carcinoma cell lines. Mol Cells, 2001. **12**(1): p. 32-40.
- 121. Murakami, K., et al., *Invasiveness of hepatocellular carcinoma cell lines: contribution of membrane-type 1 matrix metalloproteinase.* Neoplasia, 1999. **1**(5): p. 424-30.
- Ip, Y.C., S.T. Cheung, and S.T. Fan, *Atypical localization of membrane type 1-matrix metalloproteinase in the nucleus is associated with aggressive features of hepatocellular carcinoma.* Mol Carcinog, 2007. 46(3): p. 225-30.
- 123. Ishii, Y., et al., A study on angiogenesis-related matrix metalloproteinase networks in primary hepatocellular carcinoma. J Exp Clin Cancer Res, 2003. **22**(3): p. 461-70.
- Ishigaki, S., et al., Significance of membrane type 1 matrix metalloproteinase expression in breast cancer. Jpn J Cancer Res, 1999.
 90(5): p. 516-22.
- 125. Ueno, H., et al., *Expression and tissue localization of membrane-types 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human invasive breast carcinomas.* Cancer Res, 1997. **57**(10): p. 2055-60.
- 126. Blavier, L., et al., *Matrix metalloproteinases play an active role in Wnt1-induced mammary tumorigenesis.* Cancer Res, 2006. **66**(5): p. 2691-9.
- 127. Kim, H.J., et al., Expression of MT-1 MMP, MMP2, MMP9 and TIMP2 mRNAs in ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. Yonsei Med J, 2006. 47(3): p. 333-42.
- 128. Ha, H.Y., et al., Overexpression of membrane-type matrix metalloproteinase-1 gene induces mammary gland abnormalities and adenocarcinoma in transgenic mice. Cancer Res, 2001. **61**(3): p. 984-90.

- Mylona, E., et al., The clinicopathological and prognostic significance of membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and MMP-9 according to their localization in invasive breast carcinoma. Histopathology, 2007. 50(3): p. 338-47.
- Jiang, W.G., et al., Expression of membrane type-1 matrix metalloproteinase, MT1-MMP in human breast cancer and its impact on invasiveness of breast cancer cells. Int J Mol Med, 2006. 17(4): p. 583-90.
- 131. Jones, J.L., P. Glynn, and R.A. Walker, *Expression of MMP-2 and MMP-9, their inhibitors, and the activator MT1-MMP in primary breast carcinomas.* J Pathol, 1999. **189**(2): p. 161-8.
- 132. Lafleur, M.A., et al., Upregulation of matrix metalloproteinases (MMPs) in breast cancer xenografts: a major induction of stromal MMP-13. Int J Cancer, 2005. **114**(4): p. 544-54.
- Heppner, K.J., et al., *Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response.* Am J Pathol, 1996. **149**(1): p. 273-82.
- 134. Dalberg, K., et al., Gelatinase A, membrane type 1 matrix metalloproteinase, and extracellular matrix metalloproteinase inducer mRNA expression: correlation with invasive growth of breast cancer. World J Surg, 2000. 24(3): p. 334-40.
- 135. Fong, S., et al., *Id-1 as a molecular target in therapy for breast cancer cell invasion and metastasis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(23): p. 13543-8.
- 136. Szabova, L., et al., *Expression pattern of four membrane-type matrix metalloproteinases in the normal and diseased mouse mammary gland.* J Cell Physiol, 2005. **205**(1): p. 123-32.
- 137. Tetu, B., et al., *The influence of MMP-14, TIMP-2 and MMP-2 expression on breast cancer prognosis.* Breast Cancer Res, 2006. **8**(3): p. R28.
- Yao, G.Y., et al., [Significance of membrane type-1 matrix metalloproteinase expression in breast cancer]. Ai Zheng, 2004. 23(11 Suppl): p. 1482-6.
- 139. Davidson, B., et al., Altered expression of metastasis-associated and regulatory molecules in effusions from breast cancer patients: a novel model for tumor progression. Clin Cancer Res, 2004. **10**(21): p. 7335-46.
- 140. Papparella, S., et al., *Expression of matrix metalloprotease-2 (MMP-2)* and the activator membrane type 1 (*MT1-MMP*) in canine mammary carcinomas. J Comp Pathol, 2002. **126**(4): p. 271-6.
- 141. Bisson, C., et al., *Restricted expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase by myofibroblasts adjacent to human breast cancer cells.* Int J Cancer, 2003. **105**(1): p. 7-13.
- 142. Lhotak, S., et al., *Immunolocalization of matrix metalloproteinases and their inhibitors in clinical specimens of bone metastasis from breast carcinoma.* Clin Exp Metastasis, 2000. **18**(6): p. 463-70.
- 143. Kanayama, H., et al., *Prognostic values of matrix metalloproteinase-2* and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in bladder cancer. Cancer, 1998. **82**(7): p. 1359-66.
- 144. Nicholson, B.E., et al., *Profiling the evolution of human metastatic bladder cancer.* Cancer Res, 2004. **64**(21): p. 7813-21.
- 145. Nakamura, H., et al., Enhanced production and activation of progelatinase A mediated by membrane-type 1 matrix metalloproteinase

in human papillary thyroid carcinomas. Cancer Res, 1999. **59**(2): p. 467-73.

- 146. Cho Mar, K., et al., *Expression of matrix metalloproteinases in benign and malignant follicular thyroid lesions.* Histopathology, 2006. **48**(3): p. 286-94.
- Patel, A., et al., Matrix metalloproteinase (MMP) expression by differentiated thyroid carcinoma of children and adolescents. J Endocrinol Invest, 2002. 25(5): p. 403-8.
- Kamat, A.A., et al., *The clinical relevance of stromal matrix metalloproteinase expression in ovarian cancer.* Clin Cancer Res, 2006.
 12(6): p. 1707-14.
- 149. Barbolina, M.V., et al., *Microenvironmental regulation of membrane type* 1 matrix metalloproteinase activity in ovarian carcinoma cells via collagen-induced EGR1 expression. J Biol Chem, 2007. **282**(7): p. 4924-31.
- 150. Afzal, S., et al., *MT1-MMP and MMP-2 mRNA expression in human ovarian tumors: possible implications for the role of desmoplastic fibroblasts.* Hum Pathol, 1998. **29**(2): p. 155-65.
- 151. Fishman, D.A., L.M. Bafetti, and M.S. Stack, *Membrane-type matrix metalloproteinase expression and matrix metalloproteinase-2 activation in primary human ovarian epithelial carcinoma cells.* Invasion Metastasis, 1996. **16**(3): p. 150-9.
- 152. Lin, Y.G., et al., *EphA2 overexpression is associated with angiogenesis in ovarian cancer.* Cancer, 2007. **109**(2): p. 332-40.
- 153. Drew, A.F., et al., *Correlation of tumor- and stromal-derived MT1-MMP* expression with progression of human ovarian tumors in SCID mice. Gynecol Oncol, 2004. **95**(3): p. 437-48.
- Davidson, B., et al., *The prognostic value of metalloproteinases and angiogenic factors in ovarian carcinoma.* Mol Cell Endocrinol, 2002.
 187(1-2): p. 39-45.
- 155. Davidson, B., et al., *High levels of MMP-2, MMP-9, MT1-MMP and TIMP-2 mRNA correlate with poor survival in ovarian carcinoma.* Clin Exp Metastasis, 1999. **17**(10): p. 799-808.
- 156. Sood, A.K., et al., *Functional role of matrix metalloproteinases in ovarian tumor cell plasticity.* Am J Obstet Gynecol, 2004. **190**(4): p. 899-909.
- 157. Wu, M., et al., Construction of antisense MT1-MMP vector and its inhibitory effects on invasion of human ovarian cancer cells. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2005. **25**(6): p. 715-7.
- 158. Leroy-Dudal, J., et al., *Transmigration of human ovarian adenocarcinoma cells through endothelial extracellular matrix involves alphav integrins and the participation of MMP2.* Int J Cancer, 2005. **114**(4): p. 531-43.
- 159. Ellerbroek, S.M., et al., *Ovarian carcinoma regulation of matrix metalloproteinase-2 and membrane type 1 matrix metalloproteinase through beta1 integrin.* Cancer Res, 1999. **59**(7): p. 1635-41.
- 160. Sakata, K., et al., *Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9, MT1-MMP) and their inhibitors (TIMP-1, TIMP-2) in common epithelial tumors of the ovary.* Int J Oncol, 2000. **17**(4): p. 673-81.
- Torng, P.L., et al., Prognostic significance of stromal metalloproteinase-2 in ovarian adenocarcinoma and its relation to carcinoma progression. Gynecol Oncol, 2004. 92(2): p. 559-67.

- 162. Mitra, A., et al., *Cell membrane-associated MT1-MMP dependent* activation of *MMP-2 in SiHa (human cervical cancer) cells.* J Environ Pathol Toxicol Oncol, 2006. **25**(4): p. 655-66.
- Mitra, A., et al., Culture of human cervical cancer cells, SiHa, in the presence of fibronectin activates MMP-2. J Cancer Res Clin Oncol, 2006. 132(8): p. 505-13.
- 164. Gilles, C., et al., *High level of MT-MMP expression is associated with invasiveness of cervical cancer cells.* Int J Cancer, 1996. **65**(2): p. 209-13.
- 165. Zhai, Y., et al., *Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase is associated with cervical carcinoma progression and invasion.* Cancer Res, 2005. **65**(15): p. 6543-50.
- 166. Sheu, B.C., et al., *Increased expression and activation of gelatinolytic matrix metalloproteinases is associated with the progression and recurrence of human cervical cancer.* Cancer Res, 2003. **63**(19): p. 6537-42.
- 167. Sier, C.F., et al., *EMMPRIN-induced MMP-2 activation cascade in human cervical squamous cell carcinoma.* Int J Cancer, 2006. **118**(12): p. 2991-8.
- Davidson, B., et al., MMP-2 and TIMP-2 expression correlates with poor prognosis in cervical carcinoma--a clinicopathologic study using immunohistochemistry and mRNA in situ hybridization. Gynecol Oncol, 1999. **73**(3): p. 372-82.
- Yamamoto, M., et al., Differential expression of membrane-type matrix metalloproteinase and its correlation with gelatinase A activation in human malignant brain tumors in vivo and in vitro. Cancer Res, 1996.
 56(2): p. 384-92.
- 170. Nakada, M., et al., *Expression and tissue localization of membrane-type 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human astrocytic tumors.* Am J Pathol, 1999. **154**(2): p. 417-28.
- 171. Forsyth, P.A., et al., Gelatinase-A (MMP-2), gelatinase-B (MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) are involved in different aspects of the pathophysiology of malignant gliomas. Br J Cancer, 1999. **79**(11-12): p. 1828-35.
- 172. Deryugina, E.I., L. Soroceanu, and A.Y. Strongin, *Up-regulation of* vascular endothelial growth factor by membrane-type 1 matrix metalloproteinase stimulates human glioma xenograft growth and angiogenesis. Cancer Res, 2002. **62**(2): p. 580-8.
- 173. Guo, P., et al., *Up-regulation of angiopoietin-2, matrix metalloprotease-2, membrane type 1 metalloprotease, and laminin 5 gamma 2 correlates with the invasiveness of human glioma.* Am J Pathol, 2005. **166**(3): p. 877-90.
- 174. Rooprai, H.K., et al., *Comparative analysis of matrix metalloproteinases* by immunocytochemistry, immunohistochemistry and zymography in human primary brain tumours. Int J Oncol, 1998. **13**(6): p. 1153-7.
- 175. Lampert, K., et al., *Expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in human brain tumors.* Am J Pathol, 1998. **153**(2): p. 429-37.
- 176. Nakada, M., et al., Roles of membrane type 1 matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinases 2 in invasion and dissemination of human malignant glioma. J Neurosurg, 2001. **94**(3): p. 464-73.

- 177. Munaut, C., et al., Vascular endothelial growth factor expression correlates with matrix metalloproteinases MT1-MMP, MMP-2 and MMP-9 in human glioblastomas. Int J Cancer, 2003. **106**(6): p. 848-55.
- Schwandner, O., et al., *Clinicopathologic and prognostic significance of matrix metalloproteinases in rectal cancer.* Int J Colorectal Dis, 2007.
 22(2): p. 127-36.
- Kikuchi, R., et al., Immunohistochemical detection of membrane-type-1matrix metalloproteinase in colorectal carcinoma. Br J Cancer, 2000.
 83(2): p. 215-8.
- 180. Bendardaf, R., et al., *Low collagenase-1 (MMP-1) and MT1-MMP* expression levels are favourable survival markers in advanced colorectal carcinoma. Oncology, 2003. **65**(4): p. 337-46.
- 181. Sardinha, T.C., et al., *Membrane-type 1 matrix metalloproteinase mRNA expression in colorectal cancer.* Dis Colon Rectum, 2000. **43**(3): p. 389-95.
- Ngan, C.Y., et al., A multivariate analysis of adhesion molecules expression in assessment of colorectal cancer. J Surg Oncol, 2007. 95(8): p. 652-62.
- 183. Malhotra, S., et al., *Increased membrane type 1 matrix metalloproteinase* expression from adenoma to colon cancer: a possible mechanism of neoplastic progression. Dis Colon Rectum, 2002. **45**(4): p. 537-43.
- 184. Lyall, M.S., et al., *Profiling markers of prognosis in colorectal cancer.* Clin Cancer Res, 2006. **12**(4): p. 1184-91.
- 185. Curran, S., et al., *Matrix metalloproteinase/tissue inhibitors of matrix metalloproteinase phenotype identifies poor prognosis colorectal cancers.* Clin Cancer Res, 2004. **10**(24): p. 8229-34.
- 186. Murai, S., et al., *Expression and localization of membrane-type-1 matrix metalloproteinase, CD 44, and laminin-5gamma2 chain during colorectal carcinoma tumor progression.* Virchows Arch, 2004. **445**(3): p. 271-8.
- Masaki, T., et al., Matrix metalloproteinases may contribute compensationally to tumor invasion in T1 colorectal carcinomas. Anticancer Res, 2003. 23(5b): p. 4169-73.
- 188. Akgul, B., et al., *Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, MMP-13, and MT1-MMP in skin tumors of human papillomavirus type 8 transgenic mice.* Exp Dermatol, 2006. **15**(1): p. 35-42.
- Kerkela, E., et al., Differential patterns of stromelysin-2 (MMP-10) and MT1-MMP (MMP-14) expression in epithelial skin cancers. Br J Cancer, 2001. 84(5): p. 659-69.
- 190. Uchibori, M., et al., *Increased expression of membrane-type matrix metalloproteinase-1 is correlated with poor prognosis in patients with osteosarcoma.* Int J Oncol, 2006. **28**(1): p. 33-42.
- 191. Heikkila, P., et al., *Inhibition of matrix metalloproteinase-14 in osteosarcoma cells by clodronate.* J Surg Res, 2003. **111**(1): p. 45-52.
- 192. Soderstrom, M., et al., *Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human chondrosarcomas.* Apmis, 2001. **109**(4): p. 305-15.
- 193. Sakamoto, A., et al., Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase, matrix metalloproteinase 2 and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 in human cartilaginous tumors with special emphasis on mesenchymal and dedifferentiated chondrosarcoma. J Cancer Res Clin Oncol, 1999. **125**(10): p. 541-8.

- Wallard, M.J., et al., Comprehensive profiling and localisation of the matrix metalloproteinases in urothelial carcinoma. Br J Cancer, 2006.
 94(4): p. 569-77.
- 195. Furukawa, A., et al., Role of the matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of metalloproteinase families in noninvasive and invasive tumors transplanted in mice with severe combined immunodeficiency. Urology, 1998. **51**(5): p. 849-53.
- 196. Kitagawa, Y., et al., *Expression and tissue localization of membranetypes 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human urothelial carcinomas.* J Urol, 1998. **160**(4): p. 1540-5.
- 197. Sakakibara, M., et al., *Membrane-type matrix metalloproteinase-1* expression and activation of gelatinase A as prognostic markers in advanced pediatric neuroblastoma. Cancer, 1999. **85**(1): p. 231-9.
- 198. Kjellman, M., et al., *Gelatinase A and membrane-type 1 matrix* metalloproteinase mRNA: expressed in adrenocortical cancers but not in adenomas. World J Surg, 1999. **23**(3): p. 237-42.
- 199. Du, B., et al., *Expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase in laryngeal carcinoma.* Pathol Oncol Res, 1999. **5**(3): p. 214-7.
- 200. Liu, Y.H., et al., *[Gene expression of matrix mettallo-proteinase 14 in laryngeal squamous cell carcinoma].* Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi, 2004. **39**(8): p. 501-6.
- 201. Cazorla, M., et al., Collagenase-3 expression is associated with advanced local invasion in human squamous cell carcinomas of the larynx. J Pathol, 1998. **186**(2): p. 144-50.
- 202. Sun, Y.N. and Y. Li, *Expression of mRNA for membrane-type 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human laryngeal cancer.* Chin Med Sci J, 2004. **19**(3): p. 170-3.
- 203. De Bortoli, M., et al., *Patched haploinsufficient mouse rhabdomyosarcoma overexpress secreted phosphoprotein 1 and matrix metalloproteinases.* Eur J Cancer, 2007. **43**(8): p. 1308-1317.
- 204. Hagemann, T., et al., *mRNA expression of matrix metalloproteases and their inhibitors differs in subtypes of renal cell carcinomas.* Eur J Cancer, 2001. **37**(15): p. 1839-46.
- 205. Kitagawa, Y., et al., *Expression of messenger RNAs for membrane-type 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human renal cell carcinomas.* J Urol, 1999. **162**(3 Pt 1): p. 905-9.
- 206. Massi, D., et al., *Expression and prognostic significance of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in primary neuroendocrine carcinoma of the skin.* Hum Pathol, 2003. **34**(1): p. 80-8.
- 207. Rigolet, M., et al., *Profiling of differential gene expression in Wilms tumor by cDNA expression array.* Pediatr Nephrol, 2001. **16**(12): p. 1113-21.
- 208. Weinrach, D.M., et al., *Immunohistochemical expression of matrix* metalloproteinases 1, 2, 9, and 14 in dermatofibrosarcoma protuberans and common fibrous histiocytoma (dermatofibroma). Arch Pathol Lab Med, 2004. **128**(10): p. 1136-41.
- 209. Hu, Y.C., et al., *Profiling of differentially expressed cancer-related genes in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) using human cancer cDNA arrays: overexpression of oncogene MET correlates with tumor differentiation in ESCC.* Clin Cancer Res, 2001. **7**(11): p. 3519-25.

- 210. Ohashi, K., et al., *Increased expression of matrix metalloproteinase* 7 and 9 and membrane type 1-matrix metalloproteinase in esophageal squamous cell carcinomas. Cancer, 2000. **88**(10): p. 2201-9.
- 211. Etoh, T., et al., *Increased expression of collagenase-3 (MMP-13) and MT1-MMP in oesophageal cancer is related to cancer aggressiveness.* Gut, 2000. **47**(1): p. 50-6.
- 212. Yamashita, K., et al., *Differential expression of MMP and uPA systems* and prognostic relevance of their expression in esophageal squamous cell carcinoma. Int J Cancer, 2004. **110**(2): p. 201-7.
- 213. Di Nezza, L.A., et al., *Presence of active gelatinases in endometrial carcinoma and correlation of matrix metalloproteinase expression with increasing tumor grade and invasion.* Cancer, 2002. **94**(5): p. 1466-75.
- 214. Takahashi, E., et al., *Expression of matrix metalloproteinases 2 and 7 in tumor cells correlates with the World Health Organization classification subtype and clinical stage of thymic epithelial tumors.* Hum Pathol, 2003. **34**(12): p. 1253-8.
- 215. Kayano, K., et al., Activation of pro-MMP-2 mediated by MT1-MMP in human salivary gland carcinomas: possible regulation of pro-MMP-2 activation by TIMP-2. J Pathol, 2004. **202**(4): p. 403-11.
- 216. Nabeshima, K., et al., *Expression of emmprin and matrix metalloproteinases (MMPs) in peripheral nerve sheath tumors: emmprin and membrane-type (MT)1-MMP expressions are associated with malignant potential.* Anticancer Res, 2006. **26**(2B): p. 1359-67.
- 217. Kononen, J., et al., *Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens.* Nat Med, 1998. **4**(7): p. 844-7.
- 218. Bubendorf, L., et al., Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughout fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. Cancer Res, 1999. **59**(4): p. 803-6.
- 219. Bubendorf, L., et al., *Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies.* J Pathol, 2001. **195**(1): p. 72-9.
- 220. Goldbach-Mansky, R., et al., *Active synovial matrix metalloproteinase-2 is associated with radiographic erosions in patients with early synovitis.* Arthritis Res, 2000. **2**(2): p. 145-53.
- 221. Reichelt, U., et al., *Frequent homogeneous HER-2 amplification in primary and metastatic adenocarcinoma of the esophagus.* Mod Pathol, 2007. **20**(1): p. 120-9.
- Remmele, W. and H.E. Stegner, [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. Pathologe, 1987.
 8(3): p. 138-40.
- 223. Goldhirsch, A., et al., *Meeting highlights: International Consensus Panel* on the Treatment of Primary Breast Cancer. Seventh International Conference on Adjuvant Therapy of Primary Breast Cancer. J Clin Oncol, 2001. **19**(18): p. 3817-27.
- 224. Simon, R., et al., Patterns of her-2/neu amplification and overexpression in primary and metastatic breast cancer. J Natl Cancer Inst, 2001.
 93(15): p. 1141-6.
- 225. Hoos, A., et al., Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. Am J Pathol, 2001. **158**(4): p. 1245-51.

- 226. Mucci, N.R., et al., *Neuroendocrine expression in metastatic prostate cancer: evaluation of high throughput tissue microarrays to detect heterogeneous protein expression.* Hum Pathol, 2000. **31**(4): p. 406-14.
- 227. Natkunam, Y., et al., *Analysis of MUM1/IRF4 protein expression using tissue microarrays and immunohistochemistry.* Mod Pathol, 2001. **14**(7): p. 686-94.
- 228. Rubin, M.A., et al., *Tissue microarray sampling strategy for prostate cancer biomarker analysis.* Am J Surg Pathol, 2002. **26**(3): p. 312-9.
- 229. Sallinen, S.L., et al., *Identification of differentially expressed genes in human gliomas by DNA microarray and tissue chip techniques.* Cancer Res, 2000. **60**(23): p. 6617-22.
- 230. Ruiz, C., et al., *Tissue microarrays for comparing molecular features with proliferation activity in breast cancer.* Int J Cancer, 2006. **118**(9): p. 2190-4.
- 231. Torhorst, J., et al., *Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints.* Am J Pathol, 2001. **159**(6): p. 2249-56.
- 232. Moch, H., et al., *High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma.* Am J Pathol, 1999. **154**(4): p. 981-6.
- Moch, H., et al., [Identification of prognostic parameters for renal cell carcinoma by cDNA arrays and cell chips]. Verh Dtsch Ges Pathol, 1999.
 83: p. 225-32.
- 234. Mhawech-Fauceglia, P., et al., *FGFR3 and p53 protein expressions in patients with pTa and pT1 urothelial bladder cancer.* Eur J Surg Oncol, 2006. **32**(2): p. 231-7.
- 235. Nocito, A., et al., *Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade*. J Pathol, 2001. **194**(3): p. 349-57.
- 236. Zellweger, T., et al., *Expression patterns of potential therapeutic targets in prostate cancer.* Int J Cancer, 2005. **113**(4): p. 619-28.
- 237. Pantanowitz, L., et al., *Matrix metalloproteinases in the progression and regression of Kaposi's sarcoma.* J Cutan Pathol, 2006. **33**(12): p. 793-8.
- 238. Serkan Filiz, *HER-2 Expression und Amplifikation in Pankreastumoren* (Promotionsschrift in progress, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, 2007)

7 Danksagung

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken, die mich auf unterschiedliche Weise unterstützt und durch ihre Beratung und Hilfsbereitschaft positiven Einfluß auf das Gelingen meiner Dissertation genommen haben.

Allen voran gilt mein Dank natürlich meinem Doktorvater Prof. Sauter für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und besonders für die Möglichkeit, eine Zeit lang in seinem sympathischen Pathologie-Team Mitglied gewesen zu sein.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meinen direkten Betreuern Dr. Uta Reichelt und Dr. Alexander Quaas bedanken, die mir jederzeit in den Kellergewölben der Pathologie mit gutgelaunter Hilfsbereitschaft zur Seite standen.

Einen großen Anteil zum Gelingen dieser Arbeit hat zudem Incken Kramme, mit der ich in ausdauernder Tagesleistung die Auswertung der MMP14-Expression vorgenommen habe und die überdies einen Blick auf die Auswahl möglichst repräsentativer Fotos warf.

Diese konnten nach grafischer Bearbeitung verwendet werden – vielen Dank dafür an Herrn Koppelmeyer.

Ausserdem möchte ich mich bei PD Dr. Ronald Simon bedanken, dessen Tür nicht nur für Computerfragen und statistische Probleme immer offen stand, sowie bei allen MTAs für die rasche Anfertigung der zahlreichen Tumorschnitte.

Ganz besonderer Dank richtet sich an meine Eltern, die mir mein Studium und diese Dissertation ermöglicht haben. Insbesondere für ihre drängende und auch motivierende Bitte um rasches Fertigstellen möchte ich rückblickend danken.

Zuletzt sei allen denen ein Dankeschön ausgesprochen, die keine namentliche Erwähnung fanden, aber zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Jakob Michael Keimer geboren am 09.12.1978 in Dortmund Staatsangehörigkeit: deutsch ledig

Eltern:

Josef-Michael Keimer, geb. am: 22.04.1948, HNO-Arzt Konstanze Keimer, geb. Vogel, geb. am: 01.11.1953, Realschullehrerin

Geschwister:

Katharina Maria, geb. am: 09.12.1978, Medizinsoziologin (MSc) Sarah Charlotte, geb. am: 03.03.1983, Studentin der Psychologie Julian Peter, geb. am: 29.01.1989, Schüler

Schulbildung:

01.08.1985-31.07.1989	Grundschule Tannenberg in Moers-Hochstraß
01.08.1989-01.06.1998	Gymnasium Adolfinum in Moers
28.06.1998	Abiturabschluss in den Fächern Mathematik,
	Deutsch, Erdkunde, Sport

Studium:

Krankenpflegedienstes im St. Josef Krankenhaus in Moers vom 06.09.1999 bis 05.11.1999

Studium der Rechtswissenschaften in Heidelberg vom 18.04.00 bis 31.07.00
Studium der Medizin in Aachen für das Wintersemester 2000/01
seit 01.04.01 eingeschrieben an der Universität Hamburg
05.04.04 erfolgreiches Bestehen der ärztlichen Vorprüfung (Physikum)
seit August 2007 Absolvieren des Praktischen Jahres in 3 Tertialen:
1. Tertial: Innere Medizin am Triemli-Spital, Zürich, Schweiz
2. Tertial: Chirurgie am Universitätskrankenhaus Groote Schuur, Kapstadt,
Südafrika

3. Tertial: HNO an der Asklepios Klinik St. Georg, Hamburg, Deutschland

Praktika:

Famulatur in der Abteilung für Gynäkologie vom 12.08.04 bis zum 10.09.04 an der Frauenklinik vom Roten Kreuz in München Famulatur in der Abteilung für HNO-Heilkunde vom 05.08.05 bis zum 04.09.05 im Stadtspital Lainz in Wien Famulatur in der Abteilung für Transplantationschirurgie vom 28.08.06 bis zum 26.09.06 in der Scripps Clinic, San Diego, USA Famulatur in der Notaufnahme, Innere Medizin vom 14.04.2007 bis zum 13.05.2007 in der Asklepios Klinik Hamburg-Altona

Tätigkeiten neben dem Studium:

Studentische Hilfskraft am Universitätsklinikum Hamburg im Pflegebereich und als Nachtwache seit Oktober 2001 seit April 2006 studentische Hilfskraft am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Institut für Pathologie

Sprachkenntnisse:

Schulische Sprachausbildung in Englisch (9 Jahre), Latein (5 Jahre) und Französisch (2 Jahre) Auslandsaufenthalt mit College-Besuch in Edinburgh von Dezember 1999 bis April 2000
9 Erklärung

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem anderen Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Jakob Michael Keimer Hamburg, den 22.11.2007