

Aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. G. Sauter

**Expression von MMP-1, -2, -3 und Emmprin in
oralen/oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Thomas Strutz

aus Bremen

Hamburg 2007

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:

| Inhaltsverzeichnis | Seite |
|---|--------------|
| 1. Arbeitshypothese und Fragestellung | 1 |
| 2. Einleitung | 2 |
| 3. Material und Methoden | 10 |
| 3.1. Material | 10 |
| 3.2. Methoden | 11 |
| 3.2.1. Immunhistochemische Analyse | 11 |
| 3.2.1.1. Anfertigung der Paraffinschnitte | 11 |
| 3.2.1.2. Immunhistochemische Reaktion | 11 |
| 3.2.1.3. Versuchsdurchführung | 11 |
| 3.2.1.4. Lösungen, Puffer und Reagenzien | 12 |
| 3.2.1.5. Geräte und Materialien | 13 |
| 3.2.2. nicht-radioaktive RNA-RNA- <i>in situ</i> -Hybridisierung (ISH) | 13 |
| 3.2.2.1. Plasmide für die Herstellung der Ribosonden | 13 |
| 3.2.2.2. Anfertigung der Paraffinschnitte | 14 |
| 3.2.2.3. Markierung der Sonden | 14 |
| 3.2.2.4. Vorbehandlung der Präparate | 16 |
| 3.2.2.5. Hybridisierung | 16 |
| 3.2.2.6. Lösungen, Puffer und Reagenzien | 18 |
| 3.2.2.7. Geräte und Materialien | 20 |
| 3.3. semiquantitative mikroskopische Auswertung | 20 |
| 3.4. Statistische Auswertung | 21 |
| 4. Ergebnisse | |
| 4.1. Untersuchungsgut mit klinischen und morphologischen Daten | 23 |
| 4.2. Expression der Matrix-Metalloproteinase-1 (MMP-1) | 27 |
| 4.2.1. Immunhistochemische Analyse | 29 |
| 4.2.1.1. MMP-1-Expression in den Plattenepithelkarzinomen | 30 |
| 4.2.1.2. MMP-1-Expression in den Lymphknotenmetastasen | 34 |
| 4.2.1.3. MMP-1-Expression in der angrenzenden Schleimhaut mit Dysplasien | 34 |
| 4.2.1.4. MMP-1-Expression in der angrenzenden tumorfreien Schleimhaut | 35 |
| 4.2.1.5. Zusammenfassende Analyse der MMP-1-Expression in den untersuchten Geweben | 36 |

| | |
|---|----|
| 4.2.2. RNA-RNA- <i>in situ</i> -Hybridisierung | 37 |
| 4.2.2.1. MMP-1-Transkripte in den Plattenepithelkarzinomen | 38 |
| 4.2.2.2. MMP-1-Transkripte in den Lymphknotenmetastasen | 41 |
| 4.2.2.3. MMP-1-Transkripte in den tumorfreien Lymphknoten | 42 |
| 4.2.2.4. MMP-1-Transkripte in der angrenzenden Schleimhaut mit Dysplasien | 43 |
| 4.2.2.5. MMP-1-Transkripte in der angrenzenden tumorfreien Schleimhaut | 43 |
| 4.2.2.6. Zusammenfassende Analyse der MMP-1-Transkripte in den untersuchten Geweben | 43 |
| 4.3. Expression der Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP-2) | 45 |
| 4.3.1. RNA-RNA- <i>in situ</i> -Hybridisierung | 46 |
| 4.3.1.1. MMP-2-Transkripte in den Plattenepithelkarzinomen | 47 |
| 4.3.1.2. MMP-2-Transkripte in den Lymphknotenmetastasen | 49 |
| 4.3.1.3. MMP-2-Transkripte in den tumorfreien Lymphknoten | 50 |
| 4.3.1.4. MMP-2-Transkripte in der angrenzenden Schleimhaut mit Dysplasien | 50 |
| 4.3.1.5. MMP-2-Transkripte in der angrenzenden tumorfreien Schleimhaut | 50 |
| 4.3.1.6. Zusammenfassende Analyse der MMP-2-Expression in den untersuchten Geweben | 51 |
| 4.4. Expression der Matrix-Metalloproteinase-3 (MMP-3) | 52 |
| 4.5. Expression von Emmprin (extracellular matrix metalloproteinase inducer) | 53 |
| 4.5.1. Immunhistochemische Analyse | 54 |
| 4.5.1.1. Emmprin-Expression in den Plattenepithelkarzinomen | 55 |
| 4.5.1.2. Emmprin-Expression in den Lymphknotenmetastasen | 56 |
| 4.5.1.3. Emmprin-Expression in der angrenzenden Schleimhaut mit Dysplasien | 57 |
| 4.5.1.4. Emmprin-Expression in der angrenzenden tumorfreien Schleimhaut | 58 |
| 4.5.1.5. Zusammenfassende Analyse der Emmprin-Expression in den untersuchten Geweben | 59 |

| | |
|---|-----|
| 5. Diskussion | 61 |
| 5.1. Matrix-Metalloproteinase-1 (MMP-1) | 63 |
| 5.2. Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP-2) | 70 |
| 5.3. Matrix-Metalloproteinase-3 (MMP-3) | 78 |
| 5.4. Emmprin | 80 |
| 6. Zusammenfassung | 86 |
| 7. Literaturverzeichnis | 87 |
| 8. Danksagung | 104 |
| 9. Lebenslauf | 105 |
| 10. eidesstattliche Versicherung | 106 |

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Orale/oropharyngeale Karzinome sind zu über 90% Plattenepithelkarzinome, deren insgesamt schlechte Prognose vom primären Tumorstadium abhängt. Wie bei anderen malignen Tumoren wird nach zusätzlichen Markern gesucht, die eine genauere Charakterisierung des Tumorverhaltens, insbesondere des Metastasierungspotentials ermöglichen.

Maligne Tumoren verfügen über die Fähigkeit, angrenzendes normales Gewebe zu infiltrieren und sich in anderen Geweben und Organen abzusiedeln. Durch Interaktion mit der extrazellulären Matrix (EZM) kann es zur Migration maligner Zellen kommen. Matrixmetalloproteinasen wie MMP-1, -2 und -3 sind in der Lage, EZM-Komponenten abzubauen. Sie werden durch bestimmte assoziierte Faktoren, z.B. das Glykoprotein Emmprin (Extracellular matrix metalloproteinase inducer), stimuliert, mit denen sie in den komplexen, mehrstufigen Prozess der Invasion und Metastasierung eingebunden sind. MMPs und Emmprin spielen deshalb bei der Tumorprogression eine wichtige Rolle.

Arbeitshypothese:

In oralen/oropharyngealen Karzinomen und deren Metastasen werden MMP-1, -2 und -3 sowie Emmprin exprimiert. Es gibt eine Abhängigkeit der Expression von klinisch pathologischen Parametern wie pT-Stadium, pN-Stadium oder Differenzierungsgrad. Das angrenzende tumorfreie Gewebe zeigt keine oder eine schwächere Expression.

Im Rahmen dieser Hypothese wurden orale/oropharyngeale Karzinome, angrenzende tumorfreie Schleimhaut mit und ohne Dysplasien des plattenepithelialen Deckepithels sowie Lymphknoten mit und ohne Metastasen hinsichtlich der Expression von EMMPRIN, MMP-1, -2 und -3 mittels Immunhistochemie und RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierung untersucht, um folgende Fragen zu klären:

1. Lässt sich eine Expression von EMMPRIN, MMP-1, -2 und -3 in oralen/oropharyngealen Karzinomen, angrenzenden Schleimhäuten und Lymphknoten/Metastasen nachweisen?
2. Welche Zellen zeigen eine Expression?
3. Gibt es Unterschiede in der Expression in Abhängigkeit von klinischen und/oder pathologischen Parametern?

2. Einleitung

Das orale/oropharyngeale Karzinom ist die sechsthäufigste Karzinomerkrankung weltweit, von der Männer etwa doppelt so häufig betroffen sind wie Frauen (Hoffmann et al. 1998). Es handelt sich um einen von der Mund- bzw. Rachenschleimhaut ausgehenden Tumor mit einer vergleichsweise schlechten Prognose. In den letzten 20 Jahren hat sich trotz verbesserter Operationsmöglichkeiten nichts an dieser Tatsache geändert. Bisher weiß man noch zu wenig über die genauen Vorgänge der Tumorentstehung, Tumorinvasion, Tumorzell dissemination und Bildung von Metastasen. Neben der klinischen Befundung und pathologischen Begutachtung der Tumoren, die Grundlage für die Therapie und Prognoseabschätzung sind, gibt es bisher noch keine zusätzlichen etablierten Faktoren auf molekularer Ebene, mit deren Hilfe die Therapieplanung verfeinert und eine genauere Prognoseabschätzung abgeleitet werden könnten.

90% der oralen/oropharyngealen Karzinome sind Plattenepithelkarzinome (PEK) (Hoffmann et al. 1998). In Deutschland erkranken jährlich etwa 7800 Männer und 2600 Frauen daran. Das entspricht insgesamt einem Anteil von 3,6% an allen bösartigen Neubildungen bei Männern (ohne sonstigen Hautkrebs) und einem Anteil von 1,3% bei Frauen. Für Männer besteht damit ein etwa dreimal größeres Risiko am oralen/oropharyngealen Karzinom zu erkranken als für Frauen (Bertz et al. 2006).

Die Inzidenz der Krebserkrankungen des Mund- und Rachenraumes hatte vor allem bei Männern in Deutschland in den 70er und 80er Jahren erheblich zugenommen, und danach in den 90er Jahren für beide Geschlechter wieder etwas abgenommen. In Deutschland liegt die Inzidenz im Vergleich zum europäischen Ausland im mittleren Bereich. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer bei 61 Jahren, für Frauen bei 69 Jahren. Die mittlere relative 5-Jahres-Überlebensrate für die zusammen betrachteten Lokalisationen der Mundhöhle und des Rachens fällt für Männer mit 46% deutlich schlechter aus als für Frauen mit 60%. Es besteht eine Abhängigkeit von der Lokalisation des Primärtumors: Bei Lippenkarzinomen z.B. beträgt dieser Wert bei Männern über 90%, bei Rachenkarzinomen hingegen zwischen 20 und 30% (Bertz et al. 2006).

Zu den wichtigsten Risikofaktoren zählen ein erhöhter Alkoholkonsum (insbesondere hochprozentige Spirituosen) und das Zigarettenrauchen. In der Mundhöhle wird die Krebsentstehung auch durch Zigarren-, Pfeifenrauchen sowie Schnupf- und Kautabak gefördert (Winn et al. 1981, Cullen et al. 1986). Für einen Starkraucher unter 46 Jahren besteht ein 20faches Risiko, für einen starken Trinker ein 5faches und für eine Kombination aus beidem ein 50faches Risiko, am oralen/oropharyngealen Karzinom zu erkranken (Rodriguez et al. 2004).

Klinisch äußert sich die Tumorerkrankung in der Regel in Form von wunden, nicht verheilenden Stellen (Erosionen und Ulzera), die an Größe zunehmen. Im Frühstadium treten vor allem Leuko- oder Erythroplakien auf, die nicht abheilen. Mit zunehmender Tumorgöße kann es in Abhängigkeit von der Lokalisation zu einem Fremdkörpergefühl, kloßiger Sprache, Atmungsbehinderung, Änderung des Prothesensitzes, Knochenaufreibung und auch zu Schluckbeschwerden kommen (Bier 1991, Bier 1998). Da diese Tumorart häufig bei alkoholkranken Menschen auftritt, die nicht regelmäßig ärztlich oder zahnärztlich betreut werden, werden die Tumoren oft viel zu spät diagnostiziert.

Nach der Diagnosestellung bzw. –sicherung durch eine Biopsie wird therapeutisch eine möglichst vollständige Tumor-Entfernung angestrebt. Die Radikalität der Operation wird durch den möglichen Verlust an Lebensqualität infolge Verstümmelung eingeschränkt, der insbesondere bei Ausräumung der Halslymphknoten (Neck dissection) und ausgedehnteren Tumorsektionen (z.B. Kieferresektion) unvermeidlich ist. Kombinationen aus Operation und Bestrahlung, eventuell auch Chemotherapie werden in fortgeschrittenen Stadien eingesetzt. Bei palliativem Ansatz wird auch ganz auf eine radikale Operation zugunsten der Strahlentherapie verzichtet (Friedrich RE et al. 1997, Schön et al. 1999).

Trotz der therapeutischen Möglichkeiten haben sich die Überlebensraten bei dieser Tumorart nicht verbessert. Überdies besteht insbesondere aufgrund der Lokalisation ein negativer Einfluss auf die Lebensqualität der Patienten. Lange Behandlungszeiträume in Verbindung mit interdisziplinärer medizinischer Betreuung üben nicht zuletzt einen erheblichen finanziellen Druck auf die Krankenhäuser und Kostenträger aus (Hunter et al. 2005).

Besondere Bedeutung kommt deshalb der Prävention sowie der frühzeitigen Erkennung und Diagnosestellung zu. Besonders aggressive Formen oraler/oropharyngealer Karzinome und entsprechender Vorstadien gilt es zu identifizieren, zu charakterisieren und gezielt zu behandeln.

Weil die derzeitig verfügbaren klinischen und histopathologischen Möglichkeiten begrenzt sind, ist man auf der Suche nach Tumormarkern, mit denen z.B. besonders aggressiv wachsende Tumoren selektiert werden können. Darüber hinaus ist es unabdingbar, das Verständnis der Tumorgenese weiter zu verbessern. Dazu gehört, die tumorbiologischen Vorgänge nicht nur im Tumorepithel und im peritumorösen Stroma, sondern auch im benachbarten dysplastischen und normalen Epithel und im jeweils angrenzenden Stroma besser zu verstehen.

Haupteigenschaften eines malignen Tumors sind Invasion und Metastasierung. Bei diesen Prozessen spielt die Interaktion der Tumorzellen mit der extrazellulären Matrix (EZM) eine entscheidende Rolle. Verschiedene Enzymgruppen, wie zum Beispiel Cathepsine, Serinproteasen und Matrix-Metalloproteasen (MMPs) sind in diese äußerst komplexen Vorgänge involviert. Die EZM gewährleistet die Adhäsion von Zellen und überträgt Signale mithilfe von Zell-Oberflächen-Adhäsionsrezeptoren. Sie enthält Kollagen, Glykoproteine ohne Kollagenanteil und Proteoglykane. Andere EZM-Moleküle, wie Tenascin, Fibronectin und unterschiedliche Isoformen von Laminin wurden in Tumorgewebe gefunden und können wahrscheinlich das Tumorstadium stimulieren. Die Basalmembran ist eine spezialisierte EZM und trennt die Epithelzellen vom darunterliegenden Stroma. Sie stellt damit eine „Barriere“ dar, auf der sich normalerweise das Epithel regeneriert und differenziert. Auch fehdifferenzierte (dysplastische) Epithelzellen werden durch die Basalmembran im Epithelverband gehalten (z.B. Carcinoma in situ).

Kollagenmoleküle besitzen drei α -Ketten, die eine Tripelhelix-Struktur bilden (Olsen u. Ninomiya 1999). Fibrilläre Kollagene (Typ I, II, III, V and XI) bilden Fibrillen und beeinflussen Zellfunktionen, indem sie mit Integrinen interagieren. Kollagene der Basalmembran (Typ IV) sind in der Lage, Netzwerke zu bilden. Zellen treten mithilfe von Integrinen, Lamininen und Heparansulfat-Proteoglykanen in Wechselwirkung mit Kollagen Typ IV. Es gibt außerdem noch einige andere Gruppen von Kollagenen, z.B. die Transmembran-Kollagene.

Gelatine ist durch Kollagenasen verdautes denaturiertes Kollagen. Zu den Glykoproteinen gehören Laminine, die - aus α -, β - und γ -Ketten bestehend - heterotrimere Moleküle bilden. Sie befinden sich in erster Linie in Basalmembranen, wo sie unter anderem mit Kollagen Typ IV Netzwerke bilden. Laminine beeinflussen Zellfunktionen durch Bindung zu Integrinen und Non-Integrin-Rezeptoren (Sasaki u. Timpl 1999). Fibronectine sind dimere Glykoproteine, die sich in der EZM und im Blut befinden. Sie bilden Fibrillen und beeinflussen Zellmorphologie, -adhäsion, -migration und -differenzierung, indem sie an Integrine binden.

Proteoglykane bestehen aus posttranslational modifizierten Glykosaminoglykanketten wie Heparan, Keratan und Chondroitinsulfat. Perlecan ist das häufigste Heparansulfat-Proteoglykan der Basalmembran und kommt außerdem im Tumorstroma vor (Egeblad u. Werb 2002).

Viele Komponenten der EZM sind Substrate der Matrix-Metalloproteasen. Die Familie der Matrix-Metalloproteasen besteht aus Endopeptidasen, die an ein Zink-Ion gebunden sind (Egeblad et al. 2004). Man kann sie je nach Struktur unter acht unterschiedlichen Gruppen subsumieren; zu drei von ihnen gehören die membrangebundenen MMPs (MT-MMPs), zu den anderen fünf Gruppen die sezernierten MMPs. Kovalent gebunden befinden sich die MT-MMPs an der Zellmembran. Es handelt sich dabei um den wahrscheinlich häufigsten Weg, MMP-Aktivität an die Zellmembran zu binden. Die sezernierten MMPs können allerdings auch an der Zelloberfläche lokalisiert sein, entweder durch die Bindung an Integrinen (Brooks et al. 1996) oder an CD44 (Yu Q u. Starnenkovic 1999, Yu W-H et al. 2002) oder durch Wechselwirkung mit Zelloberflächen-assoziierten Heparansulfatproteoglykanen, Kollagen Typ IV oder Emprin (s.u.) (Sternlicht u. Werb 2001).

Die MMPs werden als inaktive Enzyme, Zymogene (pro-MMPs), synthetisiert und können durch Spaltung aktiviert werden. Ihre Aktivität wird durch endogene Inhibitoren reguliert, zu denen α 2-Makroglobulin (Sottrup-Jensen u. Birkedal-Hansen 1989) und die gewebeständigen Inhibitoren (TIMP: tissue inhibitors of metalloproteinases) (Edwards 2001) gehören. Viele Erkenntnisse über den Beitrag der MMPs zur Tumorprogression stammen aus Tierversuchen. In Transplantationsassays (Xenograft-Experimenten) konnte gezeigt werden, dass relativ gutartige Tumorzellen bösartige Eigenschaften annehmen, wenn die

MMP-Expression erhöht wird. Im Gegensatz dazu nimmt die Aggressivität von Tumorzellen ab, wenn die Expression bzw. die Aktivität von MMPs reduziert ist (Coussens u. Werb 1996).

MMPs werden in fast jedem menschlichen Tumor vermehrt gebildet und ihre Expression geht oft mit niedrigen Überlebensraten einher. Während einige MMPs (z.B. MMP-7) von Tumorzellen exprimiert werden, werden andere (z.B. MMP-2 und -9) hauptsächlich von Zellen der EZM synthetisiert, wozu Fibroblasten, Myofibroblasten und Abwehrzellen gehören. Wahrscheinlich stimulieren Tumorzellen durch Sekretion von Interleukinen, Interferonen, Wachstumsfaktoren und Emmprin die Zellen der EZM, MMPs zu synthetisieren (Sternlicht u. Werb 2001).

MMPs können durch Steigerung des Tumorzellwachstums, der Migration, der Invasion, der Metastasierung und der Angiogenese die Tumorprogression fördern. Das geschieht durch Spaltung verschiedener Substratgruppen, zu denen nicht nur Strukturkomponenten der EZM gehören, sondern auch Wachstumsfaktoren bindende Proteine (Vecchi et al. 1998), Vorgängermoleküle (Präkursoren) von Wachstumsfaktoren, Rezeptor-Tyrosinkinasen, Zelladhäsionsmoleküle (Kajita et al. 2001) und andere Proteinase.

Mehrere synthetische MMP-Inhibitoren werden in klinischen Tests (Trials) untersucht. Obgleich von einigen ermutigenden Resultaten berichtet wurde, sind einige Trials vorzeitig abgebrochen worden, weil kein Erfolg zu erkennen war bzw. zu starke Nebenwirkungen beobachtet wurden. Die klinischen Trials wurden bisher auf die Patienten mit fortgeschrittenem Krankheitsstadium beschränkt. Ergebnisse aus Tierversuchen legen jedoch die Vermutung nahe, dass die Nutzung von MMP-Inhibitoren auch im Frühstadium (in Kombination mit konventioneller Therapie) oder als prä- und postoperative Behandlung zur Verhinderung einer operationsbedingten Tumorzellstreuung eingesetzt werden könnte (Egeblad u. Werb 2002).

MMP-1 ist in der Lage, fibrilläres Kollagen abzubauen. Das wurde u.a. bei der Zellinvasion von Tumorzellen und Endothelzellen in Kollagengels nachgewiesen (Fisher et al. 1994, Benbow et al. 1999). In oralen/oropharyngealen Karzinomen wurde MMP-1 stärker exprimiert als in der normalen oralen Mukosa. Dieses konnte in verschiedenen Studien

nachgewiesen werden (Sutinen et al. 1998, O-Charoenrat et al. 2001, Jordan et al. 2004, Baker et al. 2005).

MMP-2 spaltet Kollagen Typ IV, einen Bestandteil der Basalmembran, sowie weitere Komponenten der EZM. Die Expression sowie die gelatinolytische Aktivität von MMP-2 wurden in oralen/oropharyngealen Karzinomen im Vergleich zur normalen Mukosa erhöht nachgewiesen (Kawamata et al. 1998, Sutinen et al. 1998, Imanishi et al. 2000, Shimada et al. 2000, Tokumaru et al. 2000, O-Charoenrat et al. 2001, Yorioka et al. 2002, Robinson et al. 2003, Tsai et al. 2003, Jordan et al. 2004, Baker et al. 2005, Gao et al. 2005, Patel et al. 2005, Tang ZG et al. 2005). Weil MMP-2 außerdem in Tumorzellen bereits metastasierter Tumoren stärker exprimiert wurde gegenüber Tumorzellen nicht metastasierter Tumoren (Kusukawa et al. 1995, Gohji et al. 1998, Kawamata et al. 1998, Dietz et al. 1999), spielt MMP-2 wahrscheinlich eine besondere Rolle in Bezug auf die Invasion oraler Karzinome (Muller et al. 1991, Kusukawa et al. 1992, Ikebe et al. 1999). Dies untermauert auch die Hypothese, dass MMP-2-Expression mit einem aggressiveren Tumorwachstum und einer schlechteren Prognose von oralen/oropharyngealen Karzinomen korreliert (Miyajima et al. 1995, Kawamata et al. 1997, Kawamata et al. 1998, Tokumaru et al. 2000).

Die Matrix-Metalloproteinase MMP-3, die Bestandteile des Zytoskeletts bzw. der EZM wie z.B. das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin spaltet, wurde in Verbindung mit dem Tumorstadium, dem Invasionspotenzial und der Inzidenz von regionalen LK-Metastasen oraler Plattenepithelkarzinome gebracht (Muller et al. 1993, Kusukawa et al. 1996). MMP-3-Expression wurde signifikant höher in oralen/oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen gegenüber der normalen Mukosa nachgewiesen (Birkedal-Hansen et al. 2000, O-Charoenrat et al. 2001, Baker et al. 2005).

Emmprin (extracellular matrix metalloproteinase inducer; CD147; basigin) ist ein häufig vorkommendes Zelloberflächen-Glykoprotein, das zur Klasse der Immunglobuline gehört. Auf der Oberfläche von bösartigen Tumorzellen ist es stark angereichert. Emmprin spielt in vielen physiologischen und pathologischen Stoffwechselfvorgängen eine Rolle. Eine Hauptfunktion hat es bei der Stimulierung der Synthese einiger MMPs sowohl in Fibroblasten des Stromas und in Endothelzellen als auch in Tumorzellen selbst. Membranassoziierte Kofaktoren wie Caveolin-I und Annexin-II sind in die

komplexen Vorgänge der Regulation der Aktivität von Emmprin einbezogen. Auch wenn die genauen Regulationsmechanismen, mit denen Emmprin zahlreiche Phänomene steuert, noch nicht umfassend erforscht sind, kann man davon ausgehen, dass Emmprin ein wichtiger Mediator in der Tumorprogression ist (Yan et al. 2005). Emmprin steuert zum Teil die Wechselwirkung zwischen Tumorzellen und Stromazellen (Tang Y et al. 2004) und spielt höchstwahrscheinlich eine zentrale Rolle beim Vorgang der Metastasierung (Pantel u. Brakenhoff 2004, Reimers et al. 2004). In zahlreichen Studien konnte nachgewiesen werden, dass es die Synthese vieler MMPs in Fibroblasten stimulieren kann: MMP-1, -2, -3, -9, -14, -15, pro MMP-2-Aktivatoren, MT1- und MT2-MMP (Kataoka et al. 1993, Guo et al. 1997, Lim et al. 1998, Bordador et al. 2000, Sameshima et al. 2000, Kanekura et al. 2002, Tang Y et al. 2004, Rosenthal et al. 2005). In zwei Studien wurde nachgewiesen, dass in oralen/oropharyngealen Karzinomen Emmprin stärker exprimiert wurde als in der normalen Schleimhaut (Bordador et al. 2000, Vigneswaran et al. 2006).

Die prognostische Aussagekraft des Expressionsmusters der Proteine MMP-1, -2, -3 und Emmprin sowie der klinisch pathologischen Parameter wie Tumorstadium und Differenzierungsgrad ist bislang unbefriedigend. Die Aggressivität oraler/oropharyngealer Karzinome lässt sich nicht genau vorhersagen. Es lassen sich mithilfe der bereits veröffentlichten Studien noch keine eindeutigen Gesetzmäßigkeiten in Bezug auf die Expression dieser Proteine und das Tumorverhalten darstellen. Ein besseres Verständnis der Tumorbiologie insbesondere der Bedeutung der MMPs und assoziierten Faktoren ist notwendig.

In verschiedenen Studien wurde eine erhöhte Expression von MMP-1, -2, -3 und Emmprin in oralen/oropharyngealen Karzinomen nachgewiesen. Auch in oralen dysplastischen Epithelien sowie in LK-Metastasen konnten erhöhte Expressionswerte festgestellt werden. Deshalb ist anzunehmen, dass diese Proteine eine Rolle bei der Invasion und Metastasierung dieser Karzinome spielen.

Bisher wurden die Gewebe in der Regel getrennt voneinander untersucht, so dass z.B. das Tumorepithel mit einem Referenzgewebe (normales Epithel) verglichen wurde, nicht aber gleichzeitig mit dysplastischen Epithelzellen,

Lymphknoten und dem angrenzenden Stroma. Es gibt keine Studie, in der gleichermaßen das Tumorepithel, das benachbarte dysplastische und normale Epithel, die LK-Metastasen, tumorfreie Lymphknoten sowie das jeweils angrenzende Stroma hinsichtlich dieser Proteine analysiert wurden.

Die Methoden, die in den bisherigen Studien angewandt wurden, sind zudem sehr unterschiedlich. Unter anderem wurden die RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction), ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), Western Blotting, Northern Blotting, Zellkulturversuche und Zymographie angewandt. Nur in wenigen Studien wurden *in situ*-Methoden wie die Immunhistochemie (IHC) und die *in situ*-Hybridisierung (ISH) benutzt, mit denen es möglich ist, die Expression der Proteine in den verschiedenen Zellen zu analysieren. Mit diesen Methoden lässt sich die Expression nicht nur auf Proteinebene (IHC), sondern auch auf mRNA-Ebene (ISH) in den Präparaten der Patientenfälle darstellen.

Um die Expression der Proteine MMP-1, -2, -3 und Emmprin in den Präparaten (*in situ*) zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit sowohl die IHC als auch die ISH benutzt. Dabei wurden die Karzinomanteile, die angrenzende Schleimhaut mit Dysplasien, die angrenzende tumorfreie Schleimhaut sowie LK-Metastasen und tumorfreie Lymphknoten hinsichtlich dieser Proteine analysiert. Die Expression wurde zusätzlich in Bezug auf eine mögliche Abhängigkeit von klinisch pathologischen Parametern (Tumorstadium und Differenzierungsgrad) untersucht.

3. Material und Methoden

3.1. Material

Das Untersuchungsgut stammt von 89 Patienten mit einem oralen/oropharyngealen Karzinom. Es umfasst archivierte formalinfixiertes und in Paraffinblöcken eingebettetes Gewebe und die routinemäßig angefertigten zugehörigen Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Schnittpräparate. Die Patienten wurden in der Klinik und Poliklinik für Zahn-, Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie oder in der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf in den Jahren 1997-2003 operiert. Bei den Operationen wurden die Primärtumoren und zum Teil auch Lymphknoten der Halsregion entfernt. Im ehemaligen Institut für Oralpathologie wurden die pathologischen Begutachtungen durchgeführt. Die klinischen Daten zum Untersuchungsgut stammen von den klinischen Untersuchungsanträgen. Jeder untersuchte Fall wurde anhand der archivierten Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Schnittpräparate nochmals begutachtet und hinsichtlich Tumortyp, Differenzierungsgrad und Tumorstadium reevaluiert.

Die klinischen Daten (Geschlecht, Alter, pN-Stadium) der 89 Patienten sind in der Tabelle 1 aufgeführt. Das Altersmittel betrug 61,7 Jahre.

Tabelle1: Untersuchungsmaterial mit klinischen Angaben und Lymphknotenstatus

| | Anzahl |
|---------------|--------|
| Insgesamt | 89 |
| Geschlecht * | |
| Weiblich | 36 |
| Männlich | 52 |
| | |
| Alter * | |
| < 50 Jahre | 15 |
| 50-60 Jahre | 24 |
| > 60 Jahre | 49 |
| | |
| pN-Stadium ** | |
| pN0 | 54 |

| | |
|-------|----|
| ≥ pN1 | 23 |
|-------|----|

*: von einem Fall nicht bekannt

** : von 12 Fällen nicht bekannt

3.2. Methoden

3.2.1. Immunhistochemische Analyse

Bei allen Primärtumoren (89 Fälle) und LK-Metastasen (19 Fälle) wurde mittels Immunhistochemie (IHC) die Expression der Proteasen MMP-1 und Emmprin analysiert.

3.2.1.1. Anfertigung der Paraffinschnitte

In üblicher Weise wurden 4-5 µm dicke Schnitte angefertigt und auf beschichteten (3-Aminopropyltriethoxysilan) Glasobjektträgern (Superfrost-Plus, MENZEL) aufgebracht.

Pro Fall wurden vier Schnitte benötigt (2 Schnitte für Antikörper; je ein Schnitt für eine Negativkontrolle und eine Isotyp-Kontrolle).

3.2.1.2. Immunhistochemische Reaktion

Die immunhistochemische Reaktion erfolgte mit dem Envision-Kit der Firma Dako. Benutzt wurden ein Emmprin-Antikörper und ein MMP-1-Antikörper zur Detektion dieser Proteine.

Für die Negativkontrollen wurde der primäre Antikörper weggelassen. Die Isotyp-Kontrolle (Mops 21) wurde durchgeführt, um nachzuweisen, dass der sekundäre Antikörper nur an den primären Antikörper und nicht an den Kontroll-Antikörper bindet. Sowohl die benutzten Antikörper als auch der Kontroll-Antikörper sind monoklonale Antikörper. Der Mops-Antikörper wurde in der gleichen IgG-Konzentration eingesetzt wie der Primär-Antikörper. Die Isotyp-Kontrollen waren negativ.

3.2.1.3. Versuchsdurchführung

1. Teil

- Paraffinschnitte wurden bei ca. 80°C im Brutschrank gebacken (30 min)
- 10 min in Xylol 1 gespült; 10 min in Xylol 2 gespült
- 5 min in Ethanol (100%) gespült; in Ethanol (100%) gespült

- in Ethanol (96%) gespült; in Ethanol (96%) gespült
 - 10 min in 200ml Methanol mit 10 ml 30%Wasserstoffperoxid (frisch ansetzen) gespült
 - Bei Nachweis von Emmprin: 20 min in 1xCitratpuffer gekocht (Mikrowelle wurde benutzt; zwischendurch wurde mit kochendem Puffer die Küvette wieder aufgefüllt)
 - Bei Nachweis von MMP-1: 15 min Protease 1 (100 µl/Schnitt) bei 37°C in feuchter Kammer
 - in Aqua dest. gespült
 - 10 min Avidin (auf den Objektträger getropft, feuchte Kammer)
 - 10 min Biotin (auf den Objektträger getropft, feuchte Kammer)
 - Zweimal 5 min in TBST gespült
 - Antikörper wurden aufgetragen (100 µl/Schnitt, Emmprin: 1:2000 ; MMP-1: 1:200 mit Verdünnungsmedium verdünnt) und bei 4°C über Nacht in feuchter Kammer inkubiert
2. Teil (darauf folgender Tag)
- 3x5 min in TBST gewaschen
 - 10 min Lösung 1 (Sekundärantikörper; 1-2 Tropfen/Schnitt) in feuchter Kammer
 - 3x5min in TBST gewaschen
 - 10 min DAB (1:50 verdünnt) in feuchter Kammer
 - 2 sec. in aqua dest. gespült
 - Gegenfärben mit Hämalaun (3 sec.); 5 min in Leitungswasser gespült
 - Aufsteigende Alkoholreihe; Xylol
 - Schnitte wurden eingedeckelt

3.2.1.4. Lösungen, Puffer und Reagenzien

Envision-Kit: ChemMate™ Envision™ DetectionKit ;
Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse; Dako Cytomation,
Hamburg
Citratpuffer 1x(DAKO)
Protease 1 (VENTANA)
Avidin (DAKO)
Biotin (DAKO)

TBST-Puffer (DAKO)
Verdünnungsmedium (DAKO)
Lösung 1 (DAKO)
DAB (DAKO)
Hämalaun-Färbebad
Xylol; FLUKA
Ethanol, 100%, 96%; WALTER CMP GmbH & Co.
Methanol
Wasserstoffperoxid (30%)
Aqua dest.
Antikörper Emmprin; clone, HIM6, Isotyp: IgG1, RDI,
Flanders, NJ, USA
Antikörper MMP-1; (Ab-1) Clone 41-1E5, Isotyp: IgG2a,
Oncogene Res Products, Cambridge, MA, USA
Mops-21; SIGMA, Deisenhofen
Kunststoff zum Eindeckeln

3.2.1.5. Geräte und Materialien

Brutschrank
Mikrowelle
Feuchte Kammer
Mikrotom
Objektträger (Superfrost-Plus, MENZEL)

3.2.2. nicht-radioaktive RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierung (ISH)

Für den Nachweis von mRNA (kodierende Gene der Proteasen MMP-1, MMP-2 und MMP-3) wurden Primärtumoren (31 Fälle), LK-Metastasen (14) und tumorfreie LK (17 Fälle) mit nicht radioaktiver RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierung (ISH) untersucht.

3.2.2.1. Plasmide für die Herstellung der Ribosonden

Alle Plasmide, die zur Herstellung der Ribosonden verwendet wurden, wurden von Prof. Dr. Hermann Herbst (Berlin) zur Verfügung gestellt und sind bei Brummer et al. (1999) beschrieben.

MMP-1

Ein 735 bp-SstI-EcoRI-Fragment wurde aus pCIIasel (Whitham et al. 1986) in pGEM1 (Promega Biotech, Madison, Wis., USA) subkloniert.

MMP-2

Ein 1,3 kb-EcoRI-BglII-Fragment wurde aus pK121 (Huthala et al. 1990) in pGEM1 subkloniert.

MMP-3

Ein 0,6 kb EcoRI-HindIII-Fragment wurde aus pTR1 (Matrisian et al. 1985) in pGEM1 subkloniert.

Für die Linearisierung der Plasmide wurden die Enzyme EcoRI und HindIII benutzt.

Für alle Plasmide traf zu:

„Antisense“-Sonde: Linearisierung mit EcoRI

Transkription mit SP6-RNA-Polymerase

„Sense“-Sonde: Linearisierung mit HindIII

Transkription mit T7-RNA-Polymerase

3.2.2.2. Anfertigung der Paraffinschnitte

In üblicher Weise wurden 4-5 µm dicke Schnitte angefertigt und auf beschichteten (3-Aminopropyltriethoxysilan) Glasobjektträgern (Superfrost-Plus, MENZEL) aufgebracht.

Pro Fall wurden sechs Schnitte angefertigt: zwei Schnitte (Antisense, Sense) pro Sonde (MMP-1,-2,-3).

3.2.2.3. Markierung der Sonden

Es wurde die RNA-Markierung mit Digoxigenin-UTP durch *in vitro*-Transkription mit SP-6 oder T7-Polymerase durchgeführt.

Prinzip:

Markierte RNA-Proben wurden durch *in vitro*-Transkription von DNA, die jenseits des SP6- oder T7-Promotors kloniert wurde, mit Hilfe der SP6- oder T7-RNA-Polymerasen unter Benutzung von Dig-UTP synthetisiert. 1 µg lineare „Template“-DNA wurde zur Transkription eingesetzt, die Ausbeute an Dig-markierter RNA betrug ca. 10 µg. Die eingesetzte DNA sollte durch Phenol/Chloroform-Behandlung und Alkoholfällung gereinigt worden sein.

- Auf Eis wurden folgende Komponenten im Eppendorfgefäß zusammenpipettiert:
 - o 1 µg DNA
 - o 2 µl NTP-Markierungsmix (Gefäß 7)
 - o 2 µl 10x Transkriptionspuffer (Gefäß 8), aufgefüllt auf 18 µl mit sterilisiertem aqua bidest.
 - o 2 µl SP6- (Gefäß 11) oder T7-Polymerase zugegeben (Gefäß 12)
- 1 µl RNase-Inhibitor (Gefäß 10) zugegeben
- kurz zentrifugiert und für 120 min bei 37°C inkubiert
- Wenn erforderlich, konnte die Template-DNA durch direkte Zugabe von 2 µl DNase I (RNase-frei) – Gefäß 9 – und Inkubation für 15 min bei 37°C entfernt werden.
- 2 µl EDTA-Lösung (0,2 M; pH 8,0) zugegeben, um die Reaktion zu stoppen
- markierte RNA wurde mit 2,5 µl LiCl (4 M) und 75 µl eiskaltem Ethanol gefällt und gut gemischt
- wurde mindestens 30 min bei –80°C oder 120 min bei –20°C gefällt
- bei 12000 g wurde abzentrifugiert, 15 min bei 4°C, Pellet mit 50 µl kaltem 70%igen Ethanol gewaschen und unter Vakuum getrocknet
- Pellet in 100 µl DEPC-Wasser (0,1%) durch Inkubation für 30 min bei 37°C gelöst (1 µl RNase-Inhibitor, Gefäß 10, konnte zugegeben werden)
- Alkalische Hydrolyse: Dauer der Hydrolyse musste zunächst berechnet werden: $t = (L_o - L_f) / (K * L_o * L_f)$
Lf = 0,2 kb
K = 0,11 kb/min
Lo = starting length of probe RNA (in kb)
t = time in min

100 µl Probe + 60 µl Na²Co³(200mM) + 40µl NaHCO³ (200mM) bei 60°C im Heizblock

- Hydrolyse wurde abgestoppt mit: 10µl 10% Essigsäure, 22µl Na-Acetat (3M, pH 6,0), 2µl tRNA (10mg/ml); 2,4µl MgCl² (1M); 600µl kaltes Ethanol abs.
mind. 60 min bei -80°C oder über Nacht bei -20°C
- 15 min bei 4°C zentrifugiert
- mit 70% Ethanol gewaschen
- Pellet wurde getrocknet
- In DEPC-Wasser gelöst (100µl)

3.2.2.4. Vorbehandlung der Präparate

Es mussten bei der RNA-*in situ*-Hybridisierung für sämtliche Arbeitsschritte bis zur Hybridisierung speziell vorbereitete Materialien und Gefäße benutzt werden, damit die unhybridisierte RNA nicht durch RNasen zerstört werden konnte. Hierfür wurden sämtliche Glasbehälter bei 250°C drei Stunden gebacken. Das aqua bidest. wurde mit DEPC versetzt (1ml auf 1l) und anschließend autoklaviert. Alle Lösungen des ersten Tages wurden mit diesem Wasser angesetzt.

Die Vorbehandlung der Präparate (1. Tag) diente auf der einen Seite der Verhinderung unspezifischer Hybridisierung der Sonde mit anderen Sequenzen als der Zielsequenz. Auf der anderen Seite sollten unspezifische Wechselwirkungen mit Proteinen und anderen Zellbestandteilen, die an die Sonde binden könnten, verhindert werden. Des Weiteren wurde das Eindringen der Sonde und des Nachweisreagenzes erleichtert und die Zielsequenzen wurden stabilisiert. Im Einzelnen wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

3.2.2.5. Hybridisierung

1. Teil

- Es wurde an einem Arbeitsplatz gearbeitet, an dem nicht mit RNase gearbeitet werden durfte!
- Die mit „Antisense“ und „Sense“ beschrifteten Schnitte wurden in Küvetten sortiert und bei 60°C 30 min getrocknet.
- Schnitte wurden in Xylol entparaffiniert (2x10 min)

- Absteigende Alkoholreihe: je 2 min in 100%-, 95%-, 80%-Ethanol (angesetzt in DEPC-Aqua dest.)
- 5 min in DEPC-Wasser gespült
- 20 min bei Raumtemperatur in 0,2 N HCL
- 15 min bei RT in 0,3 % Triton X 100 (mit PBS angesetzt, brauchte etwas Zeit, bis es sich gelöst hatte)
- 30 min bei 37°C in Proteinase-K-Puffer (Schüttler-Wasserbad)
- 30 min bei 37°C in Proteinase-K-Puffer mit Proteinase K (5µg/ml) (Schüttler-Wasserbad)
- 1 min in eiskaltem 0,2% Glycin (mit DEPC-Wasser angesetzt) abgestoppt
- 5 min in eiskalter 3%-Paraformaldehyd-Lösung postfixiert (am Vortag angesetzt)
- 5 min bei RT in DEPC-Wasser
- 3 min bei RT in 0,1 M Acetylierungspuffer äquilibriert
- 10 min bei RT in 0,1 M Acetylierungspuffer mit Acetanhydrid (0,5%ig) acetyliert
- 5 min bei RT in 2xSSC
- Schnitte 60 min bei 50°C getrocknet (Hybridisierungsofen/Wärmeschrank)
- mit 100 µm/Schnitt Prähybridisierungsmix für 150 min bei 52°C prähybridisiert (SS-DNA wurde vor Gebrauch für 5 min auf 95°C erhitzt; danach auf Eis abgekühlt)
- 29 µl Hybridmix mit 1 µl Dig-Sonde auf jeden Schnitt pipettiert, mit Cover-Medium (Deckgläschen) abgedeckt und in feuchter Kammer über Nacht bei 52°C inkubiert

2. Teil (darauffolgender Tag)

- Schnitte wurden 15 min bei RT in 2xSSC gewaschen (Deckgläschen entfernt)
- 10 min bei 60°C in Hybridisierungspuffer gewaschen
- 30 min bei 37°C in RNase-Puffer mit RNase (0,05%ig) gewaschen
- 30 min bei 37°C in RNase-Puffer ohne RNase gewaschen
- 3 min bei RT in 2xSSC gewaschen

- 15 min bei 52°C in 0,1xSSC gewaschen
- 10 min bei RT in 0,1xSSC äquibriert
- 5 min bei RT in Puffer 1 gewaschen
- 30 min bei RT mit normales Schafserum (20% in Puffer 1 verdünnt) in feuchter Kammer abgeblockt
- Schnitte kurz in Puffer 1 gewaschen
- 120 min bei RT mit Sheep-Anti-Dig-AP inkubiert
- 2x 15 min bei RT in Puffer 1 gewaschen (Schüttler)
- 15 min bei RT in Puffer 2 gewaschen (Schüttler)
- Schnitte in feuchte Kammer und mit Detektionslösung über Nacht inkubiert (an dunklem Ort gelagert)
- Je nach Farbintensität wurde Detektionslösung erneuert und weitere 3-5 Stunden inkubiert
- 10 min bei RT Farbentwicklung mit Puffer 3 abgestoppt
- 10 min bei RT mit filtriertem Nuclear Fast Red gegengefärbt
- 2-3x für 7 min in aqua dest. gespült
- Schnitte in aufsteigende Alkoholreihe gespült
- Schnitte zweimal in Xylol gespült
- Eingedeckelt

3.2.2.6. Lösungen, Puffer und Reagenzien

Acetylierungspuffer; 0,1 M: 6,65 ml Triethanolamin auf 500 ml DEPC-Wasser, pH 8 mit 37% HCL eingestellt

Denhardt's; 100x: 2g Ficoll, 2g PVP, 2 g Bovines Serum Albumin ad 200 ml DEPC-Wasser

DEPC-Wasser: Aqua bidest mit DEPC (Diethyl-Pyrocbonat) versehen (1ml DEPC auf 1 l); wenn sich DEPC aufgelöst hatte, wurde autoklaviert

Detektionslösung: 10 ml Puffer 2; 30 µl 0,3% TritonX-100; 200µl BCIP/NBT

Formamid, deionisiert: 100 ml Formamid, 6 g Mixed Bed Resin, 3 g Chelex 100; wurde zweimal durch Papierfilter filtriert

Hybridisierungsmix: 20 mM Tris; 0,3 M NaCl; 1 mM EDTA ; 100 mM DTT; 10% Dextransulfat in 50% deion. Formamid; 1x Denhardt's; 100µg/ml Poly A; 500 µg/ml SS-DNA; 500 µg/ml t-RNA; Aqua bidest.

Hybridisierungspuffer: 0,3 M NaCl; 50% Formamid; 20mM Tris (7,5); 1mM EDTA; 10mM DTT; Aqua bidest.

Nuclear Fast Red Counterstain; VECTOR

Paraformaldehydlösung; 3%: 6 g PFA in 200 ml PBS/DEPC wurde auf 60°C erwärmt, dann Zugabe von 6 Tropfen 1M NaOH bis das PFA gelöst war, auf 4°C abkühlen gelassen und dann den pH-Wert mit 2N HCL auf 7,4 eingestellt; wurde lichtgeschützt aufbewahrt

Proteinase K-Puffer: 100 mM Tris (7,4); 50 mM EDTA; DEPC-Wasser

Prä-Hybridisierungsmix: 20 mM Tris (7,4); 0,3 M NaCl; 1mM EDTA; 100 mM DTT; 50% deion. Formamid; 1% Denhardt's; 100 µg/ml Poly A; 500 µg/ml SS-DNA; 500 µg/ml t-RNA, Aqua bidest.

Poly A; 10mg/ml

RNase-Puffer: 0,5 M NaCl; 10mM Tris(pH 7,5); 1mM EDTA; Aqua bidest.

Puffer 1(pH 7,5): 0,1 M Tris (7,4); 0,15 M NaCl; Aqua bidest.

Puffer 2(pH 9,5): 0,1M Tris (7,4) ;0,1 M NaCl ; 50mM MgCl; Aqua bidest.

Puffer 3(pH 7,5): 10mM Tris (7,4), 1mM EDTA; Aqua bidest.

SSC; 20x

t-RNA, 20 mg/ml

Acetanhydrid; MERCK

Anti-Dig-AP;#10932 ROCHE; Digoxigenin-RNA labeling Kit; BOEHRINGER

Aqua bidest.

Aqua dest.

BCIP, 50 mg/ml; BOEHRINGER

Chelex

DEPC (Diethyl Pyrocarbonate) SIGMA

Dextransulfat

DTT, 1M ; SIGMA

EDTA; MERCK

Ethanol 100%, 95%, 80%; Walter CMP GmbH u. Co

Ficoll, AMERSHAM BIOSCIENCES

Formamid, deionisiert (für Hybrid.puffer wurde gereinigtes Formamid benutzt);

SIGMA

Glycin; ROTH

HCl, 1N; MERCK
HCl, 2N; MERCK
HCl, 37%ig; MERCK
Kunststoff zum Eindeckeln, Entellan; MERCK
Levamisole, 400 mg/ml; SIGMA
MgCl₂; FLUKA
Mixed Bed Resin
NaCl, J.T.BAKER
NaOH, 1M; MERCK
NBT, 100 mg/ml; BOEHRINGER
Nuclear Fast Red Counterstain, VECTOR
Paraformaldehyd; MERCK
Poly A; BOEHRINGER; # 108626
Proteinase K (SIGMA), 10mg/ml
RNA-Polymerase, 50 U/μl; BOEHRINGER/ROCHE
Rnase; BOEHRINGER/ROCHE
Schafserum, normal; DAKO; # x0503
SS-DNA; INVITROGEN; #15632-011
Triethanolamin; SIGMA
Tris; SIGMA
Triton X 100; SIGMA
t-RNA, BOEHRINGER; #109495
Xylol; FLUKA

3.2.2.7. Geräte und Materialien

Superfrostobjektträger (MENZEL)
Gebackene Küvetten, Erlenmeierkolben, Meßbecher, Meßzylinder,
Deckgläschen
Schüttler Wasserbad

3.3. semiquantitative mikroskopische Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Score's (in Anlehnung an Remmele et al. 1987).

Die Intensität der Expression wurde in vier verschiedenen Intensitäten angegeben: keine Expression (0), schwache Expression (1), mittelstarke Expression (2) und starke Expression (3).

Der Anteil der exprimierenden Zellen in Bezug zur Gesamtzahl der Zellpopulation wurde folgendermaßen erfasst: 0-9% exprimierende Zellen (1); 10-50% exprimierende Zellen (2); 50,1-80% exprimierende Zellen (3); 80,1-100% exprimierende Zellen (4).

Beide Werte (Intensität der Expression und Anteil der exprimierenden Zellen) wurden miteinander multipliziert. Die ermittelten Werte (zwischen 0 und 12), wurden in 3 Gruppen zusammengefasst:

1 (1-3) = schwache Expression

2 (4-8) = mittelstarke Expression

3 (9-12) = starke Expression

0 = keine Expression

Die Analyse erfolgte separat für folgende Zellarten/-gruppen:

1. Tumorzellen zentral und peripher (auf die Tumorzellnester/-stränge bezogen)
2. peritumorale Stromazellen
3. Plattenepithelzellen der angrenzenden tumorfreien Schleimhaut
4. korrespondierende Stromazellen der angrenzenden tumorfreien Schleimhaut
5. dysplastische Plattenepithelzellen der angrenzenden Schleimhaut
6. korrespondierende Stromazellen der Dysplasie

3.4. Statistische Auswertung

Unterstützt wurde der statistische Teil der Arbeit von dem Computerprogramm SPSS und einem Statistiker des Instituts für medizinische Biometrie und Epidemiologie des Universitätsklinikums Eppendorf (Dr. Bubenheim).

Bevor die Ergebnisse der semiquantitativen Auswertung sowie die klinisch pathologischen Parameter zur statistischen Auswertung herangezogen werden konnten, wurden alle Daten so umgeschrieben, dass ausschließlich absolute Zahlen in den Dateien zur Verfügung standen. Es wurde eine Verschlüsselung vorgenommen, bei der Daten, wie z.B. G1, G2 und G3 (Differenzierungsgrad) in

absolute Zahlen (1, 2 und 3) umgeschrieben wurden. Diese Verschlüsselung war für die Berechnungen des Statistikprogramms notwendig.

Dadurch konnten die Daten zur Expression (MMP-1, -2 und Emmprin) mit allen vorliegenden klinisch pathologischen Parametern (pT-Stadium, pN-Stadium, Differenzierungsgrad, Alter, Geschlecht) korreliert werden. Außerdem konnten Ergebnisdaten verschiedener Zellarten/-gruppen (s.o.) untereinander korreliert werden (siehe Ergebnisteil). MMP-3 wurde bei der Statistik nicht berücksichtigt, weil fast keine Expression nachgewiesen werden konnte (siehe Ergebnisteil).

In Absprache mit dem Institut für medizinische Biometrie und Epidemiologie wurde bei der statistischen Auswertung jeweils eine Kreuztabelle erstellt, in der ein möglicher Zusammenhang zweier Faktoren übersichtlich dargestellt wurde. Um die einzelnen Gruppen in einer Kreuztabelle zu vergrößern, wurden zum Teil Parameter zusammengefasst. Beispielsweise wurden die Tumorstadien pT1 und pT2 sowie pT3 und pT4 zu jeweils einem Parameter zusammengefasst. Außerdem wurden auch zum Teil die Score-Werte 1 und 2 sowie 3 und 4 zu jeweils einem Wert vereinigt. Zusätzlich wurde für jede Korrelation der exakte Test nach Fisher durchgeführt. Um von einem signifikanten Zusammenhang sprechen zu können, durfte dieser Testwert höchstens $p \leq 0,04$ betragen.

4. Ergebnisse

4.1. Untersuchungsgut mit klinischen und morphologischen Daten

Es wurden 89 orale/oropharyngeale Karzinome von 36 weiblichen und 52 männlichen Patienten untersucht. Von einem Patienten konnte das Geschlecht retrospektiv anhand der zur Verfügung stehenden Unterlagen nicht ermittelt werden.

Bei allen 89 Fällen wurde ein Plattenepithelkarzinom (PEK) diagnostiziert (Tabelle 2). Von 85 Fällen stand paraffineingebettetes Gewebe vom Primärtumor für die Untersuchungen zur Verfügung. Es gab 67 Fälle, bei denen neben dem Primärtumor auch angrenzende tumorfreie Schleimhaut untersucht werden konnte, und 34 Fälle mit angrenzender Schleimhaut mit Dysplasien. Bei vier Fällen konnten nur LK-Metastasen (3 Fälle) bzw. tumorfreie Lymphknoten (1 Fall) untersucht werden.

Die klinischen und morphologischen Daten sind in der Tabelle 2 aufgeführt. Von den 89 Patienten sind jeweils das Alter, das Geschlecht, die Lokalisation des Primärtumors, das pTNM-Stadium und der Differenzierungsgrad in der Tabelle vermerkt. Zusätzlich ist aufgeführt, welche Gewebeart untersucht wurde, und ob LK-Metastasen oder tumorfreie Lymphknoten analysiert wurden.

Tabelle 2: Untersuchungsgut mit klinischen und morphologischen Daten

| Ifd. Nr. | Alter | Geschl. | Lokalisation | pTNM | G | PEK | angrenz. Gewebe | | Lymphknoten | |
|----------|-------|---------|-------------------------------------|-------|---|-----|-------------------------|-------------------------|-------------|------------|
| | | | | | | | Plattenepithel Dysplas. | normales Plattenepithel | Met. | Keine Met. |
| 1 | 75 | ♀ | Keine genaue Angabe | pN1 | 2 | X | | | X | |
| 2 | 54 | ♂ | Zunge, Mundboden | * | 2 | X | | X | | |
| 3 | 55 | ♂ | Mundboden | pT3N0 | 2 | X | | | | |
| 4 | 67 | ♀ | Mundboden | pT3N0 | 2 | X | X | X | | |
| 5 | 65 | ♀ | Zunge, unterer Alveolarfortsatz | pT3N0 | 2 | X | | X | | |
| 6 | 54 | ♂ | Zunge, Mundboden | * | 2 | X | | X | | |
| 7 | 84 | ♀ | Mundboden, unterer Alveolarfortsatz | pT3N1 | 2 | X | | X | X | |
| 8 | * | ♂ | Unterer Alveolarfortsatz | pT3N0 | 2 | X | X | X | | |
| 9 | 64 | ♀ | Maxilla, Pharynx lat. | pT3N0 | 2 | X | X | X | | |
| 10 | 57 | ♂ | Lippe | pT1N0 | 2 | X | X | | | |
| 11 | 65 | ♀ | Mundboden | pT1N0 | 2 | X | | | | |
| 12 | 65 | ♂ | Zunge | pT3N0 | 2 | X | | X | | |

Ergebnisse

| | | | | | | | | | | |
|----|----|---|--|-------|---|----|---|---|---|---|
| 13 | 55 | ♀ | Retromolarregion | pN1 | 2 | X | | | X | |
| 14 | 67 | ♂ | Mundboden, unterer Alveolarfortsatz, Wangenschleimhaut | pT3 | 3 | X | | X | | |
| 15 | 67 | ♂ | Maxilla, Gaumen | pT2N1 | 3 | X | | | X | |
| 16 | 60 | ♂ | Zunge | pT2N0 | 2 | X | X | X | | |
| 17 | 60 | ♂ | Zunge | pT1N0 | 3 | X | X | X | | |
| 18 | 59 | ♂ | Keine genaue Angabe | pT3N0 | 2 | X | | | | |
| 19 | 77 | * | Mundboden | pT1N0 | 3 | X | | X | | |
| 20 | 55 | ♂ | Mundboden | pT1N0 | 2 | X | X | X | | |
| 21 | 56 | ♀ | Mundboden | pT2N0 | 2 | X | X | X | | |
| 22 | 61 | ♀ | Keine genaue Angabe | pT2N1 | 2 | ** | | | X | |
| 23 | 58 | ♂ | Keine genaue Angabe | pT1N0 | 2 | X | X | X | | |
| 24 | 78 | ♂ | Maxilla, Gaumen | pT2N0 | 2 | X | | X | | |
| 25 | 83 | ♀ | Wangenschleimhaut | pT1N0 | 2 | X | | | | |
| 26 | 88 | ♀ | Maxilla, Gaumen | pT1N0 | 2 | X | | | | |
| 27 | 57 | ♂ | Zunge | pN0 | 2 | X | X | X | | |
| 28 | 53 | ♂ | Zunge | pN1 | 2 | X | | X | X | |
| 29 | 64 | ♂ | Mundboden | pT2N0 | 2 | X | | | | |
| 30 | 53 | ♀ | Keine genaue Angabe | pT1N1 | 2 | X | | X | X | |
| 31 | 75 | ♀ | Maxilla, Gaumen | * | 3 | X | | | | |
| 32 | 49 | ♂ | Mundboden | pN1 | 2 | X | X | X | X | |
| 33 | 48 | ♀ | Mundboden | pT3N0 | 2 | X | X | | | |
| 34 | 65 | ♂ | Unterer Alveolarfortsatz, Retromolarregion | pT1N1 | 3 | X | X | X | X | |
| 35 | 67 | ♂ | Zunge | pN0 | 2 | X | X | X | | |
| 36 | * | ♀ | Zunge | pT1N1 | 1 | X | | X | X | |
| 37 | * | ♀ | * | pN1 | 1 | X | | | X | |
| 38 | 49 | ♂ | Zunge | pT1N1 | 2 | X | X | X | X | |
| 39 | 73 | ♂ | Mundboden | pT1N0 | 2 | X | X | X | | X |
| 40 | 45 | ♂ | Zunge | pT3N1 | 2 | X | X | X | X | |
| 41 | 76 | ♀ | * | pT1N0 | 1 | X | X | X | | |
| 42 | 51 | ♀ | Keine genaue Angabe | pT2 | 2 | X | X | X | | |
| 43 | 62 | ♂ | Zunge, Mundboden | pT2N0 | 3 | X | X | X | | X |
| 44 | * | ♂ | Mundboden, Wangenschleimhaut | pT2N1 | 1 | X | | X | X | |
| 45 | 53 | ♂ | Wangenschleimhaut | pT1N0 | 2 | ** | | | | X |
| 46 | 53 | ♀ | Keine genaue Angabe | pT1 | 2 | X | X | X | | |
| 47 | 62 | ♀ | Keine genaue Angabe | pT1N0 | 1 | X | | X | | |
| 48 | * | ♂ | Maxilla, Zunge, Pharynx | pT2N0 | 2 | X | X | X | | X |
| 49 | 52 | ♂ | Mundboden | pT2N0 | 3 | X | | X | | |
| 50 | * | ♂ | Mundboden | pT2N0 | 1 | X | | X | | X |
| 51 | 56 | ♂ | Keine genaue Angabe | pT3N0 | 3 | X | X | X | | X |
| 52 | 33 | ♂ | Zunge | pT2N0 | 1 | X | X | X | | |

Ergebnisse

| | | | | | | | | | | |
|----|----|---|---------------------------------------|-------|---|----|---|---|---|---|
| 53 | 68 | ♂ | Keine genaue Angabe | pT2N0 | 3 | X | X | X | | X |
| 54 | * | ♂ | Mundboden | pT1N0 | 2 | ** | | X | | X |
| 55 | * | ♂ | Keine genaue Angabe | pT1N0 | 2 | X | | X | | X |
| 56 | 63 | ♂ | Zunge | pT2N0 | 2 | X | | X | | |
| 57 | 76 | ♀ | Unterer Alveolarfortsatz, Zungengrund | pT1N0 | 2 | X | X | X | | X |
| 58 | 65 | ♀ | Keine genaue Angabe | pT2N0 | 2 | X | | X | | X |
| 59 | 68 | ♂ | Keine genaue Angabe | pT3N1 | 2 | X | | X | X | |
| 60 | 64 | ♂ | Mundboden | pT1N0 | 2 | X | X | X | | |
| 61 | * | ♂ | Keine genaue Angabe | pT2N0 | 2 | X | | | | X |
| 62 | 64 | ♂ | Keine genaue Angabe | pT1N1 | 2 | X | | X | X | |
| 63 | * | ♂ | Keine genaue Angabe | pT3N1 | 2 | X | | X | X | |
| 64 | 67 | ♀ | Keine genaue Angabe | pT2N1 | 3 | X | | X | X | |
| 65 | 44 | ♂ | Zunge, Mundboden | pT3N1 | 2 | X | | X | X | |
| 66 | 54 | ♀ | Zunge | pT1 | 2 | X | | X | | |
| 67 | 63 | ♀ | Maxilla, Gaumen | pT2N0 | 2 | X | | X | | X |
| 68 | 47 | ♂ | Zunge, Retromolarregion | pT1N0 | 2 | X | | X | | |
| 69 | 54 | ♀ | Zunge | pT1N0 | 2 | X | | X | | X |
| 70 | 64 | ♂ | Maxilla, Gaumen | pT1N0 | 2 | X | | X | | |
| 71 | 65 | ♂ | Mundboden | pT3N0 | 2 | X | | | | X |
| 72 | 45 | ♀ | Keine genaue Angabe | pT1N0 | 2 | X | | X | | X |
| 73 | 55 | ♀ | Mundboden | pT1N0 | 2 | X | X | X | | |
| 74 | 78 | ♀ | Maxilla, Gaumen | pT1 | 1 | X | X | X | | |
| 75 | 58 | ♂ | Keine genaue Angabe | * | 1 | X | | | | |
| 76 | 72 | ♀ | Wangenschleimhaut | pT1N0 | 2 | X | X | X | | |
| 77 | 81 | ♀ | Mundboden | pT1N0 | 2 | X | | X | | |
| 78 | 72 | ♀ | Keine genaue Angabe | pN0 | 3 | X | | | | |
| 79 | 78 | ♀ | Unterer Alveolarfortsatz, Mundboden | pT2N0 | 1 | X | X | X | | |
| 80 | 65 | ♀ | Keine genaue Angabe | pT1N0 | 3 | X | X | X | | |
| 81 | 75 | ♀ | Maxilla, Gaumen | pT1 | 1 | X | | | | |
| 82 | 78 | ♂ | * | pN1 | * | ** | | | X | |
| 83 | 76 | ♀ | Keine genaue Angabe | pT2N1 | 1 | X | X | X | X | |
| 84 | 49 | ♂ | Keine genaue Angabe | pT2N0 | 2 | X | | X | | |
| 85 | 42 | ♂ | Zunge | pT2N1 | 2 | X | | X | X | |
| 86 | 75 | ♂ | Zunge | pT3 | 2 | X | | X | | |
| 87 | 75 | ♂ | Zunge | pT3N1 | 2 | X | | X | X | |
| 88 | 53 | ♂ | Zunge | pT2 | 3 | X | | X | | |

| | | | | | | | | | | |
|----|----|---|---------------------|-------|---|---|---|---|--|--|
| 89 | 61 | ♂ | Keine genaue Angabe | pT3N0 | 2 | X | X | X | | |
|----|----|---|---------------------|-------|---|---|---|---|--|--|

* : Daten nicht vorhanden

** : keine Anteile des Primärtumors im Schnitt vorhanden

G: Differenzierungsgrad; Geschl.: Geschlecht; Met.: Metastase

Das pT-Stadium, der Differenzierungsgrad und die Lokalisation der Primärtumoren der 89 Fälle sind zusätzlich in der Tabelle 2.1 übersichtlich und zusammengefasst dargestellt.

Tabelle 2.1: Tumorstadium, Differenzierungsgrad und Tumorlokalisation

| pT-Stadium* | Anzahl |
|---------------------------------------|--------|
| pT1 | 32 |
| pT2 | 24 |
| pT3+pT4 | 19 |
| | |
| Grading/Differenzierungsgrad** | |
| G1 | 12 |
| G2 | 62 |
| G3 | 14 |
| | |
| Lokalisation*** | |
| Zunge | 17 |
| Mundboden | 17 |
| Maxilla/Gaumen | 8 |
| Zunge und Mundboden | 4 |
| Wangenschleimhaut | 3 |
| Lippe | 1 |
| Retromolarregion | 1 |
| Unterer Alveolarfortsatz | 1 |
| Ohne genaue Angabe | 24 |
| gebietübergreifend | 10 |

*: von 14 Fällen nicht bekannt

** : von einem Fall nicht bekannt

***: von 3 Fällen nicht bekannt

4.2. Expression der Matrix-Metalloproteinase-1 (MMP-1, interstitielle Kollagenase)

Die MMP-1-Expression wurde immunhistochemisch und mit der *in situ*-Hybridisierung nachgewiesen. Die Ergebnisse der 89 untersuchten Fälle sind in Tabelle 2.2 ersichtlich. In den Fällen, wo kein Ergebnis notiert ist, fehlte das jeweilige Gewebe im Schnitt (Zellverlust) bzw. wurde das Gewebe hinsichtlich dieses Proteins nicht untersucht.

Tabelle 2.2: MMP-1-Expression

| Fall Nr. | MMP-1; IHC | | | | | | | | MMP-1; ISH | | | | | | | | | |
|----------|------------|----|--------|----|----------|----|---------|----|------------|----|-----------|----|----------|----|---------|----|-------------|----|
| | Karzinom | | Dyspl. | | n.Epith. | | LK-Met. | | Karzin. | | Dysplasie | | n.Epith. | | LK-Met. | | tumorfr. LK | |
| | TZ | SZ | DZ | SZ | EZ | SZ | TZ | SZ | TZ | SZ | DZ | SZ | EZ | SZ | TZ | SZ | TZ | SZ |
| 1 | 1 | 0 | | | | | 1 | 1 | | | | | | | | | | |
| 2 | 1 | 1 | | | 2 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 3 | 2 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | 1 | 1 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | 2 | 1 | | | 1 | 0 | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 1 | 1 | | | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 2 | 2 | | | 1 | 0 | | | | | | | | | | | | |
| 8 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 9 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 10 | 2 | 2 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | | | |
| 11 | 1 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 1 | 2 | | | 1 | 2 | | | | | | | | | | | | |
| 13 | 2 | 2 | | | | | | | 2 | 1 | | | | | 1 | 1 | | |
| 14 | 1 | 1 | | | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 0 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 16 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | | | | | | | | | | | | |
| 17 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 18 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 19 | 1 | 1 | | | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 20 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 21 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 22 | | | | | | | 1 | 2 | | | | | | | | | | |
| 23 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 24 | 1 | 1 | | | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 25 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 26 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 27 | 2 | 1 | 2 | 1 | 0 | 0 | | | | | | | | | | | | |
| 28 | 1 | 1 | | | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 29 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 30 | 1 | 1 | | | 2 | 1 | 1 | 1 | | | | | | | | | | |
| 31 | 0 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 32 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | | | | | | | | | | |
| 33 | 1 | 1 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | | | |
| 34 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | | | | | | | | | | |
| 35 | | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | | | | | | |

Ergebnisse

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 36 | 0 | 0 | | | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | | |
| 37 | 1 | 1 | | | | | 1 | 1 | | | | | | | 0 | 0 | | |
| 38 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | | |
| 39 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | 0 | 0 |
| 40 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| 41 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | | | | | | |
| 42 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 43 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 | | | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | | | 0 | 0 |
| 44 | 1 | 1 | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | | | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| 45 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 0 | | | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | 0 | 0 |
| 46 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 47 | 2 | 1 | | | 1 | 0 | | | | | | | | | | | | |
| 48 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | 0 | 0 |
| 49 | 2 | 1 | | | 1 | 0 | | | | | | | | | | | | |
| 50 | 2 | | | | 1 | 1 | | | 1 | 0 | | | 0 | 0 | | | 0 | 0 |
| 51 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | 0 | 0 |
| 52 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | | | | | | | | | | | | |
| 53 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | | | 0 | 0 |
| 54 | | | | | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 55 | 1 | 1 | | | 0 | 0 | | | 2 | 1 | | | 0 | 0 | | | 0 | 0 |
| 56 | 2 | 1 | | | 1 | 0 | | | | | | | | | | | | |
| 57 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | | | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | | | 0 | 0 |
| 58 | 2 | 1 | | | 2 | 1 | | | 1 | 0 | | | 0 | 0 | | | 0 | 0 |
| 59 | 1 | 1 | | | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 2 | | | | 2 | 1 | 1 | | |
| 60 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 | | | | | | | | | | | | |
| 61 | 1 | 1 | | | | | | | 1 | 1 | | | | | | | 0 | 0 |
| 62 | 1 | 1 | | | 1 | 1 | 2 | 2 | 0 | 0 | | | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| 63 | 1 | 0 | | | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| 64 | 1 | 1 | | | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | | 0 | 0 | 3 | 1 | | |
| 65 | 1 | 1 | | | 1 | 1 | 2 | 1 | 0 | 2 | | | 0 | 2 | | 0 | | |
| 66 | 1 | 1 | | | 1 | 0 | | | | | | | | | | | | |
| 67 | 1 | 1 | | | 1 | 1 | | | 1 | 0 | | | 0 | 0 | | | 0 | 0 |
| 68 | 1 | 1 | | | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 69 | 1 | 1 | | | 1 | 1 | | | 1 | 0 | | | 0 | 0 | | | 0 | 0 |
| 70 | 1 | 1 | | | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 71 | 2 | 1 | | | | | | | 1 | 1 | | | | | | | 1 | 1 |
| 72 | 2 | 1 | | | 1 | 1 | | | 2 | 1 | | | 1 | 1 | | | 0 | 0 |
| 73 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | | | | | | | | | | | | |
| 74 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 75 | | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 76 | 1 | 1 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | | | |
| 77 | 1 | 2 | | | 2 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 78 | 2 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 79 | 1 | | 1 | 1 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 80 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 81 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 82 | | | | | | | | | | | | | | | 2 | 0 | | |
| 83 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 0 | | |
| 84 | 2 | 1 | | | 0 | 0 | 1 | 1 | | | | | | | | | | |
| 85 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 | | | | | | | 0 | 0 | | |
| 86 | 1 | 1 | | | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 87 | 1 | 1 | | | 1 | 2 | 0 | 1 | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|---|---|---|---|---|---|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| 88 | 1 | 1 | | | 1 | 0 | | | | | | | | | | | | |
| 89 | 2 | 1 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | | | |

TZ: Tumorzellen

SZ: Stromazellen

DZ: Dysplasiezellen

EZ: Epithelzellen

Score 3: starke Reaktion; Score 2: mittelstarke Reaktion; Score 1: schwache Reaktion; Score 0: keine Reaktion

n. Epithel: normales Epithel; LK-Met.: LK-Metastase; tumorfr. LK: tumorfreier Lymphknoten

4.2.1. Immunhistochemische Analyse

Bei 84 Fällen wurde die MMP-1-Expression in den Primärtumoren immunhistochemisch ermittelt. In 19 Fällen konnten auch Lymphknotenmetastasen, in 37 Fällen angrenzendes dysplastisches Plattenepithel und in 67 Fällen angrenzendes normales Plattenepithel untersucht werden. Die mikroskopische Auswertung erfolgte getrennt für die Tumorzellen, dysplastischen Epithelzellen und Plattenepithelzellen sowie für die jeweils angrenzenden Stromazellen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Immunhistochemischer Nachweis von MMP-1 in Plattenepithelkarzinomen, LK-Metastasen und angrenzendem normalen/dysplastischen Plattenepithel

| Immunhisto- chem. Reaktion | Plattenepithel | | LK-Met. | | Plattenepithel- | | normales | |
|-------------------------------|----------------|----|---------|----|-----------------|----|----------------|----|
| | -karzinom | | | | dysplasie | | Plattenepithel | |
| Score | TZ | SZ | TZ | SZ | DZ | SZ | PEZ | SZ |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 28 | 15 | 3 | 2 | 9 | 4 | 11 | 5 |
| 1 | 52 | 64 | 10 | 11 | 24 | 26 | 46 | 41 |
| 0 | 4 | 5 | 6 | 6 | 4 | 7 | 10 | 21 |
| Total | 84 | 84 | 19 | 19 | 37 | 37 | 67 | 67 |

TZ: Tumorzellen

SZ: Stromazellen

DZ: Dysplasiezellen

PEZ: Plattenepithelzellen

Score 3: starke Reaktion; Score 2: mittelstarke Reaktion; Score 1: schwache Reaktion; Score 0: keine Reaktion

4.2.1.1. MMP-1-Expression in den Plattenepithelkarzinomen

In 80 von 84 Fällen (95%) war eine MMP-1-Expression in den Tumorzellen nachweisbar. Bei 52 Fällen (62%) wurde MMP-1 schwach und bei 28 Fällen (33%) mittelstark exprimiert. Bei vier Fällen (5%) wurde keine MMP-1-Expression nachgewiesen. Eine starke Expression fand sich in keinem Fall.

Ferner wurde MMP-1 bei 79 von 84 Fällen (94%) in den peritumoralen Stromazellen exprimiert. 64 Fälle (76%) zeigten eine schwache, 15 Fälle (18%) eine mittelstarke und 5 Fälle (6%) keine Expression in den Stromazellen. Damit wurde MMP-1 in fast allen Fällen sowohl in den Tumorzellen als auch in den Stromazellen exprimiert (Tabelle 3).

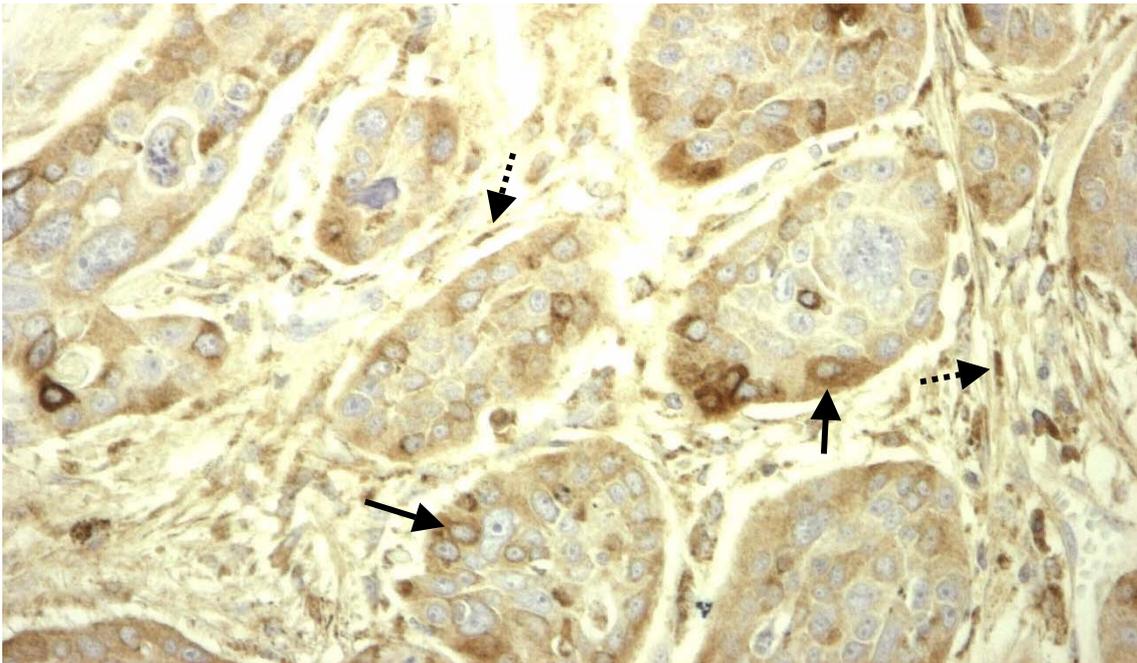


Abb. 1: MMP-1-Expression (IHC) eines Plattenepithelkarzinoms mit Markierung der Expression (braun) in Fibroblasten $\cdots \blacktriangleright$ und in Tumorzellen \blacktriangleright

Vergleich der MMP-1-Expression von Tumorzellen und Stromazellen:

76 Fälle (93%) mit einer Expression in den Stromazellen wiesen auch eine Expression in den Tumorzellen auf. Von diesen Fällen wiesen 51 Fälle (62%) jeweils dieselbe Stärke der Expression auf. In 21 Fällen (26%) fiel die Expression in den Tumorzellen um eine Score-Stufe stärker aus als in den

Stromazellen und in 8 Fällen (10%) um eine Score-Stufe geringer. Insgesamt war die Expression in den Stromazellen etwas schwächer als in den Tumorzellen (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Vergleich der MMP-1-Expression in den Tumor- und Stromazellen

| | | SZ | | |
|-----------|--------------|-----------|----|----|
| | Score | 0 | 1 | 2 |
| TZ | 0 | 2 | 2 | 0 |
| | 1 | 2 | 43 | 6 |
| | 2 | 0 | 19 | 8 |
| Total | 82 | 4 | 64 | 14 |

TZ: Tumorzellen

SZ: Stromazellen

Score 3: starke Reaktion; Score 2: mittelstarke Reaktion; Score 1: schwache Reaktion; Score 0: keine Reaktion

Exakter Wert nach Fisher: $p = 0,009$

Vergleich der MMP-1-Expression im Karzinom, in der angrenzenden tumorfreien Schleimhaut sowie in der Schleimhaut mit Dysplasien:

Bei 21 Fällen (33%) wurde in den Tumorzellen eine stärkere Expression nachgewiesen als in den Epithelzellen der normalen Schleimhaut. Ebenso wurde MMP-1 bei etwa einem Drittel der Fälle in den Tumorzellen stärker exprimiert als in den dysplastischen Epithelzellen.

In allen Fällen, bei denen eine Expression in den Dysplasiezellen (33 Fälle) bzw. Epithelzellen (54 Fälle) nachweisbar war, wurde ebenfalls eine Expression in den Tumorzellen nachgewiesen. Dagegen wurde in einigen Fällen eine Expression in den Karzinomzellen aber keine Expression in den dysplastischen Epithelzellen (3 Fälle) bzw. normalen Epithelzellen (7 Fälle) nachgewiesen (Tabelle 3.2). Für den Vergleich konnten nur die Fälle herangezogen werden, bei denen in den jeweiligen Geweben eine Expression (Score: 2, 1 oder 0) nachgewiesen wurde (Tabelle 2.2).

Tabelle 3.2: Immunhistochemischer Nachweis der MMP-1-Expression im Karzinom sowie in der angrenzenden tumorfreien Schleimhaut und der Schleimhaut mit Dysplasien

| | | tumorfreie Schleimhaut | | | Schleimhaut mit Dysplasien | | |
|----------|-------|------------------------|-------|-----|----------------------------|-------|-----|
| | Score | 0 | 1 | 2 | 0 | 1 | 2 |
| Karzinom | 0 | 2/3 | 0/7 | 0/1 | 1/2 | 0/0 | 0/0 |
| | 1 | 5/16 | 29/32 | 6/1 | 3/4 | 13/22 | 4/2 |
| | 2 | 2/2 | 14/5 | 5/3 | 0/1 | 10/4 | 6/1 |

(erste Zahl: Anzahl der Fälle, bei denen epithelial differenzierte Zellen verglichen wurden; zweite Zahl: Anzahl der Fälle, bei denen Stromazellen verglichen wurden)

MMP-1-Expression und pT-Stadium

Auch wenn die Stärke der MMP-1-Expression in den Tumorzellen mit dem pT-Stadium nicht signifikant korrelierte, konnte dennoch eine Tendenz gezeigt werden. In den fortgeschritteneren Tumoren (pT2/pT3) wurde eine etwas stärkere MMP-1-Expression nachgewiesen als in den kleineren Tumoren (pT1). So gab es in der Gruppe der pT2- oder pT3-Tumoren prozentual etwas mehr Fälle mit mittlerer bzw. starker Expression von MMP-1 (15 Fälle, 36%) als in der Gruppe der pT1-Tumoren (9 Fälle, 28%) (Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: pT-Stadium und MMP-1-Expression in den Tumorzellen

| | MMP-1- Score, TZ | |
|----------------|-------------------------|----------|
| | 0 oder 1 | 2 oder 3 |
| pT1 | 23 | 9 |
| pT2 od. pT3 | 27 | 15 |
| Total=74 | 50 | 24 |

TZ: Tumorzellen

Score 3: starke Reaktion; Score 2: mittelstarke Reaktion; Score 1: schwache Reaktion; Score 0: keine Reaktion

Zwischen der MMP-1-Expression in den peritumoralen Stromazellen und dem pT-Stadium konnte hingegen kein Zusammenhang gezeigt werden. In der

Gruppe der pT2- oder pT3-Tumoren gab es prozentual etwa genau so viele Fälle mit mittlerer bzw. starker Expression wie in der Gruppe der pT1-Tumoren. Hier wurde MMP-1 unabhängig von der Tumorgroße in den Stromazellen exprimiert (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: pT-Stadium und MMP-1-Expression in den Stromazellen

| | MMP-1- Score, SZ | |
|----------------|-------------------------|----------|
| | 0 oder 1 | 2 oder 3 |
| pT1 | 27 | 5 |
| pT2 od. pT3 | 33 | 7 |
| Total=72 | 60 | 12 |

SZ: Stromazellen

Score 3: starke Reaktion; Score 2: mittelstarke Reaktion; Score 1: schwache Reaktion; Score 0: keine Reaktion

MMP-1-Expression und Differenzierungsgrad

Es fand sich keine Abhängigkeit zwischen der MMP-1-Expression und dem Differenzierungsgrad (Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5: Differenzierungsgrad und MMP-1-Expression in den Tumorzellen

| | MMP-1- Score, TZ | |
|---------------|-------------------------|----------|
| | 0 oder 1 | 2 oder 3 |
| G1 | 7 | 4 |
| G2 oder G3 | 49 | 24 |
| Total=84 | 56 | 28 |

TZ: Tumorzellen

Score 3: starke Reaktion; Score 2: mittelstarke Reaktion; Score 1: schwache Reaktion; Score 0: keine Reaktion

MMP-1-Expression und N-Stadium

Eine signifikante Beziehung zwischen dem N-Stadium und der MMP-1-Expression konnte nicht nachgewiesen werden.

4.2.1.2. MMP-1-Expression in den Lymphknotenmetastasen

19 LK-Metastasen wurden hinsichtlich der MMP-1-Expression untersucht. In den Tumorzellen wiesen 10 Fälle (53%) eine schwache, 3 Fälle (16%) eine mittelstarke und 6 Fälle (32%) keine Expression auf.

In den Stromazellen nahe der LK-Metastasen wurde bei 11 Fällen (58%) eine schwache, bei 2 Fällen (11%) eine mittelstarke und bei 6 Fällen (32%) keine Expression ermittelt. Bei mehr als der Hälfte der Fälle konnte sowohl in den Tumorzellen als auch in den Stromazellen eine Expression aufgezeigt werden. Zwischen der Expression in den Tumorzellen und der Expression in den Stromazellen gab es nahezu keinen Unterschied (Tabelle 3). Ferner wurde MMP-1 hier schwächer exprimiert als in den Plattenepithelkarzinomen.

4.2.1.3. MMP-1-Expression in der angrenzenden Schleimhaut mit Dysplasien

Bei 37 Fällen wurde die angrenzende Schleimhaut mit den dysplastischen Plattenepithelzellen untersucht. 24 Fälle (65%) wiesen in den dysplastischen Epithelzellen eine schwache, 9 Fälle (24%) eine mittelstarke und 4 Fälle (11%) keine MMP-1-Expression auf. In den subepithelialen Stromazellen konnte in 26 Fällen (70%) eine schwache, in 4 Fällen (11%) eine mittelstarke und in 7 Fällen (19%) keine Expression ermittelt werden (Tabelle 3).

Im Vergleich zu den Plattenepithelkarzinomen wurde MMP-1 in den dysplastischen Epithelzellen und in den subepithelialen Stromazellen etwas schwächer exprimiert.

Vergleich der dysplastischen Plattenepithelzellen mit den Stromazellen:

30 Fälle (81%) mit einer Expression in den Stromazellen wiesen auch eine Expression in den dysplastischen Epithelzellen auf, wobei bei 21 Fällen (57%) dieselbe Stärke der Expression zu verzeichnen war.

In 10 Fällen (27%) fiel die Expression in den dysplastischen Epithelzellen um eine Score-Stufe stärker aus als in den Stromazellen, in 2 Fällen (5%) um eine Stufe niedriger. Insgesamt wurde MMP-1 in den dysplastischen Epithelzellen etwas stärker exprimiert als in den umliegenden Stromazellen (Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6: MMP-1-Expression in den dysplastischen Epithelzellen und Stromazellen

| | | SZ | | |
|-----------|--------------|-----------|----|---|
| | Score | 0 | 1 | 2 |
| DZ | 0 | 4 | 0 | 0 |
| | 1 | 3 | 19 | 2 |
| | 2 | 0 | 7 | 2 |
| Total | 37 | 7 | 26 | 4 |

SZ: Stromazellen

DZ: Dysplasiezellen

Score 3: starke Reaktion; Score 2: mittelstarke Reaktion; Score 1: schwache Reaktion; Score 0: keine Reaktion

Exakter Wert nach Fisher: $p = 0,002$

4.2.1.4. MMP-1-Expression in der angrenzenden tumorfreien Schleimhaut

In 67 Fällen fand sich in Nachbarschaft der Karzinome normales Plattenepithel. 46 Fälle (69%) wiesen in den Plattenepithelzellen eine schwache, 11 Fälle (16%) eine mittelstarke und 10 Fälle (15%) keine MMP-1-Expression auf. In den subepithelialen Stromazellen wurden in 41 Fällen (61%) eine schwache, in 5 Fällen (7%) eine mittelstarke und in 21 Fällen (31%) keine Expression ermittelt (Tabelle 3).

Im Vergleich zu den Tumorzellen bzw. Stromazellen der Plattenepitheldysplasien wurde MMP-1 hier etwas schwächer exprimiert.

Vergleich der MMP-1-Expression von Plattenepithelzellen und Stromazellen:

46 Fälle (69%) mit einer Expression in den Stromazellen wiesen auch eine Expression in den Plattenepithelzellen auf, wobei bei 36 Fällen (54%) dieselbe Stärke der Expression zu verzeichnen war.

Bei 19 Fällen (28%) fiel die Expression in den Plattenepithelzellen um eine Score-Stufe stärker aus als in den Stromazellen, bei 2 Fällen (3%) um eine Stufe niedriger. Damit fiel die Expression in den Stromazellen geringer aus als in den Plattenepithelzellen (Tabelle 3.7).

Tabelle 3.7: MMP-1-Expression in den Epithelzellen und Stromazellen

| | | SZ | | |
|-------|-------|----|----|---|
| | Score | 0 | 1 | 2 |
| PEZ | 0 | 10 | 0 | 0 |
| | 1 | 11 | 33 | 2 |
| | 2 | 0 | 8 | 3 |
| Total | 67 | 21 | 41 | 5 |

SZ: Stromazellen

PEZ: Plattenepithelzellen

Score 3: starke Reaktion; Score 2: mittelstarke Reaktion; Score 1: schwache Reaktion; Score 0: keine Reaktion

Exakter Wert nach Fisher: $p = 0,000$

4.2.1.5. Zusammenfassende Analyse der MMP-1-Expression in den untersuchten Geweben

Bei vergleichender Betrachtung der MMP-1-Expression in der Sequenz „angrenzende tumorfreie Schleimhaut - Schleimhaut mit Dysplasie - Karzinom“ wurde bei 23 Fällen (33%) in den epithelial differenzierten Zellen eine zunehmende, bei 41 Fällen (59%) eine gleich bleibende und bei 6 Fällen (9%) eine abfallende MMP-1-Expression nachgewiesen. In den korrespondierenden Stromazellen konnte eine vergleichbare Expression nachgewiesen werden. Betrachtet man für die epithelial differenzierten Zellen nur die Sequenz „angrenzende tumorfreie Schleimhaut - Schleimhaut mit Dysplasie“ lag bei 11 Fällen (33%) ein Anstieg der Expression vor und in der Sequenz „Schleimhaut mit Dysplasie - Karzinom“ bei 12 Fällen (34%). Ein Anstieg der Expression konnte demnach nicht häufiger von der Dysplasie zum Karzinom als von der normalen Schleimhaut zur Dysplasie nachgewiesen werden (Tabelle 3.8).

Bei den Fällen, wo tumorfreie Lymphknoten vorlagen, wurden mehr Fälle (7 Fälle, 54%) mit ansteigender Expression (angrenzende tumorfreie Schleimhaut - Schleimhaut mit Dysplasie - Karzinom) nachgewiesen als bei den Fällen, wo LK-Metastasen vorlagen (4 Fälle, 25%). Bei den Fällen mit LK-Metastasen wurde MMP-1 bei 3 Fällen in den Epithelzellen und bei 3 Fällen in den Tumorzellen mit mittlerer Stärke exprimiert. Dagegen wurde MMP-1 bei den Fällen ohne LK-Metastasen nur bei einem Fall in den Epithelzellen, dafür aber

bei 7 Fällen in den Tumorzellen mit mittelstarker Expression nachgewiesen. Dadurch kommt der stärkere Expressionsanstieg bei den Fällen ohne LK-Metastase zustande (Tabelle 3.8). Insgesamt konnten für den Vergleich nur die Fälle herangezogen werden, bei denen in den jeweiligen Geweben eine Expression (Score: 3, 2, 1 oder 0) nachgewiesen wurde (Tabelle 2.2).

Tabelle 3.8: Vergleich der MMP-1-Expression (IHC) in der Sequenz „angrenzende tumorfreie Schleimhaut (SH) - Schleimhaut mit Dysplasie (Dyspl.) - Karzinom“ sowie „Karzinom – LK-Metastasen“

| Protein/Methode | Sequenz | N Total | Expression | | |
|---------------------|---|------------|------------|----------------|---------|
| | | | steigend | gleichbleibend | sinkend |
| MMP-1 IHC | SH - Dyspl. – Karz. (alle Fälle) | 70/68 | 23/23 | 41/43 | 6/2 |
| | SH - Dysplasie | 33/33 | 11/8 | 17/22 | 5/3 |
| | Dysplasie - Karzinom | 35/34 | 12/8 | 19/24 | 4/2 |
| | SH - Dyspl. - Karzinom (Fälle mit LK-Met.) | 16/16 | 4/4 | 9/10 | 3/2 |
| | SH - Dyspl. - Karzinom (Fälle mit tumorfr.LKs) | 13/12 | 7/4 | 6/8 | 0/0 |
| | Karzinom - LK-Met. | 19/17 | 3/2 | 9/8 | 7/7 |

N: Anzahl der Fälle mit Veränderung der Expression (mindestens eine Score-Stufe; erste Zahl: epithelial differenzierte Zellen, zweite Zahl: Stromazellen)

4.2.2. RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierung

Bei 26 Fällen wurde die MMP-1-Expression in den Primärtumoren mithilfe nicht-radioaktiver *in situ*-Hybridisierung ermittelt. In 13 Fällen konnten auch Lymphnotenmetastasen, in 15 Fällen tumorfreie Lymphknoten, in 11 Fällen angrenzendes dysplastisches Plattenepithel und in 23 Fällen angrenzendes normales Plattenepithel untersucht werden. Die mikroskopische Auswertung erfolgte getrennt für die Tumorzellen, dysplastischen Epithelzellen und Plattenepithelzellen sowie für die jeweils angrenzenden Stromazellen (Tabelle 4).

Tabelle 4: Nachweis von MMP-1-Transkripten in Plattenepithelkarzinomen, Lymphknoten/Metastasen und angrenzendem normalen/dysplastischen Plattenepithel mithilfe der *in situ*-Hybridisierung

| ISH Score | Plattenepithelkarzinom | | LK-Met. | | Tumorfreie Lymphknoten | | Plattenepitheldysplasie | | normales Plattenepithel | |
|--------------|------------------------|----|---------|----|------------------------|----|-------------------------|----|-------------------------|----|
| | TZ | SZ | TZ | SZ | TZ | SZ | DZ | SZ | PEZ | SZ |
| 3 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 7 | 4 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 |
| 1 | 14 | 13 | 3 | 4 | 1 | 1 | 3 | 1 | 2 | 2 |
| 0 | 5 | 9 | 7 | 9 | 14 | 13 | 7 | 10 | 20 | 19 |
| Total | 26 | 26 | 13 | 13 | 15 | 14 | 11 | 11 | 22 | 23 |

TZ: Tumorzellen

SZ: Stromazellen

DZ: Dysplasiezellen

PEZ: Plattenepithelzellen

Score 3: starke Signale; Score 2: mittelstarke Signale; Score 1: schwache Signale; Score 0: keine Signale

4.2.2.1. MMP-1-Transkripte in den Plattenepithelkarzinomen

In 21 von 26 Fällen (81%) waren MMP-1-Transkripte in den Tumorzellen nachweisbar. Bei 14 Fällen (54%) wurde MMP-1 schwach, bei 7 Fällen (27%) mittelstark und bei 5 Fällen (19%) nicht exprimiert. In den peritumoralen Stromazellen wurden in 13 Fällen (50%) schwache, in 4 Fällen (15%) mittelstarke und in 9 Fällen (35%) keine Transkripte ermittelt (Tabelle 4).

Im Vergleich mit der Expression, die mit der immunhistochemischen Methode ermittelt wurde, wurde MMP-1 hier etwas schwächer exprimiert.

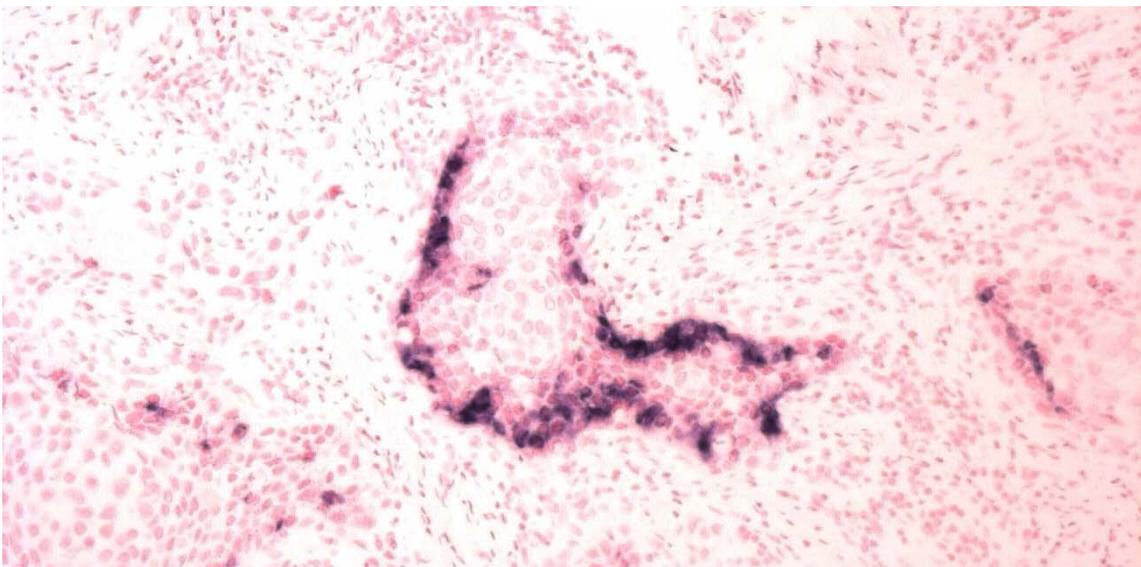


Abb. 2: MMP-1-mRNA-Expression (ISH) eines Plattenepithelkarzinoms mit Signalen (lila) über peripheren Karzinomzellen eines Tumorzellnests

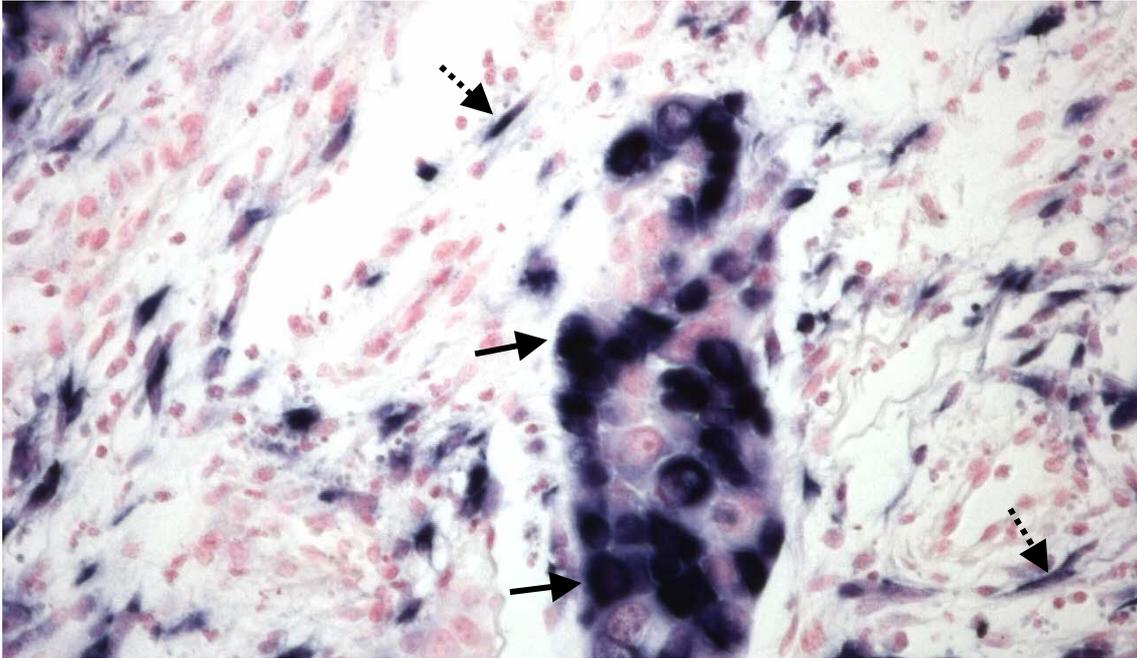


Abb. 3: MMP-1-mRNA-Expression (ISH) eines Plattenepithelkarzinoms mit Signalen (blau) über Fibroblasten $\cdots \rightarrow$ und Tumorzellen \rightarrow

Vergleich der Fälle mit LK-Metastasen und der Fälle mit tumorfreien Lymphknoten

Bei den Fällen mit LK-Metastasen konnte im peritumorösen Stroma von 4 Fällen (36%) eine mittelstarke Expression nachgewiesen werden. Dagegen wurde bei den Fällen mit tumorfreien Lymphknoten bei keinem der 15 Fälle in den peritumorösen Stromazellen eine mittelstarke Expression ermittelt (Tabelle 2.2).

Vergleich der MMP-1-Signale in Tumorzellen und Stromazellen:

Tabelle 4.1: MMP-1-Expression in den Tumorzellen und Stromazellen

| | | SZ | | |
|-------|-------|----|----|---|
| | Score | 0 | 1 | 2 |
| TZ | 0 | 4 | 0 | 1 |
| | 1 | 5 | 8 | 1 |
| | 2 | 0 | 5 | 2 |
| Total | 26 | 9 | 13 | 4 |

TZ: Tumorzellen

SZ: Stromazellen

Score 3: starke Signale; Score 2: mittelstarke Signale; Score 1: schwache Signale; Score 0: keine Signale

Exakter Wert nach Fisher: $p = 0,012$

16 Fälle (62%) mit einer Expression in den Stromazellen wiesen auch eine Expression in den Tumorzellen auf, wobei bei 10 Fällen (38%) dieselbe Stärke der Expression zu verzeichnen war.

In 10 Fällen (38%) fiel die Expression in den Tumorzellen um eine Score-Stufe stärker aus als in den Stromazellen, bei einem Fall (4%) um eine Stufe schwächer. Damit fiel die Expression in den Stromazellen geringer aus als in den Tumorzellen (Tabelle 4.1).

Vergleich der MMP-1-Transkripte im Karzinom, in der angrenzenden tumorfreien Schleimhaut sowie in der Schleimhaut mit Dysplasien:

Bei 16 Fällen (76%) wurde in den Tumorzellen eine stärkere Expression nachgewiesen als in den normalen Epithelzellen. Im Vergleich mit den dysplastischen Epithelzellen wurde in den Tumorzellen bei 6 Fällen (55%) eine stärkere Expression nachgewiesen.

In den normalen Epithelzellen wurde nur bei 2 Fällen (10%) und in den dysplastischen Epithelzellen wurde nur bei 4 Fällen (36%) überhaupt eine Expression nachgewiesen. In den Tumorzellen wurde MMP-1 dagegen in den meisten Fällen (25 Fälle, 78%) exprimiert (Tabelle 4.2). Für den Vergleich konnten nur die Fälle herangezogen werden, bei denen in den jeweiligen Geweben eine Expression (Score:2, 1 oder 0) nachgewiesen wurde (Tabelle 2.2).

Tabelle 4.2: MMP-1-mRNA-Nachweis im Karzinom sowie in der angrenzenden tumorfreien Schleimhaut und der Schleimhaut mit Dysplasien

| | | tumorfreie Schleimhaut | | | Schleimhaut mit Dysplasien | | |
|----------|---|------------------------|-----|-----|----------------------------|-----|-----|
| Score | | 0 | 1 | 2 | 0 | 1 | 2 |
| Karzinom | 0 | 5/8 | 0/0 | 0/0 | 2/3 | 0/0 | 0/0 |
| | 1 | 10/8 | 0/2 | 0/0 | 4/6 | 2/1 | 0/0 |
| | 2 | 4/2 | 2/0 | 0/2 | 1/1 | 1/0 | 1/0 |

(erste Zahl: Anzahl der Fälle, bei denen epithelial differenzierte Zellen verglichen wurden; zweite Zahl: Anzahl der Fälle, bei denen Stromazellen verglichen wurden)

Vergleich der MMP-1-Transkripte in den Tumorzellen (ISH) mit der Emmprin-Expression in den Tumorzellen (IHC):

In den MMP-1 positiven Fällen wurde Emmprin in den Tumorzellen bei 50% der Fälle (6 Fälle) stark, bei 5 Fällen (42%) mittelstark und bei einem Fall (8%) schwach exprimiert (Tabelle 4.3). Bei den MMP-1 negativen Fällen wurde Emmprin nur in einem Fall (14%) stark und bei 6 Fällen (86%) mittelstark exprimiert. Eine starke Emmprin-Expression wurde also deutlich häufiger bei den MMP-1 positiven Fällen nachgewiesen.

Tabelle 4.3: Vergleich der MMP-1-Transkripte in den Tumorzellen mit der Emmprin-Expression in den Tumorzellen

| | | Emmprin, TZ, IHC | | |
|--------------|-------|------------------|---|---|
| | Score | 1 | 2 | 3 |
| MMP-1 | 0 | 0 | 6 | 1 |
| TZ | 1 | 1 | 1 | 3 |
| ISH | 2 | 0 | 4 | 3 |

TZ: Tumorzellen

Mit der *in situ*-Hybridisierung konnten keine signifikanten Zusammenhänge der MMP-1-Expression mit dem pT-Stadium, dem Differenzierungsgrad und dem N-Stadium aufgezeigt werden.

4.2.2.2. MMP-1-Transkripte in den Lymphknotenmetastasen

In 6 von 13 Fällen (46%) waren MMP-1-Transkripte in den Tumorzellen der LK-Metastasen nachweisbar. Bei 3 Fällen (23%) wurde MMP-1 schwach, bei 2 Fällen (15%) mittelstark, bei einem Fall (8%) stark und bei 7 Fällen (54%) nicht exprimiert. In den angrenzenden Stromazellen wurden von 13 Fällen bei 4 Fällen (31%) schwache und bei 9 Fällen (69%) keine Transkripte ermittelt (Tabelle 4).

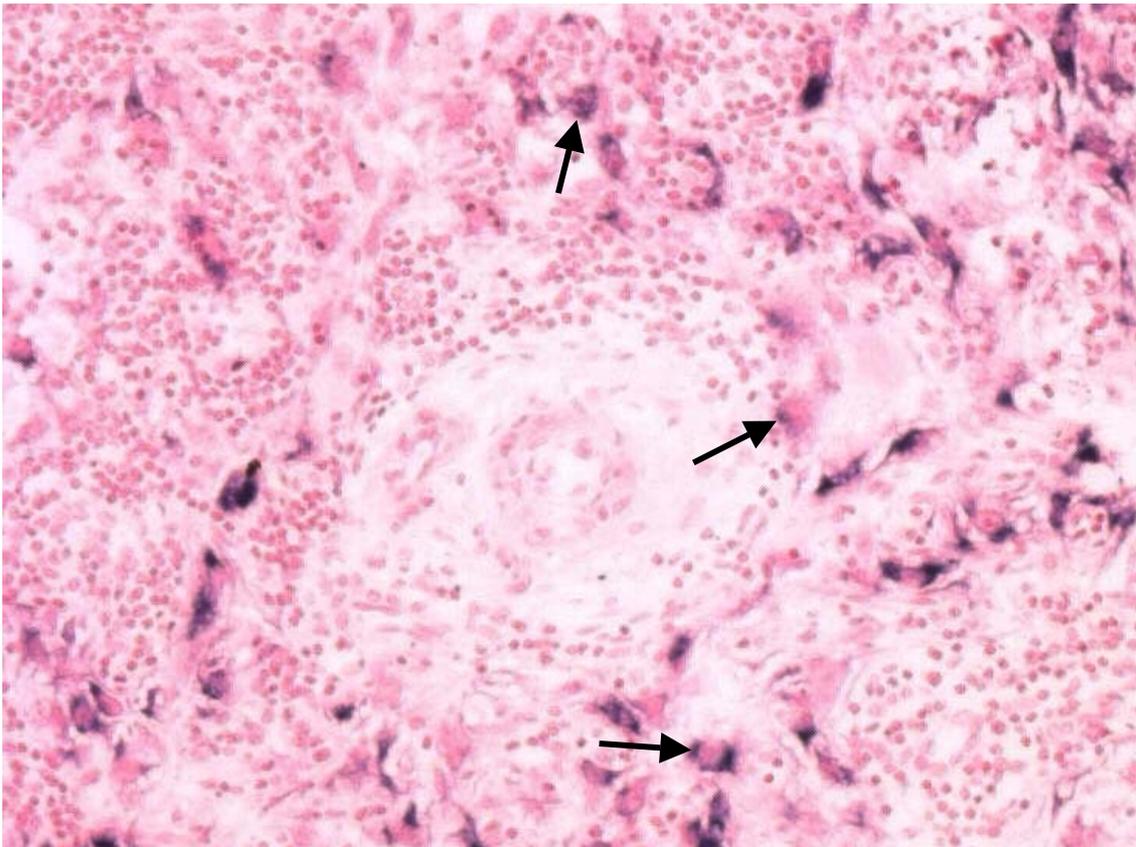


Abb. 4: MMP-1-mRNA-Expression (ISH) einer LK-Metastase mit Signalen (lila) über Tumorzellen →

Damit wurde MMP-1 bei verhältnismäßig weniger Fällen in den LK-Metastasen als in den Plattenepithelkarzinomen exprimiert. Im Einzelfall wurden jedoch stärkere Signale in den Metastasen gegenüber den Plattenepithelkarzinomen nachgewiesen.

Im Vergleich mit der Expression, die mit der immunhistochemischen Methode ermittelt wurde, wurde MMP-1 hier in verhältnismäßig weniger LK-Metastasen exprimiert, im Einzelfall jedoch mit einer stärkeren Expression.

4.2.2.3. MMP-1-Transkripte in den tumorfreien Lymphknoten

In einem von 15 Fällen (7%) waren MMP-1-Transkripte in den tumorfreien Lymphknoten nachweisbar. Bei den übrigen 14 Fällen (93%) wurden keine Transkripte ermittelt. In den angrenzenden Stromazellen wurde von 14 Fällen nur bei einem Fall (7%) eine schwache Expression festgestellt (Tabelle 4).

Die tumorfreien Lymphknoten wiesen also praktisch keine Signale auf.

4.2.2.4. MMP-1-Transkripte in der angrenzenden Schleimhaut mit Dysplasien

In 4 von 11 Fällen (36%) waren MMP-1-Transkripte in den dysplastischen Plattenepithelzellen nachweisbar. Bei 3 Fällen (27%) wurde MMP-1 schwach, bei einem Fall (9%) mittelstark und bei 7 Fällen (64%) nicht exprimiert. In den subepithelialen Stromazellen wurden von 11 Fällen nur bei einem Fall (9%) schwache Transkripte ermittelt (Tabelle 4).

Die Expression war deutlich geringer im Vergleich zu den Plattenepithelkarzinomen. Außerdem wurde hier mit der *in situ*-Hybridisierung eine deutlich schwächere Expression ermittelt als mit der immunhistochemischen Methode.

4.2.2.5. MMP-1-Transkripte in der angrenzenden tumorfreien Schleimhaut

In 2 von 22 Fällen (9%) waren MMP-1-Transkripte in den Plattenepithelzellen der normalen Plattenepithelien nachweisbar. In den beiden Fällen wurde MMP-1 schwach exprimiert. In den subepithelialen Stromazellen wurden von 23 Fällen in 2 Fällen (9%) schwache und in weiteren 2 Fällen (9%) mittelstarke Transkripte ermittelt (Tabelle 4).

Die Expression war deutlich geringer im Vergleich zu den Plattenepitheldysplasien. Außerdem wurde hier mit der *in situ*-Hybridisierung eine deutlich schwächere Expression ermittelt als mit der immunhistochemischen Methode.

Vergleich der Fälle mit LK-Metastasen und der Fälle mit tumorfreien Lymphknoten

Im Stroma des normalen Epithels wurde bei 3 Fällen (30%) (Fälle mit LK-Metastasen) eine mittelstarke bzw. schwache Expression nachgewiesen. Unter den Fällen ohne LK-Metastasen wurde nur bei einem Fall (8%) im Stroma des normalen Epithels eine Expression ermittelt (Tabelle 2.2).

4.2.2.6. Zusammenfassende Analyse der MMP-1-Transkripte in den untersuchten Geweben

Bei vergleichender Betrachtung der MMP-1-Expression in der Sequenz „angrenzende tumorfreie Schleimhaut – Schleimhaut mit Dysplasie – Karzinom“ wurde bei 18 Fällen (78%) in den epithelial differenzierten Zellen und in den

korrespondierenden Stromazellen bei 10 Fällen (42%) eine zunehmende MMP-1-Expression nachgewiesen. Damit wurde ein deutlicher Unterschied zwischen dem Expressionsanstieg, der mit der IHC und dem, der hier mit der ISH ermittelt wurde, nachgewiesen. Mit der IHC wurde nur bei 33% der Fälle ein Anstieg der Expression nachgewiesen. Betrachtet man für die epithelial differenzierten Zellen nur die Sequenz „angrenzende tumorfreie Schleimhaut – Schleimhaut mit Dysplasie“ lag bei 4 Fällen (36%) ein Anstieg der Expression vor und in der Sequenz „Schleimhaut mit Dysplasie – Karzinom“ bei 6 Fällen (55%) (Tabelle 4.4).

Tabelle 4.4: Vergleich der MMP-1-Transkripte in der Sequenz „angrenzende tumorfreie Schleimhaut (SH) - Schleimhaut mit Dysplasie (Dyspl.) - Karzinom“ sowie „Karzinom – LK-Metastasen“ und „Karzinom – tumorfreie Lymphknoten“

| Protein/Methode | Sequenz | N Total | Expression | | |
|---------------------|---|------------|------------|----------------|---------|
| | | | steigend | gleichbleibend | sinkend |
| MMP-1 ISH | SH - Dyspl. - Karzinom (alle Fälle) | 23/24 | 18/10 | 5/14 | 0/0 |
| | SH - Dysplasie | 11/11 | 4/0 | 7/11 | 0/0 |
| | Dysplasie - Karzinom | 11/11 | 6/7 | 5/4 | 0/0 |
| | SH - Dyspl. - Karzinom (Fälle mit LK-Met.) | 9/10 | 5/4 | 4/6 | 0/0 |
| | SH - Dyspl. - Karzinom (Fälle mit tumorfr.LKs) | 13/13 | 12/6 | 1/7 | 0/0 |
| | Karzinom - LK-Met. | 9/10 | 2/0 | 3/5 | 4/5 |
| | Karzinom - tumorfr. LKs | 14/14 | 0/0 | 1/6 | 13/8 |

N: Anzahl der Fälle mit Veränderung der Expression (mindestens eine Score-Stufe; erste Zahl: epithelial differenzierte Zellen, zweite Zahl: Stromazellen)

Eine Steigerung der Expression von MMP-1-mRNA findet hier also häufiger von der Dysplasie zum Karzinom als von der angrenzenden tumorfreien Schleimhaut zur Dysplasie statt. Mit der IHC konnte dieser Unterschied nicht nachgewiesen werden (s.o.). Bei den Fällen, wo tumorfreie Lymphknoten vorlagen, wurden mehr Fälle (12 Fälle, 92%) mit ansteigender Expression (angrenzende tumorfreie Schleimhaut – Schleimhaut mit Dysplasie - Karzinom) nachgewiesen als bei den Fällen, wo LK-Metastasen vorlagen (5 Fälle, 56%) (Tabelle 4.4). Ein Grund dafür war, dass es bei den Fällen mit tumorfreien Lymphknoten 9 Fälle (69%) gab, bei denen die Expression von 0 auf 1 (Score) anstieg. Ein anderer Grund war, dass es unter den Fällen mit LK-Metastasen 4

Fälle (44%) gab, bei denen die epithelial differenzierten Zellen keine Expression aufwiesen (Tabelle 4.4). Insgesamt konnten für den Vergleich nur die Fälle herangezogen werden, bei denen in den jeweiligen Geweben eine Expression (Score: 3, 2, 1 oder 0) nachgewiesen wurde (Tabelle 2.2).

4.3. Expression der Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP-2, Gelatinase A)

Die MMP-2-Expression wurde mit der *in situ*-Hybridisierung nachgewiesen. Die Ergebnisse der untersuchten Fälle sind in Tabelle 4.5 ersichtlich. In den Fällen, wo kein Ergebnis notiert ist, fehlte das jeweilige Gewebe im Schnitt (Zellverlust) bzw. wurde das Gewebe hinsichtlich dieses Proteins nicht untersucht.

Tabelle 4.5: MMP-2-Expression

| Ifd. Nr. | MMP-2; ISH | | | | | | | | | | | | Ifd. Nr. | Karzin. | | Dyspl. | | n.Epith. | | LK-Met. | | tumorfr. LK | | | |
|----------|------------|----|--------|----|----------|----|---------|----|-------------|----|----|----|----------|---------|----|--------|----|----------|----|---------|----|-------------|----|---|---|
| | Karzin. | | Dyspl. | | n.Epith. | | LK-Met. | | tumorfr. LK | | TZ | SZ | | DZ | SZ | EZ | SZ | TZ | SZ | TZ | SZ | | | | |
| | TZ | SZ | DZ | SZ | EZ | SZ | TZ | SZ | TZ | SZ | TZ | SZ | | DZ | SZ | EZ | SZ | TZ | SZ | TZ | SZ | | | | |
| 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 46 | | | |
| 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 47 | | |
| 3 | | | | | | | | | | | | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | 48 | 0 | 1 |
| 4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 49 | | |
| 5 | | | | | | | | | | | | 1 | 1 | | | 0 | 0 | | | | | | 50 | 1 | 1 |
| 6 | | | | | | | | | | | | 1 | 1 | | | 0 | 0 | | | | | | 51 | 1 | 1 |
| 7 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 52 | | |
| 8 | | | | | | | | | | | | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | | | | | | 53 | 0 | 2 |
| 9 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 54 | | |
| 10 | | | | | | | | | | | | 0 | 2 | | | 0 | 1 | | | | | | 55 | 0 | 2 |
| 11 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 56 | | |
| 12 | | | | | | | | | | | | 1 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | | | | | | 57 | 1 | 2 |
| 13 | 1 | 2 | | | | | 1 | 2 | | | | 0 | 1 | | | 0 | 0 | | | | | | 58 | 0 | 1 |
| 14 | | | | | | | | | | | | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | | | | 59 | 0 | 3 |
| 15 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 60 | | |
| 16 | | | | | | | | | | | | 0 | 2 | | | | | | | | | | 61 | 0 | 2 |
| 17 | | | | | | | | | | | | 0 | 2 | | 0 | 2 | 1 | 2 | | | | | 62 | 0 | 2 |
| 18 | | | | | | | | | | | | 0 | 2 | | 0 | 0 | | 1 | | | | | 63 | 0 | 2 |
| 19 | | | | | | | | | | | | 0 | 2 | | 0 | 0 | 0 | 2 | | | | | 64 | 0 | 2 |
| 20 | | | | | | | | | | | | 0 | 3 | | 0 | 2 | 0 | 2 | | | | | 65 | 0 | 3 |
| 21 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 66 | | |
| 22 | | | | | | | | | | | | 0 | 2 | | 0 | 2 | | | | | | | 67 | 0 | 2 |
| 23 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 68 | | |
| 24 | | | | | | | | | | | | 0 | 1 | | 0 | 0 | | | | | | | 69 | 0 | 1 |
| 25 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 70 | | |
| 26 | | | | | | | | | | | | 0 | 2 | | | | | | | | | | 71 | 0 | 2 |
| 27 | | | | | | | | | | | | | 2 | | 0 | 1 | | | | | | | 72 | | 2 |
| 28 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 73 | | |
| 29 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 74 | | |
| 30 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 75 | | |
| 31 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 76 | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|---|---|---|---|---|---|---|---|--|
| 32 | | | | | | | | | | | 77 | | | | | | | | | |
| 33 | | | | | | | | | | | 78 | | | | | | | | | |
| 34 | | | | | | | | | | | 79 | | | | | | | | | |
| 35 | | | | | | | | | | | 80 | | | | | | | | | |
| 36 | 0 | 0 | | | | | 0 | 0 | | | 81 | | | | | | | | | |
| 37 | | | | | | | 0 | 0 | | | 82 | | | | | | 2 | 2 | | |
| 38 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 2 | | | 83 | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | |
| 39 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | | | 0 | 0 | 84 | | | | | | | | | |
| 40 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | 85 | | | | | | 0 | 0 | | |
| 41 | | | | | | | | | | | 86 | | | | | | | | | |
| 42 | | | | | | | | | | | 87 | | | | | | | | | |
| 43 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | 0 | 0 | 88 | | | | | | | | | |
| 44 | 0 | 1 | | | 0 | 1 | 0 | 0 | | | 89 | | | | | | | | | |
| 45 | 1 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | | | 0 | 0 | | | | | | | | | | |

TZ: Tumorzellen

SZ: Stromazellen

DZ: Dysplasiezellen

EZ: Epithelzellen

Score 3: starke Reaktion; Score 2: mittelstarke Reaktion; Score 1: schwache Reaktion; Score 0: keine Reaktion

n. Epithel: normales Epithel; LK-Met.: LK-Metastase; tumorfr. LK: tumorfreier Lymphknoten

4.3.1. RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierung

Tabelle 5: Nachweis von MMP-2-Transkripten in Plattenepithelkarzinomen, Lymphknoten/Metastasen und angrenzendem normalen/dysplastischen Plattenepithel mithilfe der *in situ*-Hybridisierung

| ISH Score | Plattenepithel- karzinom | | LK-Met. | | Tumorfrie Lymphknoten | | Plattenepithel- dysplasie | | normales Plattenepithel | |
|--------------|-----------------------------|----|---------|----|--------------------------|----|------------------------------|----|----------------------------|----|
| | TZ | SZ | TZ | SZ | TZ | SZ | DZ | SZ | PEZ | SZ |
| 3 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 1 | 16 | 2 | 8 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| 1 | 6 | 7 | 2 | 1 | 0 | 0 | 1 | 4 | 0 | 5 |
| 0 | 18 | 1 | 9 | 5 | 15 | 14 | 9 | 6 | 22 | 13 |
| Total | 25 | 26 | 13 | 14 | 15 | 15 | 10 | 10 | 22 | 22 |

TZ: Tumorzellen

SZ: Stromazellen

DZ: Dysplasiezellen

PEZ: Plattenepithelzellen

Score 3: starke Signale; Score 2: mittelstarke Signale; Score 1: schwache Signale; Score 0: keine Signale

Bei 26 Fällen wurde die MMP-2-Expression in den Primärtumoren mithilfe nicht-radioaktiver *in situ*-Hybridisierung ermittelt. In 14 Fällen konnten auch Lymphknotenmetastasen, in 15 Fällen tumorfreie Lymphknoten, in 10 Fällen angrenzendes dysplastisches Plattenepithel und in 22 Fällen angrenzendes normales Plattenepithel untersucht werden. Die mikroskopische Auswertung erfolgte getrennt für die Tumorzellen, dysplastischen Epithelzellen und Plattenepithelzellen sowie für die jeweils angrenzenden Stromazellen (Tabelle 5).

4.3.1.1. MMP-2-Transkripte in den Plattenepithelkarzinomen

In 7 von 25 Fällen (28%) waren MMP-2-Transkripte in den Tumorzellen nachweisbar. Bei 6 Fällen (24%) wurde MMP-2 schwach, bei einem Fall (4%) mittelstark und bei 18 Fällen (72%) nicht exprimiert. In den peritumoralen Stromazellen wurden von 26 Fällen bei 7 Fällen (27%) schwache, bei 16 Fällen (62%) mittelstarke, bei 2 Fällen (8%) starke und bei einem Fall (4%) keine Transkripte ermittelt (Tabelle 5). Die Expression war in den Stromazellen deutlich stärker als in den Tumorzellen.

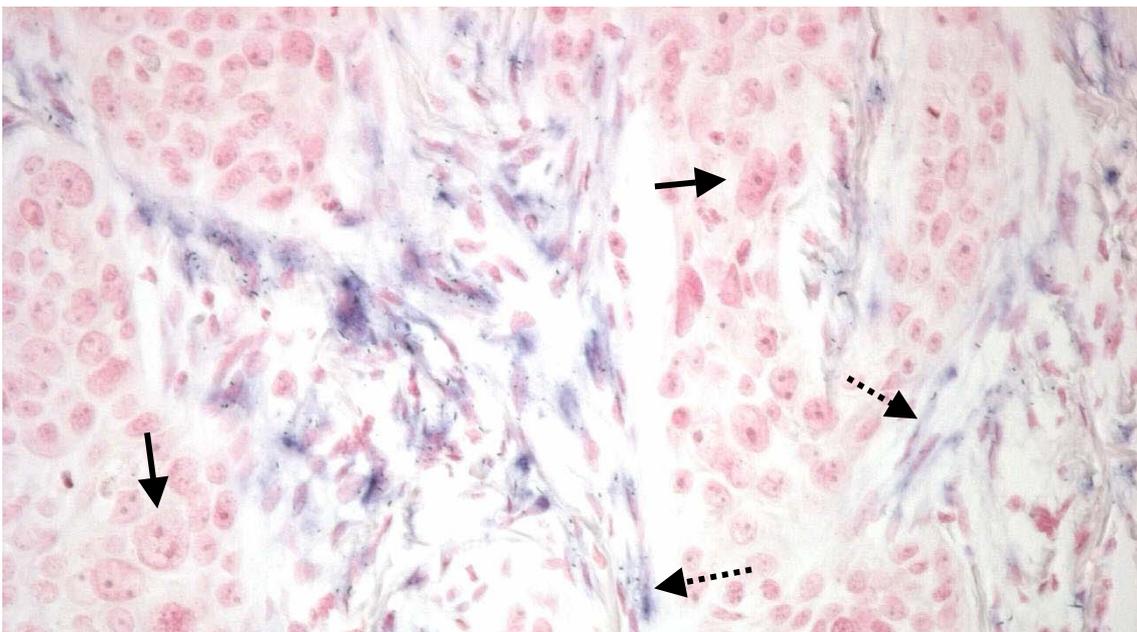


Abb. 5: MMP-2-mRNA-Expression (ISH) eines Plattenepithelkarzinoms mit Signalen (blau) über Fibroblasten $\cdots \rightarrow$
Keine Signale über den Tumorzellen \rightarrow

Vergleich der MMP-2-Expression im peritumorösen Stroma und im Stroma der LK-Metastasen

Bei den Fällen (8 Fälle, 73%), bei denen im peritumorösen Stroma eine mittlere bzw. starke Expression nachgewiesen wurde, wurde im Stroma der jeweiligen LK-Metastase eine schwache bzw. mittelstarke Expression ermittelt. Dagegen wurde in den Fällen (3 Fälle, 27%), wo keine bzw. schwache Transkripte im peritumorösen Stroma nachgewiesen wurden, im Stroma der LK-Metastasen auch keine Expression nachgewiesen (Tabelle 4.5).

Vergleich der MMP-2-Transkripte im Karzinom, in der angrenzenden tumorfreien Schleimhaut sowie in der Schleimhaut mit Dysplasien:

Bei 19 Fällen (86%) wurde im Stroma des Karzinoms eine höhere Expression nachgewiesen als im Stroma der normalen Schleimhaut. Im Vergleich mit dem Stroma des dysplastischen Epithels wurde im Stroma des Karzinoms bei allen 10 Fällen eine stärkere Expression nachgewiesen.

Nur bei 10 Fällen (31%) konnte überhaupt eine Expression in den Tumorzellen nachgewiesen werden. Unter diesen Fällen wies ein Fall auch eine Expression in den dysplastischen Epithelzellen auf (Tabelle 6). Für den Vergleich konnten nur die Fälle herangezogen werden, bei denen in den jeweiligen Geweben eine Expression (Score: 3, 2, 1 oder 0) nachgewiesen wurde (Tabelle 4.5).

Tabelle 6: MMP-2-mRNA-Nachweis im Karzinom sowie in der angrenzenden tumorfreien Schleimhaut und der Schleimhaut mit Dysplasien

| | | Tumorfreie Schleimhaut (SH) | | | SH mit Dysplasien | |
|----------|-------|-----------------------------|-----|-----|-------------------|-----|
| | Score | 0 | 1 | 2 | 0 | 1 |
| Karzinom | 0 | 15/0 | 0/0 | 0/0 | 6/0 | 0/0 |
| | 1 | 5/6 | 0/1 | 0/0 | 2/2 | 1/0 |
| | 2 | 1/7 | 0/4 | 0/2 | 1/3 | 0/4 |
| | 3 | 0/0 | 0/0 | 0/2 | 0/1 | 0/0 |

(erste Zahl: Anzahl der Fälle, bei denen epithelial differenzierte Zellen verglichen wurden; zweite Zahl: Anzahl der Fälle, bei denen Stromazellen verglichen wurden)

Bei den Expressionswerten konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des pT-Stadiums, des Differenzierungsgrads und des N-Stadiums ermittelt werden.

4.3.1.2. MMP-2-Transkripte in den Lymphknotenmetastasen

In 4 von 13 Fällen (31%) waren MMP-2-Transkripte in den Tumorzellen der LK-Metastasen nachweisbar. Bei 2 Fällen (15%) wurde MMP-2 schwach, bei weiteren 2 Fällen (15%) mittelstark und bei 9 Fällen (69%) nicht exprimiert. In den angrenzenden Stromazellen wurden von 14 Fällen bei einem Fall (7%) schwache, bei 8 Fällen (57%) mittelstarke und bei 5 Fällen (36%) keine Transkripte ermittelt (Tabelle 5). Wie bei den Plattenepithelkarzinomen wurde MMP-2 auch hier bei den LK-Metastasen in den angrenzenden Stromazellen wesentlich stärker exprimiert als in den Tumorzellen.

Vergleich der MMP-2-Signale im Stroma der LK-Metastasen und im Stroma der Plattenepithelkarzinome:

Die Stärke der MMP-2-Expression in den LK-Metastasen verhielt sich bei dieser Patientengruppe analog zur MMP-2-Expression in den Plattenepithelkarzinomen. Bei den Fällen, wo die Expression im Stroma nahe dem Karzinom mittelstark bzw. stark ausfiel, war die Expression im Stroma der LK-Metastasen in dieser Patientengruppe auch mittelstark bzw. stark (Tabelle 7).

Tabelle 7: MMP-2-Expression in den peritumorösen Stromazellen und in den Stromazellen nahe den LK-Metastasen

| | | LK-Metastase, SZ | |
|-------|----------|------------------|----------|
| | Score | 0 oder 1 | 2 oder 3 |
| SZ | 0 oder 1 | 3 | 0 |
| | 2 oder 3 | 1 | 7 |
| Total | 11 | 4 | 7 |

SZ: Stromazellen

Score 3: starke Signale; Score 2: mittelstarke Signale; Score 1: schwache Signale; Score 0: keine Signale

Exakter Wert nach Fisher: $p = 0,024$

4.3.1.3. MMP-2-Transkripte in den tumorfreien Lymphknoten

In keinem Fall (von 15 Fällen) konnten MMP-2-Transkripte in den tumorfreien Lymphknoten nachgewiesen werden. In den angrenzenden Stromazellen wurde von 15 Fällen nur bei einem Fall (7%) eine mittelstarke Expression festgestellt. Die tumorfreien Lymphknoten wiesen also praktisch keine Signale auf (Tabelle 5).

4.3.1.4. MMP-2-Transkripte in der angrenzenden Schleimhaut mit Dysplasien

In einem von 10 Fällen (10%) waren MMP-2-Transkripte in den dysplastischen Plattenepithelzellen nachweisbar. In den übrigen 9 Fällen (90%) wurde keine Expression festgestellt. In den subepithelialen Stromazellen wurden von 10 Fällen bei 4 Fällen (40%) schwache Transkripte ermittelt (Tabelle 5). Auch hier wurde in den subepithelialen Stromazellen eine stärkere Expression nachgewiesen als in den Tumorzellen. Im Vergleich zu den Plattenepithelkarzinomen fiel die Expression deutlich schwächer aus.

4.3.1.5. MMP-2-Transkripte in der angrenzenden tumorfreien Schleimhaut

In keinem von 22 Fällen waren MMP-2-Transkripte in den Plattenepithelzellen der normalen Plattenepithelien nachweisbar. In den subepithelialen Stromazellen wurden von 22 Fällen bei 5 Fällen (23%) schwache und bei 4 Fällen (18%) mittelstarke Transkripte ermittelt (Tabelle 5). Die Expression in den subepithelialen Stromazellen fiel wesentlich stärker aus als in den Plattenepithelzellen, wo keine Expression ausgemacht wurde. Im Vergleich zu den Plattenepitheldysplasien wiesen die Stromazellen nahe der tumorfreien Schleimhaut sogar eine etwas stärkere Expression auf.

Vergleich der Fälle mit LK-Metastasen und der Fälle mit tumorfreien Lymphknoten

Bei den Fällen mit LK-Metastasen konnte im Stroma des normalen Epithels von 3 Fällen (33%) eine mittelstarke Expression nachgewiesen werden. Unter den Fällen mit tumorfreien Lymphknoten gab es dagegen nur einen Fall (8%), bei dem eine mittlere Expression im Stroma des normalen Epithels ermittelt wurde (Tabelle 4.5).

4.3.1.6. Zusammenfassende Analyse der MMP-2-Expression in den untersuchten Geweben

Bei vergleichender Betrachtung der MMP-2-Expression in der Sequenz „angrenzende tumorfreie Schleimhaut - Schleimhaut mit Dysplasie - Karzinom“ wurde bei 20 Fällen (91%) in den Stromazellen eine zunehmende MMP-2-Expression nachgewiesen. In den Epithel-, Dysplasie- und Karzinomzellen wurde nur in 6 Fällen (29%) eine ansteigende und in den übrigen 15 Fällen (71%) eine gleichbleibende Expression festgestellt. Betrachtet man für die Stromazellen nur die Sequenz „angrenzende tumorfreie Schleimhaut - Schleimhaut mit Dysplasie“ lag bei 5 Fällen (45%) ein Anstieg der Expression vor und in der Sequenz „Schleimhaut mit Dysplasie - Karzinom“ bei 10 Fällen (100%). Ein Anstieg der Expression in den Stromazellen konnte demnach häufiger von der Dysplasie zum Karzinom als von der normalen Schleimhaut zur Dysplasie nachgewiesen werden.

Im Vergleich der Fälle mit und ohne LK-Metastasen gab es keine nennenswerten Unterschiede (Tabelle 8). Insgesamt konnten für den Vergleich nur die Fälle herangezogen werden, bei denen in den jeweiligen Geweben eine Expression (Score: 3, 2, 1 oder 0) nachgewiesen wurde (Tabelle 4.5).

Tabelle 8: Vergleich der MMP-2-Transkripte in der Sequenz „angrenzende tumorfreie Schleimhaut (SH) - Schleimhaut mit Dysplasie (Dyspl.) - Karzinom“ sowie „Karzinom – LK-Metastasen“ und „Karzinom – tumorfreie Lymphknoten“

| Protein/Methode | Sequenz | N Total | Expression | | |
|---------------------|---|------------|------------|----------------|---------|
| | | | steigend | gleichbleibend | sinkend |
| MMP-2 ISH | SH - Dyspl. - Karzinom (alle Fälle) | 21/22 | 6/20 | 15/2 | 0/0 |
| | SH - Dysplasie | 11/11 | 1/5 | 10/3 | 0/3 |
| | Dysplasie - Karzinom | 10/10 | 3/10 | 7/0 | 0/0 |
| | SH - Dyspl. - Karzinom (Fälle mit LK-Met.) | 9/9 | 2/7 | 7/2 | 0/0 |
| | SH - Dyspl. - Karzinom (Fälle mit tumorfr.LKs) | 12/13 | 4/12 | 8/1 | 0/0 |
| | Karzinom - LK-Met. | 9/10 | 1/0 | 6/4 | 2/6 |
| | Karzinom - tumorfr. LKs | 14/15 | 0/0 | 10/1 | 4/14 |

N: Anzahl der Fälle mit Veränderung der Expression (mindestens eine Score-Stufe; erste Zahl: epithelial differenzierte Zellen, zweite Zahl: Stromazellen)

4.4. Expression der Matrix-Metalloproteinase-3 (MMP-3, Stromelysin-1)

RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierung

Bei 32 Fällen wurde die MMP-3-Expression in den Primärtumoren mithilfe nicht-radioaktiver *in situ*-Hybridisierung ermittelt. In 25 Fällen konnten auch Lymphknotenmetastasen, in 10 Fällen angrenzendes dysplastisches Plattenepithel und in 22 Fällen angrenzendes normales Plattenepithel untersucht werden. Die mikroskopische Auswertung erfolgte getrennt für die Tumorzellen, dysplastischen Epithelzellen und Plattenepithelzellen sowie für die jeweils angrenzenden Stromazellen (Tabelle 9).

Tabelle 9: Nachweis von MMP-3-Transkripten in Plattenepithelkarzinomen, Lymphknoten/Metastasen und angrenzendem normalen/dysplastischen Plattenepithel mithilfe der *in situ*-Hybridisierung

| ISH Score | Plattenepithel- karzinom | | Lymphknoten | | Plattenepithel- dysplasie | | normales Plattenepithel | |
|--------------|-----------------------------|----|-------------|----|------------------------------|----|----------------------------|----|
| | TZ | SZ | TZ | SZ | DZ | SZ | PEZ | SZ |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 29 | 30 | 25 | 25 | 10 | 10 | 22 | 22 |
| Total | 32 | 32 | 25 | 25 | 10 | 10 | 22 | 22 |

TZ: Tumorzellen

SZ: Stromazellen

DZ: Dysplasiezellen

PEZ: Plattenepithelzellen

Score 3: starke Signale; Score 2: mittelstarke Signale; Score 1: schwache Signale; Score 0: keine Signale

Bei 32 Patienten wurden die Plattenepithelkarzinome hinsichtlich der MMP-3-Expression untersucht. Nur in drei Fällen (9%) kam es in den Tumorzellen der Plattenepithelkarzinome zu einer schwachen Expression. In den peritumoralen Stromazellen wurde bei 2 Fällen (6%) eine schwache Expression nachgewiesen. In allen übrigen Fällen konnten keine Signale ermittelt werden.

Sowohl in den LK-Metastasen als auch in den tumorfreen Lymphknoten sowie in den Plattenepitheldysplasien und den normalen Plattenepithelien wurden keine Transkripte von MMP-3 nachgewiesen (Tabelle 9).

4.5. Expression von Emmprin (extracellular matrix metalloproteinase inducer, CD 147)

Die Emmprin-Expression wurde immunhistochemisch nachgewiesen. Die Ergebnisse der 89 untersuchten Fälle sind in Tabelle 10 ersichtlich. In den Fällen, wo kein Ergebnis notiert ist, fehlte das jeweilige Gewebe im Schnitt (Zellverlust) bzw. wurde das Gewebe hinsichtlich dieses Proteins nicht untersucht.

Tabelle 10: Emmprin-Expression

| | | Emmprin; IHC | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|--|--------------|----|----|----|-----------|----|----|----|-----------|----|----|----|--------|----|----|----|----|
| | | Karzinom | | | | Dysplasie | | | | n.Epithel | | | | LK-Met | | | | |
| lfd. Nr | | TZ | SZ | DZ | SZ | EZ | SZ | TZ | SZ | lfd. Nr | TZ | SZ | DZ | SZ | EZ | SZ | TZ | SZ |
| 1 | | 2 | 1 | | | | | 3 | 2 | 46 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | | |
| 2 | | 2 | 1 | | | 2 | 1 | | | 47 | 2 | 2 | | | 2 | 1 | | |
| 3 | | 3 | 2 | | | | | | | 48 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 | | |
| 4 | | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | | | 49 | 2 | 1 | | | 2 | 1 | | |
| 5 | | 2 | 2 | | | 1 | 0 | | | 50 | 3 | 1 | | | 2 | 1 | | |
| 6 | | 2 | 1 | | | 3 | 1 | | | 51 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | | |
| 7 | | 2 | 1 | | | 2 | 1 | | | 52 | 2 | 1 | 1 | 0 | 2 | 0 | | |
| 8 | | 2 | 1 | 3 | 2 | 2 | 1 | | | 53 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | | |
| 9 | | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 0 | | | 54 | | | | | 2 | 1 | | |
| 10 | | 3 | 2 | 3 | 2 | | | | | 55 | 3 | 1 | | | 2 | 1 | | |
| 11 | | 1 | 2 | | | | | | | 56 | 2 | 1 | | | 2 | 1 | | |
| 12 | | 2 | 1 | | | 2 | 1 | | | 57 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| 13 | | 3 | 2 | | | | | | | 58 | 2 | 1 | | | 1 | 1 | | |
| 14 | | 2 | 2 | | | 1 | 1 | | | 59 | 2 | 2 | | | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 15 | | 2 | 2 | | | | | | | 60 | 1 | 1 | 3 | 1 | 2 | 1 | | |
| 16 | | 2 | 1 | 2 | 2 | 3 | 2 | | | 61 | 3 | 1 | | | | | | |
| 17 | | 2 | 1 | 2 | 1 | 3 | 1 | | | 62 | 3 | 1 | | | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 18 | | 2 | 2 | | | | | | | 63 | 2 | 2 | | | 2 | 2 | 2 | 1 |
| 19 | | 2 | 2 | | | 2 | 1 | | | 64 | 2 | 1 | | | 2 | 2 | 3 | 1 |
| 20 | | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | | | 65 | 2 | 1 | | | 2 | 1 | 2 | 1 |
| 21 | | 2 | 1 | 3 | 1 | 2 | 2 | | | 66 | 1 | 1 | | | 1 | 1 | | |
| 22 | | | | | | | | 2 | 1 | 67 | 2 | 1 | | | 0 | 1 | | |
| 23 | | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | | | 68 | 3 | 2 | | | 2 | 2 | | |
| 24 | | 3 | 2 | | | 2 | 1 | | | 69 | 2 | 1 | | | 1 | 0 | | |
| 25 | | 3 | 2 | | | | | | | 70 | 2 | 1 | | | 2 | 1 | | |
| 26 | | 2 | 2 | | | | | | | 71 | 2 | 2 | | | | | | |
| 27 | | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 0 | | | 72 | 2 | 1 | | | 2 | 2 | | |
| 28 | | 1 | 1 | | | 3 | 2 | | | 73 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | | |
| 29 | | 0 | 2 | | | | | | | 74 | 2 | 2 | 3 | 1 | 2 | 1 | | |
| 30 | | 2 | 2 | | | 2 | 1 | 1 | 1 | 75 | | 1 | | | | | | |
| 31 | | 2 | 1 | | | | | | | 76 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|---|---|---|---|---|---|---|---|----|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 32 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 3 | 1 | 77 | 2 | 1 | | | 2 | 2 | | |
| 33 | 2 | 1 | 1 | 1 | | | | | 78 | 2 | 1 | | | | | | |
| 34 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 79 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | | |
| 35 | 2 | 1 | 3 | 1 | 2 | 1 | | | 80 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | | |
| 36 | 2 | 1 | | | 2 | 1 | 2 | | 81 | | | | | | | | |
| 37 | 2 | 1 | | | | | 2 | 1 | 82 | | | | | | | | |
| 38 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 83 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 |
| 39 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | | | 84 | 2 | 2 | | | 1 | 1 | 2 | 1 |
| 40 | 3 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 85 | 2 | 2 | | | 1 | 1 | 2 | 1 |
| 41 | 3 | 2 | 3 | 2 | 2 | 1 | | | 86 | 2 | 1 | | | 2 | 1 | | |
| 42 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | | | 87 | 3 | 2 | | | 2 | 2 | 0 | 2 |
| 43 | 2 | 1 | 3 | 2 | 2 | 1 | | | 88 | 3 | 2 | | | 3 | 2 | | |
| 44 | 2 | 2 | | | 2 | 1 | 2 | | 89 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | | |
| 45 | | | | | | | | | | | | | | | | | |

TZ: Tumorzellen

SZ: Stromazellen

DZ: Dysplasiezellen

EZ: Epithelzellen

Score 3: starke Reaktion; Score 2: mittelstarke Reaktion; Score 1: schwache Reaktion; Score 0: keine Reaktion

n. Epithel: normales Epithel; LK-Met.: LK-Metastase; tumorfr. LK: tumorfreier Lymphknoten

4.5.1. Immunhistochemische Analyse

Tabelle 11: Immunhistochemischer Nachweis von Emmprin in Plattenepithelkarzinomen, LK-Metastasen und angrenzendem normalen/dysplastischen Plattenepithel

| Immunhistochem. Reaktion | Plattenepithelkarzinom | | LK-Met. | | Plattenepithel-dysplasie | | normales Plattenepithel | |
|--------------------------|------------------------|-----------|-----------|-----------|--------------------------|-----------|-------------------------|-----------|
| | TZ | SZ | TZ | SZ | DZ | SZ | PEZ | SZ |
| Score 3 | 16 | 0 | 3 | 0 | 8 | 0 | 5 | 0 |
| 2 | 60 | 34 | 12 | 4 | 20 | 17 | 50 | 17 |
| 1 | 6 | 50 | 3 | 13 | 6 | 16 | 12 | 44 |
| 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 7 |
| Total | 83 | 84 | 19 | 17 | 34 | 34 | 68 | 68 |

TZ: Tumorzellen

SZ: Stromazellen

DZ: Dysplasiezellen

PEZ: Plattenepithelzellen

Score 3: starke Reaktion; Score 2: mittelstarke Reaktion; Score 1: schwache Reaktion; Score 0: keine Reaktion

Bei 84 Fällen wurde die Emmprin-Expression in den Primärtumoren immunhistochemisch ermittelt. In 19 Fällen konnten auch Lymphknotenmetastasen, in 34 Fällen angrenzendes dysplastisches Plattenepithel und in 68 Fällen angrenzendes normales Plattenepithel untersucht werden. Die mikroskopische Auswertung erfolgte getrennt für die Tumorzellen, dysplastischen Epithelzellen und Plattenepithelzellen sowie für die jeweils angrenzenden Stromazellen (Tabelle 11).

4.5.1.1. Emmprin-Expression in den Plattenepithelkarzinomen

In 82 von 83 Fällen (99%) war eine Emmprin-Expression in den Tumorzellen nachweisbar. Bei 6 Fällen (7%) wurde Emmprin schwach, bei 60 Fällen (72%) mittelstark und bei 16 Fällen (19%) stark exprimiert. Bei 1 Fall (1%) wurde keine Emmprin-Expression nachgewiesen. Ferner wurde Emmprin bei allen 84 untersuchten Fällen in den peritumoralen Stromazellen exprimiert. 50 Fälle (60%) hatten eine schwache und 34 Fälle (40%) eine mittelstarke Expression. Damit wurde Emmprin in fast allen Fällen sowohl in den Tumorzellen als auch in den Stromazellen exprimiert. Insgesamt war die Expression in den Stromazellen deutlich schwächer als in den Tumorzellen (Tabelle 11).

Vergleich der Emmprin-Expression im Karzinom, in der angrenzenden tumorfreien Schleimhaut sowie in der Schleimhaut mit Dysplasien:

Bei 20 Fällen (30%) wurde in den Tumorzellen eine stärkere Expression nachgewiesen als in den normalen Epithelzellen. Im Vergleich mit den dysplastischen Epithelzellen wurde bei 7 Fällen (21%) eine höhere Expression in den Tumorzellen nachgewiesen. Es gab nur einen Fall, bei dem in den normalen Epithelzellen keine Expression nachgewiesen wurde. Bei allen Fällen wurde sowohl in den Tumorzellen als auch in den Dysplasiezellen eine Expression nachgewiesen (Tabelle 12). Für den Vergleich konnten nur die Fälle herangezogen werden, bei denen in den jeweiligen Geweben eine Expression (Score: 3, 2, 1 oder 0) nachgewiesen wurde (Tabelle 10).

Tabelle 12: Immunhistochemischer Nachweis der Emmprin-Expression im Karzinom sowie in der angrenzenden tumorfreien Schleimhaut und der Schleimhaut mit Dysplasien

| | | tumorfreie Schleimhaut | | | | Schleimhaut mit Dysplasien | | |
|----------|-------|------------------------|------|------|-----|----------------------------|------|-----|
| | Score | 0 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| Karzinom | 1 | 0/6 | 3/27 | 1/10 | 1/0 | 2/13 | 0/9 | 1/0 |
| | 2 | 1/1 | 9/16 | 38/7 | 3/0 | 4/3 | 17/8 | 5/0 |
| | 3 | 0/0 | 0/0 | 10/0 | 1/0 | 0/0 | 3/0 | 2/0 |

(erste Zahl: Anzahl der Fälle, bei denen epithelial differenzierte Zellen verglichen wurden; zweite Zahl: Anzahl der Fälle, bei denen Stromazellen verglichen wurden)

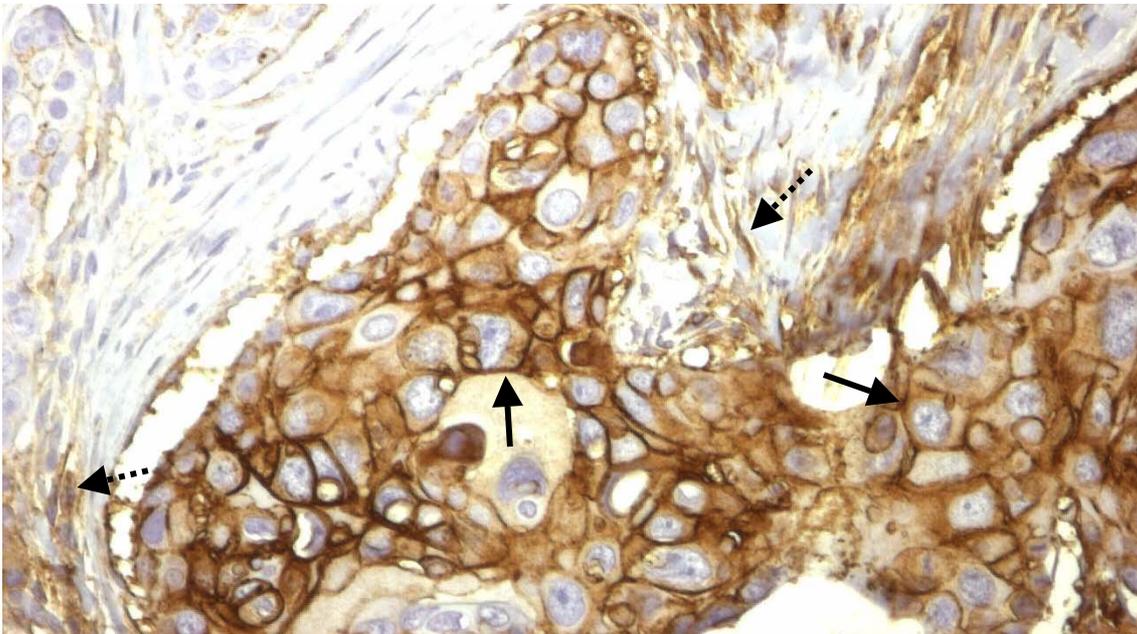


Abb. 6: Emmprin-Expression (IHC) eines Plattenepithelkarzinoms mit Markierung der Expression (braun) in Fibroblasten $\cdots\blacktriangleright$ und Tumorzellen (membranöse Reaktion) \blacktriangleright

Bei den Expressionswerten konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des pT-Stadiums, des Differenzierungsgrads und des N-Stadiums ermittelt werden.

4.5.1.2. Emmprin-Expression in den Lymphknotenmetastasen

In 18 von 19 Fällen (95%) war eine Emmprin-Expression in den Tumorzellen der LK-Metastasen nachweisbar. In den Tumorzellen wiesen 3 Fälle (16%) eine

schwache, 12 Fälle (63%) eine mittelstarke, 3 Fälle (16%) eine starke und 1 Fall (5%) keine Expression auf.

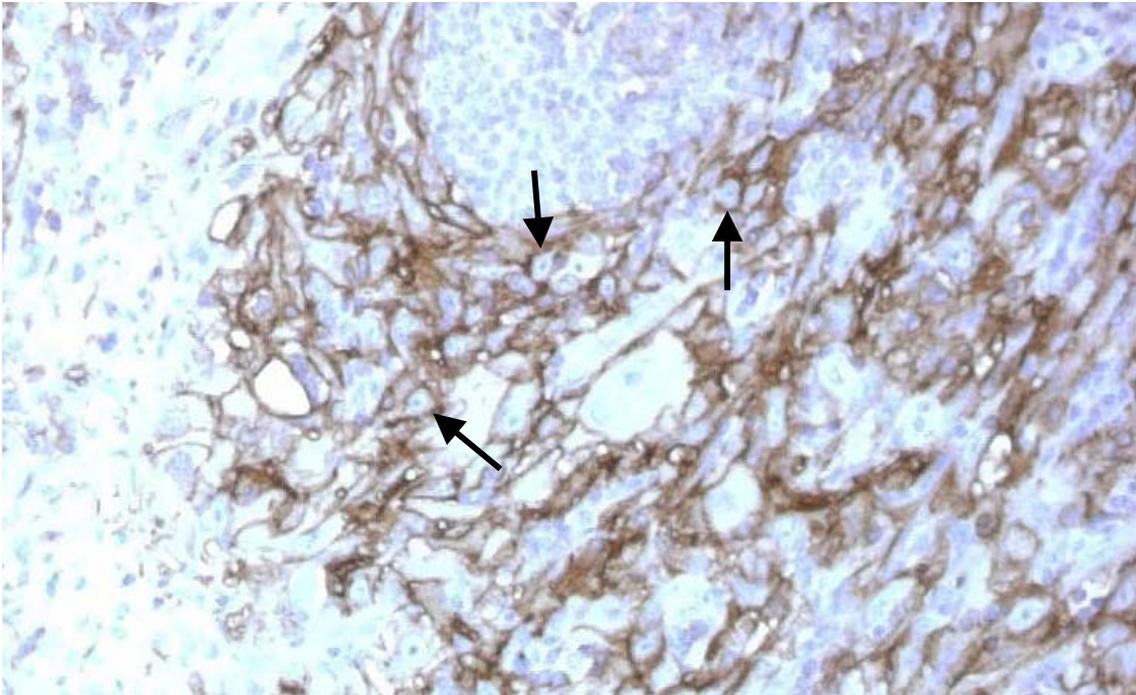


Abb. 7: Emmprin-Expression (IHC) einer LK-Metastase mit membranöser Expression (braun) in den Tumorzellen →

In den Stromazellen angrenzend an die LK-Metastasen wurde von 17 Fällen bei 13 Fällen (76%) eine schwache und bei 4 Fällen (24%) eine mittelstarke Expression ermittelt (Tabelle 11). Hier wurde Emmprin in den Tumorzellen auch wesentlich stärker exprimiert als in den umliegenden Stromazellen. Die Expression war außerdem in den LK-Metastasen schwächer als in den Plattenepithelkarzinomen.

4.5.1.3. Emmprin-Expression in der angrenzenden Schleimhaut mit Dysplasien

In allen Fällen (34) wurde Emmprin in den dysplastischen Plattenepithelzellen exprimiert: 6 Fälle (18%) wiesen in diesen Zellen eine schwache, 20 Fälle (59%) eine mittelstarke und 8 Fälle (24%) eine starke Emmprin-Expression auf. In den subepithelialen Stromazellen wurde von 34 untersuchten Fällen bei 33 Fällen eine Expression verzeichnet. Bei 16 Fällen (47%) wurde eine schwache, bei 17 Fällen (50%) eine mittelstarke und bei 1 Fall (3%) keine Expression ermittelt (Tabelle 11). Emmprin wurde also in den Stromazellen deutlich

schwächer exprimiert als in den dysplastischen Epithelzellen. Die Stärke der Expression war insgesamt vergleichbar mit der in den Plattenepithelkarzinomen.

4.5.1.4. Emmprin-Expression in der angrenzenden tumorfreien Schleimhaut

In 67 von 68 Fällen (99%) war eine Emmprin-Expression in den Plattenepithelzellen der tumorfreien Schleimhaut nachweisbar. 12 Fälle (18%) wiesen in den Plattenepithelzellen eine schwache, 50 Fälle (74%) eine mittelstarke, 5 Fälle (7%) eine starke und 1 Fall (1%) keine Emmprin-Expression auf. In den subepithelialen Stromazellen wurden von 68 Fällen in 44 Fällen (65%) eine schwache, in 17 Fällen (25%) eine mittelstarke und in 7 Fällen (10%) keine Expression ermittelt (Tabelle 11).

Damit fiel die Expression in den Stromazellen geringer aus als in den Plattenepithelzellen. Insgesamt war die Expression in der tumorfreien Schleimhaut geringer als in den Plattenepitheldysplasien.

Vergleich der Expression von Emmprin und MMP-1 im Stroma

Bei 47 Fällen (72%) waren sowohl die Expression von Emmprin als auch die von MMP-1 in den subepithelialen Stromazellen des normalen Plattenepithels schwach. Unter den Fällen, die eine mittelstarke bzw. starke Expression von Emmprin aufwiesen (17 Fälle), konnten 4 Fälle (24%) beobachtet werden, die auch eine mittelstarke bzw. starke Expression von MMP-1 aufwiesen. In der Gruppe der Fälle mit erhöhter Emmprin-Expression gab es also prozentual mehr Fälle mit erhöhter MMP-1-Expression als in der Gruppe mit schwacher Emmprin-Expression (Tabelle 13).

Tabelle 13: Expression von Emmprin und MMP-1 im Stroma

| | | MMP-1- Score, SZ | |
|--------------------------|----------|-------------------------|----------|
| | | 0 oder 1 | 2 oder 3 |
| Emmprin-Score, SZ | 0 oder 1 | 47 | 1 |
| | 2 oder 3 | 13 | 4 |
| Total | 65 | 60 | 5 |

SZ: Stromazellen

Score 3: starke Reaktion; Score 2: mittelstarke Reaktion; Score 1: schwache Reaktion; Score 0: keine Reaktion

Exakter Wert nach Fisher: $p = 0,015$

In den normalen Plattenepithelzellen konnte dagegen kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Emmprin- und der MMP-1-Expression nachgewiesen werden.

4.5.1.5. Zusammenfassende Analyse der Emmprin-Expression in den untersuchten Geweben

Bei vergleichender Betrachtung der Emmprin-Expression in der Sequenz „angrenzende tumorfreie Schleimhaut - Schleimhaut mit Dysplasie - Karzinom“ wurde bei 23 Fällen (34%) in den epithelial differenzierten Zellen und in den korrespondierenden Stromazellen bei 26 Fällen (38%) eine zunehmende Emmprin-Expression nachgewiesen. Betrachtet man für die epithelial differenzierten Zellen nur die Sequenz „angrenzende tumorfreie Schleimhaut - Schleimhaut mit Dysplasie“ lag bei 9 Fällen (28%) ein Anstieg der Expression vor und in der Sequenz „Schleimhaut mit Dysplasie - Karzinom“ bei 7 Fällen (21%).

Tabelle 14: Vergleich der Emmprin-Expression in der Sequenz „angrenzende tumorfreie Schleimhaut (SH) - Schleimhaut mit Dysplasie (Dyspl.) - Karzinom“ sowie „Karzinom – LK-Metastasen“

| Protein/Methode | Sequenz | N Total | Expression | | |
|-----------------------|---|------------|------------|----------------|---------|
| | | | steigend | gleichbleibend | sinkend |
| Emmprin IHC | SH - Dyspl. - Karzinom (alle Fälle) | 68/68 | 23/26 | 42/34 | 3/8 |
| | SH - Dysplasie | 32/32 | 9/13 | 20/16 | 3/3 |
| | Dysplasie - Karzinom | 34/34 | 7/3 | 20/20 | 7/11 |
| | SH - Dyspl. - Karzinom (Fälle mit LK-Met.) | 17/17 | 8/6 | 9/8 | 0/3 |
| | SH - Dyspl. - Karzinom (Fälle mit tumorfr.LKs) | 12/12 | 5/2 | 7/7 | 0/3 |
| | Karzinom - LK-Met. | 18/17 | 2/2 | 8/9 | 8/6 |

N: Anzahl der Fälle mit Veränderung der Expression (mindestens eine Score-Stufe; erste Zahl: epithelial differenzierte Zellen, zweite Zahl: Stromazellen)

Im Vergleich der Fälle mit und ohne LK-Metastasen gab es keine nennenswerten Unterschiede (Tabelle 14). Insgesamt konnten für den Vergleich nur die Fälle herangezogen werden, bei denen in den jeweiligen Geweben eine Expression (Score: 3, 2, 1 oder 0) nachgewiesen wurde (Tabelle 10).

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der Matrix-Metalloproteinasen-1, -2 und -3 (MMP-1, -2, -3) sowie die Expression von Emmprin (extracellular matrix metalloproteinase inducer) in oralen/oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen, in der benachbarten Schleimhaut mit und ohne Dysplasien sowie in LK-Metastasen und tumorfreien Lymphknoten untersucht.

Es wurden an Paraffinschnitten zum mRNA-Nachweis mittels *in situ*-Hybridisierung (ISH) DIG-markierte MMP-1, -2 und -3 –Sonden eingesetzt und für den immunhistochemischen Antigen-Nachweis Antikörper gegen MMP-1 und Emmprin benutzt, um die Expressionsmuster zu ermitteln. Weiterhin sollte festgestellt werden, ob die Expressionsstärke und das Expressionsmuster im Zusammenhang mit klinisch pathologischen Parametern stehen.

Orale/oropharyngeale Karzinome metastasieren in erster Linie auf lymphatischem Wege. Das geschieht unabhängig vom T-Stadium, vom Differenzierungsgrad oder anderen Parametern (Werner et al. 2002). Um eine genauere Prognose für diese Karzinome geben zu können, ist ein besseres Verständnis der Tumorbilogie dieser Tumorart notwendig. In der Tumorforschung werden seit langem Mutationen in Tumorzellen untersucht, in denen entweder Onkogene wirksam sind oder Tumorsuppressorgene ausgeschaltet wurden (Friedrich et al. 1997, Riethdorf S et al. 1997, Riethdorf S et al. 1998, Friedrich et al. 2000, Egeblad u. Werb 2002). Viele Studien befassen sich gleichzeitig mit den Wechselwirkungen von Tumor und Stroma in allen Phasen der Tumorprogression. Diese Wechselwirkungen beruhen auf dem Zusammenspiel zwischen den vorhandenen Zellen (epithelial differenzierte Zellen, Stromazellen) und der umgebenden extrazellulären Matrix (EZM). Im Stroma befinden sich unter anderem Fibroblasten, Endothelzellen und Abwehrzellen (Lymphozyten, Makrophagen etc.), die mit Tumorzellen in Wechselwirkung treten können, das Tumorgewebe infiltrieren und/oder von Tumorzellen stimuliert werden können, frei lösliche und gebundene Faktoren zu exprimieren. Solche Faktoren sind wiederum für die Stimulierung des Tumorwachstums, der Tumorangiogenese und der Metastasierung verantwortlich (Yan et al. 2005).

Durch die Tumorzell-Stroma-Wechselwirkungen kommt es zu zellphysiologischen Alterationen, in deren Zusammenspiel malignes Wachstum

ermöglicht wird. Dazu zählen z.B. Eigenversorgung mit Wachstumssignalen/-faktoren, Unempfindlichkeit gegenüber inhibierenden Signalen, Umgehen der Apoptose, ungebremstes Replikationspotenzial, andauernde Angiogenese, Gewebeinvasion und Metastasierung (Hanahan u. Weinberg 2000).

Beim Prozess der Invasion und Metastasierung kommt es zunächst zur Anheftung von transformierten Keratinozyten an die Basalmembran und zur Auflösung derselben unter anderem durch Matrix-Metalloproteinasen (MMP-2, -9). Das gelingt durch die Schaffung einer tumorperizellulären Umgebung, in der MMPs und andere Proteasen konzentriert werden. Darüber hinaus können andere EZM-Komponenten abgebaut werden, was eine Voraussetzung für die Migration der Tumorzellen ist (Basbaum u. Werb 1996, Chen 1996, Werb 1997, Duffy 1998). Neben den MMPs spielen Serinproteasen (z.B. Furin) eine wichtige Rolle in der proteolytischen Kaskade des Matrixabbaus. Sie aktivieren beispielsweise MMPs (Egeblad u. Werb 2002). Auch Plasmin hat eine große Substratspezifität und kann latente Formen anderer proteolytischer Enzyme aktivieren (Crowley et al. 1993, Schmitt et al. 1997, Brünner et al. 1999, Look u. Foekens 1999). Ferner ist das Urokinase Plasminogenaktivatorsystem in der Lage, verschiedene Proteine der EZM (z.B. Fibronectin) direkt abzubauen und eine Form der Kollagenase IV zu aktivieren. Wenn der Tumor durch sein Wachstum eine Größe erreicht, bei der die Versorgung durch Nährstoffe nicht mehr gewährleistet ist, kommt es zur Bildung neuer Blutgefäße (Angiogenese) (Riethdorf L et al. 1999, Riethdorf L et al. 2001).

Bilden sich entfernte Metastasen, dann müssen Tumorzellen nicht nur das mechanische Trauma durch den Blut-/Lymphfluss überleben, sondern sich auch der potenziellen Immunreaktion des Wirtsorganismus entziehen. Überdies müssen sie an das Endothel eines Blut-/Lymphgefäßes binden und wieder die Basalmembran überwinden. Im dortigen interstitiellen Parenchym (z.B. Lymphknoten) erfolgt dann das Tumorstadium unter Bedingungen, die sich von denen des Ursprungsgewebes unterscheiden können (Liotta et al. 1986, Stetler-Stevenson et al. 1993, MacDougall u. Matrisian 1995, Woudhouse et al. 1997, Werb et al. 1997, Cazorla et al. 1998, Kurahara et al. 1999). Mit einem gesteigerten Metastasierungsverhalten werden auch bestimmte Membranproteine in Verbindung gebracht, wie das Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) und das CD44-Protein sowie die Aktivierung bestimmter

Wachstumsfaktoren (Hepatocyte growth factor; Johnson et al. 1989, Günthert et al. 1991, Mars et al. 1993, Mayer et al. 1993). Die Migration der Tumorzellen wird außerdem durch die „down“-Regulation der Expression desmosomaler Adhäsionsmoleküle (E-Cadherin, Plakoglobin) erleichtert, wodurch die Adhäsion epithelialer Zellen verloren geht (Valles et al. 1990, Birchmeier et al. 1992, Valles et al. 1992, Mayer et al. 1993, Peifer 1993, Pantel et al. 1998). Eine weitere Förderung der Invasion von Tumorzellen geschieht durch die Expression von Motilitätsfaktoren (Scatter Factor, Transforming Growth Factor, u.a.; Stoker u. Gherardi 1991, Birchmeier u. Birchmeier 1993, Stetler-Stevenson et al. 1993, Nekarda et al. 1994).

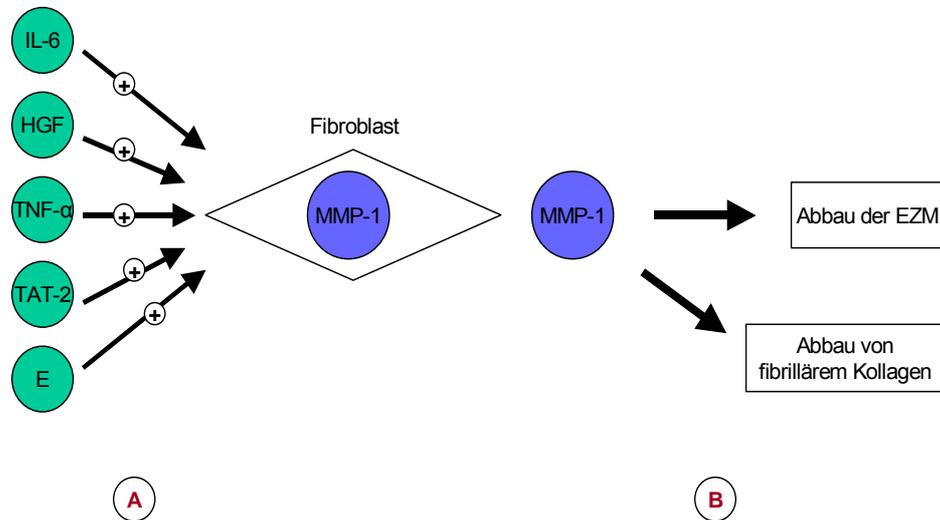
5.1. Matrix-Metalloproteinase-1 (MMP-1)

Matrix-Metalloproteinase-1 (interstitielle Kollagenase) ist in der Lage, fibrilläres Kollagen abzubauen. Diese Eigenschaft wurde bei Versuchen nachgewiesen, bei denen Endothel- und Tumorzellen mithilfe von MMP-1 in Kollagengels invadierten (Fisher et al. 1994, Benbow et al. 1999). Es handelt sich um eine Funktion, die für die Invasion von Tumorzellen durch die Basalmembran in die interstitielle Matrix, für die Angiogenese und für das Tumorzellwachstum notwendig ist (Liotta et al. 1991, Chambers u. Matrisian 1997, Shapiro 1998).

Stimuliert wird die MMP-1-Synthese in Fibroblasten und Endothelzellen u.a. durch Emmprin (Biswas et al. 1995, Guo et al. 1997, Lim et al. 1998). Dieses Molekül bindet MMP-1 auch an die Tumorzelloberfläche (Guo et al. 2000), was den Invasionsprozess erleichtert. Außerdem stimulieren die Zytokine IL-6 (soluble IL-6 receptor), HGF (hepatocyte growth factor) und TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) Tumorzellen oraler/oropharyngealer Plattenepithelkarzinome zur Synthese von MMP-1 (Sundelin et al. 2005).

Die vorliegenden Patientenfälle wurden hinsichtlich der MMP-1-Expression sowohl mit der Immunhistochemie (IHC) als auch mit der *in situ*-Hybridisierung (ISH) untersucht. Immunhistochemisch wurden 89 Fälle untersucht, von denen 19 Fälle eine LK-Metastase aufwiesen. Mit der *in situ*-Hybridisierung wurden 31 Fälle, von denen 14 Fälle eine LK-Metastase und 17 Fälle tumorfreie Lymphknoten aufwiesen, untersucht. Damit wurde die Expression sowohl auf Proteinebene (IHC) als auch auf Transkriptionsebene (ISH) analysiert.

Stimulation und Funktion von MMP-1



A: IL-6, HGF, TNF- α , TAT-2 und Emmprin stimulieren die MMP-1-Synthese u.a. in Fibroblasten
B: MMP-1 degradiert Bestandteile der EZM, insbesondere fibrilläres Kollagen
 (IL-6: Interleukin-6, HGF: Hepatocyte-growth-factor, TNF- α : Tumor necrosis factor- α ; TAT-2: Tumor associated trypsin-2; E: Emmprin; EZM: Extrazelluläre Matrix)

Sowohl mit der IHC als auch mit der ISH wurde MMP-1 am stärksten in den Tumorzellen der Plattenepithelkarzinome nachgewiesen. Eine geringere Expression wurde in den benachbarten dysplastischen Epithelzellen und eine noch geringere Expression im benachbarten normalen Epithel festgestellt. In den vorliegenden Fällen wurde MMP-1 also sowohl als mRNA-Molekül als auch als Protein mit abnehmender Stärke im Tumorepithel, im dysplastischen und normalen Epithel exprimiert. Im Gegensatz zur ISH wurden mit der IHC allerdings geringere Unterschiede zwischen Tumor, dysplastischem Epithel und normalem Epithel nachgewiesen. Mit der IHC wurde etwa genauso häufig ein Anstieg der Expression vom normalen Epithel zur Dysplasie (11 Fälle, 33%) wie von der Dysplasie zum Tumorgewebe (12 Fälle, 34%) ermittelt. Aufgrund dieses Ergebnisses lässt sich keine Tendenz erkennen, in welchen Zellen es zu einer Anschaltung der Expression kommt.

Mit der ISH konnten deutlichere Unterschiede nachgewiesen werden. Die Expression im normalen Epithel unterschied sich zwar nur gering von der

schwachen Expression im dysplastischen Epithel. Im Tumorepithel konnte aber eine deutlich stärkere Expression gezeigt werden. Im jeweiligen Stroma wurde eine ähnliche Expression festgestellt, insgesamt aber etwas schwächer als in den epithelial differenzierten Zellen. Es wurden mehr Fälle nachgewiesen, bei denen die Expression von der Dysplasie zum Tumor (6 Fälle, 55%) als vom normalen Epithel zur Dysplasie (4 Fälle, 36%) anstieg. Insgesamt nahm die Expression vom normalen Epithel über das dysplastische Epithel zum Tumorepithel sogar bei 18 Fällen (78%) zu.

Die eigenen Ergebnisse, besonders die der ISH, legen die Vermutung nahe, dass die MMP-1-Expression in erster Linie im Tumorepithel bzw. im peritumorösen Stroma angeschaltet wird. Die Ursache für den Expressionsanstieg im Tumorgewebe ist aber noch nicht bekannt. Insgesamt wurde in den eigenen Untersuchungen ein sehr heterogenes Expressionsmuster nachgewiesen. Es traten große Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen Fällen auf. Daher ist es kaum möglich, eine quantitative Analyse durchzuführen, um Tendenzen oder sogar signifikante Korrelationen darzustellen. Auf der anderen Seite lassen sich mit den durchgeführten *in situ*-Methoden (IHC und ISH) qualitative Unterschiede aufzeigen, die mit anderen Methoden (z.B. microarrays) nicht dargestellt werden können.

Immunhistochemisch wurde in den Tumorzellen bei 80 Fällen (95%) und in den peritumorösen Stromazellen bei 79 Fällen (94%) eine schwache bzw. mittelstarke Expression nachgewiesen. Mit der ISH konnte in den Tumorzellen bei 21 Fällen (81%) und in den Stromazellen bei 17 Fällen (65%) eine schwache bzw. mittelstarke Expression festgestellt werden.

In einigen Fällen konnte mit der ISH ein Unterschied zwischen den Fällen mit LK-Metastase und denen ohne LK-Metastase aufgezeigt werden. Bei den Fällen mit LK-Metastasen wurde im peritumorösen Stroma bei 4 Fällen (36%) die vergleichsweise stärkste Expression (mittelstark) nachgewiesen. Dagegen wurde bei den Fällen mit tumorfreien Lymphknoten bei keinem der 15 Fälle in den peritumorösen Stromazellen eine mittelstarke Expression ermittelt. Dieses Ergebnis zeigt eine Tendenz auf, wonach die Expression von einigen Fällen, wo LK-Metastasen vorliegen, stärker ist gegenüber den Fällen, wo keine LK-Metastasen vorliegen.

Von einer im Vergleich zur normalen Mukosa erhöhten MMP-1-Expression in oralen/oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen wurde auch in verschiedenen Studien berichtet. Sutinen et al. 1998 wiesen MMP-1-Transkripte (ISH) in Fibroblasten nahe des Tumorepithels, jedoch nicht in Tumorzellen nach. Immunhistochemisch konnten sie MMP-1 sowohl in Tumor- als auch in Stromazellen nachweisen. Das untersuchte Patientenkollektiv war mit 10 Fällen allerdings verhältnismäßig klein. O-Charoenrat et al. 2001 und Baker et al. 2005 wiesen mit anderen Methoden (RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction), Western Blotting, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)) eine erhöhte Expression in den Karzinomen nach. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass MMP-1 in 30% der untersuchten Primärtumorzellen exprimiert wurde (Ito et al. 2003). Diese Ergebnisse bestätigen die eigenen mit der Ausnahme, dass Sutinen et al. 1998 keine MMP-1-Transkripte in den Tumorzellen nachweisen konnten. Die erhöhte MMP-1-Expression verstärkt das Invasionspotenzial der Plattenepithelkarzinome. In einer immunhistochemischen Studie mit 96 Fällen oraler Karzinome konnten Kurahara et al. 1999 diesen Zusammenhang zwischen erhöhter Expression und der Invasion/Metastasierung von Tumorzellen sowie dem Abbau der EZM nachweisen.

Immunhistochemisch wurde sowohl in den dysplastischen Epithelzellen (33 Fälle, 89%) als auch in den angrenzenden Stromazellen (30 Fälle, 81%) eine geringere Expression nachgewiesen als in den Tumorzellen. Mit der ISH konnte in den dysplastischen Epithelzellen bei wenigen Fällen (4 Fälle, 36%) eine schwache Expression festgestellt werden. In den Stromazellen wurde eine so schwache Expression ermittelt, dass sie vernachlässigt werden kann. Jordan et al. 2004 wiesen MMP-1-Expression mit der IHC und der RT-PCR im Tumorepithel sowie im dysplastischen Epithel nach. Bei 24 von 34 Fällen (71%) stellten sie im dysplastischen Epithel eine erhöhte Expression fest. Sie konnten außerdem mehr MMP-1-Transkripte im Tumorepithel als in den Dysplasien nachweisen, was in der eigenen Arbeit auch bestätigt werden konnte. Sutinen et al. 1998 wiesen im Gegensatz zu den eigenen Ergebnissen Transkripte in Fibroblasten einiger Fälle nach; eine immunhistochemische Untersuchung führten sie hier jedoch nicht durch. Zusätzlich berichteten Jordan et al. 2004,

dass die Expression in Dysplasien, die später zu Karzinomen entarteten, höher war als die Expression in Dysplasien, die nicht entarteten.

Immunhistochemisch wurde sowohl in den normalen Epithelzellen (57 Fälle, 85%) als auch in den angrenzenden Stromazellen (46 Fälle, 69%) eine geringere Expression nachgewiesen als in den dysplastischen Epithelzellen. Mit der ISH konnte in den Epithelzellen bei sehr wenigen Fällen (2 Fälle, 9%) eine schwache Expression festgestellt werden. In den Stromazellen wurde nur bei wenigen Fällen (4 Fälle, 17%) eine Expression ermittelt.

In der Literatur gibt es keine Untersuchungen zur MMP-1-Expression im normalen Plattenepithel angrenzend an orale/oropharyngeale Plattenepithelkarzinome. Das normale Plattenepithel wurde u.a. von O-Charoenrat et al. 2001 als Referenzgewebe genannt. Auch Sutinen et al. 1998 konnten im normalen Plattenepithel keine Expression (ISH) nachweisen.

Im Stroma des normalen Epithels wurde in den eigenen Untersuchungen bei 3 Fällen (30%) (Fälle mit LK-Metastasen) eine mittelstarke bzw. schwache Expression nachgewiesen. Unter den Fällen ohne LK-Metastasen wurde nur bei einem Fall (8%) im Stroma des normalen Epithels eine Expression (schwach) ermittelt. In einigen Fällen, wo auch LK-Metastasen vorlagen, wurde im Stroma des normalen Epithels eine vergleichsweise höhere Expression nachgewiesen. Immunhistochemisch wurde die MMP-1-Expression in den LK-Metastasen bei 13 Fällen (68%) sowohl in den Tumor- als auch in den Stromazellen exprimiert. Mit der ISH wurde MMP-1-mRNA bei 6 Fällen (46%) in den Tumorzellen und bei 4 Fällen (31%) in den Stromazellen nachgewiesen.

In den eigenen Untersuchungen wurde MMP-1 als Protein in den LK-Metastasen schwächer als im Plattenepithelkarzinom, in den Plattenepitheldysplasien sowie in den normalen Plattenepithelien exprimiert. In den Tumorzellen bzw. Stromazellen der LK-Metastasen wurde also die geringste Expression von MMP-1 als Protein nachgewiesen. MMP-1-mRNA wurde dagegen in den LK-Metastasen stärker exprimiert als im dysplastischen Epithel.

Sutinen et al. (1998) berichteten in einer immunhistochemischen Untersuchung von einer MMP-1-Expression in Stromazellen und einigen Tumorzellen in LK-Metastasen. MMP-1-mRNA konnten sie aber nur in einigen Fibroblasten nahe den LK-Metastasen nachweisen.

Es stellt sich die Frage, warum im eigenen Material einerseits die *Transkripte* von MMP-1 in den LK-Metastasen stärker nachgewiesen wurden als in den Plattenepitheldysplasien und den normalen Plattenepithelien, und warum andererseits MMP-1 als *Protein* in den LK-Metastasen schwächer exprimiert wurde als in den Plattenepitheldysplasien und normalen Plattenepithelien. Die Konzentration an MMP-1 in den verschiedenen Geweben verschiebt sich nach der Proteinbiosynthese möglicherweise durch stärkere oder schwächere Bindung an die Zellen. Emmprin ist für die Bindung von MMP-1 an Tumorzellen mitverantwortlich (Guo et al. 2000). Da Emmprin in den LK-Metastasen am schwächsten exprimiert wurde (s.u.), könnte dies ein Grund dafür sein, dass MMP-1 (Protein) hier vergleichsweise nicht so stark gebunden bzw. exprimiert wurde.

In den tumorfreien Lymphknoten wurde eine sehr geringe Expression nachgewiesen. Sie kann daher vernachlässigt werden.

In allen Geweben wurde mit der IHC eine deutlich stärkere Expression nachgewiesen als mit der ISH. Auch wenn ein direkter Vergleich der Ergebnisse, die mit unterschiedlichen Methoden erhoben wurden, schwierig ist, könnte der bereits oben angeführte Aspekt eine Ursache für die Diskrepanz sein. Die Bindung von MMP-1 an Tumorzellen durch Moleküle wie z.B. Emmprin verändert möglicherweise die Expression. So ist es möglich, dass MMP-1 (Protein) unabhängig vom Syntheseort an Zellen gebunden wird (Guo et al. 2000). Dieses würde eine Erklärung dafür liefern, dass die MMP-1-Expression (IHC) stärker auftrat als die mRNA-Expression. Darüber hinaus muss beachtet werden, dass die graduelle Unterscheidung bei der mikroskopischen Auswertung der IHC deutlich schwieriger vorzunehmen ist als bei der ISH. Die Auswertung der Expression ist folglich von subjektiv beeinflussten Parametern abhängig. Da diese Fehlerquelle nicht vernachlässigt werden kann, ist es hier schwierig, die Ursache dafür zu finden, dass MMP-1 mit der IHC stärker exprimiert wird als mit der ISH.

In sämtlichen Geweben wurde in den Tumorzellen, dysplastischen bzw. normalen Epithelzellen eine stärkere Expression nachgewiesen als in den jeweils angrenzenden Stromazellen. In den Tumorzellen wurde MMP-1 gleich stark bzw. etwas stärker exprimiert als in den peritumorösen Stromazellen. In mehreren Studien wurde jedoch gezeigt, dass MMPs in der Regel von

peritumorösen Stromazellen und weniger von Tumorzellen selbst synthetisiert werden (Gray et al. 1992, Poulsom et al. 1992, Ralfkiaer et al. 1992, Sasaguri et al. 1992, MacDougall et al. 1995, Heppner et al. 1996, Johnsen et al. 1998). Die Frage ist daher, warum im eigenen Untersuchungsmaterial MMP-1 auch in den Tumorzellen exprimiert wurde und teilweise sogar stärker als in den Stromazellen. Bei 51 Fällen (62%) wurde MMP-1 als Protein sowohl in Tumoral als auch in Stromazellen gleich stark exprimiert, bei 21 Fällen (26%) fiel die Expression in den Tumorzellen um eine Score-Stufe stärker, bei 8 Fällen (10%) um eine Score-Stufe geringer aus als in den Stromazellen. Auch die mRNA-Expression wurde in den Tumorzellen gleich stark bzw. stärker nachgewiesen als in den Stromazellen. Dabei konzentrierten sich die Transkripte im Tumorepithel in der basalen Zellschicht. Eine Erklärung für die stärkere Expression könnte eine tatsächlich stärkere Synthese von MMP-1 in den Tumorzellen oraler/oropharyngealer Plattenepithelkarzinome sein. Eine zweite Erklärung wäre die Bindung von MMP-1 an Tumorzellen, nachdem MMP-1 synthetisiert worden ist. Das Glykoprotein Emmprin bindet MMP-1 an Tumorzellen (Guo et al. 2000). Da im eigenen Untersuchungsmaterial Emmprin stärker in den Tumorzellen als in den peritumorösen Stromazellen exprimiert wurde (s.u.), ist dies möglicherweise auch ein Grund dafür, dass MMP-1 in Tumorzellen stärker nachgewiesen wurde.

MMP-1 wurde in den dysplastischen Epithelzellen etwas stärker exprimiert als in den umliegenden Stromazellen. Auch hier könnte der Grund dafür eine stärkere Synthese von MMP-1 in den dysplastischen Epithelzellen gegenüber den umliegenden Stromazellen sein. Emmprin wurde im eigenen Untersuchungsmaterial in den Dysplasiezellen stärker exprimiert als in den Stromazellen (s.u.). Ob MMP-1 durch Emmprin auch stärker an Dysplasiezellen gebunden wird, wie es Guo et al. 2000 für die Tumorzellen zeigen konnten, wurde bisher noch nicht nachgewiesen.

Es konnte kein aussagekräftiger und signifikanter Zusammenhang hinsichtlich der MMP-1-Expression und klinisch pathologischen Parametern dargestellt werden. Dennoch gab es Ergebnisse, bei denen eine mögliche Tendenz in Bezug auf klinisch pathologische Parameter zu erkennen war.

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen der MMP-1-Expression (IHC) in den Karzinomzellen und dem pT-Stadium konnte zwar nicht gezeigt werden. Es gab

aber in der Gruppe der Fälle mit höherem pT-Stadium (pT2/pT3) mehr Fälle mit stärkerer MMP-1-Expression (15 Fälle, 36%) als in der Gruppe der Fälle mit pT1-Stadium (9 Fälle, 28%). Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen von O-Charoenrat et al. 2001, die einen signifikanten Zusammenhang zwischen der MMP-1-Expression und dem T-Stadium ermittelten. In größeren Tumoren (T3/T4) konnte er eine stärkere Expression nachweisen als in kleineren Tumoren (T1/T2).

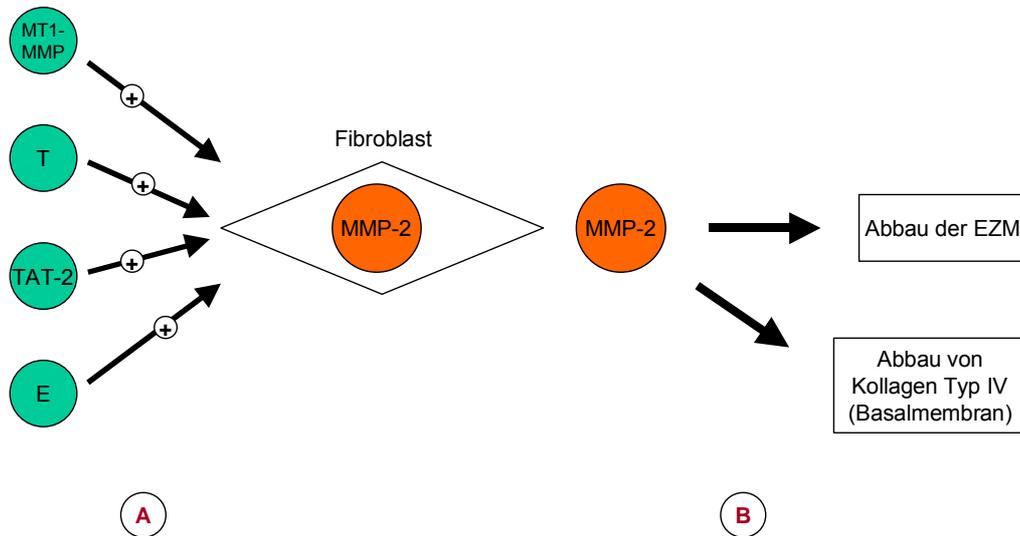
5.2. Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP-2)

MMP-2 (Gelatinase A) wurde als zweite Matrix-Metalloprotease entdeckt. Sie spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Tumorprogression oraler/oropharyngealer Plattenepithelkarzinome (Imanishi et al. 2000). Sie ist in der Lage, Kollagen Typ IV, einen Hauptbestandteil der Basalmembran, sowie andere Komponenten der EZM abzubauen (Salo et al. 1982, Salo et al. 1983, Sorsa et al. 2004). Deswegen könnte das Vorkommen der Protease ein Indikator für den Grad der Invasion und Metastasierung sein (Kawata et al. 2002). MMP-2, -9 und -14 regulieren direkt die Angiogenese. Bei Verminderung der MMP-2-Expression kommt es zur Abschwächung der Angiogenese (Fang et al. 2000). Bei der Aktivierung von MMP-2 bindet TIMP-2 ein MT1-MMP-Molekül an seinem Aminoende und proMMP-2 an seinem Carboxylende. Ein angrenzendes, nicht inhibiertes MT1-MMP-Molekül kann nun das gebundene proMMP-2 spalten. Dazu wird ein bereits aktiviertes MMP-2-Molekül benötigt (Deryugina et al. 2001). Zusätzlich wurde auch ein TIMP-2 unabhängiger Aktivierungsweg beschrieben (Morrison et al. 2001). Sowohl MMP-2 als auch MMP-9 und -14 sind an der Invadopodia, einem Membranvorsprung, an dem aktiver Abbau der EZM stattfindet, lokalisiert (Nakahara et al. 1997).

Die Synthese von MMP-2 wird durch verschiedene Proteine reguliert. TAT-2 (tumor associated trypsin-2) ist eine Initial-Aktivator-Serinprotease, die Proteasen wie z.B. Kollagenasen (MMP-1), Gelatinasen (MMP-2) und Stromelysin-1 (MMP-3) stark aktivieren kann (Sorsa et al. 1997, Moilanen et al. 2003). Thrombospondin stimuliert die MMP-2 und -9-Expression (Taraboletti et al. 2000). Die Spaltung von Lamimin-5 durch MMP-2 und -14 deckt eine cryptic site dieses Moleküls auf, die die Zellmotilität und die Migration triggert. Dieser Vorgang stellt einen ersten Schritt zur Invasion dar (Giannelli et al. 1997,

Koshikawa et al. 2000, Xu et al. 2001). MMP-2-Aktivität wird durch Proteinkinase C vermindert (Tsai et al. 2003).

Stimulation und Funktion von MMP-2



A: MT1-MMP, Thrombospondin, TAT-2 und Emmprin stimulieren die MMP-2-Synthese in Fibroblasten
B: MMP-2 degradiert Bestandteile der EZM, insbesondere Kollagen Typ IV
(MT1-MMP: membrane type1-matrix metalloprotease; T: Thrombospondin; TAT-2: Tumor associated trypsin-2; E: Emmprin; EZM: Extrazelluläre Matrix)

MT1-MMP wurde ursprünglich als Aktivator von MMP-2 identifiziert. TIMP-2 wurde als Inhibitor von MMP-2 und MT1-MMP beschrieben. Jedoch ist TIMP-2 auch für zellvermittelte MMP-2-Aktivierung erforderlich. Der Beitrag von TIMP-2 zur Tumorerkrankung wird daher kontrovers diskutiert (Yoshizaki et al. 2002). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) stimulierte dosisabhängig die Synthese von proMMP-2 in zwei unterschiedlichen oralen Plattenepithelkarzinom-Zelllinien. GM-CSF führte zu erhöhten mRNA-Levels von MMP-2 in beiden untersuchten Zelllinien (Tomita et al. 2000). In zwei weiteren oralen Plattenepithelkarzinom-Zelllinien suppressierte ein selektiver Cox-2-Inhibitor (NS-398) und ein Cox-2 antisense Oligonucleotid (Cox-2 AS) die Sekretion und Expression von MMP-2 sowie die Sekretion von CD44 auf der Oberfläche in beiden Zelllinien (Kinugasa et al. 2004). Endostatin ist ein antiangiogenes wirksames, 20 kDa großes Proteinfragment, das vom hemidesmosomalen Typ 18 Kollagen abgeleitet ist (O'Reilly et al. 1997). Es

verringert zum einen das Wachstum von Endothelien und reduziert zum anderen die Tumorzellaktivität, indem es die Aktivierung von MMP-2, -9 und -13 inhibiert. In einer weiteren Studie verhinderte Endostatin die Fragmentation von proMMP-2, was die katalytische Aktivität reduzierte. Endostatin blockiert die Aktivierung und Funktion von bestimmten tumorassoziierten proMMPs wie proMMP-2 (Nyberg et al. 2003).

In der Literatur wurde von Zusammenhängen zwischen der Expression und dem biologischen Tumorverhalten berichtet. Robinson et al. 2003 zeigten, dass Zellen, die hohe MMP-2-Level aufweisen, den höchsten Invasionsgrad bei der Durchdringung von Matrigel besitzen im Vergleich mit Zellen, die niedrige bzw. variable MMP-2-Level aufweisen. Ferner wurde von einer signifikanten Beziehung zwischen der erhöhten MMP-2-Expression und dem Invasions- und Metastasierungsverhalten sowie dem Abbau von EZM berichtet (Kurahara et al. 1999). Liu et al. (2004) konnten zudem zeigen, dass MMP-2 an der Invasionsfront mit größerer Signifikanz exprimiert wurde als im Zentrum der oralen Plattenepithelkarzinome.

Tumorpatienten mit erhöhten MMP-2-Werten haben eine kürzere krankheitsfreie Überlebensrate als Patienten mit niedrigerer MMP-2-Expression (Sorsa et al. 2004). Die erhöhte MMP-2-Expression ist nach Ruokolainen et al. 2006 ein prognostischer Faktor für verkürzte Überlebensraten bei Plattenepithelkarzinomen. Die rezidivfreie 5-Jahres-Überlebensrate betrug demnach bei Patienten mit stark erhöhter MMP-2-Expression 42%. Bei Patienten ohne Expression bzw. mit schwacher Expression betrug sie 61%. Zusätzlich zeigten Ruokolainen et al. 2006 einen Zusammenhang auf zwischen der MMP-2-Expression und einem späteren LK-Befall. Dem gegenüber steht allerdings auch die Publikation von Hong et al. 2000, in der keine Assoziation zwischen der MMP-2-Expression und dem Metastasierungsprozess gezeigt werden konnte.

Von den vorliegenden Fällen wurden mit der *in situ*-Hybridisierung (ISH) 31 Fälle hinsichtlich der MMP-2-Expression untersucht. Unter den 31 untersuchten Fällen gab es 14 Fälle, bei denen eine LK-Metastase vorlag und 17 Fälle, bei denen die untersuchten Lymphknoten tumorfrei waren.

In den eigenen Untersuchungen wurde MMP-2-mRNA deutlich stärker in den Stromazellen nachgewiesen als in den Tumorzellen, den dysplastischen und den normalen Epithelzellen sowie den LK-Metastasen bzw. tumorfreien Lymphknoten. Im Stroma der LK-Metastasen wurde eine schwächere Expression als in den peritumorösen Stromazellen ermittelt. In den Stromazellen, die an die dysplastischen und normalen Epithelzellen angrenzen, wurde eine noch schwächere Expression festgestellt. Jedoch wurden in den Stromazellen des normalen Epithels etwas stärkere Signale nachgewiesen als im Stroma des dysplastischen Epithels. Die tumorfreien Lymphknoten waren praktisch frei von MMP-2-Transkripten.

MMP-2-Transkripte konnten also vor allem im Stroma, besonders im peritumorösen Stroma ermittelt werden. In den Tumorzellen wurde deutlich seltener eine Expression aufgezeigt. Dennoch könnte die Expression in den Tumorzellen in Bezug auf das Metastasierungsverhalten eine Rolle spielen. Insgesamt ist die Ursache des Expressionsanstiegs im Tumor bzw. Stroma des Tumors noch unbekannt.

Betrachtet man das Stroma des normalen Epithels und das Stroma des dysplastischen Epithels wurde bei 5 Fällen (45%) eine ansteigende Expression nachgewiesen. Vom Stroma der Dysplasie zum peritumorösen Stroma wurde bei allen Fällen (10) ein Anstieg der Expression nachgewiesen. Ein Anstieg der Expression konnte also eher vom Stroma der Dysplasie zum peritumorösen Stroma beobachtet werden als vom Stroma des normalen Epithels zum Stroma der Schleimhaut mit Dysplasien. Die Expression im Stroma des normalen Epithels, der Dysplasie und des Karzinoms stieg im Verlauf bei 91% der Fälle um mindestens eine Score-Stufe an. Dieses verdeutlicht zusätzlich die Zunahme der Expression zum Tumor hin.

In den Tumorzellen wurde nur bei 7 Fällen (28%) eine zumeist schwache MMP-2-mRNA-Expression festgestellt. Einer dieser Fälle wies auch in den dysplastischen Epithelzellen eine Expression auf. Im Stroma der Plattenepithelkarzinome konnte dagegen in fast allen Fällen (25 Fälle, 96%) eine Expression ermittelt werden, die meistens mittelstark (62%) aber z.T. auch schwach (27%) oder stark (8%) ausfiel.

In verschiedenen Publikationen wurde die Expression von MMP-2 in oralen/oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen beschrieben. So wurde eine

signifikant höhere MMP-2-mRNA-Expression in Plattenepithelkarzinomen verglichen mit dem Normalgewebe nachgewiesen (Imanishi et al. 2000, O-Charoenrat et al. 2001, Jordan et al. 2004, Tang ZG et al. 2005). O-Charoenrat et al. 2001 wiesen mit der RT-PCR bei 54 Fällen eine signifikant höhere MMP-2-Expression nach. Unter diesen 54 Fällen waren allerdings 25 Fälle, bei denen der Tumor im Hypopharynx bzw. Larynx lokalisiert war. Auch Ito et al. 2003 zeigten, dass MMP-2-mRNA in 30% der Primärtumorfälle exprimiert wurde.

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass in oralen/oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen auch eine erhöhte MMP-2-Protein-Aktivität im Vergleich zum umliegenden Normalgewebe vorliegt (Shimada et al. 2000, Tokumaru et al. 2000, O-Charoenrat et al. 2001, Yorioka et al. 2002, Robinson et al. 2003, Tsai et al. 2003, Baker et al. 2005, Gao et al. 2005, Patel et al. 2005). Patel et al. 2005 wiesen mit der Gelatine-Zymographie bei 39 Fällen eine erhöhte MMP-2-Aktivität nach.

Sowohl im eigenen Untersuchungsmaterial als auch in Experimenten anderer Forschungsgruppen konnten in oralen/oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen demnach deutlich höhere Expressionswerte festgestellt werden. Hierdurch wird die These untermauert, dass MMP-2 eine wichtige Rolle bei der Invasion und Metastasierung dieser Tumorart spielt.

Mit der ISH wurde in den dysplastischen Epithelzellen bei einem Fall (10%) eine schwache Expression nachgewiesen. Im angrenzenden Stroma konnten bei 4 Fällen (40%) schwache Signale entdeckt werden. Von einer Expression (MMP-2-mRNA) in einigen Fibroblasten unterhalb der Basalmembran der Dysplasie berichteten Sutinen et al. 1998 bei 2 von 6 Fällen. Jordan et al. 2004 konnten dagegen MMP-2-mRNA in Dysplasiezellen und MMP-2 als Protein in Dysplasie- und Stromazellen nachweisen.

In den normalen Epithelzellen konnten mit der ISH keine Signale gefunden werden. Im angrenzenden Stroma wurden aber bei 9 Fällen (41%) sowohl schwache als auch mittelstarke Signale ermittelt. Bei den Fällen mit LK-Metastasen konnte im Stroma des normalen Epithels von 3 Fällen (33%) eine mittelstarke Expression nachgewiesen werden. Unter den Fällen mit tumorfreien Lymphknoten gab es dagegen nur einen Fall (8%), bei dem eine mittlere Expression im Stroma des normalen Epithels ermittelt wurde. Diese Tendenz würde für eine stärkere Anschaltung der Expression bei den Fällen mit

LK-Metastasen sprechen. Weder in den normalen Epithelzellen noch im angrenzenden Stroma wurde bisher in anderen Studien eine Expression nachgewiesen.

In den LK-Metastasen wurden in den Tumorzellen bei 4 Fällen (31%) sowohl schwache als auch mittlere Signale nachgewiesen. Bei 9 Fällen (64%) wurde MMP-2-mRNA im angrenzenden Stroma zumeist mittelstark und am Rand (Kapsel) des Lymphknotens lokalisiert exprimiert. Damit war die Expression schwächer als in den nicht metastasierten Tumorzellen bzw. in den peritumorösen Stromazellen. O-Charoenrat et al. 2001 stellten fest, dass sowohl MMP-2-mRNA als auch MMP-2-Aktivität in LK-Metastasen stärker nachgewiesen wurden als im normalen Epithel. Sutinen et al. 1998 zeigten Transkripte im Stroma und MMP-2 (Protein) in Tumorzellen der LK-Metastasen auf.

In den vorliegenden Fällen konnte weiterhin gezeigt werden: Je mehr Fälle eine erhöhte Expression im peritumorösen Stroma aufwiesen, desto mehr Fälle wiesen auch im Stroma der LK-Metastasen eine erhöhte Expression auf. Auch wenn es sich nicht um einen signifikanten Zusammenhang handelt, zeigte sich doch die Tendenz, dass eine erhöhte Expression im peritumorösen Stroma mit einer erhöhten Expression im Stroma der LK-Metastasen einhergehen könnte.

Weder in den Zellen der tumorfreien Lymphknoten noch in den angrenzenden Stromazellen konnte eine aussagekräftige Expression nachgewiesen werden. Auch wenn es dazu bisher noch keine weiteren Untersuchungen gegeben hat, scheinen MMP-2-Transkripte in diesen Lymphknoten nicht synthetisiert zu werden.

In unseren Untersuchungen wurde MMP-2-mRNA vor allem in peritumorösen Stromazellen aber auch in Tumorzellen exprimiert. Verschiedene Studien haben unterschiedliche Aussagen zum Ort der MMP-2-Expression gemacht. Liu et al. 2001 wiesen nach, dass MMP-2-mRNA sowohl von Tumor- als auch von Stromazellen in oralen/oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen exprimiert wurde. Weiterhin berichteten Kawata et al. 2002, dass MMP-2 (Protein) vor allem in Tumorzellen exprimiert wurde. In einer Brustkrebs-Untersuchung konnte die Expression von MMP-2-mRNA in Stromazellen nachgewiesen werden. Das MMP-2-Protein wurde allerdings sowohl auf Stroma- als auch auf Tumorzellmembranen detektiert. MMPs, die von Stromazellen sezerniert

wurden, können demnach zur Tumorzellmembran gebracht werden (Polette et al. 1994). Lokalisiert ist das Enzym in oralen/oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen innerhalb eines MMP-2/TIMP-2/MT1-MMP-Komplexes an der Zellmembran der Tumorzelle (Thomas et al. 1999, Sorsa et al. 2004). Auch Sutinen et al. 1998 konnten MMP-2-mRNA in Fibroblasten aber nicht in Karzinomzellen nachweisen. MMP-2 (Protein) wiesen sie aber sowohl im Stroma als auch in der peripheren Zellschicht neoplastischer Inseln nach.

Betrachtet man die eigenen Ergebnisse sowie die der genannten Studien werden MMP-2-Transkripte sowie MMP-2 (Protein) sowohl in Tumorzellen als auch in peritumorösen Stromazellen exprimiert. In den meisten Fällen scheint dabei allerdings die Expression von mRNA in den Stromazellen einerseits und die MMP-2-Protein-Expression in den Tumorzellen andererseits stattzufinden. Nachdem MMP-2-mRNA vor allem in den Stromazellen synthetisiert worden ist, wird es möglicherweise in einem späteren Schritt als Protein vor allem an Tumorzellen gebunden. Auch in den dysplastischen Epithelzellen scheint diese Abfolge die häufigste zu sein. In den eigenen Untersuchungen konnten in einigen Fällen im angrenzenden Stroma der dysplastischen Epithelzellen MMP-2-Signale ermittelt werden. In den dysplastischen Epithelzellen war die Expression sehr schwach. Sutinen et al. 1998 konnten ebenfalls nur in den Stromazellen Transkripte feststellen. Jordan et al. 2004 wiesen Transkripte in den Dysplasiezellen sowie MMP-2 als Protein sowohl in den Dysplasiezellen als auch den angrenzenden Stromazellen nach.

In den eigenen Analysen konnten Transkripte vor allem in den perinodulären Stromazellen der LK-Metastasen und weniger in den LK-Metastasen selber nachgewiesen werden. Nur O-Charoenrat et al. 2001 wiesen in den LK-Metastasen MMP-2 (Protein) nach. Es ist demnach sehr schwer, aufgrund der geringen Datenmenge eine Tendenz bei der MMP-2-Expression in LK-Metastasen und dem angrenzenden Stroma auszumachen. In den normalen Epithelzellen wurde bisher in keiner Studie von einer Expression berichtet. Die eigenen Ergebnisse – eine schwache bzw. mittlere mRNA-Expression in den angrenzenden Stromazellen weniger Fälle – lassen vermuten, dass MMP-2 zunächst als Transkript in den Stromazellen vorhanden ist, bevor mögliche Signale zu einem eventuell späteren Zeitpunkt in den Epithelzellen nachgewiesen werden können.

Hinsichtlich einer Korrelation der MMP-2-Expression mit klinisch pathologischen Parametern gibt es in der Literatur unterschiedliche Daten. Ein Zusammenhang zwischen der MMP-2-Expression und dem T-Stadium wurde in verschiedenen Studien beschrieben (Dunne et al. 2003, Do et al. 2004, Gao et al. 2005). MMP-2 wurde z.B. in T3- oder T4-Tumoren signifikant stärker exprimiert als in T1- oder T2-Tumoren (Kato et al. 2005). Auf der anderen Seite konnten Kawata et al. 2002 keinen Zusammenhang zwischen der MMP-2-Expression und dem T-Stadium aufzeigen. In den eigenen Untersuchungen konnten wir ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang entdecken.

Auch in Bezug auf den Differenzierungsgrad gibt es in der Literatur verschiedene Aussagen. Gao et al. 2005 konnten in seinen Untersuchungen (40 Fälle, Immunhistochemie, RT-PCR) einen Zusammenhang zwischen der MMP-2-Expression und dem Differenzierungsgrad aufzeigen. Tang ZG et al. 2005 und O-Charoenrat et al. 2001 konnten dagegen keinen Zusammenhang darstellen. Mit dem eigenen Untersuchungsmaterial konnte ebenfalls keine Assoziation aufgezeigt werden.

Es ist außerdem sehr wichtig, Parameter zur frühzeitigen Erkennung von Metastasen zu finden. Werner et al. 2002 berichteten von einer Untersuchung, bei der 25% der Patienten, bei denen keine LK-Metastasen klinisch erkennbar waren, Mikrometastasen hatten. Ein Zusammenhang zwischen der MMP-2-Expression und dem N-Stadium ist mehrfach beschrieben worden. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass MMP-2 höher exprimiert wurde, wenn eine LK-Metastase vorlag (Shimada et al. 2000, Tokumaru et al. 2000, Liu et al. 2001, O-Charoenrat et al. 2001, Kawata et al. 2002, Dunne et al. 2003, Liu et al. 2004, Do et al. 2004, Gao et al. 2005, Kato et al. 2005, Patel et al. 2005, de Vicente et al. 2005). In den eigenen Untersuchungen konnte jedoch kein Zusammenhang dargestellt werden.

Anderen Studien zufolge wurde MMP-2 in Tumorzellen bereits metastasierter Tumoren stärker exprimiert als in Tumorzellen nicht metastasierter Tumoren. Deshalb wird MMP-2 eine besondere Funktion bei der Invasion des Tumors zugeschrieben (Kusukawa et al. 1995, Gohji et al. 1998, Kawamata et al. 1998, Dietz et al. 1999). Daraus ergibt sich die Hypothese, dass MMP-2 in oralen/oropharyngealen Karzinomen mit aggressivem Tumorwachstum und schlechter Prognose korreliert (Miyajima et al. 1995, Kawamata et al. 1997,

Kawamata et al. 1998, Tokumaru et al. 2000). Hierin könnte ein Ansatzpunkt liegen, eine sicherere Prognose bezüglich der Tumorprogression zu stellen.

5.3. Matrix-Metalloproteinase-3 (MMP-3)

MMP-3 (Stromelysin) spaltet Bestandteile des Zytoskeletts bzw. der EZM wie z.B. das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin. Dadurch wird die Zell-Zell-Adhäsionsfunktion unterdrückt, was die Tumorprogression begünstigt. Weiterhin erhöht Beta6 (Untereinheit des alpha v beta6 Fibronectin Rezeptors) die Zellmotilität und das Zellwachstum in oralen/oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen, verringert die Anordnung von Fibronectinmatrix und stimuliert die Expression und Aktivierung von MMP-3 (Ramos et al. 2002).

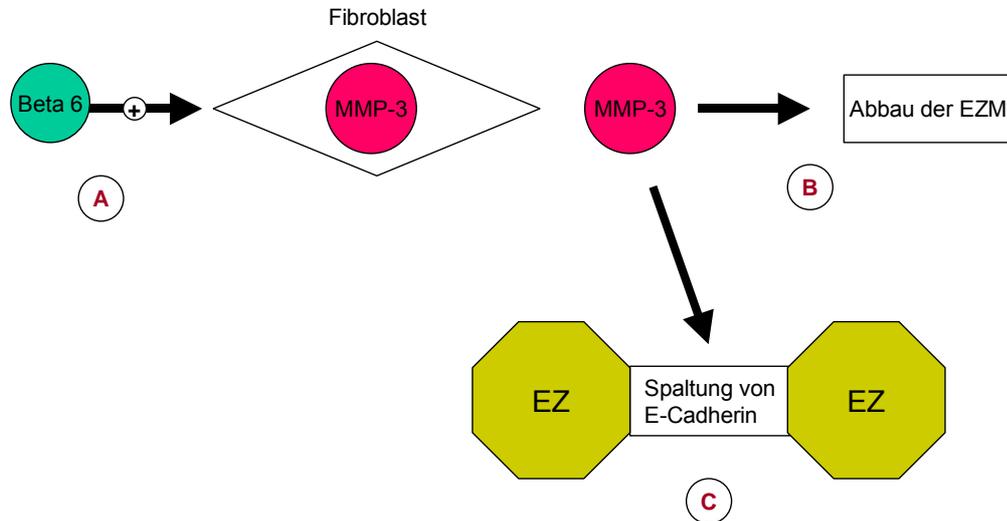
Von den vorliegenden Fällen wurden mit der ISH 31 Fälle hinsichtlich der MMP-3-Expression untersucht. Unter den 31 untersuchten Fällen gab es 14 Fälle, bei denen eine LK-Metastase vorlag und 17 Fälle, bei denen die untersuchten Lymphknoten tumorfrei waren.

Insgesamt konnte nur eine sehr geringe Expression ermittelt werden. Nur in sehr wenigen Fällen wurden im Plattenepithelkarzinom (3 Fälle, 9%) und im peritumorösen Stroma (2 Fälle, 6%) Transkripte festgestellt. Bei den übrigen Fällen konnte keine Expression nachgewiesen werden. Im normalen Epithel, in der Dysplasie, in den LK-Metastasen, in den tumorfreien Lymphknoten sowie in den jeweils angrenzenden Stromazellen wurde MMP-3 nicht exprimiert.

Auch wenn im eigenen Untersuchungsmaterial kaum Transkripte nachgewiesen werden konnten, wurde in anderen Studien MMP-3 in oralen/oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen signifikant höher exprimiert im Vergleich zu der normalen Mukosa (O-Charoenrat et al. 2001, Baker et al. 2005). Birkedal-Hansen et al. 2000 wiesen mit der RT-PCR MMP-3 in 20 (100%) Patientenfällen nach. Auch Kusakawa et al. 1996 konnten bei 37 von 65 Fällen (57%) MMP-3 immunhistochemisch in oralen/oropharyngealen Karzinomen feststellen.

In den eigenen Untersuchungen gab es keine Ergebnisse, mit denen eine statistische Auswertung hätte durchgeführt werden können. Nur in sehr wenigen Fällen kam es zu einer Expression (s.o.). Insofern konnte auch kein Zusammenhang zwischen der MMP-3-Expression und klinisch pathologischen Parametern dargestellt werden.

Stimulation und Funktion von MMP-3



- A: Beta 6 stimuliert die MMP-3-Synthese in Fibroblasten
 - B: MMP-3 degradiert Bestandteile der EZM
 - C: MMP-3 spaltet u.a. Bestandteile des Zytoskeletts (E-Cadherin) und hebt damit die Zelladhäsion auf
- (Beta 6: Untereinheit des alpha v beta 6 Fibronectin Rezeptors;
EZM: Extrazelluläre Matrix; EZ: Epithelzelle)

Von einer Beziehung zwischen der MMP-3-Expression und dem N-Stadium berichteten Nagata et al. 2003. MMP-3 wurde stärker in oralen/oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen exprimiert, bei denen eine LK-Metastase vorlag, im Vergleich mit Karzinomen ohne LK-Metastasen. Auch in anderen Studien wurde MMP-3 nicht nur in Verbindung mit dem N-Stadium, sondern auch mit dem Tumorstadium und dem Invasionspotenzial gebracht (Muller et al. 1993, Kusakawa et al. 1996). Ferner wurde von einer Korrelation zwischen der MMP-3-Expression und dem T-Stadium sowie der Invasionstiefe berichtet (Kusakawa et al. 1995). Ein Zusammenhang zwischen der MMP-3-Expression und dem Differenzierungsgrad konnte aber nicht aufgezeigt werden (O-Charoenrat et al. 2001).

Da die eigenen Ergebnisse diesbezüglich nicht aussagekräftig genug waren, konnten Ergebnisse anderer Studien weder bestätigt noch in Frage gestellt werden.

5.4. Emmprin

Unabhängig voneinander entdeckten verschiedene Labore Emmprin (CD147) und benannten das Glykoprotein unterschiedlich: Basigin, HT7, OX-47, M6, Neurothelin (Miyachi et al. 1990, Seulberger et al. 1990, Fossum et al. 1991, Kasinrek et al. 1992, Schlosshauer et al. 1995). Das 58 kDa große Oberflächenglykoprotein gehört zur Immunglobulinfamilie und konnte ursprünglich aus der Plasmamembran von Tumorzellen isoliert werden (Biswas et al. 1995). In der Regel wird Emmprin von Tumorzellen gebildet, wohingegen MMPs von Stromazellen synthetisiert werden (Tang Y et al. 2004). Transkripte von Emmprin wurden jedoch auch in Stromazellen von Ovarial- und Mammakarzinomen detektiert (Dalberg et al. 2000, Davidson et al. 2003).

Emmprin ist an zahlreichen physiologischen Körperfunktionen beteiligt: Es nimmt an immunologischen Zellinteraktionen teil (Koch et al. 1999, Cho et al. 2001), wirkt als Prozessvermittler bei Virusinteraktionen (Pushkarsky et al. 2001), vermittelt Zell-Zell-Interaktionen bei der Entwicklung des Nervensystems (Fadool u. Linser 1993), ist mitverantwortlich für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der Blut-/Hirnschranke (Schlosshauer 1993, Sameshima et al. 2003) und spielt eine wichtige Rolle bei der Fortpflanzung (Spermatogenese und Befruchtung) (Igakura et al. 1998, Kuno et al. 1998).

Emmprin ist außerdem an vielen pathophysiologischen und tumorbiologischen Funktionen beteiligt. Emmprin erleichtert die Tumorzellmotilität durch seine anti-adhäsions- und motilitätsverstärkenden Eigenschaften (Bordador et al. 2000).

Es spielt höchstwahrscheinlich eine zentrale Rolle beim Vorgang der Metastasierung: Emmprin konnte bei den meisten Brustkrebsmikrometastasen, die aus dem Knochenmark isoliert werden konnten, ohne dass eine Metastase bekannt war, auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden (Pantel u. Brakenhoff 2004, Reimers et al. 2004).

Weiterhin steuert es - wenigstens zum Teil - die Wechselwirkung zwischen Tumorzellen und Stromazellen (Tang Y et al. 2004). Humane Brustkrebszelllinien (MDA-MB-436), die zur erhöhten Emmprin-Expression gezüchtet wurden, teilen sich schneller und besitzen ein erhöhtes Invasionspotenzial (Zucker et al. 2001). Die Funktion von Emmprin ist eng an seinen Glykosylierungszustand gekoppelt: Nur stark glykosylierte Moleküle sind

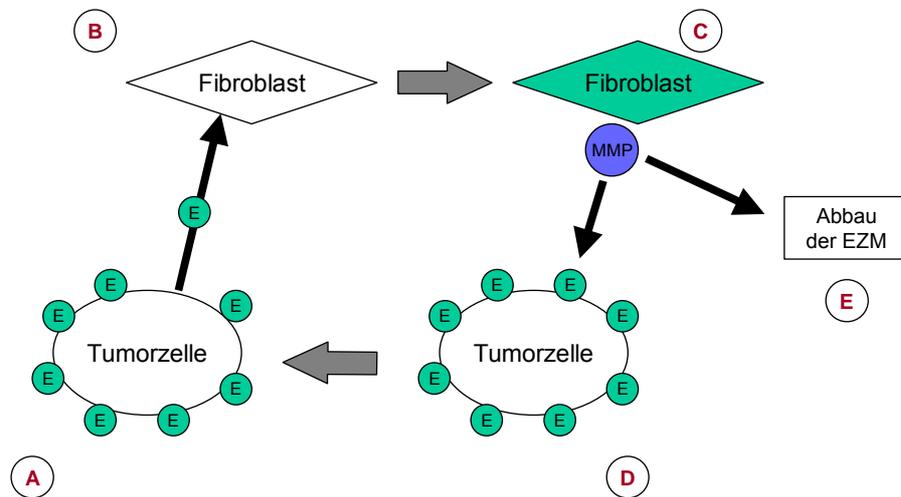
in der Lage, MMP-Synthese zu stimulieren (Guo et al. 1997, Sun u. Hemler 2001).

Emmprin ist für die Stimulation der MMP-Synthese mitverantwortlich. Transfektionierte Zellen oraler/oropharyngealer Karzinome, die vermehrt Emmprin bilden, stimulieren die MMP-Expression von co-kultivierten Fibroblasten, was für die Tumorzellinvasion wichtig ist (Rosenthal et al. 2005). Emmprin kann die Synthese vieler MMPs in Fibroblasten stimulieren: MMP-1, -2, -3, -9, -14, -15, pro MMP-2-Aktivatoren, MT1- und MT2-MMP (Kataoka et al. 1993, Guo et al. 1997, Lim et al. 1998, Bordador et al. 2000, Sameshima et al. 2000, Kanekura et al. 2002, Tang Y et al. 2004). Auch stimuliert Emmprin die MMP-Synthese in Endothelzellen. Diesen Einfluss auf die Angiogenese bestätigte die Studie von Tang ZG et al. 2005, die zeigen konnte, dass Emmprin aus Tumorzellen die Wechselwirkung von Tumor und Stroma beeinflusst, indem es die VEGF- und die MMP-Expression stimuliert. Die offensichtliche Folge der emmprinabhängigen MMP-2-Stimulation ist außerdem die MMP-2 abhängige Tumorzellinvasion (Sun u. Hemler 2001).

In Tumoren stimuliert Emmprin höchstwahrscheinlich die Expression von MMPs in Stromazellen und Endothelzellen aber auch in Tumorzellen. Das geschieht durch homophile Wechselwirkung zwischen Emmprinmolekülen und benachbarten Zellen (Yan et al. 2005). Freies Emmprin übt seine Wirkung parakrin auf Stromazellen aus, die sich in angrenzenden aber auch in entfernteren Geweben befinden. Dadurch wird die Expression von MMPs und auch die von Emmprin stimuliert (Autostimulation), was einen Beitrag zur Angiogenese, zum Tumorwachstum und zur Metastasierung darstellt. Diese Autostimulation wurde in der Studie nachgewiesen, bei der die Kultivierung von Emmprin positiven Tumorzellen zusammen mit Fibroblasten zu einer Stimulierung der Emmprin-, MMP-2- und MMP-9-Synthese führte. Die Synthese war emmprinabhängig. Damit konnte gezeigt werden, dass Emmprin seine eigene Expression fördert. Zusätzlich führt eine erhöhte MMP-Expression im Tumorgewebe zur Spaltung von membranassoziiertem Emmprin und setzt es dadurch frei. Dazu wurde ein Modell konstruiert, bei dem Emmprin einerseits sich selbst durch einen Positiv-Feedback-Mechanismus über seinen Gegenrezeptor in Fibroblasten kontrolliert und wo andererseits freies Emmprin

einen Einfluss auf die Emmprin-Expression in den Fibroblasten ausübt (Tang Y et al. 2004).

**Emmprin
Tumor-Stroma Interaktionen (in Anlehnung an Tang Y et al. 2004)**



- A: Emmprin wird u.a. von Tumorzellen synthetisiert
 - B: freies Emmprin bindet an Fibroblasten
 - C: Emmprin stimuliert die MMP-Synthese in Fibroblasten
 - D: MMP spaltet gebundenes Emmprin von Tumorzelle ab
 - E: MMP baut EZM ab
- (E: Emmprin; MMP: Matrix-Metalloproteinase, EZM: Extrazelluläre Matrix)

Zu den potenziellen Regulatoren, die Emmprin und sein MMP-Aktivierungspotenzial beeinflussen, gehören u.a. Wachstumsfaktoren und Hormone, der Grad der Glykosylierung und Membranabschnürung (membrane shedding) (Gabison et al. 2005).

Der Mechanismus, der der Emmprinregulation zugrunde liegt, ist noch nicht vollständig geklärt. Allerdings haben die meisten malignen wie benignen Tumore, die häufig Emmprin synthetisieren, sehr oft erhöhte EGFR-Werte (epithelial growth factor receptor). Das trifft auch für orale Plattenepithelkarzinome zu (Bei 2001, Eriksen 2004, Vlachtsis 2005).

Eine weitere Glykosylierung und damit eine MMP-Induktion verhindert Caveolin-1 (Tumorsuppressorprotein, integrales Membranprotein), indem es an schwach glykosyliertes Emmprin andockt (Tang W u. Hemler 2004, Tang Y et al. 2004). Funktionsblockierende Antikörper gegen Emmprin verhindern in Plattenepithelkarzinomen signifikant die Zellmigration an Tenascin-C und

Fibronektin genauso wie die Invasion durch eine rekonstruierte Basalmembran (Bordador et al. 2000).

Die vorliegenden Patientenfälle wurden hinsichtlich der Emmprin-Expression mit der Immunhistochemie (IHC) untersucht. Es wurden 89 Fälle untersucht, von denen 19 Fälle eine LK-Metastase aufwiesen. In den folgenden Geweben wurde Emmprin im eigenen Untersuchungsmaterial mit abnehmender Stärke exprimiert: Plattenepithelkarzinom, Plattenepitheldysplasie, normales Plattenepithel und LK-Metastasen. Emmprin wurde jeweils in den Zellmembranen exprimiert. Dabei wurde gezeigt, dass die Expression innerhalb des Epithels in der Basalzellschicht jeweils stärker war als im Bereich der Intermediär-/Superficialzellen. In den letztgenannten Zellen wurde besonders im Tumorepithel eine starke Expression nachgewiesen, während im normalen Epithel in erster Linie die Basalzellschicht die stärkste Expression zeigte. Bordador et al. (2000) wiesen nach, dass Emmprin in der Zellmembran in der ganzen Läsion oraler/oropharyngealer Plattenepithelkarzinome exprimiert wurde. Ein Anstieg der Expression vom normalen Epithel über die dysplastischen Epithelzellen zum Tumorepithel ließ sich im eigenen Untersuchungsgut insgesamt kaum feststellen. Nur etwa ein Drittel der Fälle (23) wiesen eine ansteigende Expression auf. Weiterhin wurde nur bei 20 Fällen (30%) in den Tumorzellen eine stärkere Expression nachgewiesen als in den normalen Epithelzellen. Der Unterschied zwischen Tumorepithel und dysplastischem Epithel war noch geringer. Gerade einmal bei 7 Fällen (21%) wurde im Tumorepithel eine stärkere Expression nachgewiesen. Es konnte aber die Tendenz gezeigt werden, dass Emmprin bei den Fällen besonders stark in den Tumorzellen exprimiert wurde, bei denen auch MMP-1 in den Tumorzellen exprimiert wurde. Während dieses für eine gegenseitige Verstärkung der beiden Proteine spricht, scheint Emmprin insgesamt nur ein Faktor unter vielen anderen zu sein. Emmprin wurde zwar mit erhöhter Expression nachgewiesen, jedoch waren quantitativ keine großen Unterschiede in den verschiedenen Geweben zu erkennen. Auch in vielen anderen untersuchten Tumoren wurde Emmprin erhöht exprimiert (Riethdorf S et al. 2006). Daher scheint Emmprin als Marker in oralen/oropharyngealen Tumoren nicht aussagekräftiger zu sein als in anderen Tumoren.

Emmprin wurde bei fast allen Fällen (82 Fälle, 99%) in den Tumorzellen sowie in den angrenzenden Stromazellen (84 Fälle, 100%) nachgewiesen. Zum gleichen Ergebnis kamen auch verschiedene Studien, die zeigen konnten, dass Emmprin in Tumorepithelzellen verschiedener Tumorarten stärker exprimiert wurde als in normalen Epithelzellen (Ellis et al. 1989, Muraoka et al. 1993, Polette et al. 1997, van den Oord et al. 1997, Kanekura et al. 2002). Auch Bordador et al. 2000 wiesen u.a. mit der IHC erhöhte Expressionswerte von Emmprin in oralen/oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen nach. Die Ergebnisse ermittelten sie anhand von jeweils 6 Fällen mit Plattenepithelkarzinomen bzw. normaler Mukosa. Laut dieser Studie erleichtert Emmprin die Tumorzellmotilität und vermittelt die Tenascin-C-Matrix Deposition. Auch Vigneswaran et al. 2006 zeigten, dass die Emmprin-Expression in primären und metastasierten Tumorzellen deutlich höher ist verglichen mit der Expression in normalen Epithelzellen. Die Karzinomzellen zeigen eine starke Zelloberflächenexpression von Emmprin.

Die Expression von Emmprin wurde im eigenen Untersuchungsmaterial in den Karzinomzellen stärker nachgewiesen als in den peritumorösen Stromazellen. Wie oben bereits erwähnt, beschrieben auch Tang Y et al. 2004, dass Emmprin in den meisten Fällen in Tumorzellen stärker exprimiert wird als in den benachbarten Stromazellen.

Zusätzlich zu den vergleichbaren Ergebnissen in anderen Studien, konnte außerdem eine höhere Expression im peritumorösen Stroma verglichen mit dem Stroma des normalen Epithels ermittelt werden.

In den dysplastischen Epithelzellen konnte in allen Fällen (34) eine etwa gleich starke Emmprin-Expression wie in den Karzinomzellen nachgewiesen werden. Auch Vigneswaran et al. 2006 konnten zeigen, dass die Emmprin-Expression in prämaligen Zellen stärker ist als in normalen Epithelzellen. Daher vermuteten sie, dass die Emmprin-Expression eine Rolle in der frühen Tumorentwicklung spielt. Ferner stellten sie fest, dass in prämaligen Zellen und in Plattenepithelkarzinomen sowohl hoch als auch niedrig glykosylierte Formen von Emmprin vorliegen. Die Freisetzung von Emmprin erfolgt ihren Untersuchungen nach aber nur von Karzinomzellen und nicht von prämaligen Zellen.

In den normalen Epithelzellen wurde Emmprin in fast allen Fällen (67 Fälle, 99%) exprimiert. Es wurde aber eine etwas schwächere Expression als in den Plattenepithelkarzinomen und den Plattenepitheldysplasien nachgewiesen. Dieses Ergebnis entspricht den Resultaten der bereits genannten Studien (Ellis et al. 1989, Muraoka et al. 1993, Polette et al. 1997, van den Oord et al. 1997, Kanekura et al. 2002, Vigneswaran et al. 2006).

Die Expression war im Stroma in den meisten Fällen (47 Fälle, 72%) zwar schwach, dennoch konnte bei einigen Fällen eine mittelstarke Expression nachgewiesen werden. Unter den Fällen mit mittelstarker Emmprin-Expression (17 Fälle) in den Stromazellen des normalen Epithels gab es mehr Fälle (4 Fälle, 24%) mit erhöhter MMP-1-Expression (mittelstark/stark) (IHC) ebenfalls im Stroma des normalen Epithels im Vergleich zu den Fällen mit schwacher bzw. ohne Emmprin-Expression (1 Fall, 2%). Im Stroma der normalen Schleimhaut konnte also eine leichte Tendenz ausgemacht werden: Je mehr Fälle mit erhöhter Emmprin-Expression auftraten, desto mehr Fälle traten auch mit erhöhter MMP-1-Expression auf. Eine Gesetzmäßigkeit lässt sich hieraus jedoch noch nicht ableiten. Immerhin lässt sich aber aufgrund dieses Ergebnisses vermuten, dass Emmprin die Synthese von MMP-1 stimuliert (Biswas 1995, Guo 1997, Lim 1998).

Emmprin wurde zwar in fast allen LK-Metastasen (18 Fälle, 95%) exprimiert, es wurde aber eine schwächere Expression als im normalen Plattenepithel nachgewiesen. Vigneswaran et al. 2006 berichteten dagegen neben einer starken Emmprin-Expression in den Karzinomzellen der Primärtumoren auch von einer starken Expression in den metastasierten Karzinomzellen. Ebenso wiesen sie in metastasierten Karzinomzellen eine erhöhte Expression im Vergleich zu normalen Epithelzellen nach. Daher vermuteten sie, dass die erhöhte Emmprin-Expression eine Rolle in der frühen Tumorentwicklung spielt. Aufgrund der eigenen Ergebnisse kann diese Vermutung nicht gestützt werden.

6. Zusammenfassung

Die Fähigkeit von Tumoren, das umliegende Gewebe zu infiltrieren und Metastasen zu bilden, ist ein Merkmal malignen Zellwachstums. Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) nehmen beim Prozess der Invasion und Metastasierung wahrscheinlich eine Schlüsselrolle ein. Die Expression der MMPs wird zum Teil durch das Glykoprotein Emmprin (extracellular matrix metalloproteinase inducer) stimuliert. In oralen/oropharyngealen Karzinomen konnte in verschiedenen Studien eine erhöhte Expression dieser Proteine nachgewiesen werden. Vergleichende Analysen unter Einbeziehung der angrenzenden Schleimhaut und Lymphknoten mit und ohne Metastasen fehlen jedoch. Von insgesamt 89 Fällen mit oralen/oropharyngealen Karzinomen wurde daher die Expression von MMP-1, -2, -3 und EMMPRIN mittels Immunhistochemie (IHC) und RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierung (ISH) in den oben genannten Geweben untersucht. MMP-1 konnte sowohl mit der IHC als auch mit der ISH in epithelial differenzierten Zellen (besonders Tumorzellen) und in Stromazellen nachgewiesen werden. Während mit der immunhistochemischen Methode eine etwas stärkere Expression ermittelt wurde, zeigte sich insgesamt ein sehr heterogenes Expressionsmuster. Da die MMP-1-Transkripte (ISH) fast nur im Karzinom nachgewiesen wurden, wird die Expression hier vermutlich angeschaltet. MMP-2-Transkripte wurden vor allem im peritumorösen Stroma, zum Teil aber auch im Stroma der LK-Metastasen nachgewiesen. Auch hier konnte kein einheitliches Expressionsmuster ermittelt werden, jedoch bei fast allen Fällen eine Zunahme der Expression von der tumorfreien Schleimhaut zum Karzinom hin. MMP-3 wurde nur in wenigen Karzinomen exprimiert. Emmprin wurde sowohl in den epithelial differenzierten Zellen als auch in den Stromazellen häufig stark exprimiert. In nur 34% der Fälle konnte ein Anstieg der Expression von der tumorfreien Schleimhaut über die Schleimhaut mit Dysplasien zum Karzinom nachgewiesen werden. Bezüglich einer Abhängigkeit von klinisch und/oder pathologischen Parametern wurden bei keinem Protein signifikante Unterschiede in der Expression ermittelt.

Eine wichtige Aufgabe für die Zukunft ist es, die Erforschung des Tumorverhaltens bezüglich des Einflusses dieser Proteine wie auch anderer Marker zu intensivieren.

7. Literaturverzeichnis

Baker EA, Leaper DJ, Hayter JP, Dickenson AJ (2005) The matrix metalloproteinase system in oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg.* Dec 7

Basbaum CB, Werb Z (1996) Focalized proteolysis: spatial and temporal regulation of extracellular matrix degradation at the cell surface. *Curr. Opin. Cell Biol* 8: 731-738

Bei R, Pompa G, Vitolo D, Moriconi E, Ciocci L, Quaranta M, Frati L, Kraus MH, Muraro R (2001) Co-localization of multiple ErbB receptors in stratified epithelium of oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* 195(3):343-348

Benbow U, Schoenermark MP, Mitchell TI, Rutter JL, Shimokawa K, Nagase H, Brinckerhoff CEA (1999) A novel host/ tumor cell interaction activates matrix metalloproteinase 1 and mediates invasion through type I collagen. *J Biol Chem* 274: 25371-25378

Bertz J, Giersiepen K, Haberland J, Hentschel S, Kaatsch P, Katalinic A, Stabenow R, Stegmaier C, Ziegler H (2006) Krebs in Deutschland – Häufigkeiten und Trends. In: Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI (Hrsg.) 5.überarbeitete aktualisierte Ausgabe, Saarbrücken

Bier J (1991) Tumoren im Mund-Kiefer-Gesichtsbereich. In: H.-H.Horch (Hrsg.) *Praxis der Zahnheilkunde; MKG-Chirurgie II.* Urban&Schwarzenberg, München Wien Baltimore p 271-296

Bier J (1998) Tumoren im Mund-Kiefer-Gesichtsbereich. In: H.-H.Horch (Hrsg.) *Praxis der Zahnheilkunde; MKG-Chirurgie II.* Urban&Schwarzenberg, München Wien Baltimore p 269-280

Birchmeier C, Birchmeier W (1993) Molecular aspects of mesenchymal-epithelial interactions. *Annu Rev Cell Biol* 9: 511-540

Birchmeier W, Weidner KM, Behrens J (1992) Molecular aspects of the invasion of carcinoma cells. In: Rabes H, Peters PE, Munk K (Hrsg.) *Metastasis: basic research and its clinical applications.* Karger, Basel p95-107

Birkedal-Hansen B, Pavelic ZP, Gluckman JL, Stambrook P, Li YQ, Stetler-Stevenson WG (2000) MMP and TIMP gene expression in head and neck squamous cell carcinomas and adjacent tissues. *Oral Dis* 6(6):376-382

- Biswas** C, Zhang Y, DeCastro R, Guo H, Nakamura T, Kataoka H, Nabeshima K (1995) The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res* 55: 434-439
- Bordador** LC, Li X, Toole B, Chen B, Regezi J, Zardi L, Hu Y, Ramos DM (2000) Expression of Emmprin by oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 85: 347-352
- Brooks** PC et al. (1996) Localisation of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin $\alpha v \beta 3$. *Cell* 85: 683-693
- Brummer** O, Athar S, Riethdorf L, Loning T, Herbst H (1999) Matrix-metalloproteinases 1, 2, and 3 and their tissue inhibitors 1 and 2 in benign and malignant breast lesions: an in situ hybridization study. *Virchows Arch.* 435(6):566-73
- Brünner** N, Jorgen H, Hamers M, Christensen IJ, Thorlacius-Ussing O, Stephens RW (1999) The urokinase plasminogen activator receptor in blood from healthy individuals and patients with cancer. *APMIS* 107: 160-167
- Cazorla** M, Hernandez L, Nadal A (1998) Collagenase-3 expression is associated with advanced local invasion in human squamous cell carcinomas of the larynx. *J Pathol* 186: 144-150
- Chambers** AF, Matrisian LM (1997) Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 89:1260-1270
- Chen** WT (1996) Proteases associated with invadopodia, and their role in degradation of extracellular matrix. *Enzyme Protein* 49: 59-71
- Cho** JY, Fox DA, Horejsi V et al (2001) The functional interactions between CD98, beta 1-integrins, and CD147 in the induction of U937 homotypic aggregation. *Blood* 98:374-382
- Coussens** LM, Werb Z (1996) Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *Chem.Biol.* 3: 895-904
- Crowley** CW, Cohen RL, Lucas BK, Liu G, Suhman MA, Levinson AD (1993) Prevention of metastasis by inhibition of the urokinase receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 5021-5025
- Cullen** JW, Blot W, Henningfield J, Boyd G, Mecklenburg R, Massey MM (1986) Health consequences of using smokeless tobacco: summary of the

Advisory Committee's report to the Surgeon. General Public Health Rep 101:355-373

Dalberg K, Eriksson E, Enberg U et al. (2000) Gelatinase A, membrane type 1 matrix metalloproteinase, and extracellular matrix metalloproteinase inducer mRNA expression: correlation with invasive growth of breast cancer. *World J Surg* 24: 334-340

Davidson B, Goldberg I, Berner A, Kristensen GB, Reich R (2003) EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) is a novel marker of poor outcome in serous ovarian carcinoma. *Clin & Exp Metastasis* 20:161-169

de Vicente JC, Fresno MF, Villalain L, Vega JA, Hernandez Vallejo G (2005) Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 41(3): 283-293

Deryugina EI, Ratnikov B, Monosov E, Postnova TI, DiScipio R, Smith JW, Strongin AY (2001) MT1-MMP initiates activation of proMMP-2 and integrin $\alpha v \beta 3$ promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. *Exp Cell Res* 263: 209-223

Dietz A, Rudat V, Vanselox B (1999) Prognostische Bedeutung von bFGF, VEGF und MMP-2 im Serum von Patienten mit fortgeschrittenen Kopf-Hals-Tumoren. *HNO* 47:695-701

Do NY, Lim SC, Im TS (2004) Expression of c-erbB receptors, MMPs and VEGF in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oncol Rep* 12(2):229-237 (ARA)

Duffy MJ (1998) Cancer metastasis: biological and clinical aspects. *Ir J Med Sci* 167:4-8

Dunne AA, Sesterhenn A, Gerisch A, Teymoortash A, Kuropkat C, Werner JA (2003) Expression of MMP-2, -9 and -13 in cell lines and fresh biops of squamous cell carcinomas of the upper aerodigestive tract. *Anticancer Res* 23(3B): 2233-2239

Edwards DR (2001) Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy. In: Clendeninn NJ, Appelt K (Hrsg.) Humana Press, Totowa, New Jersey, p 67-84

Egeblad M, Werb Z (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews Cancer* 2:163-176

- Egeblad** T, Tjäderhane L, Salo T (2004) Matrix metalloproteinases in oral diseases. Review article. *Oral Diseases* 10. 311-318
- Ellis** SM, Nabeshima K, Biswas C (1989) Monoclonal antibody preparation and purification of a tumor cell collagenase-stimulatory factor. *Cancer Res* 49: 3385-3391
- Eriksen** JG, Steiniche T, Askaa J, Alsner J, Overgaard J (2004) The prognostic value of epidermal growth factor receptor is related to tumor differentiation and the overall treatment time of radiotherapy in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58(2):561-566
- Fadool** JM, Linser PJ (1993) 5A11 antigen is a cell recognition molecule which is involved in neuronal-glia interactions in avian neural retina. *Dev Dyn* 196: 252-262
- Fang** J, Shing Y, Wiederschain D, Yan L, Butterfield C, Jackson G, Harper J, Tamvakopoulos G, Moses MA (2000) Matrix metalloproteinase-2 is required for the switch to the angiogenic phenotype in a tumor model. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 3884-3889
- Fisher** C, Gilberston-Beadling S, Powers EA, Petzold G, Poorman R, Mitchell MA (1994) Interstitial collagenase is required for angiogenesis in vitro. *Dev Biol* 162: 499-510
- Fossum** S, Mallett S, Barclay AN (1991) The MRC OX-47 antigen is a member of the immunoglobulin superfamily with an unusual transmembrane sequence. *Eur J Immunol* 21:671-679
- Friedrich** RE, Bartel-Friedrich S, Plambeck K, Bahlo M, Klapdor R (1997) p53 auto-antibodies in the sera of patients with oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 17 4B:3183-3184
- Friedrich** RE, Giese M, Riethdorf S, Löning T (2000) p53-mutation in smears of oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 20 6D:4927-4930
- Friedrich** RE, Krüll A, Schwarz R, Thurmann H, Plambeck K, Schmelzle R (1997) Salvage therapy of advanced squamous cell carcinoma of the mouth cavity and oropharynx. Results of interstitial high-dose-rate brachytherapy combined with ablative tumor surgery. *Strahlenther Onkol.* 173 10:507-512
- Gabison** E, Hoang-Xuan T, Mauviel A, Menashi S (2005) EMMPRIN/CD147, an MMP modulator in cancer, development and tissue repair. *Biochimie* 87(3-4):361-368

- Gao** ZB, Duan YQ, Zhang L, Chen DW, Ding PT (2005) Expression of matrix metalloproteinase 2 and its tissue inhibitor in oral squamous cell carcinoma. *16(4):599-603*
- Giannelli** G, Falk-Marzillier J, Schiraldi O, Stetler-Stevenson WG, Quaranta V (1997) Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. *Science 277: 225-228*
- Gohji** K, Fujimoto N, Hara I (1998) Serum matrix metalloproteinase-2 and its density in men with prostate cancer as a new predictor of disease extension. *Int J Cancer 79:96-101*
- Gray** ST, Wilkens RJ, Yun K (1992) Interstitial collagenase gene expression in oral squamous cell carcinoma. *Am J Pathol 141: 301-306*
- Günthert** U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zöller M, Haußmann I, Matzku S, Wenzel A, Ponta H, Herrlich P (1991) A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell 65: 13-24*
- Guo** H, Li R, Zucker S, Toole BP (2000) EMMPRIN (CD147), an Inducer of Matrix Metalloproteinase synthesis, also binds interstitial collagenase to the tumor cell surface. *Cancer Res 60: 888-891*
- Guo** H, Zucker S, Gordon MK, Toole BP, Biswas C (1997) Stimulation of matrix metalloproteinase production by recombinant extracellular matrix metalloproteinase inducer from transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem 272: 24-27*
- Hanahan** D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell 100: 57-70*
- Heppner** K, Matrisian LM, Jensen RA, Rodgers WH (1996) Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response. *Am J Pathol 149: 273-282*
- Hoffmann** HT, Karnell LH, Funk GF, Robinson RA, Menck HR (1998) The National Cancer Data Base report on cancer of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg 124:951-962*
- Hong** SD, Hong SP, Lee JI, Lim CY (2000) Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oral squamous cell carcinomas with regard to the metastatic potential. *Oral Oncol 36(2):207-213*
- Hunter** K, Parkinson E, Harrison P (2005) Profiling early head and neck cancer. *Nature reviews 5:127-135*

Huthala P, Chow LT, Tryggvason K (1990) Structure of human type IV collagenase gene. *J Biol Chem* 265:11077-11082

Igakura T, Kadomatsu K, Kaname T, Muramatsu H, Fan QW, Miyauchi T, Toyama Y, Kuno N, Yuasa S, Takahashi M, Senda T, Taguchi O, Yamamura K, Arimura K, Muramatsu T (1998) A null mutation in basigin, an immunoglobulin superfamily member, indicates its important roles in peri-implantation development and spermatogenesis. *Dev Biol* 194: 152-165

Ikebe T, Shinohara M, Takeuchi H (1999) Gelatinolytic activity, of matrix metalloproteinase in tumor tissues correlates with the invasiveness of oral cancer. *Clin Exp Metastasis* 17:315-323

Imanishi Y, Fujii M, Tokumaru Y, Tomita T, Kanke M, Kanzaki J, Kameyama K, Otani Y, Sato H (2000) Clinical significance of expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase and matrix metalloproteinase-2 in human head and neck squamous cell carcinoma. *Hum Pathol* 31: 895-904

Ito H, Hatori M, Kinugasa Y, Irie T, Tachikawa T, Nagumo M (2003) Comparison of the expression profile of metastasis-associated genes between primary and circulating cancer cells in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 23(2B):1425-1431

Johnsen M, Lund LR, Romer J, Almholt K, Dano K (1998) Cancer invasion and tissue remodelling: common themes in proteolytic matrix degradation. *Curr Opin Cell Biol* 10: 667-671

Johnson JP, Stade BG, Holzmann B, Schwäble W, Riethmüller G (1989) De novo expression of intercellular adhesion molecule 1 in melanoma correlates with increased risk of metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 641-644

Jordan RC, Macabeo-Ong M, Shiboski CH, Dekker N, Ginzinger DG, Wong DT, Schmidt BL (2004) Overexpression of matrix metalloproteinase-1 and -9 mRNA is associated with progression of oral dysplasia to cancer. *Clin Cancer Res* 10(19):6460-6465

Kajita M, et al. (2001) Membrane-type-1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Cell Biol* 153: 893-904

Kanekura T, Chen X, Kanzaki T (2002) Basigin (CD147) is expressed on melanoma cells and induces tumor cell invasion by stimulating production of matrix metalloproteinases by fibroblasts. *Int J Cancer* 99:520-528

- Kasinrerk** W, Fiebiger E, Stefanova I, Baumruker T, Knapp W, Stockinger H (1992) Human leukocyte activation antigen M6, a member of the Ig superfamily, is the species homologue of rat OX-47, mouse basigin, and chicken HT7 molecule. *J Immunol* 149:847-854
- Kataoka** H, DeCastro R, Zucker S, Biswas C (1993) Tumor cell-derived collagenase-stimulatory factor increases expression of interstitial collagenase, stromelysin, and 72-kDA gelatinase. *Cancer Res* 53:3154-3158
- Kato** K, Hara H, Kuno T, Kitaori N, Huilan Z, Mori H, Toida M, Shibata T (2005) Matrix metalloproteinase 2 and 9 in oral squamous cell carcinomas: manifestation and localization of their activity. *J Cancer Res Clin Oncol.* 131(6):340-346
- Kawamata** H, Nakashiro K, Uchida D (1997) Possible contribution of active MMP2 to lymph-node metastasis and secreted cathepsin L cell lines. *Int J Cancer* 70: 120-127
- Kawamata** H, Uchida D, Hamano H, Kimura-Yanagawa T, Nakashiro KI, Hino S, Omotehara F, Yoshida H, Sato M (1998) Active-MMP-2 in cancer cell nests of oral cancer patients: correlation with lymph node metastasis. *Int J Oncol* 13(4):699-704
- Kawata** R, Shimada T, Maruyama S, Hisa Y, Takenaka H, Murakami Y (2002) Enhanced production of matrix metalloproteinase-2 in human head and neck carcinomas is correlated with lymph node metastasis. *Acta Otolaryngol* 122(1):101-106
- Kinugasa** Y, Hatori M, Ito H, Kurihara Y, Ito D, Nagumo M (2004) Inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses invasiveness of oral squamous cell carcinoma cell lines via down-regulation of matrix metalloproteinase-2 and CD44. *Clin Exp Metastasis* 21(8):737-745
- Koch** C, Staffler G, Huttinger R et al (1999) T cell activation-associated epitopes of CD147 in regulation of the T cell response, and their definition by antibody affinity and antigen density. *Int Immunol* 11:777-786
- Koshikawa** N, Giannelli G, Cirulli V, Miyazaki K, Quaranta V (2000) Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin 5. *J Cell Biol* 146: 615-624
- Kuno** N, Kadomatsu K, Fan QW, Hagihara M, Senda T, Mizutani S, Muramatsu T (1998) Femal sterility in mice lacking the basigin gene, which encodes a

transmembrane glycoprotein belonging to the immunoglobulin superfamily. FEBS Lett 425: 191-194

Kurahara S, Shinohara M, Ikebe T (1999) Expression of MMPs, MT-MMP, and TIMPs in squamous cell carcinomas of the oral cavity: Correlation with tumor invasion and metastasis. Head Neck 21: 627-638

Kusukawa J, Harada H, Shima I et al. (1996) The significance of epidermal growth factor receptor and matrix metalloproteinase-3 in squamous cell carcinomas of the oral cavity. Eur J Cancer B Oral Oncol 32B: 217-221

Kusukawa J, Sasaguri Y, Morimatsu M, Kameyama T (1995) Expression of matrix metalloproteinase-3 in stage I and II squamous cell carcinoma of the oral cavity. J Oral Maxillofac Surg 53:530-534

Kusukawa J, Sasaguri Y, Shima I et al. (1992) Production of matrix metalloproteinase 2 (gelatinase/ type IV collagenase) and 3 (stromelysin) by cultured oral squamous cell carcinomas. J Oral Pathol Med 21: 221-224

Lim M, Martinez T, Jablons D, Cameron R, Guo H, Toole B, Li J, Basbaum C (1998) Tumor-derived EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) stimulates collagenase transcription through MAPK p38. FEBS Lett 441: 88-92

Liotta LA, Rao CN, Wewer UM (1986) Biochemical interactions of tumor cells with the basement membrane. Annu Rev Biochem 55: 1037-1057

Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson S (1991) Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. Cell 64: 327-336

Liu G, Li J, Li Z, Chen X (2001) The effects of MMPs and TIMPs on the metastasis of oral squamous cell carcinoma to neck lymph nodes. Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi 19(4):216-218, 224

Liu LK, Li YN, Jiang HB, HE ZX, Yi XZ (2004) The correlation between neck lymph node metastasis and matrix metalloproteinase-2 expression at the invasive tumor front of oral squamous cell carcinomas. Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi 22(2):106-108

Look MP, Foekens JA (1999) Clinical relevance of the urokinase plasminogen activator system in breast cancer. APMIS 107(1): 150-159

MacDougall JR, Matrisian LM (1995) Contributions of tumor and stromal matrix metalloproteinases to tumor progression, invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 14: 351-362

Mars W, Zarnegar R, Michalopoulos GK (1993) Activation of hepatocyte growth factor by the plasminogen activators uPA and tPA. *Am J Pathol* 143: 949-958

Matrisian LM, Glaichenhaus N, Gesnel MC, Breathnach R (1985) Epidermal growth factor and oncogenes induce transcription of the same cellular mRNA in rat fibroblasts. *EMBO J* 4:1435-1440

Mayer B, Jauch KW, Günthert U, Figdor CG, Schildberg FW, Funke I, Johnson JP (1993) De novo expression of CD44 in gastric cancer correlates with increased mortality. *Lancet* 342: 1019-1022

Mayer B, Johnson JP, Leitl F, Jauch KW, Heiss MM, Schildberg FW, Birchmeier W, Funke I (1993) E-cadherin expression in primary and metastatic gastric cancer: downregulation correlates with cellular dedifferentiation and glandular disintegration. *Cancer Res* 53: 1690-1695

Miyajima Y, Nakano R, Morimatsu M (1995) Analysis of expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 in hypopharyngeal squamous cell carcinoma by in situ hybridisation. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 104: 678-684

Miyauchi T, Kanekura T, Yamaoka A, Ozawa M, Miyazawa S, Muramatsu T (1990) Basigin, a new, broadly distributed member of the immunoglobulin superfamily, has strong homology with both the immunoglobulin V domain and the β -chain of major histocompatibility complex class II antigen. *J Biochem* 107:316-323

Moilanen M, Sorsa T, Stenman M et al (2003) Tumor-associated trypsinogen-2 (trypsinogen-2) activates procollagenases (MMP-1, -8, -13) and stromelysin-1 (MMP-3) and degrades type I collagen. *Biochemistry* 42:5414-5420

Morrison CJ et al. (2001) Cellular activation of MMP-2 (Gelatinase A) by MT2-MMP occurs via a TIMP-2-independent pathway. *J Biol Chem* 276: 47402-47410

Muller D, Breathnach R, Engelmann A (1991) Expression of collagenase-related metalloproteinase genes in human lung or head and neck tumors. *Int J Cancer* 48: 550-556

- Muller D, Wolf C, Abecassis J (1993)** Increased stromelysin 3 gene expression is associated with increased local invasiveness in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Res* 53: 165-169
- Muraoka K, Nabeshima K, Murayama T, Biswas C, Kono M (1993)** Enhanced expression of a tumor-cell-derived collagenase-stimulatory factor in urothelial carcinoma: its usefulness as a tumormarker for bladder cancers. *Int J Cancer* 55: 19-26
- Nagata M, Fujita H, Ida H, Hoshina H, Inoue T, Seki Y, Ohnishi M, Ohyama T, Shingaki S, Kaji M, Saku T, Takagi R (2003)** Identifikation of potential biomarkers of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma by cDNA microarray analysis. *Int J Cancer* 20;106(5):683-689
- Nakahara H, Howard L, Thompson E, Sato H (1997)** Transmembrane/cytoplasmic domain-mediated membrane type 1-matrix metalloproteinase docking to invadopodia is required for cell invasion. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 7959-7964
- Nekarda H, Schmitt M, Ulm K, Wenninger A, Vogelsang H, Becker K, Roder J, Fink U, Siewert JR (1994)** Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in completely resected gastric cancer. *Cancer Res* 54: 2900-2907
- Nyberg P, Heikkila P, Sorsa T, Luostarinen J, Hejasvaara R, Stenman UH, Pihlajaniemi T, Salo T (2003)** Endostatin inhibits human tongue carcinoma cell invasion and intravasation and blocks the activation of matrix metalloproteinase-2, -9, and -13. *J Biol Chem* 278(25):22404-22411
- O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y et al. (1997)** Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88: 277-285
- O-Charoenrat P, Rhys-Evans PH, Eccles SA (2001)** Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 127 (7):813-820
- Olsen B, Ninomiya Y (1999)** Anchor and Adhesion Proteins. In: Kreis T, Vale R (Hrsg.) *Guidebook to the Extracellular Matrix*. Oxford Univ. Press, Oxford (UK) p 380-408
- Pantel K, Brakenhoff RH (2004)** Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 4(6):448-456

- Pantel** K, Passlick B, Vogt J, Stosiek P, Angstwurm M, Seen-Hibler R, Haussinger K, Thetter O, Izbicki JR, Riethmuller G (1998) Reduced expression of plakoglobin indicates an unfavourable prognosis in subsets of patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 16(4):1407-1413
- Patel** BP, Shah PM, Rawal UM, Desai AA, Shah SV, Rawal RM, Patel PS (2005) Activation of MMP-2 and MMP-9 in patients with oral squamous cell carcinomas. *J Surg Oncol*; May 1;90(2):81-88
- Peifer** M (1993) Cancer, catenins, and cuticle patterns: a complex connection. *Science* 262: 1667-1668
- Polette** M, Gilbert N, Stas I, Nawrocki B, Noel A, Remacle A, Stetler-Stevenson WG, Birembaut P, Foidart M (1994) Gelatinase A expression and localisation in human breast cancers. An *in situ* hybridisation study and immunohistochemical detection using confocal microscopy. *Virchows Arch* 424: 641-645
- Polette** M, Gilles C, Marchand V, Lorenzato M, Toole B, Tournier JM, Zucker S, Birembaut P (1997) Tumor collagenase stimulatory factor (TCSF) expression and localisation in human lung and breast cancer. *J Histochem Cytochem* 45: 703-709
- Poulsom** R, Pignatelli M, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Wright PA, Jeffery RE, Longcroft JM, Rogers L, Stamp GW (1992) Stromal expression of 72 kDa type IV collagenase (MMP-2) and TIMP-2 mRNAs in colorectal neoplasia. *Am J Pathol* 141: 389-396
- Pushkarsky** T, Zybarth G, Dubrovsky L et al. (2001) CD147 facilitates HIV-1 infection by interacting with virus-associated cyclophilin A. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 :6360-6365
- Ralfkiaer** PC, Huhtala P, Hurskainen T, Dano K, Tryggvason K (1992) Localization of messenger RNA for M_r 72.000 and 92.000 type IV collagenases in human skin cancers by *in situ* hybridisation. *Cancer Res* 52: 1336-1341
- Ramos** DM, But M, Regezi J, Schmidt BL, Atakilit A, Dang D, Ellis D, Jordan R, Li X (2002) Expression of integrin beta 6 enhances invasive behaviour in oral squamous cell carcinoma. *Matrix Biol* 21(3):297-307
- Reimers** N, Zafrakas K, Assmann V, Egen C, Riethdorf L, Riethdorf S, Berger J, Ebel S, Jänicke F, Sauter G, Pantel K (2004) Expression of extracellular matrix metalloproteinases inducer on micrometastatic and primary mammary carcinoma cells. *Clinical Cancer Res* 10: 3422-3428

- Remmele** W, Stegner HE (1987) Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologe* 8(3): 138-140
- Riethdorf** L, Riethdorf S, Petersen S, Bauer M, Herbst H, Jänicke F, Löning T (1999) Urokinase gene expression indicates early invasive growth in squamous cell lesions of the uterine cervix. *J Pathol*; 189 2:245-250
- Riethdorf** L, Riethdorf S, Petersen S, Löning T (2001) Expression of genes encoding components of the plasminogen activator system in squamous cell lesions of the cervix uteri. *J Cancer Res Clin Oncol* 127 (Suppl 1):64
- Riethdorf** S, Friedrich RE, Ostwald C, Barten M, Gogacz P, Gundlach KK, Schlechte H, Becker J, Bregenzner T, Riethdorf L, Löning T (1997) p53 gene mutations and HPV infections in primary head and neck squamous cell carcinomas do not correlate with overall survival: a long-term follow-up study. *J Oral Pathol Med.* 26 7:315-321
- Riethdorf** S, Friedrich RE, Sühwold J, Ostwald C, Barten M, Gogacz P, Gundlach KK, Schlechte H, Becker J, Bregenzner T, Riethdorf L, Löning T (1998) p53 mutations and HPV infections in squamous epithelial carcinomas of the head-neck region. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 21:30-34
- Riethdorf** S, Reimers N, Assmann V, Kornfeld JW, Terracciano L, Sauter G, Pantel K (2006) High incidence of EMMPRIN expression in human tumors. *Int J Cancer* 119(8):1800-1810
- Robinson** CM, Stone AM, Shields JD, Huntley S, Paterson IC, Prime SS (2003) Functional significance of MMP-2 and MMP-9 expression by human malignant oral keratinocyte cell lines. *Arch Oral Biol.* 48(11)779-786
- Rodriguez** T, Altieri A, Chatenoud L, Galindo PJ, Balsalobre MD, Parrilla P (2004) Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults. *Oral Onc* 40: 207-213
- Rosenthal** EL, Zhang W, Talbert M, Raisch KP, Peters GE (2005) Extracellular matrix metalloproteinase inducer-expressing head and neck squamous cell carcinoma cells promote fibroblast-mediated type I collagen degradation in vitro. *Mol Cancer Res* 3(4):195-202
- Ruokolainen** H, Paakko P, Turpeenniemi-Hujanen T (2006) Tissue and circulating immunoreactive protein for MMP-2 and TIMP-2 in head and neck

squamous cell carcinoma-tissue immunoreactivity predicts aggressive clinical course. *Mod Pathol* 19(2):208-217

Salo T, Liotta LA, Keski-Oja J, Turpeenniemi-Hujanen T, Tryggvason K (1982) Secretion of basement membrane collagen degrading enzyme and plasminogen activator by transformed cells—role in metastasis. *Int J Cancer* 30(5):669-673

Salo T, Liotta LA, Tryggvason K (1983) Purification and characterization of a murine basement membrane collagen-degrading enzyme secreted by metastatic tumor cells. *J Biol Chem* 258(5):3058-3063

Sameshima T, Nabeshima K, Toole BP (2000) Glioma cell extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) (CD147) stimulates production of membrane-type matrix metalloproteinases and activated gelatinase A in co-cultures with brain-derived fibroblasts. *Cancer Lett* 157:177-184

Sameshima T, Nabeshima K, Toole BP et al. (2003) Correlation of emmprin expression in vascular endothelial cells with blood-brain-barrier function: a study using magnetic resonance imaging enhanced by Gd-DTPA and immunohistochemistry in brain tumors. *Virchows Arch* 442:577-584

Sasaguri Y, Komiya S, Sugama K, Suzuki K, Inoue A, Morimatsu M, Nagase H (1992) Production of matrix metalloproteinases 2 and 3 (stromelysin) by stromal cells of giant cell tumor of bone. *Am J Pathol* 141: 611-621

Sasiki T, Timpl R (1999) Anchor and Adhesion Proteins. In: Kreis T, Vale R (Hrsg.) *Guidebook to the Extracellular Matrix*. Oxford Univ. Press, Oxford (UK) p 434-443

Schlosshauer B (1993) The blood-brain barrier: morphology, molecules, and neurothelin. *Bioessays* 15:341-346

Schlosshauer B, Bauch H, Frank R (1995) Neurothelin: amino acid sequence, cell surface dynamics and actin colocalization. *Eur J Cell Biol* 68:158-166

Schmitt M, Polednik C, Ulm K, Seiderer A, Harbeck N, Jänicke F, Graeff H (1997) Time-varying prognostic impact of tumor biological factors urokinase (uPA), PAI-1 and steroid hormone receptor status in primary breast cancer. *Br J Cancer* 76: 306-311

Schön D, Bertz J, Görsch B, Haberland J, Ziegler H, Stegmaier C, Eisinger B, Stabenow R (1999) Entwicklung der Überlebensraten von Krebspatienten in Deutschland. Verlag Robert Koch Institut: ICD 140-149

- Seulberger** H, Lottspeich F, Risau W (1990) The inducible blood-brain barrier specific molecule HT7 is a novel immunoglobulin-like cell surface glycoprotein. *EMBO J* 9:2151-2158
- Shapiro** SD (1998) Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr Opin Cell Biol* 10: 602-608
- Shimada** T, Nakamura H, Yamashita K, Kawata R, Murakami Y (2000) 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* 18(2):179-188
- Sorsa** T, Salo T, Koivunen E et al. (1997) Activation of type IV procollagenases by human tumor-associated trypsin-2. *J Biol Chem* 272: 21067-21074 (AR)
- Sorsa** T, Tjäderhane L, Salo T (2004) Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Diseases* 10: 311-318
- Sottrup-Jensen** L, Birkedal-Hansen H. (1989) Human fibroblast collagenase- α -macroglobulin interactions. Localization of cleavage sites in the bait regions of five mammalian α -macroglobulin. *J.Biol.Chem.* 264: 393-401
- Sternlicht** MD, Werb Z. (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:463-516
- Stetler-Stevenson** WG, Aznavoorian S, Liotta LA (1993) Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Ann Rev Cell Biol* 9: 541-573
- Stoker** M, Gherardi E (1991) Regulation of cell movement: the motogenic cytokines. *Biochem Biophys Acta* 1072: 81-102
- Sun** J, Hemler ME (2001) Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/ extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions. *Cancer Res* 61: 2276-2281
- Sundelin** K, Roberg K, Grenman R, Hakansson L (2005) Effects of cytokines on matrix metalloproteinase expression in oral squamous cell carcinoma in vitro. *Acta Otolaryngol.* 125(7): 765-773
- Sutinen** M, Kainulainen T, Hurskainen T (1998) Expression of matrix metalloproteinases (MMP-1 and -2) and their inhibitors (TIMP-1, -2 and -3) in oral lichen planus, dysplasia, squamous cell carcinoma and lymph node metastasis. *Br J Cancer* 77: 2239-2245

Tang W, Hemler ME (2004) Caveolin-1 regulates matrix metalloproteinases-1 induction and CD147/ EMMPRIN cell surface clustering. *J Biol Chem* 279(12):11112-11118

Tang Y, Kesavan P, Nakada MT, Yan L (2004) Tumor-Stroma interaction: positive feedback Regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) expression and matrix metalloproteinase-dependent generation of soluble EMMPRIN. *Molecular Cancer Res* 2: 73-80

Tang ZG, Li JM, Hong ZZ, Yu ZW, Liu CH (2005) Expression of matrix metalloproteinase 2 in oral verrucous carcinoma and squamous cell carcinoma. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban; Dez;* 30(6):650-652

Taraboletti G, Morbidelli L, Donnini S, Parenti A, Granger HJ, Giavazzi R, Ziche M (2000) The heparin binding 25 kDa fragment of thrombospondin-1 promotes angiogenesis and modulates gelatinase and TIMP-2 production in endothelial cells. *FASEB J* 14: 1674-1676

Thomas GT, Lewis MP, Speight PM (1999) Matrix metalloproteinase and oral cancer. *Oral Oncol* 35(3):227-233

Tokumar Y, Fujii M, Otani Y, Kameyama K, Imanishi Y, Igarashi N, Kanzaki J (2000) Activation of matrix metalloproteinase-2 in head and neck squamous cell carcinoma: studies of clinical samples and in vitro cell lines co-cultured with fibroblasts. *Cancer Lett* 150: 15-21

Tomita T, Fujii M, Tokumar Y, Imanishi Y, Kanke M, Yamashita T, Ishiguro R, Kanzaki J, Kameyama K, Otani Y (2000) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor upregulates matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and membrane type-1 MMP (MT1-MMP) in human head and neck cancer cells. *Cancer Lett.*1;156(1):83-91

Tsai CH, Hsieh YS, Yang SF, Chou MY, Chang YC (2003) Matrix metalloproteinase 2 and matrix metalloproteinase 9 expression in human oral squamous cell carcinoma and zhe effect of protein kinase C inhibitors: preliminary observations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 95(6):710-716

Valles AM, Boyer B, Badet J, Tucker GC, Barritault D, Thiery JP (1990) Acidic fibroblast growth factor is a modulator of epithelial plasticity in a rat bladder carcinoma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1124-1128

- Valles** AM, Boyer B, Tucker GC, Jouanneau J, Moens G, Thiery JP (1992) The epithelial to mesenchymal transition of rat bladder carcinoma cells: an in vitro model system to study the initial steps of cancer dissemination. In: Rabes H, Peters PE, Munk K (Hrsg.) *Metastasis: basic research and its clinical applications*. Karger, Basel p 49-55
- van den Oord** JJ, Paemen L, Opdenakker G, de Wolf-Peters C (1997) Expression of gelatinase B and the extracellular matrix metalloproteinase inducer EMMPRIN in benign and malignant pigment cell lesions of the skin. *Am J Pathol* 151: 665-670
- Vecchi** M, Rudolph-Owen LA, Brown CL, Dempsey PJ, Carpenter G (1998) Tyrosine phosphorylation and proteolysis. Pervanadate-induced, metalloprotease-dependent cleavage of the ErbB-4 receptor and amphiregulin. *J.Biol.Chem.* 273:20589-20595
- Vigneswaran** N, Beckers S, Waigel S, Mensah J, Wu J, Mo J, Fleisher KE, Bouquot J, Sacks PG, Zacharias W (2006) Increased EMMPRIN (CD 147) expression during oral carcinogenesis. *Exp Mol Pathol* 80(2):147-159
- Vlachtsis** K, Nikolaou A, Markou K, Fountzilias G, Daniilidis I (2005) Clinical and molecular prognostic factors in operable laryngeal cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 262(11):890-898
- Werb** Z (1997) ECM and cell surface proteolysis: regulating cell ecology. *Cell* 91: 439-442
- Werner** JA, Rathke IO, Mandic R (2002) The role of matrix metalloproteinases in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clinical Experimental Metastasis* 19: 275-282
- Whitham** SE, Murphy G, Angel P, Rahmsdorf HJ, Smith BJ, Lyons A, Harris TJR, Reynolds JJ, Herrlich P, Docherty AJP (1986) Comparison of the human Stromelysin and collagenase by cloning and sequence analysis. *Biochem J.* 240 (3):913-916
- Winn**, DM, Blot WJ, Shy CM, Pickle LW, Toledo A, Fraumeni JF Jr. (1981) Snuff dipping and oral cancer among women in the southern United States *N Engl J Med* 304:745-749
- Woudhouse** EC, Chuaqui RF, Liotta LA (1997) General mechanisms of metastasis. *Cancer* 80: 1529-1537

- Xu J**, Rodriguez D, Petitclerc E, Kim JJ, Hangai M, Moon YS, Davis GE, Brooks PC (2001) Proteolytic exposure of a cryptic site within collagen type IV is required for angiogenesis and tumor growth *in vivo*. *J Cell Biol* 154: 1069-1080
- Yan L**, Zucker S, Toole B (2005) Roles of the multifunctional glycoprotein, emmprin (basigin; CD147), in tumour progression. *Thromb Haemost* 93:199-204
- Yorioka CW**, Coletta RD, Alves F, Nishimoto IN, Kowalski LP, Graner E (2002) Matrix metalloproteinase-2 and -9 activities correlate with the disease-free survival of oral squamous cell carcinoma patients; *Int J Oncol* 20(1):189-194
- Yoshizaki T**, Sato H, Furukawa M (2002) Recent advances in the regulation of matrix metalloproteinase 2 activation: from basic research to clinical implication (Review) *Oncol Rep* 9(3):607-611
- Yu Q**, Starnenkovic I. (1999) Localisation of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev.*13: 35-48
- Yu W-H**, Woessner JF, McNeish JD, Starnenkovic I (2002) CD44 anchors the assembly of matrilysin/ MMP-7 with heparin-binding epidermal growth factor precursor and ErbB4 and regulates female reproductive organ remodelling. *Genes Dev.* 16: 307-323
- Zucker S**, Hymowitz M, Rollo EE, Mann R, Conner CE, Cao J et al. (2001) Tumorigenic potential of extracellular matrix metalloproteinase inducer. *Am J Pathol* 158: 1921-1928

8. Danksagung

Frau Dr. rer. nat. Sabine Riethdorf und Herrn PD Dr. med. Lutz Riethdorf danke ich für die wissenschaftliche Betreuung, besonders für die ständige Gesprächsbereitschaft sowie die immer motivierende Unterstützung bei der gesamten Arbeit.

Frau Tanja Karstens, Frau Sonja Santjer, Frau Malgorzata Stoupiec und Frau Dr. rer. nat. Kerstin Röser danke ich für die sehr geduldige Einarbeitung in die Laborarbeit und die Gestaltung eines außerordentlich angenehmen Arbeitsklimas.

Herrn Tim Poser, Herrn Dr. Reinhard Müller und Herrn Dirk Kemming danke ich für die Unterstützung bei Softwarefragen.

Herrn Dr. Bubenheim danke ich für die statistische Beratung im Institut für medizinische Biometrie und Epidemiologie des Universitätsklinikums Eppendorf.

Meinen Chefs, Herrn Dr. Hajo Wohlberg und Herrn Dr. Uwe Maaz, danke ich für alle Unterstützung in Bezug auf diese Arbeit.

Meiner lieben Frau, Christine Strutz, meiner Familie und vielen Freunden danke ich für alle tatkräftige (Korrekturlesen), geistige und geistliche Unterstützung.

9. Lebenslauf

| | |
|--------------------|---|
| 05.02.1979 | Als viertes Kind von Dr. Johannes und Ingrid Strutz in Bremen geboren |
| ab 1985 | Grundschule |
| ab 1989 | Orientierungsstufe |
| ab 1991 | Gymnasium |
| 1998 | Abitur alle Klassen wurden an der Freien evangelischen Bekenntnisschule Bremen besucht |
| Juli 1998 | |
| bis April 1999 | Wehrdienst bei der Bundeswehr |
| April 1999 | Aufnahme des Studiums der Zahnmedizin in Hamburg |
| Februar 2000 | Vorphysikum |
| Sommer 2001 | Zahnärztliche Vorprüfung (Physikum) |
| Juli bis Dez. 2004 | Staatsexamen |
| 16. Dez. 2004 | zahnärztliche Approbation |
| | Zahnärztliche Tätigkeit |
| März 2005 | |
| bis April 2006: | als Vorbereitungsassistent in der Praxis Dr. Wohlberg, Scheeßel |
| Mai 2006 | |
| bis Juni 2007 | als Vorbereitungsassistent in der Praxis Dr. Maaz, Braunschweig |
| ab Juli 2007 | zahnärztlich niedergelassen in der Gemeinschaftspraxis Dr. Maaz, Dr. Genée, Thomas Strutz |

10. 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 Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: