Aus dem Institut für Tumorbiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. K. Pantel

Nachweis der Expression ausgewählter MMPs (Matrixmetalloproteinasen) und TIMPs (Tissue Inhibitors of Matrixmetalloproteinases) in Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich der Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Stephanie Meder, geb. Kutschera

aus Stuttgart

Hamburg 2012

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 13.06.2013
Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
der Universität Hamburg
Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. K. Pantel
Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD Dr. S. Riethdorf
Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. Dr. M. Blessmann

I. Inhaltsverzeichnis

I. INHALTSVERZEICHNIS 5

II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 7

III. FRAGESTELLUNG 8

3.1. PROJEKTSKIZZE 8
3.2. FRAGESTELLUNG 9

IV. EINLEITUNG 11

4.1. MALIGNE TUMOREN DER KOPF-HALS-REGION 11
4.1.1. Ätiologie 11
4.1.2. Epidemiologie 16
4.1.3. Einteilung 17
4.1.4. Symptome und Befunde 19
4.1.5. Metastasierung und Ausbreitung 19
4.1.6. Therapie 21
4.1.7. Prognose 22
4.2. MATRIX-METALLOPROTEINASEN 24
4.2.1. Matrix-Metalloproteinasen allgemein 24
4.2.2. Struktur der Matrix-Metalloproteinasen 24
4.2.3. Einteilung und Funktion der Matrix-Metalloproteinasen 26
4.2.4. Matrix-Metalloproteinasen und Metastasierung 29
4.2.5. Regulation der Matrix-Metalloproteinasen 31
4.2.6. Gewebslokalisation von Matrix-Metalloproteinasen 33
4.2.7. Matrix-Metalloproteinase-9 35
4.3. TISSUE INHIBITORS OF METALLOPROTEINASES 36
4.3.1. Struktur der Tissue Inhibitors of Metalloproteinases 36
4.3.2. Funktion und Regulation der TIMPs 37
4.3.3. TIMP-1 39
4.3.4. TIMP-2 40
4.3.5. TIMP-3 41

V. MATERIAL UND METHODEN 44

5.1. MATERIAL 44
5.1.1. Herstellung der Sonden 44
5.1.2. Patientenmaterial 47
5.1.3. In Situ-Hybridisierung 48
5.1.4. Immunhistochemie 55
5.1.5. Verbrauchsmaterialien 56
5.2. METHODEN 57
5.2.1. Herstellung der Sonden 57
5.2.2. In Situ-Hybridisierung 68
5.2.3. Immunhistochemie 72
5.3. AUSWERTUNG 75
5.3.2. Statistische Auswertung 77
5.3.3. Auswertung der Expression von MMP-9 und TIMP-1, -2, -3 in Bezug auf klinisch-pathologische Faktoren 77

VI. ERGEBNISSE 79

6.1. MMP-9-EXPRESSION 79
6.1.1. Expressionsmuster von MMP-9 79
6.2. TIMP-1-EXPRESSION 96
6.2.1.Expressionsmuster von TIMP-1-mRNA in der in situ-Hybridisierung 96
6.2.2. Expression von TIMP-1 im Vergleich mit klinisch-pathologischen Faktoren 99
6.3. TIMP-2-EXPRESSION 105
6.3.1. Expressionsmuster von TIMP-2-mRNA in der In situ- Hybridisierung 105
6.3.2. Expression von TIMP-2 im Vergleich mit klinisch-pathologischen Faktoren 108
6.4. TIMP-3-EXPRESSION 115
6.4.1. Expressionsmuster von TIMP-3-mRNA in der in situ- Hybridisierung 115

6.4.2. Expression von TIMP-3 im Vergleich mit klinisch-pathologischen Faktoren ... *119*
6.5. VERGLEICH VON MMP-9 UND TIMP-1, -2, -3 UNTEREINANDER ... 126
6.5.1. Vergleich der MMP-9-Signale in der in situ-Hybridisierung und Immunhistochemie ... *126*
6.5.2. Expressionsmuster von MMP-9 und TIMP-1, -2, -3 in Primärtumoren ... *128*
6.5.3. Expressionsmuster von MMP-9 und TIMP-1, -2, -3 in Lymphknotenmetastasen ... *129*
6.5.4. Vergleich der Expression von MMP-9 und TIMP-1, -2, -3 ... *131*

VII. DISKUSSION ... 138

7.1. EXPRESSION VON MMPS UND TIMPS IN TUMORGEWEBEN ... 138
7.2. MMP-9 ... 138
7.2.1. Verteilungsmuster von MMP-9 ... *139*
7.2.2. MMP-9-Expression im Vergleich mit klinisch-pathologischen Faktoren ... *140*
7.2.3. Vergleich von MMP-9 und TIMP-1, -2, -3: Ist das Verhältnis zwischen Metalloproteinase und Inhibitor prognostisch entscheidend? ... *143*
7.2.4. MMP-9: Ein prognostischer Faktor im Hinblick auf Überlebens- rate und Rezidiv? ... *144*
7.3. TIMP-1 ... 145
7.3.1. Verteilungsmuster von TIMP-1 ... *146*
7.3.2. TIMP-1 im Zusammenhang mit der Metastasierung ... *146*
7.3.3. Welche Rolle spielt TIMP-1 in Bezug auf die Tumorinvasion und -aggressivität? *147*
7.4. TIMP-2 ... 149
7.4.1. TIMP-2: Marker für Aggressivität und Metastasierungspotential eines Tumors und Indikator für eine schlechte Prognose? ... *150*
7.5. TIMP-3 ... 152
7.5.1. Verteilungsmuster von TIMP-3 ... *153*
7.5.2. TIMP-3 im Vergleich mit klinisch-pathologischen Faktoren ... *154*
7.5.3. TIMP-3 und seine Funktion: prognostisch günstig? ... *155*
7.6. AUFTRETEN VORHANDENER MUSTER VON MMP-9 SOWIE TIMP-1, -2, UND -3 IM JEWEILIGEN EXPRESSIONSVERHALTEN ... 156
7.7. PROGNOSTISCHE EIGNUNG VON MMP-9 UND TIMP-1, -2, -3 ? ... 157
7.8. MMP-INHIBITOREN ALS THERAPIEANSATZ? ... 158

VIII. ZUSAMMENFASSUNG ... 160

IX. LITERATURVERZEICHNIS ... 162

X. ANHÄNGE ... 183

10.1. LEBENSLAUF ... 183
10.2. DANKSAGUNG ... 184
10.3. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG ... 185

II. Abkürzungsverzeichnis

ADAM	A Desintegrin And Metalloproteinase
bp	Basenpaar(e)
c-DNA	copy-DNA
DNA	Desoxyribonucleidacid, Desoxyribonukleinsäure
Dys	Dysplasie
EGFR	epidermal growth factor
EMMPRIN	extracellular matrix metalloproteinase inducer
EZM	Extrazelluläre Matrix
G	histologisches Grading
HNSCC	Head and Neck squamous cell carcinoma Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich
HPV	Humanes Papillomavirus
IHC	Immunhistochemie
IL-2	Interleukin-2
ISH	in situ-Hybridisierung
M	Grad der Fernmetastasierung in der pTNM-Klassifikation
N	Lymphknotenkategorie in der pTNM-Klassifikation
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	messenger RNA
OSCC	oral squamous cell carcinoma
PE	Plattenepithel
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonucleidacid, Ribonukleinsäure
SCC	Squamous cell carcinoma, Plattenepithelkarzinom
ss-DNA	Salmon sperm DNA
T	Tumorkategorie in der pTNM-Klassifikation
TACE	TNF Alpha Converting Enzyme, gleichbedeutend mit ADAM-17
TGF α	Transforming Growth Factor Alpha
TNF α	Tumor Nekrose Factor Alpha
TIMP	Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase
VEGF	vascular endothelial growth factor

III. Fragestellung

3.1. Projektskizze

Trotz intensiver klinischer und molekularer Forschung hat sich an der schlechten Prognose der Tumoren der Kopf-Hals-Region in den letzten Jahren wenig geändert. Probleme wie das lokal-regionale Rezidiv oder die frühe lymphogene Metastasierung, die in Bezug auf die Prognose eine wesentliche Rolle spielen, existieren nach wie vor.
Das Hauptproblem besteht jedoch darin, dass frühe Erkrankungsstadien oft aufgrund der schwer zugänglichen Lage nicht erkannt werden und es sich daher bei Diagnosestellung häufig schon um ein fortgeschrittenes Tumorstadium handelt (Mashberg A und Samit A, 1995). Aus diesem Grund liegt das Augenmerk der Forschung besonders auf der Etablierung zuverlässiger diagnostischer Marker, die eine über das Staging hinausgehende Charakterisierung des biologischen Tumorverhaltens erlauben und eine Selektion von Risikofällen mit schlechter Prognose ermöglichen, was besonders wichtig für nicht metastasierte T1- und T2-Tumoren mit klinisch stummer lymphangischer und hämatogener Tumorzell-disseminierung wäre.

Die Therapie der Tumoren der Kopf-Hals-Region besteht momentan meist aus der operativen Entfernung des Tumors, der Radiatio und/oder der Kombination mehrerer unterschiedlicher Chemotherapeutika. Trotz der vielfältigen Therapie-strategien konnte jedoch bislang keine wesentliche Verbesserung der Prognose erreicht werden. Daher sucht man auch im Hinblick auf die Therapie dieser Tumoren immer noch nach effektiven Substanzen, die Tumorwachstum und Metastasierung auf kausale Weise mit möglichst wenig Nebenwirkungen eindämmen können.

Mittlerweile ist dank langjähriger Forschung ein besseres Verständnis der Pathogenese und Progression oraler/oropharyngealer Karzinome auf molekularer und zellulärer Ebene erreicht worden. Die Degradation von Komponenten der Extrazellulären Matrix (EZM) durch Matrix-Metalloproteinasen ist dabei ein entscheidender Schritt für die lokale Invasion und Metastasierung.

Durch zahlreiche in vitro- und in vivo-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sowohl synthetische als auch natürliche Gewebeinhibitoren (TIMPs) die tumorassoziierte proteolytische Aktivität inhibieren und somit die Invasionsfähigkeit und Metastasierung des Tumors reduzieren können. Trotz der Identifizierung disseminierungsrelevanter Proteasen und ihrer Inhibitoren sind die Kenntnisse über die genaue Funktion während der komplexen Vorgänge der Tumorinvasion und -disseminiertion, die für die Prognose eines Tumors eine große Rolle spielen, gerade bei den oralen/oropharyngealen Karzinomen noch sehr lückenhaft. Welche Zellen bei Tumoren der Kopf-Hals-Region MMPs und TIMPs synthetisieren und welche Bedeutung die Expression der Proteasen und ihrer Inhibitoren letztendlich für die Klinik hat, ist immer noch nicht zufriedenstellend geklärt. Für ein besseres Verständnis ist es notwendig und besonders wichtig, in weiterführenden Untersuchungen die Interaktion von Tumorzellen und Stromazellen sowohl in Primärtumoren als auch in den Metastasen zu analysieren und somit eine umfassende Expressionsanalyse der Invasions- und Disseminations-relevanten Faktoren aufzustellen.

Die Untersuchungen dieser Dissertation sollten einen Beitrag zur Aufklärung der Rolle von MMP-9 und den Inhibitoren der Matrix-Metalloproteinasen (TIMP-1, -2, -3) bei der Invasion und Metastasierung von Karzinomzellen oraler/oropharyngealer Plattenepithelkarzinome leisten. Im Ergebnis dieser Analysen sollten Protease-Expressionsmuster identifiziert werden, die mit bestimmten klinisch-pathologischen Parametern assoziiert sind.

3.2. Fragestellung

Folgende Ziele wurden mit der vorliegenden Dissertation verfolgt:

- Welche Zellen exprimieren MMP-9 bzw. TIMP-1, -2, -3 in Tumoren der Kopf-Hals-Region?
- Lassen sich bestimmte Expessionsmuster einzelnen Zelltypen zuordnen (Tumorzellen, Stromazellen, Endothelien, normale und dysplastische Epithelzellen)?

- Ist der Syntheseort von MMP-9 auch ihr Wirkungsort Vergleich von in situ-Hybridisierung und Immunhistochemie
- Ist die Expression von MMP-9 mit der Expression von TIMP-1 oder TIMP-3 assoziiert?
- Korrelieren die Ergebnisse mit TNM-Stadium, Grading, Lymphknotenstatus?
- Gibt es unterschiedliche Expressionsmuster in Abhängigkeit vom Tumorstadium?
- Welchen Einfluss haben MMP-9 und TIMP-1, -2, -3 auf die Prognose der Tumoren?
- Sind bestimmte Expressionsmuster mit einer schlechteren Prognose (Rezidive, verkürztes Gesamtüberleben) assoziiert?
- Kann MMP-9 in Tumoren der Kopf-Hals-Region basierend auf diesen Ergebnissen ein prädiktiver Wert bezüglich Metastasierungsverhalten und/ oder Prognose zugeschrieben werden?
- Können TIMPs als diagnostischer Marker eingesetzt werden? Eignen sie sich aufgrund der Ergebnisse für neue Therapieansätze?
- Welche Rolle spielen MMP-9 und TIMP-1, -2, -3 bei der Invasion, Disseminierung und Metastasierung von oralen/oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen?

Um diese Fragen beantworten zu können wurden 120 orale/oropharyngeale Plattenepithelkarzinome mittels RNA-in situ-Hybrisierung und Immunhistochemie auf das Expressionsverhalten von MMP-9 und TIMP-1, -2, -3 untersucht.
Dadurch sollten genaue Expressionsmuster von MMP-9 und TIMP-1, -2, -3 in Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region analysiert und mit klinisch-pathologischen Faktoren korreliert werden.

IV. Einleitung

4.1. Maligne Tumoren der Kopf-Hals-Region

Über 90 % der malignen Tumoren der Kopf-Hals-Region sind Plattenepithelkarzinome (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC). Einen weitaus geringeren Anteil machen Adenokarzinome, lymphoepitheliale Karzinome (v. a. Nasopharynxkarzinome), maligne Lymphome (z. B. Burkitt-Lymphom), Sarkome oder maligne Melanome aus.
Lokalisiert sind die Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region an den Lippen, in der Mundhöhle (Wangenschleimhaut, Zunge, Gaumen, Mundboden), im Oropharynx einschließlich Tonsillen, im Hypopharynx und Larynx. Die meisten dieser Tumoren treten in der Mundhöhle vorwiegend an Mundboden (36 %), Zunge (22 %) sowie Mundschleimhaut/Wange (15 %) auf (Goldhaber P, 1977). Bei etwa 10 % aller Tumoren der Kopf-Hals-Region kann der Ausgangspunkt des Tumors nicht eindeutig identifiziert werden.

4.1.1. Ätiologie

4.1.1.1. Prämaligne Läsionen, Mehrschritt-Kanzerogenese (Epithel-Dysplasie-Karzinom-Sequenz)

Eine Präkanzerose geht nicht zwingend in ein Karzinom über, ist jedoch das Vorstadium vieler Karzinome.
Wichtige Präkanzerosen werden im Folgenden kurz beschrieben.
- Die Leukoplakie ist ein weißer keratotischer Plaque, der durch manuelle Manipulation nicht entfernt werden kann und histologisch Hyperkeratosen, Parakeratosen oder Akantosen aufweisen kann. In 40 % der Fälle bildet sich eine Leukoplakie spontan zurück, in 47 % bleibt sie bestehen und in 3-6 % entsteht eine maligne Transformation (Mehta FS und Hammner III JE, 1993).
- Erythroplakien sind Schleimhautläsionen, die als rote, papilläre oder ulzerierte Plaques imponieren. Erythroplakien gehen mit einem Risiko von über 15 % einher, ein Karzinom zu entwickeln (Mashberg A et al., 1973; Kramer IRH et al., 1978).

- Die Dysplasie ist ein histologischer Begriff, der verschiedene abnormale epitheliale Veränderungen, wie z. B. eine erhöhte Kern-Plasma-Relation, eine erhöhte Mitoserate, zelluläre Pleomorphismen und nukleäre Hyperchromatismen, beschreibt. Die Ausdehnung der atypischen Zellen innerhalb des Epithels, der Grad der Hyperchromasie und die Zahl der atypischen Zellen bestimmen den Schweregrad der Dysplasie. Das Risiko der malignen Entartung einer Dysplasie liegt bei 10-14 % (Silverman S et al., 1984).
- Das Carcinoma in situ besteht aus atypischen Zellen im Epithel ohne Infiltration des darunterliegenden Gewebes. Häufig werden Carcinoma in situ-Herde als multifokale Läsionen beobachtet. Zudem werden sie vermehrt in der Nachbarschaft von infiltrierenden Karzinomen angetroffen. Daher sollte bei der Diagnose eines Carcinoma in situ bzw. eines Karzinoms der Patient sorgfältig auf evtl. vorliegende weitere Tumorherde untersucht werden (Noltenius H, 1987).

Weitere prämaligne Läsionen sind z. B. der Lichen planus der Mundhöhle, eine zellvermittelte Immunreaktion der basalen Keratinozyten, und die orale submuköse Fibrose (OSMF), die eine erhöhte Prävalenz in Indien und Süd-Ost-Asien hat und mit dem Kauen der Areca Nuss mit oder ohne Tabak im Zusammenhang steht (Vas'Kovaskaia GP und Abramova EI, 1981; Pindborg JJ et al., 1984).

4.1.1.2. Feldkanzerogenese

Durch die Einwirkung von Karzinogenen entstehen unabhängig voneinander an mehreren Orten eines Gewebes, zeitgleich oder zu unterschiedlichen Zeiten, Neoplasien. Slaughter et al. beschrieben bereits 1953 bei Patienten mit Mundhöhlenkarzinomen zusätzliche, vom Karzinom jedoch lokal unabhängige, multifokale Läsionen mit unterschiedlichem histologischem Charakter von milder Dysplasie bis zum invasiven Karzinom.

4.1.1.3. Risikofaktoren

Als wichtigste Risikofaktoren für Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region gelten der Tabakkonsum, dabei vor allem das Pfeiferauchen oder das Kauen von Tabak, und Alkohol. Raucher erkranken an bösartigen Neubildungen der Mundhöhle und des Rachens bis zu sechsmal häufiger als Nichtraucher (Robert-Koch-Institut, 2007).

Tabak besteht aus 2500 verschiedenen Inhaltsstoffen, wovon ca. 300 als kanzerogen bekannt sind. Die wichtigste Rolle spielen dabei die Nitrosamine (Tabak spezifische Nitrosamine (TSNA)). Weitere Faktoren sind Kohlenmonoxid, Phenole und Polyzyklische Aromatische Hydrocarbone (PAH). Beim Kauen der Betel-Nuss kommt zudem die Exposition an Alkaloiden und Polyphenolen hinzu (International Agency for Research on Cancers (IARC), 1985/1986; Ramchandani AG et al., 1998; Merchant A et al., 2000). In Ländern wie Pakistan, Indien und Süd-Ost-Asien ist der Genuss von Betel-Blättern und der Areca-Nuss, auch Betel-Nuss genannt, weit verbreitet. Häufig werden die Produkte mit Tabak und Aromastoffen versetzt. Bereits 1985 wurde die krebserregende Wirkung dieser Produkte mit Tabakzusatz beschrieben (IARC, 1985). Gesundheitlich bedenklich ist auch der Zusatz von gebranntem Kalk, der durch Wasseraufnahme in das ätzende Kalziumhydroxid übergeht und schwerste chronische Entzündungen der Mundschleimhaut verursacht.

Alkohol spielt sowohl einzeln als auch im synergistischen Effekt mit Rauchen eine wesentliche Rolle bei der Entstehung oraler Karzinome (International Agency for Research on Cancers, 1988). Alkoholabusus geht zudem oft mit Mangelernährung und einer dadurch bedingten Immunsuppression einher. Des Weiteren kann Alkohol als ein Lösungsmittel wirken und so die Penetration von Karzinogenen in das Zielgewebe ermöglichen. Acetaldehyd, ein Metabolit des Alkohols, ist bereits als Tumor-Promotor identifiziert worden (Harty LC et al., 1997).

Weitere Risikofaktoren sind bestimmte Viren, wie z. B. Humane Papillomaviren (35 % der HNC (head and neck cancer)), hierbei v. a. HPV 16/18, die man häufig bei Tonsillenkarzinomen bei jungen Patienten oder auch bei Zungenkarzinomen

gefunden hat (DeVilliers EM, 1985; Daftary DK et al., 1991). HPV 16 und 18 kodieren die Onkoproteine E6 und E7, die an die Tumorsuppressor-Proteine p53 und pRb binden und diese inaktivieren (Paz JB et al., 1997; Nagpal JK et al., 2002).
Auch das Epstein-Barr-Virus scheint eine Rolle in der Kanzerogenese der oralen Karzinome zu spielen. Es wurde in 50 % bei OSCC (oral squamous cell carcinoma) Patienten entdeckt (Mao EJ und Smith CJ, 1993). Vor allem bei Nasopharynxkarzinomen scheint es gehäuft aufzutreten (Lo YM et al., 1999).
Selten wird auch das Herpes-simplex-Virus in Verbindung mit Malignomen der Kopf-Hals-Region beschrieben.
Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle (Zunge) und des Oropharynx werden zudem gehäuft in Assoziation mit HIV/AIDS beobachtet (Lozada F et al., 1982).

Mangelhafte Mundhygiene und mechanische Alterationen, z. B. durch schlecht angepasste Prothesen, gelten zudem als Risikofaktoren für orale/oropharyngeale Plattenepithelkarzinome (Boenninghaus HG und Lennaz T, 2001).

Erhebliche geographische Unterschiede in der Häufigkeit der Tumoren in diesem Bereich sind vermutlich überwiegend auf Umweltfaktoren zurückzuführen.
In Süd- und Südostasien sind Plattenepithelkarzinome im Bereich von Mundhöhle und Rachen weitaus häufiger (fast 60 %) als in anderen Bevölkerungsgruppen. Dies liegt zu einem grossen Teil, wie oben beschrieben, an dem weit verbreiteten Gebrauch der Betel-Nuss (Pan) als Genussmittel, wodurch ein achtfach höheres Risiko an der Entwicklung eines Karzinoms gegeben ist (Jussawalla DJ und Deshpande VA, 1971). Die Ernährung spielt ebenso eine Rolle. Bei Isländern und Eskimos haben Karzinome der Kopf-Hals-Region eine höhere Inzidenz als in anderen Kulturen, was zum Teil auf den Verzehr von stark gesalzenem Fisch zurückgeführt wird. Auch das häufige Vorkommen in der chinesischen Bevölkerung wird auf spezielle Essgewohnheiten - dem hohen Konsum gewürzter und sehr heisser Speisen, kantonesisch gesalzenem Fisch und Mate-Tee - in Beziehung gebracht. Verschiedene Studien haben zudem gezeigt, dass Früchte und Gemüse, die reich an Vitamin A und C sind, in Bezug auf die Entstehung oraler Karzinome protektiv wirken können, wohingegen Fleisch und Chili-Gewürze

als Risikofaktoren einzuordnen sind (Notani PN und Jayant K, 1987; Negri E et al., 2000).
Ein weiterer Kofaktor zur Entstehung eines Karzinoms ist die Sonneneinstrahlung. Durch die chronische UV-Exposition neigen z. B. Seeleute oder Bauern häufiger dazu, Plattenepithelkarzinome an den Lippen zu entwickeln als andere Berufsgruppen (Szpak CA et al., 1977). Dabei ist die Unterlippe 10 mal häufiger betroffen als die Oberlippe.

4.1.1.4. Genetische Faktoren

Und nicht zuletzt spielen auch genetische Faktoren eine Rolle. Personen aus Familien mit bekannter Tumoranamnese haben ein erhöhtes Risiko, an einem oralen Plattenepithelkarzinom zu erkranken (McGuirt WF et al., 1982; Preston-Martin S et al., 1982). Es ist mittlerweile weltweit anerkannt, dass die Kanzerogenese mit einer Reihe genetischer Alterationen einhergeht.
Es sind bereits häufig Alterationen in Tumorsuppressor-Genen, wie z. B. p53 und p16 nachgewiesen worden (Nagpal JK et al., 2002; Gonzales MV et al., 1995; Riethdorf et al., 1997; Miracca EC et al., 1999; Scully C et al., 2000). Es wird angenommen, dass durch die Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p16, das in der Regulation des Zellzyklus eine wichtige Rolle spielt, die Entwicklung zum malignen, invasiven Tumor aus prämalignen Läsionen möglich wird. Dies wurde bereits für Tumoren der Kopf-Hals-Region in mehreren Studien gezeigt (Reed A et al., 1996; Papadimitrakopoulou V et al., 1997; Emilion G et al., 1996). Nahezu 50 % aller Kopf-Hals-Tumoren weisen eine Mutation im p53 Gen, dem „Wächter des Genoms“, auf, das in der Chromosomen-Region 17p13 lokalisiert ist (Boyle JO et al., 1993; Caamano J et al., 1993; Baral RN et al., 1998; Saranath D et al., 1999).
Des Weiteren zu erwähnen sind die Onkogene, eine Gruppe von Genen, deren Proteinprodukte im normalen Zellwachstum eine wichtige Rolle spielen und bei Überproduktion oder Mutation zu unkontrolliertem Zellwachstum und Tumorgenese führen können. Im Zusammenhang mit oralen Plattenepithel-karzinomen wurde eine Überexpression des Epidermal Growth Factor Rezeptor (EGFR) und seinen Liganden häufig untersucht und nachgewiesen (Saranath D et

al., 1992; Grandis JR und Tweardy D, 1993; Grandis JR et al., 1998; He Y et al., 1998; Rubin GJ et al., 1998). Des Weiteren wurden erhöhte Mengen des Transforming Growth Factor Alpha (TGF α) frühzeitig in der Kanzerogenese oraler Karzinome beschrieben (Grandis JR und Tweardy D, 1993). Eine Amplifikation und Überexpression von c-myc / N-myc wurde in 20 bis 40 % oraler Karzinome gefunden (Saranath D et al., 1989). In verschiedenen Studien an oralen Plattenepithelkarzinomen von Patienten aus westlichen Ländern konnte eine Amplifikation der Region von 11q13, auf der die Onkogene int-2, hst-1 und cyclin D1 (prad-1 / bcl-1) lokalisiert sind, in 30 bis 50 % der Tumoren nachgewiesen werden. Diese Amplifikation war mit einer schlechten Prognose assoziiert (Leonard JH et al., 1991; Jares P et al., 1994; Bartkova J et al., 1995; Kyomoto R et al., 1997; Meredith SD et al., 1995; Akervall JA et al., 1995). Im Zusammenhang mit Tabakkonsum wurden die Aktivierung von Stat-3 (Nagpal JK et al., 2002) sowie Alterationen von p53, cyclin D1, Rb und H-ras (Xu J et al., 1998) als ein frühes Event der Kanzerogenese beschrieben.

4.1.2. Epidemiologie

Oropharyngeale Karzinome machen 5 bis 10 % aller malignen Tumoren aus und stehen damit an sechster Stelle der Karzinom-Häufigkeit weltweit (Crowe DL et al., 2002). Weltweit werden jährlich ca. 500.000 Neuerkrankungen diagnostiziert.
Die Inzidenz für Deutschland beträgt 0,5 bis 3/100.000 Einwohner (7800 Neuerkrankungen/Jahr bei Männern, 2600 Neuerkrankungen/Jahr bei Frauen). Die geschätzte Zahl der jährlichen Neuerkrankungen ist bei Männern doppelt bis dreifach so hoch wie bei Frauen (Garewal H, 1995; Amer. Cancer Soc., 1993). Die Häufigkeit nimmt mit dem Alter zu, der Häufigkeitsgipfel liegt im 6. Lebensjahrzehnt. Die höchsten Erkrankungsraten liegen für Männer in den Altersgruppen zwischen 55 und 65 Jahren vor (Robert-Koch-Institut, 2007).
Zu erwähnen sind auch die geographischen Schwankungen, besonders hoch ist die Rate der oralen Plattenepithelkarzinome in Südchina und den Entwicklungsländern. Über 70 % der jährlichen Neuerkrankungen betreffen Dritte-Welt-Länder, allein 65.000 davon fallen auf Indien (Gupta PC et al., 1982). In Indien und den meisten Ländern Südostasiens ist das Mundhöhlenkarzinom die häufigste Neoplasie (Sankaranarayanan et al., 1990).

Es konnten sowohl klinisch-pathologische als auch molekular-pathologische Unterschiede in oralen Karzinomen verschiedener Länder, wie z. B. USA, UK, Frankreich, Japan u. a., nachgewiesen werden (Paterson IC et al., 1996). Durch den extensiven Genuss von Tabak und Betel-Blättern in Süd-Ost-Asien stellt die Wangenschleimhaut hier mit Abstand die häufigste Lokalisation der Karzinomentstehung dar, im Gegensatz zu den westlichen Ländern, in denen Mundboden und Zunge an erster Stelle stehen (Daftary DK et al., 1991).

4.1.3. Einteilung

Die Tumoren der Kopf-Hals-Region werden nach ihrer Lokalisation folgendermaßen eingeteilt (nach Noltenius H, 1987):
Tumoren der Lippen und Mundhöhle, des Oropharynx, Nasopharynx, Hypopharynx und Larynx.

Makroskopisch werden die Tumoren der Kopf-Hals-Region nach ihrem Wachstumsverhalten in exophytisch wachsende Tumoren und ulzerierende Tumoren oder beide Wachstumsformen zeigende Tumoren unterteilt (Alvi A et al., 1996). Dabei wachsen exophytische Tumoren im allgemeinen langsamer und weniger infiltrativ als ulzerierende Tumoren.

Nach dem Differenzierungsgrad werden vier Malignitätsgrade unterschieden. Der Differenzierungsgrad kann sich jedoch auch mit der Infiltration in die Tiefe ändern (z. B. beim Tonsillenkarzinom): Während der Tumor an der Oberfläche noch gut differenziert sein kann, ist der tiefere Anteil bereits entdifferenziert.

Tab. 1: Differenzierung und histopathologisches Grading der oralen/oropharyngealen Plattenepithelkarzinome (Wittekind et al., 2002)

Differenzierungsgrad = Grading (G)	
Gx	Grad der Differenzierung nicht beurteilbar
G1	gut differenziert
G2	mässig differenziert
G3	schlecht differenziert
G4	undifferenziert/anaplastisch

Das biologisches Verhalten der Tumoren ist jedoch eher vom Ursprung des Wachstums als von der histologischen Erscheinungsform abhängig. In der TNM-Klassifikation wird diese Situation berücksichtigt. Je nach Lokalisation unterscheidet sich auch die Einteilung nach dem TNM-System geringfügig.

Tab. 2: TNM-Klassifikation der oralen/oropharyngealen Plattenepithelkarzinome (American Joint Committee for Cancer Staging and End Results Reporting, Chicago, 1998; Wittekind et al., 2002)

Primärtumor (T)	
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	kein Anhalt für Tumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor </= 2 cm
T2	Tumor > 2 cm aber < 4 cm
T3	Tumor > 4 cm
T4	Tumor infiltriert angrenzende Strukturen (Unterkiefer, Muskulatur der Zunge, Oberkiefer, Nasennebenhöhlen, Haut)
Lymphknotenmetastasen (N)	
Nx	regionale Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	keine Metastasen in regionalen LK
N1	Metastase in einem ipsilateralen LK, </= 3 cm
N2	Metastase in einem/mehreren ipsilateralen, kontralateralen oder bilateralen LK, > 3 cm aber < 6 cm
N3	Metastase in einem LK, > 6 cm
Fernmetastasen (M)	
Mx	Vorliegen von Fernmetastasen nicht beurteilbar
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Desweiteren beschreibt eine R-Klassifikation das Fehlen oder Vorhandensein von Residualtumor (Resttumor) nach einer Behandlung.

Tab. 3: R-Klassifikation der oralen/oropharyngealen Plattenepithelkarzinome (Wittekind et al.,2002)

Residualtumor (R)	
Rx	Vorhandensein von Residualtumor nicht beurteilbar
R0	kein Residualtumor
R1	mikroskopischer Residualtumor
R2	makroskopischer Residualtumor

4.1.4. Symptome und Befunde

Die Symptome sind je nach Lokalisation unterschiedlich.
Bei Tumoren in der Mundhöhle findet man vorwiegend brennende Schmerzen, verstärkt bei Nahrungsaufnahme, Speichelfluss, Foetor ex ore und erschwertes Schlucken, teilweise Kaumuskelkrampf mit schmerzhafter Kieferklemme. In fortgeschrittenen Stadien finden sich auch Blutungen im Mund.
Bei Lokalisation im Oropharynx treten meist erst in fortgeschrittenen Tumorstadien Schluckbeschwerden aufgrund von Tumorstenosen, Halsschmerzen oder eine klosige Sprache auf. Häufig berichten die Patienten auch über Stiche in das Ohr oder Atemschwierigkeiten (Boenninghaus HG und Lenarz T, 2001).
Gemeinsame Symptome, unabhängig von der Lokalisation, sind vergrößerte Halslymphknoten und häufig Gewichtsabnahme, meist durch Schluck-beschwerden bedingt.
Initial fällt meist ein umschriebener, verhärteter tumoröser Bezirk oder Knoten auf, der an Größe zunimmt, später oft ulzeriert oder geschwürig zerfällt, und am Rande eine blumenkohlartige Struktur aufweisen kann.
Histologisch findet man Dysplasien unterschiedlichen Schwerengrades bis hin zum Carzinoma in situ in unmittelbarer Nachbarschaft zu invasiven Karzinomen. Auch deshalb werden solche Dysplasien als Vorläuferstadium angenommen.
Die Dauer der Symptome und die Schnelligkeit des Wachstums können auf die Aggressivität des Tumors hinweisen. Rezidive nach einem operativen Eingriff oder nach Strahlentherapie können als nicht heilende Ulzerationen in Erscheinung treten oder sich hinter einem Ödem verstecken (Noltenius H, 1987).

4.1.5. Metastasierung und Ausbreitung

Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region sind häufig multifokal. Der multifokale Ursprung dieser Karzinome ist der Grund ihrer hohen Rezidivrate. Bevor Metastasen in diesen Gebieten angenommen werden, muss an die Möglichkeit der multizentrisch entstehenden primären Karzinome gedacht werden.
Häufig sind bei Karzinomen aus dem Kopf- und Halsbereich in bis zu 50 % der Fälle weitere Primärkarzinome in dieser Region vorhanden, die oft erst nach dem

Tod durch eine Obduktion entdeckt werden. Gleichzeitig sind diese Tumoren in 25 bis 30 % mit Bronchialkarzinomen assoziiert (Noltenius H, 1987).

Ein weiteres Merkmal ist das aggressive und infiltrative Wachstum. Die Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region wachsen sehr früh in die Umgebung ein und infiltrieren Nachbarstrukturen, wie z. B. Nasenhöhle, Nasennebenhöhlen, Hirnnerven, Schädelbasis, Kehlkopf und Speiseröhre.

Es erfolgt eine frühzeitige Metastasierung auf dem Lymphweg in die Halslymphknoten, die abhängig ist von Tumorlokalisation und T-Stadium (Jones AS et al., 1994). Da Lymphknotenmetastasen häufig occult vorkommen, sollte eine chirurgische und strahlentherapeutische Behandlung der Lymphknoten auch durchgeführt werden, wenn klinisch keine Hinweise auf Metastasen vorliegen (Noltenius H, 1987; Snow GB et al., 1977).

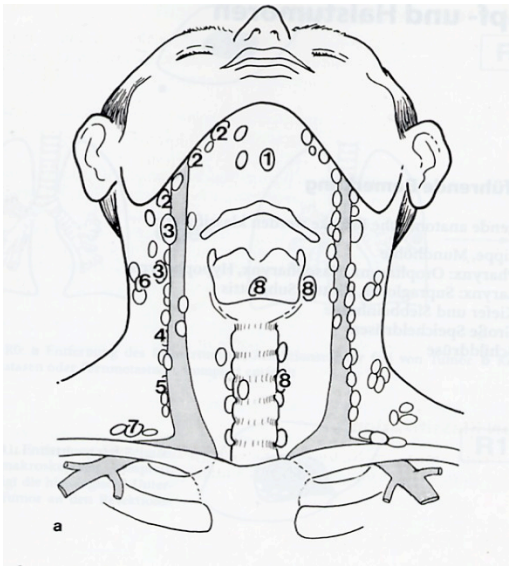


Abb. 1: Lokalisation der regionalen Lymphknoten der Kopf-Hals-Region.

1: submental, Level Ia
2: submandibulär, Level Ib
3: kranial jugulär, Level II
4: medial jugulär, Level III
5: kaudal jugulär, Level IV
6: dorsal zervikal, Level V
7: supraklavikulär
8: prälaryngeal / -tracheal, Level VI

Fernmetastasen (vor allem in Lunge, Skelettsystem, Leber, Niere) von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region sind verhältnismäßig selten und spielen bei dem Verlauf dieser Erkrankung nur eine untergeordnete Rolle (Zbären

P und Lehmann W, 1987). Trotz reichlicher Vaskularisation von Kopf und Hals kommt es erst in späten Stadien zu Fernmetastasen. Ca. 25 % der Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren in den späten Stadien T3 und T4 entwickeln hämatogene Fernmetastasen, v. a. in Lunge und Skelettsystem (Stupp R et al., 1994; Fidler IJ and Hart IR, 1982). Diese Fernmetastasen werden nahezu niemals ohne vorausgegangene Lymphknotenmetastasierung beobachtet. Zum Zeitpunkt des Todes sind ca. 50 % der Patienten frei von Tumormetastasen. Selbst große Karzinome mit einem Durchmesser von über 10 cm sind häufig nicht mit Fernmetastasen assoziiert (Noltenius H, 1987). Dementsprechend sind Tumormetastasen als Todesursache bei Karzinomen aus dem Kopf-Hals-Bereich sehr selten.
Die weitaus größere Zahl der Patienten stirbt durch die lokalen Komplikationen des Tumors und der Therapie, ferner durch zweite Primärtumoren (z. B. Bronchialkarzinome) oder Rezidive, bzw. durch andere Ursachen, die unabhängig von dem primären Karzinom des Kopf-Hals-Bereichs sind.

4.1.6. Therapie

Als Therapiemaßnahmen kommen Operation und/oder Strahlentherapie in Frage. Die Entscheidung ist abhängig von der Lokalisation des Tumors, der Tumorgröße, der Ausbreitung in die Umgebung und eventuell vorhandenen Lymphknoten-metastasen.
Die Operation muss neben dem Tumor auch immer die Lymphabflusswege am Hals berücksichtigen, teilweise ist sogar die radikale Halsausräumung erforderlich. Durch die oft schwer zugängliche Lage der Tumoren ist die operative Therapie nur eingeschränkt möglich. Dabei sollten basale Funktionen wie Kauen, Schlucken, Sprechen zumindest zu einem Minimum erhalten werden, um den Verlust an Lebensqualität und eine soziale Isolierung des Patienten zu verhindern. Meist ist der Tumor aus funktionellen oder lageabhängigen Gründen nicht komplett entfernbar, dadurch kommt es häufig zu Rezidiven.

Die Heilungs- und Überlebensraten sind in frühen Stadien für beide Verfahren annähernd gleich, allerdings sind durch die Strahlentherapie meist bessere funktionelle und kosmetisch günstigere Ergebnisse zu erzielen. Die National

Comprehensive Cancer Network empfiehlt eine definierte Radiotherapiedosis von bis zu 66 Gy für den Primärtumor der Mundhöhle oder Pharynx, bei vorhandenen Lymphknotenmetastasen auch für die Lymphabflussgebiete der Kopf-Hals-Region (Practice Guidelines for Squamous Cell Cancers of the Head and Neck, Philadelphia, 2000). Mit den kosmetisch besseren Ergebnissen der Strahlentherapie einhergehend kommt es jedoch auch zu deren typischen Komplikationen wie Xerostomie, Ödem, Erythem, Karies der Zähne und Osteoradionekrosen.

Bei ausgedehnten Tumoren, Mitbefall von Knochen und Nerven oder Lymphknotenmetastasen kommt heutzutage auch die Kombination von Radiatio und Chemotherapie in Frage. Die hierbei meist verwendeten Zytostatika sind Methotrexat, Cisplatin, Carboplatin, Fluoruracil, Paclitaxel und Docetaxel. Diese werden neoadjuvant (z. B. zum Downstaging vor der operativen Therapie) oder adjuvant, z. B. als adjuvante Radiochemotherapie, angewandt. Eine neue Methode ist die regionale oder intraarterielle Chemotherapie, die hohe Zytostatikakonzentrationen am Tumor und geringe systemische Nebenwirkungen zu versprechen scheint (Robbins KT et al., 1997).
In fortgeschrittenen inkurablen Fällen bleibt jedoch lediglich die palliative Therapie (Behandlung von Mundtrockenheit, Sicherstellung der Flüssigkeitszufuhr, Freihaltung der Atemwege) und die Schmerztherapie.

4.1.7. Prognose

Die Prognose ist vom histologischen Typ, dem Differenzierungsgrad, der Primärlokalisation, und dem TNM-Stadium abhängig. Hoch differenzierte Plattenepithelkarzinome werden vorwiegend an den Lippen, in den vorderen 2/3 der Zunge, der Wangenschleimhaut und dem Gaumen beobachtet. Tumoren des weichen Gaumens und der Rachenmandel haben insgesamt die beste Prognose (Boenningshaus HG und Lenarz T, 2001). Tumoren der Rachenhinterwand und des Zungengrundes haben die schlechteste Prognose. Diese ist vor allem durch das späte Entdecken des Tumors bedingt. Erste klinische Zeichen sind häufig Halsschmerzen oder auch von Metastasen befallene Lymphknoten, die sich plötzlich infolge von Tumornekrosen vergrößern. Zudem sind diese Tumoren

häufig schlecht differenziert. Frühe Infiltration darunterliegender Muskeln und Einbruch in die Lymphbahnen (75 % zum Zeitpunkt der Diagnosestellung) mit frühen Lymphknotenmetastasen verschlechtern zudem die Prognose (Noltenius H, 1987; Boenninghaus HG und Lenarz T, 2001). Die 5-Jahresüberlebenszeit erreichen nur etwa 20 % der Patienten.
Die Tumorgröße kann prognostisch bedeutsam sein, ist jedoch keineswegs entscheidend. So gibt es nicht selten kleine Karzinome mit einer fortgeschrittenen Metastasierung (Noltenius H, 1987). Hierfür ursächlich angenommen werden Faktoren, die zu einer frühzeitigen Metastasierung beitragen, wie z. B. auch Vertreter der Matrix-Metalloproteinasen.
Multifokale Tumoren sind nicht selten (besonders bei Tumoren des Mundbodens, der Zunge und des Pharynx) und gewöhnlich mit einer schlechten Prognose assoziiert (Noltenius H, 1987; Berg JW und Schottenfeld D, 1977). Häufig sind auch Zweitkarzinome der Atemwege und der Speiseröhre.

Die häufigste Todesursache ist das lokal-regionale Rezidiv. Die Rezidivhäufigkeit ist gerade dann groß, wenn der Tumor bereits in das Stroma eingedrungen ist, die Resektionsränder nicht tumorfrei waren und es zu einer Metastasierung in die Lymphknoten gekommen ist (Martin SA et al., 1980).
Viele Patienten sterben an interkurrenten Erkrankungen und Mangelernährung, lediglich 10 % an Fernmetastasen (Noltenius H, 1987).

Die Prognose fortgeschrittener Karzinome der Kopf-Hals-Region ist trotz moderner Behandlungsmethoden und seltener Metastasierung immer noch sehr schlecht. Der abnehmende Anteil prognostisch günstiger Tumoren, wie z. B. Karzinome der Lippen, und die Zunahme prognostisch ungünstiger Karzinome wie die des Rachens haben erheblich zur Verschlechterung der Überlebensraten beigetragen.

Die 5-Jahresüberlebensrate beträgt für die zusammen betrachteten Lokalisationen der Mundhöhle und des Rachens für Männer 46 % und für Frauen 60 %. Für die unterschiedlichen Lokalisationen liegen die Überlebensraten bei sehr unterschiedlichen Werten von über 90 % bei Lippenkarzinomen, 56 % bei Mundhöhlenkarzinomen und zwischen 20-30 % bei Pharynxkarzinomen (Robert-Koch-Institut, 2007).

4.2. Matrix-Metalloproteinasen

4.2.1. Matrix-Metalloproteinasen allgemein

Matrix-Metalloproteinasen sind eine Gruppe sezernierter oder membranständiger proteolytischer Enzyme, die Bestandteile des interstitiellen Bindegewebes und der Basalmembran abbauen können.
Die erste humane Matrix-Metalloproteinase (MMP-1) wurde 1966 von Fullmer HM et al. als Kollagenase im menschlichen Zahnfleisch beschrieben. Über 10 Jahre später wurde das zweite Mitglied der MMP-Familie, die Gelatinase-A (MMP-2) entdeckt, die außer Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) auch Kollagen Typ IV abbauen konnte. 1979 beschrieben Sopata I und Wize J die Gelatinase in menschlichen Leukozyten, wenige Jahre später wurde sie von Seltzer JL et al. sowie Nakano T und Scott PG auch in menschlichen Fibroblasten nachgewiesen.
Nachdem MMP-2 in verschiedenen kultivierten malignen Zelllinien nachgewiesen werden konnte, wurde spekuliert, es könne das Schlüsselenzym in Bezug auf Tumorwachstum und Metastasierung sein (Salo T et al., 1982). Mittels Immunhistochemie und in situ-Hybridisierung konnte jedoch gezeigt werden, dass MMP-2 nicht nur von den Karzinomzellen, sondern hauptsächlich von den die Karzinomzellen umgebenden Fibroblasten sezerniert wird (Sutinen M et al., 1998). Auch MMP-9 (Gelatinase-B) konnte sowohl in Tumor- als auch Entzündungszellen nachgewiesen werden (Thomas GT et al., 1999). In mehreren Studien konnte bisher gezeigt werden, dass einige MMPs in Tumoren der Kopf-Hals-Region sowohl von Tumorzellen als auch von umgebenden Mesenchymzellen, verschiedenen Entzündungszellen oder Endothelzellen produziert werden können (Sutinen M et al., 1998; Väänänen A et al., 2001; Moilanen M et al., 2002; Sorsa T et al., 2004).

4.2.2. Struktur der Matrix-Metalloproteinasen

Zum jetzigen Zeitpunkt sind 23 humane Matrix-Metalloproteinasen bekannt (Sorsa T et al., 2004; Marchenko GN et al., 2003). Gemeinsames Merkmal aller MMPs ist eine strukturell homologe, aminoterminale Region mit einem Signalpeptid

(hydrophobe Pro-Domäne) und einer Cystein enthaltenden Pro-Peptid-Domäne, die zur Aktivierung der Enzyme abgespalten wird, sowie eine katalytische Domäne mit der Fähigkeit zur Bindung von Zinkionen (aktives Zentrum, enzymatische Aktivität) mit einer Länge von ca. 50 Aminosäuren (Kleiner DE und Stetler-Stevenson WG, 1999, Becker JW et al., 1995; Lovejoy B et al., 1994). Bis auf MMP-7 besitzen alle übrigen MMPs zudem eine C-terminale Domäne, die Ähnlichkeit mit dem Protein Hämopexin besitzt und über eine „hinge region“ mit der katalytisch wirkenden Domäne verbunden ist (Kleiner DE und Stetler-Stevenson WG, 1999). Sie spielt eine große Rolle bei der Erkennung der Substrate. Darüber hinaus enthält sie eine Bindungsstelle für die natürlichen Inhibitoren der Matrix-Metalloproteinasen (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases, TIMPs) und ist auch an der Bindung an Rezeptoren der Zelloberfäche oder extrazellulären Matrix beteiligt (Murphy G et al., 1992; Gohlke U et al., 1996; Murphy G und Knäuper V, 1997).

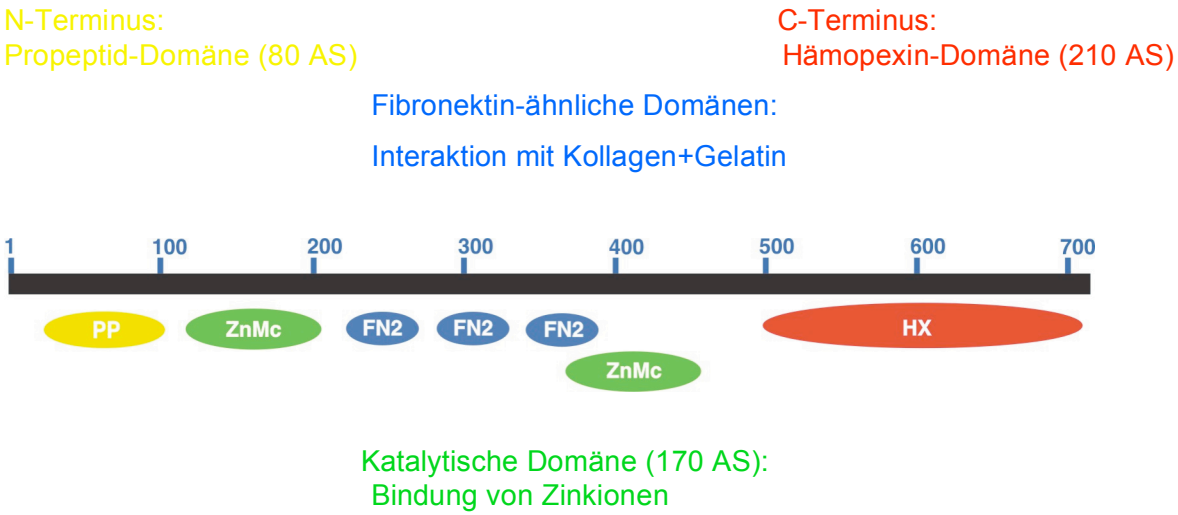


Abb. 2: Struktur der Matrix-Metalloproteinasen (verändert n. Egeblad u. Werb, 2002). Gemeinsames Merkmal aller MMPs ist die aminoterminale Region mit einem Signalpeptid und einer Cystein enthaltenden Pro-Peptid-Domäne, die zur Aktivierung der Enzyme abgespalten wird, sowie eine katalytische Domäne. Bis auf MMP 7 besitzen alle übrigen MMPs zudem eine C-terminale Domäne, die Ähnlichkeit mit dem Protein Hämopexin aufweist und eine Bindungsstelle für TIMPs enthält.

Die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 besitzen zudem noch drei Typ-2 fibronektinähnliche Domänen innerhalb ihrer katalytischen Domäne, die für die Bindung von Gelatin verantwortlich sind (Strongin AY et al., 1993). MMP-9 weist außerdem eine Kollagen IV ähnliche Sequenz innerhalb der katalytischen Domäne auf.

Synthetisiert werden die meisten MMPs als inaktive lösliche Zymogene (pro-MMPs). Sie sind durch eine Interaktion zwischen einer Cystein-SH-Gruppe in der Pro-Peptid-Domäne und einem Zinkion in der katalytischen Domäne inaktiviert. Zur Aktivierung wird die Pro-Peptid-Prodomäne proteolytisch abgespalten (Egeblad M und Werb Z, 2002; Sternlicht MD und Werb Z, 2001).
Die Aktivierung der latenten Pro-Enzyme stellt einen wichtigen Schritt bei der Regulation und Kontrolle der Matrix-Metalloproteinasen dar. Die Aktivierung erfolgt meist außerhalb der Zelle durch Autokatalyse, andere aktivierte Matrix-Metalloproteinasen (MMP-2, -3 und -7 können z. B. MMP-9 aktivieren (Sang QX et al., 1995)) oder Serinproteasen (z. B. Plasmin, tumorassoziiertes Trypsin-2 (Mazzieri R et al., 1997; Sorsa T et al., 1997)). Zudem ist die Aktivität abhängig von Zink- und Calciumionen (Egeblad M und Werb Z, 2002; Nagase H, 1997).
Membrantyp-MMPs (MT-MMPs) werden nicht sezerniert, sondern sind membran-gebundene Enzyme. Soweit bekannt spielen sie unter anderem eine wichtige Rolle bei der Aktivierung latenter MMP-Vorstufen (Cowell S et al., 1998).

4.2.3. Einteilung und Funktion der Matrix-Metalloproteinasen

Basierend auf der Substratspezifität und der strukturellen Unterschiede wurden die Matrix-Metalloproteinasen ursprünglich in Kollagenasen (Abbau von fibrillären Kollagenen), Stromelysine (Abbau von Proteoglykanen und Glykoproteinen) und Gelatinasen (Degradierung nicht-fibrillärer und denaturierter fibrillärer Kollagene) unterteilt. Mittlerweile sind verschiedene Einteilungen der Matrix-Metallo-proteinasen beschrieben und auch Überschneidungen zwischen den einzelnen Unterklassen gefunden worden. So kann z. B. die Gelatinase-A (MMP-2) analog zu den Kollagenasen der MMP-Familie auch fibrilläre Kollagene abbauen (Aimes RT und Quigley JP, 1995). Historisch beruht die Bezeichnung vieler Matrix-

Metalloproteinasen auf ihrer Substratspezifität, was sich in den auch heute noch häufig gebrauchten älteren Namen der MMPs widerspiegelt, z. B. Gelatinase-A (MMP-2), Gelatinase-B (MMP-9). Mit der Erkenntnis, dass viele Matrix-Metalloproteasen verschiedene Substrate haben, wurden die MMPs aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu einer Gruppe zusammengefasst und durch Ziffern gekennzeichnet (Egeblad M und Werb Z, 2002).

Heute weiss man, dass Matrix-Metalloproteinasen viele Funktionen haben:
Sie nehmen Einfluss auf Zellwachstum, Regulation und Differenzierung, indem sie die Zellen einerseits über TGF-α und Intergrine stimulieren, andererseits aber auch durch Aktivierung von TGF-β oder TNF-α hemmen können. Desweiteren besitzen sie eine apoptotische und auch antiapoptotische Wirkung: So vermindern z. B. MMP-9 und -11 die Apoptose von Tumorzellen, während sie die Apoptose in der Embryogenese und späteren Entwicklung fördern.

Eine weitere wichtige Funktion der MMPs ist die Regulation der Angiogenese: Allgemein wird die Angiogenese durch Degradation der extrazellulären Matrix gefördert, wodurch es den Endothelzellen ermöglicht wird, in das Tumorstroma einzudringen. Eine direkte Regulation der Angiogenese erfolgt durch MMP-2, -9 und -14, z. B. durch eine Erhöhung der Bioverfügbarkeit des pro-angiogenetischen Faktors VEGF (vascular endothelial growth factor). MMPs produzieren jedoch auch Faktoren, die die Angiogenese hemmen: z. B. Angiostatin, das durch die Spaltung von Plasminogen durch MMP-2, -3, -7, -9 und -12 erzeugt wird (Egeblad M und Werb Z, 2002).

MMPs haben auch Einfluss auf Migration, Invasion und Metastasierung: Es konnte z. B. nachgewiesen werden, dass die Spaltung von Laminin-5 durch MMP-2 und -14 die Zellmotilität triggert (Giannelli G et al., 1997). MMP-9 kann durch Bindung an CD44, den Hauptrezeptor von Hyaluron, die Tumorinvasion fördern (Xu Q und Stamenkovic I, 1999). MMPs nehmen auch an den letzten Schritten des Metastasierungsprozesses teil, wenn Tumorzellen in Blut- oder Lymphgefäße eindringen, dort einige Zeit überleben und die Gefäße anschließend wieder verlassen; es konnte gezeigt werden, dass MMP-9 für die Intravasation erforderlich ist (Egeblad M und Werb Z, 2002).

MMPs können zudem die Immunantwort beeinflussen: Wie bereits bekannt ist, sind Entzündungsreaktionen ein wichtiger Teil menschlicher Neoplasien (Egeblad M und Werb Z, 2002). Das Immunsystem ist normalerweise in der Lage, Tumorzellen zu erkennen und anzugreifen. Die Tumorzellen haben jedoch verschiedene Wege entwickelt, dem Immunsystem zu entkommen, hierbei sind auch MMPs von Bedeutung. MMPs, darunter v. a. MMP-9, können z. B. den IL-2 Rezeptor α spalten und so die Proliferation von T-Lymphozyten supprimieren (Egeblad M und Werb Z, 2002). Zudem synthetisieren Entzündungszellen selbst verschiedene MMPs, wie z. B. die Synthese von MMP-9 durch Makrophagen, und stimulieren so die Tumorprogression (Egeblad M und Erb Z, 2002)).

Weitere Funktionen der MMPs bestehen in der Regulation bestimmter Wachstumsfaktoren und Zelloberflächen-Rezeptoren (Egeblad M und Werb Z 2002; Overall C und Lopez-Otin C, 2002).

Durch ihre Fähigkeit zum Abbau unterschiedlicher extrazellulärer Faserstrukturen nehmen Matrix-Metalloproteinasen an den verschiedensten Umbauprozessen der Gewebe teil. Unter physiologischen Bedingungen sind die Enzyme an der Remodellierung des Bindegewebes, z. B. im Verlauf der Embryogenese, der Wundheilung oder von Wachstum und Involution hormonabhängiger Organe, beteiligt (Johansson N et al., 1997; Jeffrey JJ, 1991; Matrisian LM, 1990; Kahari VM und Saarialho-Kere U, 1997). In adulten Geweben sind die Expression und Aktivität der MMPs normalerweise relativ gering, sie steigen jedoch signifikant unter verschiedenen pathologischen Bedingungen, die zu Gewebedestruktionen führen, wie z. B. bei Entzündungen und degenerativen Erkrankungen (Keyszer G et al., 1998; Uitto VJ et al., 1998; Page RC, 1991), Tumorwachstum und Metastasierung (Egeblad M und Werb Z, 2002).

Von besonderer Bedeutung sind Matrix-Metalloproteinasen im Zusammenhang mit malignen Tumoren; ihre Expression ist in fast allen menschlichen Tumoren erhöht, wie z. B. Tumoren des oberen Aerodigestivtraktes (Kawata R et al., 1996), des Ösophagus (Ohashi K et al., 2000), des Magens (David L et al., 1994), des Dickdarms (Gallegos NC et al.,1995), des Pankreas (Bramhall SR et al.,1997), der Leber (Hayasaka A et al., 1996), der Lunge (Nakagawa H and Yagihashi S, 1994),

des Genitaltrakts (Davidson B et al., 1999) und der Haut (Airola K et al., 1997). Das jeweilige Vorkommen wird mit ihrer Fähigkeit zum Abbau der extrazellulären Matrix und von Kollagen Typ IV in Zusammenhang gebracht (Derrico A et al., 1991). Die Bedeutung der Degradation der extrazellulären Matrix, v. a. von Kollagen Typ IV, einem wichtigen Baustein der Basalmembran, wurde bereits durch Liotta LA et al. 1980 und seitdem wiederholt beschrieben, so dass man Matrix-Metalloproteinasen eine entscheidende Bedeutung in der Ausbreitung maligner Prozesse zuschreibt.

4.2.4. Matrix-Metalloproteinasen und Metastasierung

Alle Mitglieder der MMP-Familie können als Proteinasen Komponenten der extrazellulären Matrix abbauen und somit physiologische Barrieren für die Ausbreitung maligner Prozesse zerstören. Unter physiologischen Bedingungen tragen Matrix-Metalloproteinasen durch den Abbau unerwünschter Proteine zur Aufrechterhaltung und Funktionstüchtigkeit der extrazellulären Matrix bei. Die Zerstörung der EZM durch die Degradation ihrer Strukturproteine ist ein entscheidender Schritt zur Invasion und Metastasierung (Liotta LA et al., 1980).

Matrix-Metalloproteinasen ermöglichen die lokale Invasion von Tumorzellen und die Metastasierung vor allem durch drei wesentliche Mechanismen: Die Degradation von Proteinen der extrazellulären Matrix (Kleiner DE und Stetler-Stevenson WG, 1999; Duffy MJ, 1998), die Modulation der Zelladhäsion (Ray JM und Stetler-Stevenson WG, 1995) und die zelluläre Motilität (die Fähigkeit der Tumorzellen, sich durch Defekte der EZM zu bewegen; Friedl P und Wolf K, 2003). Nach erfolgter Lösung aus dem ursprünglichen Zellverband dringen die Tumorzellen in die umgebende extrazelluläre Matrix ein. Sie durchbrechen die Basalmembran und können so in lokale Lymph- und Blutgefäße einbrechen. Schließlich verlassen sie die Blutgefäße an entfernter Stelle auf demselben Weg und können dann zur Entstehung eines neuen Tumorklons, einer Metastase führen (Liotta LA et al., 1993). In einigen Studien wurde dieses 3-Stufen-Modell der Metastasierung mit anderen Charakteristika der MMPs, wie z. B. die Fähigkeit, die Angiogenese zu stimulieren oder das Immunsystem auszuschalten, ergänzt.

Diese Charakteristika können jedoch auch bei gutartigen Neubildungen (wie z. B. Angiomen) gefunden werden und sind somit für maligne Tumoren und ihre Metastasierung nicht spezifisch (Kleiner DE und Stetler-Stevenson WG, 1999).
Auf der anderen Seite ist die Angiogenese ein wesentliches Kriterium für das Wachstum von Tumor und Metastasen (Folkman J, 1971). Tumoren mit einem höheren Anteil angiogenetischer Zellen haben daher ein größeres metastatisches Potential und ein aggressiveres Verhalten (Pluda JM, 1997). Die Rolle von MMPs beschränkt sich dabei jedoch nicht auf die vielfältigen Umbauprozesse der extrazellulären Matrix, die zur Gefäßneubildung notwendig sind. Sie nehmen auch Einfluss auf beteiligte angiogenetische Faktoren, wie z. B. VEGF (Zucker S et al., 1998; Lamoreaux WJ et al., 1998). Im Gegenspiel ist VEGF, der von Tumorzellen meist in hohen Mengen produziert wird, auch ein wichtiger Stimulator der Expression von MMPs in Endothelzellen (Wang H und Keiser JA, 1998; Lamoreaux WJ et al., 1998). Die Proteolyse der extrazellulären Matrix in der Umgebung der Endothelzellen ermöglicht nicht nur die Penetration der Tumorzellen in den intravasalen Raum, sondern fördert auch die Angiogenese durch Wachtum von Endothelzellen und deren Migration (Mignatti P und Rifkin DB, 1993; Fernandez HA et al., 1999).

In einer Vielzahl tierexperimenteller Modelle wurde nachgewiesen, dass Matrix-Metalloproteinasen das Wachstum von Primärtumoren und die Metastasierung beeinflussen. Es konnte dabei gezeigt werden, dass durch natürliche und synthetische Inhibitoren von Metalloproteasen (unter anderem TIMP-1 und TIMP-2, Batimastat) die Metastasierung gehemmt werden kann. Schultz et al. (1988) zeigten, dass durch systemische Gabe von TIMP-1 die Zahl experimenteller Lungenmetastasen vermindert werden kann. DeClerck YA et al. (1991, 1992) konnten die gleichen Ergebnisse für TIMP-2 nachweisen. Brown PD et al. (1993) verwendete Batimastat, einen synthetischen MMP-Inhibitor, der sowohl die interstitielle Kollagenase, die Stromelysine als auch die Gelatinasen-A und -B hemmt. Er erreichte so eine Verminderung der Zahl an experimentellen Lungenmetastasen um mehr als 50 %, zudem wurde auch das Wachstum der Primärtumoren gehemmt.

Des weiteren konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte MMP-Aktivität mit der Invasion und dem metastatischen Potential bei vielen Tumoren korreliert, wie z. B. bei Ovarial-, Lungen-, Prostata-, Mamma- und Pankreaskarzinomen (Cancer Medicine, American Cancer Society). Obwohl in oralen Tumoren verschiedene Matrix-Metalloproteinasen vermehrt produziert werden (Thomas GT et al., 1999), scheinen MMP-2 und MMP-9 in dieser Tumorgruppe eine besondere Rolle zu spielen. Patienten mit erhöhter MMP-2- und MMP-9- Aktivität im Tumor haben nachweislich eine kürzere rezidivfreie Überlebenszeit nach Behandlung als Patienten mit niedriger Gelatinase-Aktivität (Yorioka CW et al., 2002).

4.2.5. Regulation der Matrix-Metalloproteinasen

Um einen überschießenden Abbau von Komponenten der extrazellulären Matrix zu vermeiden, ist eine strenge Regulation von Matrix-Metalloproteasen (MMPs) und ihren Inhibitoren (TIMPs) erforderlich.
Die Aktivität der MMPs und z. T. auch der TIMPs kann auf verschiedene Weise gehemmt und somit kontrolliert werden. Ein wesentlicher Punkt bei der Regulation der MMPs ist deren proteolytischer Abbau und Inaktivierung. Des weiteren wird die Regulation aber auch auf verschiedenen indirekten Wegen beeinflusst. Durch Ausschaltung potentieller Aktivatoren, wie z. B. Phorbolester (Toth M et al., 1997; Overall CM, 1994); Zytokine wie Interleukin-8, Tumor Nekrose Faktor (TNF) oder Tumor Growth Factor-1β (TGF-1β) (Tyagi SC, 1997; Overall CM, 1994; Ito A et al., 1990); Onkoproteine wie c-Ets (Wasylyk C et al., 1991) oder Faktoren wie Epidermal Growth Factor (EGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) u. a. (Kanno N et al., 1998; Ganser GL et al., 1991; Lamoreaux WJ et al., 1998), wird die Menge an aktiven, funktionstüchtigen MMPs begrenzt. Desweiteren spielen unspezifische endogene Inhibitoren, wie z. B. α2-Makroglobulin, einer der Hauptinhibitoren der MMPs (Egeblad M und Werb Z, 2002), bei deren Regulation eine wichtige Rolle. Und nicht zuletzt tragen die spezifischen Inhibitoren, TIMP-1 bis -4, einen entscheidenden Teil zur Regulierung der Enzyme bei, weshalb sie auch gerade in der Tumorforschung in den letzten Jahren das Augenmerk auf sich gezogen haben. Sie inhibieren die Matrix-Metalloproteinasen, indem sie nicht-kovalente, reversible Enzym-Inhibitor-Komplexe hoher Affinität im Verhältnis 1:1

bilden (Brew K et al., 2000). Die Beziehungen zwischen membranständigen Matrix-Metalloproteinasen (MT-MMPs), sezernierten Matrix-Metalloproteinasen (aktiviert) und ihren stärksten endogenen Inhibitoren (TIMPs, frei) bestimmen die Balance zwischen Matrixabbau und -stabilisierung (Uitto et al., 2003).
Es gibt allerdings wenige gesicherte Zusammenhänge zwischen der Expression von Matrix-Metalloproteinasen und ihren Inhibitoren im Gewebe von Primärtumoren einerseits und klinischen Parametern wie Tumorausbreitung und Prognose andererseits. Die Hemmung der MMPs durch synthetisch hergestellte Inhibitoren könnte jedoch eine interessante Möglichkeit zur Kontrolle von Erkrankungen mit extensiver Gewebedestruktion, bei denen eine erhöhte MMP-Aktivität nachgewiesen wurde, darstellen (Overall CM und Lopez-Otin C, 2002).

Die ersten MMP-Inhibitoren, die in klinischen Studien zur Tumorbehandlung eingesetzt wurden, waren Batimastat und Marimastat und basierten auf der Hemmung der Chelatbildung im aktiven Zentrum durch Zinkionen (Coussens LM und Fingleton B, 2002). Desweiteren wurden Tetrazykline verwendet, von denen bekannt ist, dass sie die MMPs auf mehreren Wegen inhibieren können: zusätzlich zur Chelatbildung von Zinkionen können sie die MMP-mRNA-Expression herabregulieren, bei der Aktivierung der Enzyme interferieren und MMPs für ihren Abbau leichter zugänglich machen (Golub LM et al., 1998).
Die klinischen Studien und ihre Ergebnisse waren jedoch nicht überzeugend. Die Versuche mit MMP-Inhibitoren konnten therapeutisch nicht das erreichen, was man sich davon versprochen hatte. Jedoch lag das nach Egeblad M und Werb Z, womöglich auch an den nicht ideal konstruierten Versuchen (Egeblad M und Werb Z, 2002): MMP-Inhibitoren wurden mit zytotoxischen Medikamenten kombiniert und bei Patienten in einem fortgeschrittenen Tumorstadium getestet. Tierversuche konnten demonstrieren, dass Matrix-Metalloproteasen in frühen Stadien der Tumorprogression als therapeutisches Ziel genutzt werden sollten. Sternlicht MD und Mitarbeiter zeigten durch ihre Experimente, dass in Zellen, in denen die Expression von MMP-3 induziert wurde, in nur 2 Wochen nach Inokulation Tumoren entstanden (Sternlicht MD et al., 1999).

Statt MMP-Inhibitoren zur Behandlung von inoperablen Tumoren zu verwenden, sollten sie als präventive Medikamente eingesetzt werden. Gerade Patienten mit

einer genetischen Prädisposition für bestimmte Tumoren oder Patienten nach Resektion des Primärtumors ohne Nachweis von Metastasen könnten von der Behandlung mit MMP-Inhibitoren profitieren (Egeblad M und Werb Z, 2002).

Für die Entwicklung effektiver, zielgerichteter MMP-Inhibitoren, die eine effektive Behandlung mit wenigen unerwünschten Nebenwirkungen ermöglichen würden, müssen diejenigen MMPs identifiziert werden, die eine Schlüsselfunktion bei verschiedenen Erkrankungen spielen (Sorsa T et al., 2004, Hidalgo M und Eckhardt SG, 2001). Die Rolle der MMPs in Tumoren der Kopf-Hals-Region ist bisher nicht vollständig geklärt. Intensive Untersuchungen sind erforderlich, um die richtige Assoziation der MMPs mit Inhibitoren und Aktivatoren detailliert aufklären zu können (Sorsa T et al., 2004).

4.2.6. Gewebslokalisation von Matrix-Metalloproteinasen

Solide Tumoren bestehen aus den eigentlichen Tumorzellen und den sie umgebenden akzessorischen Zellen wie Fibroblasten, Endothelzellen und Entzündungszellen. Mittlerweile ist bekannt, dass nicht nur Tumorzellen, sondern auch nicht-maligne Stromazellen an der Bildung der MMPs und somit an der proteolytischen Degradation der EZM teilhaben (DeClerck YA, 2000).

Untersuchungen verschiedener Karzinome ergaben, dass sich die Synthese und Lokalisation der Matrix-Metalloproteinasen sowohl hinsichtlich der Zellart als auch der Position der Zellen im Tumor unterscheiden (Heppner et al., 1996).
Die überwiegende Anzahl von MMPs wird nicht von den Tumorzellen selbst, sondern von den Zellen des Tumorstromas gebildet (s. Abb. 3).

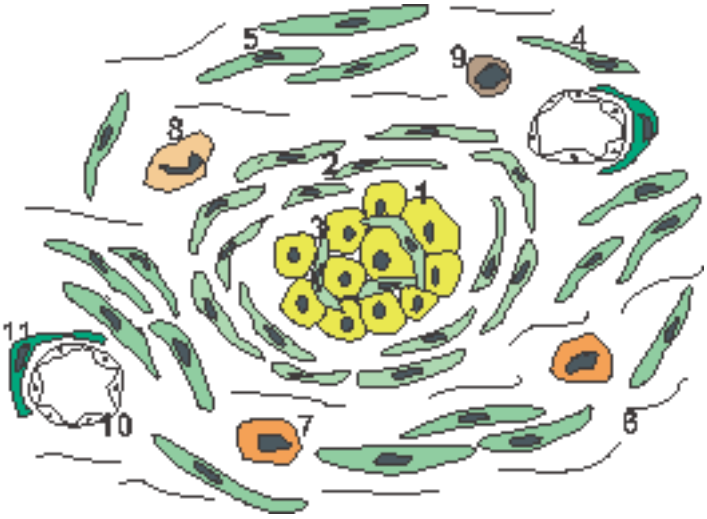


Abb. 3: Gewebslokalisation der Matrix-Metalloproteinasen (verändert n. Egeblad u. Werb, 2002; Heppner et al., 1996)

Synthese von MMPs und TIMPs durch Tumorzellen und akzessorische Zellen: Tumorzellen (1): MMP-1,-3,-7,-9,-13; vereinzelt -8; TIMP-1; Fibroblasten Invasionsfront (2): MMP-1,-2,-3,-11,-14; TIMP-1,-2; Intratumorale Fibroblasten (3): TIMP-3; Fibroblasten gesamtes Tumorstroma (4): MMP-2,-14; Einzelne fokal angeordnete Fibroblasten (5): MMP-1,-3; EZM (6): MMP-3,-10; TIMP-1,-2; Makrophagen (7): MMP-9, vereinzelt -12; Neutrophile (8): MMP-9; Lymphozyten (9): MMP-9; Endothelzellen (10): MMP-2,-3,-9; Perizyten (11): MMP-9

Es wird vermutet, dass die Tumorzellen über eine Sekretion von Interleukinen, Interferonen, EMMPRIN und Wachstumsfaktoren die Stromazellen zur Sythese von MMPs stimulieren können (Sternlicht MD und Werb Z, 2001). Dieser stimulierende Effekt auf das Tumorstroma kann einerseits durch Faktoren, die direkt von den Tumorzellen produziert werden, bedingt sein, andererseits aber auch das Ergebnis einer Entzündungsreaktion sein, die oft die Tumorentstehung begleitet (DeClerck YA, 2000). Viele Zytokine, wie z. B. Interleukin-1, -6 und -8, und Wachstumsfaktoren, die sich infolge der begleitenden Entzündungsreaktion oft in reichlicher Menge im Tumorgewebe finden lassen, können die Expression von MMPs auf Transkriptionsebene hochregulieren (Kusano K et al., 1998).

Die direkte Stimulation der Expression von MMPs in Fibroblasten durch Tumorzellen wurde bereits in verschiedenen Untersuchungen bewiesen (Himmelstein BP et al., 1994; Zucker S und Biswas C, 1994). Ein wichtiger Faktor,

der hierbei spezifisch die Expression von MMPs in Fibroblasten stimuliert, ist EMMPRIN, ein Induktor der Matrix-Metalloproteinasen (Guo H et al., 1998). Tatsächlich besteht die Möglichkeit, dass MMPs, die von Stromazellen sezerniert wurden, in die Tumorzellen gelangen, wie bereits für MMP-2 beschrieben. MMP-2 war als aktives Enzym immunhistochemisch sowohl in Tumor- als auch Stromazellen nachzuweisen, obwohl die mRNA Expression nur in Stromazellen stattfand (Egeblad M und Werb Z, 2002).

Da sich die Expression einiger Matrix-Metalloproteinasen, wie z. B. MMP-9, immer wieder in Leukozyten und Makrophagen nachweisen lies, wurde vermutet, dass es sich möglicherweise um eine Reaktion auf kleinere Blutungen handele, die durch die invadierende Tumorfront verursacht werden. Dies würde auf eine Funktion im Rahmen der Angiogenese hindeuten.

4.2.7. Matrix-Metalloproteinase-9

MMP-9 gehört zur Untergruppe der Gelatinasen und weist ein Molekulargewicht von 92 kDa auf. Sie wird auch als Gelatinase-B bezeichnet.
Exprimiert wird MMP-9 vorwiegend in Karzinomzellen, angrenzenden Stromazellen, Entzündungszellen (Makrophagen, Neutrophile, Lymphozyten) und Endothelzellen (Thomas GT et al.,1999). Die Synthese wird u. a. durch inflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 und TNF-α induziert. Ein über Zytokine vermittelter Regulationsmechanismus ist für solche MMPs wahrscheinlich, die in Fibroblasten an der Invasionsfront gebildet werden. TAT-2 (tumorassoziiertes Trypsin-2, eine Serinprotease) gilt als sehr potenter Aktivator von MMP-9 (Nyberg P et al., 2002). Endostatin hingegen hemmt neben dem Endothelzellwachstum auch die Aktivierung von MMP-9 und anderen MMPs (Nyberg P et al., 2003). Ein weiterer Inhibitor ist das gelatinasespezifische CTT-Peptid (Nyberg P et al., 2002).

Die Besonderheit der Gelatinasen ist ihre Fähigkeit zur Degradation von Kollagen Typ IV, das eine wesentliche Komponente der Basalmembranen darstellt, und Gelatin. Durch diese Tatsache wird den Gelatinasen eine entscheidende

Bedeutung in der Ausbreitung maligner Prozesse zugeschrieben. Ossowski und Mitarbeiter konnten zeigen, dass MMP-9 für das Eindringen von Tumorzellen in die Gefäße (Intravasation) von besonderer Bedeutung ist. Dabei waren nur Tumorzellen mit einer hohen Produktion von MMP-9 in der Lage, aus dem interstitiellen Bindegewebe in die Gefäße einzudringen. Durch die systemische Gabe eines Metalloproteinaseninhibitors konnte die Intravasation der Tumorzellen blockiert werden.

Oft wurde MMP-9 zudem als ein prognostischer Faktor beschrieben: Dabei soll MMP-9 mit einer schlechten Überlebensrate korrelieren: Patienten mit oralen Karzinomen, die eine erhöhte MMP-2 und MMP-9-Aktivität zeigten, hatten nach Behandlung eine kürzere krankheitsfreie Überlebenszeit als Patienten mit gelatinasefreien Tumoren (Yorioka CW et al., 2002, Katayama A et al., 2004).

4.3. Tissue Inhibitors of Metalloproteinases

4.3.1. Struktur der Tissue Inhibitors of Metalloproteinases

Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) sind physiologische Inhibitoren der Matrix-Metalloproteinasen.
Inzwischen sind vier verschiedene TIMPs bekannt (TIMP-1 bis -4; nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung benannt), die in verschiedenen menschlichen Geweben und Körperflüssigkeiten nachzuweisen sind (Gomez DE et al., 1997). Während TIMP-1, -2 und -4 in gelöster Form vorliegen, ist TIMP-3 an die extrazelluläre Matrix (EZM) gebunden (Brew K et al., 2000; Stricklin GP und Welgus HG, 1983).

Ähnlich wie die Matrix-Metalloproteinasen weisen auch ihre Inhibitoren einige Gemeinsamkeiten in Struktur und Funktion auf. Es sind Proteine mit einem Molekulargewicht von 21 bis 28 kDa mit einer festgelegten Struktur (Kleiner DE und Stetler-Stevenson WG, 1999). Alle TIMPs besitzen 6 Disulfidbrücken, die durch 12 Cysteine in definierten Regionen des Gesamtmoleküls gebildet werden. An ihrem N-terminalen Ende weisen die Inhibitoren eine feststehende Sequenz

(VIRAK) auf, die zur Inhibition der Matrix-Metalloproteinasen notwendig ist (Murphy G et al., 1991). Das C-terminale Ende des Moleküls scheint, strukturellen Analysen zur Folge, für diese Funktion nicht notwendig zu sein. Zur Aktivierung des Enzyms wird bei allen TIMPs eine Signalsequenz, die aus 29 Aminosäuren besteht, abgespalten (Denhardt DT et al., 1993; Greene J et al., 1996). Aktiviert werden die Enzyme durch verschiedene Faktoren, wie z. B. Phorbolester, Interleukin-1β (Overall CM, 1994), Tumor Growth Factor (TGF) - 1β (Overall CM et al., 1991), Epidermal Growth Factor (EGF), u. a. (Ganser GL et al., 1991). Dem Tumornekrosefaktor (TNF) kommt bei der Regulation der TIMPs eine besondere Bedeutung zu: bei niedriger TNF-Konzentration wird die TIMP-1-Produktion gefördert, bei hohen TNF-Spiegeln kommt es zu einer dosisabhängigen Hemmung von TIMP-1 (Ito A et al., 1990).

MMPs und TIMPs können im gleichen Gewebe (Tumor- und Stromazellen) produziert werden (Stetler-Stevenson WG et al., 1989).

4.3.2. Funktion und Regulation der TIMPs

Gewebsständige Inhibitoren der Matrix-Metalloproteinasen (TIMPs) gelten als multifunktionelle Proteine, die eine große Breite biologischer Aktivitäten besitzen (Fassina G et al., 2000). TIMPs inhibieren die Aktivität von Metalloproteinasen, regulieren Proliferation und Apoptose verschiedener Zelltypen und nehmen zudem Einfluss auf Angiogenese und Entzündungsreaktionen (Rhee JS et al., 2004).

Jeder Inhibitor besitzt die Fähigkeit, mit mehreren Mitgliedern der MMP-Familie sehr starke, nicht-konvalente Bindungen mit dem aktiven Zentrum der Enzyme einzugehen (Birkedal-Hansen H et al., 1993). Es wurde gezeigt, dass während der Inhibierung die terminale Aminogruppe der TIMPs einen Teil des aktiven Zentrums füllt (Gomis-Ruth FX et al., 1997). Neben ihrer Fähigkeit zur Inhibition der proteolytischen Aktivität der Matrix-Metalloproteinasen besitzen sie noch eine Reihe weiterer biologischer Funktionen. Sie können die Invasionsfähigkeit des Tumors reduzieren und die Metastasierung unterdrücken (Edwards DR und

Murphy G, 1998; Johnson M et al., 1998). Daher wurde ihnen auch schon eine protektive Rolle in menschlichen Tumoren zugeschrieben (Rhee JS et al., 2004).
In verschiedenen Studien, in denen Proben von Tumorgewebe der Patienten entnommen wurden, konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein einer größeren Menge aktivierter MMP-2 klinisch mit aggressiveren Formen von Brust- und Lungenkrebs einhergeht (Brown PD et al., 1993; Davies B et al., 1993). Diese Ergebnisse führten zu folgendem Schluss: Die assoziierten Tumoren oder Tumorzelllinien haben ein erhöhtes Metastasierungspotential wenn das Verhältnis zwischen aktiven MMPs zu TIMPs ansteigt (Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG, 1999). Dies konnten Gohji K et al. bei Patienten mit invasivem Blasenkarzinom bestätigen. Patienten mit einer erhöhten Ratio von MMP-2 zu TIMP-2 hatten früher Rezidive und aggressivere Krankheitsverläufe (Gohji K et al., 1996 u. 1998).

In vielen menschlichen Tumoren korrelierte jedoch auch eine erhöhte mRNA-Expression der TIMPs mit Malignität und schlechtem klinischen Verlauf (Curran S und Murray GI, 1999; Rhee JS et al., 2004). So gingen beispielsweise in einigen Studien erhöhte TIMP-Levels bei Karzinomen des Magens und der Blase mit einer schlechten Prognose einher (Grignon DJ et al., 1996). Das könnte die Annahme unterstützen, dass das Gleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs während der Tumorprogression durch einen erhöhten Matrix-Umbau insgesamt auf einem höheren Gesamtlevel ist. Hohe TIMP-Levels wären somit zwar mit Tumorprogression und schlechter Prognose assoziiert, würden sie jedoch nicht bedingen (Egeblad M und Werb Z, 2002).

In einigen experimentellen Studien scheinen TIMPs jedoch auch die Tumorprogression zu begünstigen. Dabei konnte gezeigt werden, dass TIMP-1 und -2 die Apoptose der Tumorzellen inhibieren, TIMP-2 und -3 das Tumorwachstum und TIMP-1 die Tumorangiogenese fördern können (Egeblad M und Werb Z, 2002). Dabei ist nicht geklärt, ob diese Funktionen Resultate der Inhibition der Proteasen oder proteinaseunabhängiger Aktivitäten, wie z. B. die Hochregulation antiapoptotischer Proteine, sind (Egeblad M und Werb z, 2002). Zudem ist bereits beschrieben worden, dass TIMPs die Sekretion von VEGF (vascular endothelial growth factor) fördern und somit auf die Tumorangiogenese wirken können (Egeblad M und Werb Z, 2002). Tierversuche zeigten außerdem

eindeutig, dass TIMP-2, entgegen seiner Bezeichnung, ein wichtiger Aktivator von MMP-2 ist (Wang Z et al., 2000).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass MMPs und TIMPs nicht nur geeignete Targets für eine antineoplastische Therapie darstellen, sondern auch klinisch für die Identifizierung von Subgruppen von Patienten mit einem erhöhten Rezidivrisiko Relevanz besitzen und somit als Marker der Aggressivität von Tumoren fungieren können (Grignon DJ et al., 1996; Kleiner DE und Stetler-Stevenson WG, 1999).

4.3.3. TIMP-1

Von allen physiologischen Inhibitoren der Matrix-Metalloproteinasen ist TIMP-1 am längsten und daher auch am besten bekannt.
Er wird von einer Vielzahl verschiedener Zellen synthetisiert und kommt in diversen Geweben vor. Das TIMP-1-Protein besteht aus 148 Aminosäuren inklusive der 12 Cysteine, die die bereits erwähnten Disulfidbrücken formen und das Protein in drei knotenähnliche Strukturen unterteilen (Williamson RA et al., 1990; Carmicheal DF et al., 1986).
Es hat sich in den letzten Jahren als multifunktionales Protein mit verschiedensten biologischen Funktionen erwiesen. So nimmt es neben der Inhibition der MMPs auch Einfluss auf die Aktivität von Wachstumsfaktoren (Hayakawa T et al., 1992) und auf Veränderungen in der Morphologie der Zellen (Ray JM und Stetler-Stevenson WG, 1995). Zudem soll TIMP-1 die Apoptose regulieren (Guedez l et al., 2001) und Entzündungsreaktionen verstärken (Apparailly F et al., 2001). Auch in der Steroidsynthese in den Gonaden wurde TIMP-1 eine Funktion zugeschrieben (Boujrad N et al., 1995).

In Bezug auf das biologische Verhalten und die Aggressivität von Tumoren scheint TIMP-1 zudem eine bedeutende - wenn nicht zugleich die interessanteste und am häufigsten kontrovers diskutierte - Rolle zu spielen. Es konnte gezeigt werden, dass Primärtumoren mit erfolgter Metastasierung geringere Spiegel für TIMP-1-RNA aufwiesen als Tumoren ohne Metastasen (Ikebe T et al., 1999). Es wurde sogar die These aufgestellt, dass ein Fehlen von TIMP-1 (besonders im

Zusammenhang mit nachweisbarer Expression von MMP-9) eine höhere Aggressivität der einzelnen Tumoren indizieren soll (Heissenberg MC et al., 1998).

Rhee JS und Mitarbeiter konnten allerdings zeigen, dass TIMP-1 die Tumorentstehung von Plattenepithelkarzinomen fördert, indem es die Keratinozyten zur Hyperproliferation anregt und das Auftreten von chromosomalen Aberrationen in prämalignen Zellen und dadurch auch das Risiko der Entartung verstärkt. In einigen Studien konnte sogar nachgewiesen werden, dass eine erhöhte TIMP-1-Expression in verschiedenen Tumoren (z. B. Kolorektale Tumoren, Lymphome, Mammakarzinome) mit Tumorprogression und einem schlechten Krankheitsverlauf bzw. Prognose einhergeht (Murashige M et al., 1996; Curran S und Murray GI, 1999; Schrohl AS et al., 2003).

Auch in Bezug auf die Angiogenese gibt es kontroverse Resultate: Nach Johnson MD et al. ist TIMP-1 auch an der Hemmung der Angiogenese beteiligt. Dagegen sprechen Resultate verschiedener Studien, die TIMP-1 eine Rolle als Promotor der Angiogenese zuschreiben (Lafleur MA et al., 2003; Yamada E et al., 2001; Thorgeirsson UP et al., 1996).

Ob sich seine Funktion je nach Tumorstadium ändert, ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Es könnte jedoch durchaus sein, dass TIMP-1 in frühen Stadien der Tumorerkrankung die epitheliale Kanzerogenese fördert, während es in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien die MMP-Aktivität inhibiert und die extrazelluläre Matrix stabilisiert, oder auch umgekehrt, ohne sich auf die Metastasierung auszuwirken (Rhee JS et al., 2004).

4.3.4. TIMP-2

TIMP-2 ist mit 21 kDa etwas kleiner als TIMP-1 (ca. 28 kDa). Die Aminosäuresequenz ist zu 40 % identisch mit der von TIMP-1 (Stetler-Stevenson WG et al., 1989). Es kann ebenfalls in verschiedenen Geweben gefunden werden, und auch in seinen Funktionen ähnelt es TIMP-1.

Funktionell zeigt TIMP-2 eine große Spannweite: TIMP-2 spielt einerseits eine Rolle als Adaptermolekül, das die Aktivierung von pro MMP-2 durch MT1-MMP an der Zelloberfläche fördert, andererseits wirkt es als Inhibitor von verschiedenen MMPs, darunter auch MMP-2. Ob TIMP-2 primär als Aktivator oder Inhibitor von MMPs wirkt, hängt von seiner Konzentration im Vergleich zu pro MMP-2 und MT1-MMP ab (DeClerck YA, 2000).

Auch hier stellt sich die Frage, welche spezifische Funktion TIMP-2 als Inhibitor der Metalloproteinasen bei der Tumorprogression zukommt.
TIMP-2 soll ein langsameres Wachstum bei Primärtumoren und eine Reduktion des Metastasierungspotentials bewirken (Kawamata H et al., 1995). Katayama A et al. zeigten ein gegenteiliges Ergebnis. Patienten, die regionale Lymphknoten-Metastasen oder hämatogene Fernmetastasen entwickelten, zeigten signifikant höhere Expressionswerte von TIMP-2 als Patienten ohne Tumormetastasen. Die stark erhöhten TIMP-2-Werte korrelierten auch mit einer schlechten Überlebensrate. Katayama A und Mitarbeiter folgerten somit, TIMP-2 habe einen prädiktiven Wert sowohl für die Entwicklung von Tumormetastasen als auch für die Überlebensrate. TIMP-2 sei dabei sogar der unabhängigste Faktor für eine schlechte Prognose in frühen Stadien der Plattenepithelkarzinome.

4.3.5. TIMP-3

TIMP-3 weist ein Molekulargewicht von 24 kDa auf und ist wie TIMP-2 unglykosyliert. 30 % seiner Aminosäuresequenz ist identisch mit TIMP-1 und 38 % seiner Aminosäuresequenz stimmt mit TIMP-2 überein (Pavloff N et al., 1992). TIMP-3 wird sezerniert, ist aber im Gegensatz zu TIMP-1 und -2 an die extrazelluläre Matrix (EZM) gebunden (Stricklin GP und Welgus HG, 1983).

TIMP-3 kommen einige wichtige Funktionen zu, die zu diesem Zeitpunkt jedoch nur bedingt geklärt sind und z. T. kontrovers diskutiert werden:
Es induziert die Apoptose von Tumorzellen (Ahonen MA et al., 1998; Baker AH et al., 1999) und unterdrückt somit das Tumorwachstum. Es hemmt die Angiogenese durch Inhibierung von VEGF (Anand-Apte B et al., 1996, 1997; Qi JH et al., 2003).

Zudem ist es als physiologischer Regulator bei Entzündungen von Bedeutung, indem es TACE/ADAM-17 (TNF Alpha Converting Enzyme / A Disintegrin And Metalloproteinase) und so die Bildung von löslichem Tumornekrosefaktor (TNF) hemmt (Black RA, 2004; Mohammed FF et al., 2004). Mohammed FF et al. konnten in einem Tierversuch nachweisen, dass Mäuse mit einem Mangel an TIMP-3 Entzündungen der Leber entwickelten, und dass diese Entzündungen durch einen Anstieg der TNF-α Aktivität bedingt waren. Die größte Rolle spielt es aber wohl bei der Inhibierung der Matrix-Metalloproteasen MMP-1, -2, -3, -9, -13 und -14 sowie von ADAM-17 (Airola K et al.., 1998; Amour A et al., 1998).
Andererseits soll TIMP-3 aber auch die Ablösung von transformierten Zellen von der EZM fördern und morphologische Veränderungen, die mit Zelltransformation einhergehen, beschleunigen (Yang TT und Hawkes SP, 1992).

Wie wir kürzlich zeigen konnten, ist eine erhöhte Expression von TIMP-3 mit einem verkürzten Gesamtüberleben von Patienten mit PEK der Kopf-Hals-Region assoziert (Kornfeld et al. 2011). Starke ADAM-17-Expression ging dabei mit erhöhter TIMP-3-Expression einher (Kornfeld et al. 2011). Seine Effekte auf Wachstum und Entwicklung wurden schon in mehreren Studien nachgewiesen. Airola K et al. konnten zeigen, dass TIMP-3 während der Fetalentwicklung des Menschen in verschiedenen Geweben hochreguliert ist. In normalem adulten Geweben konnte eine Expression von TIMP-3 lediglich in der Wachstumsphase von Haarfollikeln nachgewiesen werden. Dabei schien TIMP-3 nicht nur in Wachstumsvorgänge gesunder Gewebe involviert zu sein, sondern auch eine Rolle bei der Tumorprogression zu spielen. Airola K et al. konnten TIMP-3-mRNA sowohl in randständigen Tumorzellen von infiltrativ wachsenden Basaliomen als auch in umgebenden Stromazellen von Plattenepithelkarzinomen der Haut nachweisen, jedoch fand sich keine Expression in benignen Tumoren. Auch in anderen Tumoren, wie z. B. Kolonkarzinomen oder intraduktalen Mammakarzinomen, konnte TIMP-3 in den umgebenden Stromazellen nachgewiesen werden, nicht jedoch in den Tumorzellen. Auffällig dabei war, dass in beiden Tumorentitäten die Expression von TIMP-3 ko-lokalisiert war mit der Expression von TIMP-1 (Airola K et al., 1998). Miyazaki T et al. untersuchten die Expression von TIMP-3 in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus in Relation zu klinisch-pathologischen Faktoren und konnten dabei zeigen, dass eine verringerte

TIMP-3-Expression signifikant mit der Invasionstiefe, dem infiltrativen Wachstumsmuster, dem Erkrankungsstadium und der Zahl an Lymphknoten-metastasen korreliert. Ein regionaler Verlust an TIMP-3 scheint somit zu einer erhöhten Invasivität der Tumoren beizutragen (Powe DG et al., 1997). Miyazaki T et al. konnten zudem nachweisen, dass Patienten mit TIMP-3 positiven Tumoren signifikant höhere Überlebensraten hatten als Patienten mit TIMP-3 negativen Tumoren. Sie kamen so zu dem Schluss, dass die Expression von TIMP-3 in Tumoren zu einer besseren Prognose führt.

Zusammengefasst wurde das Vorhandensein von TIMP-3 mit einer Unterdrückung des Wachstuns von Tumorzellen assoziiert, was wiederum zur Folge hat, dass Tumoren mit höherem Malignitätsgrad (mehr invasive und weniger apoptotische Zellen) kein TIMP-3 exprimieren (Miyazaki T et al., 2004; Baker AH et al., 1999). Das weist darauf hin, dass TIMP-3 bei der Unterdrückung der Invasivität von Tumorzellen eine große Rolle spielen und somit zu neuen therapeutischen Ansätzen führen könnte.

V. Material und Methoden

5.1. Material

5.1.1. Herstellung der Sonden

5.1.1.1. Tumorzelllinien

Zur Herstellung der Sonden wurde cDNA aus der oralen Tumorzelllinie UM SCC 14 C (Mundboden, T1 N0 M0, G3, F, 58 J.) und UM SCC 22 A (Hypopharynx, T2 N1 M0, G2, F, 59 J.) verwendet, die freundlicherweise von Dipl. Biochemiker J. W. Kornfeld zur Verfügung gestellt wurden.

5.1.1.2. PCR

Die Taq-Polymerase wurde zusammen mit dem 10x Puffersystem und dem Ultrapure-dNTP-Set von der Firma Pharmacia bezogen. Das dNTP-Set wurde von je 100 mM je Nukleotid auf 10 mM verdünnt (dNTP-Mix).

5.1.1.3. Vektoren

Es wurde der Vektor pCR®II-TOPO® (Invitrogen, Leek, Niederlande) verwendet.

5.1.1.4. Bakterienstämme

Zur Amplifikation der Plasmide wurden folgende E. coli-Zellen verwendet:
MAX Efficiency® DH5α™Competent Cells (Invitrogen, Leek, Niederlande)

5.1.1.5. Medien zur Anzucht von Bakterien

LB-Medium:

10 g	Bacto-Trypton
5 g	Bacto-Hefe Extrakt
10 g	NaCl

in 800 ml A. dest. gelöst, auf pH 7,5 eingestellt, anschließend mit A. dest. auf 1000 ml aufgefüllt und autoklaviert.

LB-Ampicillin-Platten:

Zur Bakterienanzucht wurde dem LB-Medium Bacto-Agar in einer Endkonzentration von 1,5% zugesetzt. Nach Autoklavieren und Abkühlen auf 50°C wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ ml zugefügt. Das Nährmedium wurde in Petrischalen (∅: 9 cm) gegossen, bei Raumtemperatur abgekühlt und anschließend bei 4°C gelagert. Zur Blau-Weiß-Selektion wurden die Platten mit 40 µl IPTG (100 mM) versetzt und bei 37°C für 20 min getrocknet. Danach wurde X-GAL (Farbstoff; 40 µl, 1:10 verdünnt) ausplattiert. Die Platten wurden wieder bei 37°C für 20 min getrocknet und nach dem Abkühlen bei + 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

5.1.1.6. Marker

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe und Analyse der PCR-Produkte wurden Agarosegele verwendet.
Für die Abschätzung der Fragmentgrößen wurden folgende Marker verwendet:
Marker VII (Roche, Mannheim)
Marker XIV (Roche, Mannheim)

5.1.1.7. Restriktionsenzyme

Es wurden folgende Restriktionsenzyme und Puffer verwendet:

Enzyme: EcoR I (New England BioLabs®)
Xho I (New England BioLabs®)
BamH I (New England BioLabs®)
Spe I (New England BioLabs®)
Hind III (New England BioLabs®)

Puffer: Eco-Puffer (New England BioLabs®) (in Kombination mit EcoR1)
NEB-Puffer 2 (New England BioLabs®) (in Kombination mit Xho I / Spe I / Hind III)
BamH I-Puffer (New England BioLabs®) (in Kombination mit BamH I)

5.1.1.8. Primer

Die folgende Tabelle zeigt die Sequenzen des Primers-1 (M13 (-20) Forward Primer)) und des Primers-2 (M13 Reverse Primer). Primer-1 enthält einen T7 Promotor, Primer-2 einen SP6 Promotor. Die Primer stammten aus ABI PRISM BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit der Firma Applied Biosytems.

Tab. 4: Anordnung von Primer und Promotor im Zusammenhang mit den verwendeten Spaltenzymen im pCR®II-TOPO® (Vektor, 4.0 kb)

Primer	Promotor	Richtung	Sequenz	Enzym	Sonde
Primer-1	T7 Promotor	(5'→ 3')	5'- TTG TAA AAC GAC GGC CAG TGA ATT GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CGA -3'	BamH1 / Spe1	antisense
Primer-2	SP6 Promotor	(3'→ 5')	3'- CAG GAA ACA GCT ATG ACC ATG ATT ACG CCA AGC TAT TTA GGT GAC ACT ATA GAA -5'	Xho1	sense

5.1.1.9. RNA-Markierung

Die markierte RNA wurde durch in vitro Transkription unter Einbau von Digoxigenin-UTP hergestellt. Dazu wurde der DIG-RNA-Labeling-Mix (Roche Mannheim GmbH) verwendet.

5.1.1.10. Puffer

TBE-Puffer: 40 mM Tris/HCl
2 mM EDTA
pH 8,0

5.1.2. Patientenmaterial

Es wurde Tumorgewebematerial von 120 Patienten mit oralen/oropharyngealen Karzinomen verwendet. Die geplanten Untersuchungen stützten sich auf in Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe (Primärtumoren, Lymphknoten) aus dem Archiv des Institutes für Oralpathologie der Universität Hamburg. Das Tumormaterial stammte aus den Jahren 1997-2004. Alle Patienten wurden im Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf operiert und hatten ihr Einverständnis gegeben, das entfernte Tumorgewebe für Forschungszwecke zu verwenden. Ein positives Votum der Ethikkommission lag vor.
In Zusammenarbeit mit dem Institut für Oralpathologie und der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, Universität Hamburg, wurden von diesen Fällen klinische Daten zum Vergleich mit den experimentellen Daten erfasst.

5.1.3. In Situ-Hybridisierung

Die nachfolgend aufgelisteten, für die In situ-Hybridisierung benötigten Salze/ Chemikalien wurden, soweit nicht anders beschrieben, von den Firmen Sigma-Aldrich, St. Louis, USA; Merck Eurolab, Darmstadt, Deutschland; J. T. Baker, Deventer, Niederlande; Fluka, Buchs, Schweiz; Invitrogen, Carlsbad, USA; Boehringer Mannheim GmbH / Roche, Penzberg, Deutschland; bezogen.

H_2O / DEPC (ca. 5 Liter):
Es wurde 1 ml DEPC (Diethyl Pyrocarbonat) in 1 l Aqua bidest gegeben, dann geschüttelt und über Nacht stehen gelassen. Am nächsten Tag wurde das DEPC-Wasser autoklaviert.

1 M Tris / HCL:
121,1 g Tris (Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan) wurden in 800 ml DEPC-Wasser gelöst, mit HCL (Salzsäure, 2 mol/l), ca. 70 ml, auf pH = 7,4 eingestellt und mit DEPC-Wasser auf 1 l aufgefüllt. Anschließend wurde der Tris-Puffer autoklaviert.

0,5 M EDTA (pH 8):
186,1 g EDTA (Diethylen-diamin-tetraessigsäure) wurden in 800 ml DEPC-Wasser gelöst und mit NaOH auf pH = 8 eingestellt, das Volumen wurde auf 1 l mit DEPC-Wasser ergänzt und autoklaviert.

3 M NaCl:
175,3 g NaCl (Natriumchlorid) wurden in 1 l DEPC-Wasser gelöst. Anschließend wurde die Lösung autoklaviert.

1 M $MgCl_2$:
15,21 g $MgCl_2$ (Magnesiumchlorid) wurden in 1 l DEPC-Wasser gelöst und anschließend autoklaviert.

20x SCC:

175,3 g NaCl und 88,2 g Sodium Citrat wurden in 800 ml DEPC-Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde mit NaOH (Natriumhydroxid) auf pH 7 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung autoklaviert.

0,2 N HCL:

Pro Küvette wurden 70 - 80 ml benötigt. Dafür wurden 20 ml 2M HCL / 200 ml DEPC-Wasser gegeben.

0,3% TritonX-100:

Pro Küvette wurden 70 - 80 ml benötigt. Dafür wurden 600 µl TritonX-100 zu 200 ml PBS / DEPC (20 ml 10x PBS + 180 ml DEPC-H_2O) gegeben und gerührt.

4% PFA:

Das Paraformaldehyd wurde frisch angesetzt und höchstens 2 Wochen verwendet. 8 g Paraformaldehyd (PFA) wurden in 200 ml PBS / DEPC (20 ml 10x PBS + 180 ml DEPC-H_2O) unter dem Abzug auf 60°C erwärmt, durch Zugabe von 1 M NaOH wurde das PFA gelöst. Anschließend wurde nach Abkühlen auf Raumtemperatur der pH-Wert auf pH = 7,4 eingestellt und die Lösung bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

0,1 M Acetylierungspuffer:

9 g Triethanolamin (Feststoff) wurden in 500 ml DEPC-H_2O gelöst. Der pH-Wert wurde mit 37% HCL (rauchend) auf pH = 8 eingestellt, dann mit DEPC-H_2O auf 600 ml aufgefüllt.

Alternativ: 6,66 ml Triethanolamin (Flüssigkeit) wurden in 450 ml DEPC-H_2O gelöst. Der pH-Wert wurde mit 37 % HCL (rauchend) auf pH = 8 eingestellt, dann mit DEPC-H_2O auf 500 ml aufgefüllt und anschließend autoklaviert.

Proteinase K (SIGMA):

Es wurde eine Stammlösung von 10 mg / ml hergestellt und Aliquots wurden bei -20°C eingefroren.

Proteinase-K-Puffer:

Pro Küvette benötigte man 140 - 160 ml.

Tab. 5: Zusammensetzung des Proteinase-K-Puffer (In situ-Hybridisierung)

Stammlösung	Verdünnung	Endkonzentration	Menge für 400 ml
1 M Tris (7,4)	1:10	100 mM	40 ml
500 mM EDTA	1:10	50 mM	40 ml
DEPC-H_2O			ad 400 ml

RNAse-Puffer:

Pro Küvette benötigte man 140 - 160 ml.

Tab. 6: Zusammensetzung RNAse-Puffer (In situ-Hybridisierung)

Stammlösung	Verdünnung	Endkonzentration	Menge für 400 ml
3 M NaCl	1:6	0,5 M	66,66 ml
1 M Tris (pH 7,4)	1:100	10 mM	4 ml
0,5 M EDTA	1:500	1 mM	800 µl
DEPC-H_2O			ad 400 ml

RNAse A:

Die RNAse A (Roche GmbH Mannheim) stammte aus Rinder-Pankreas. Sie wurde bei -20°C gelagert.

Waschpuffer:

Pro Küvette benötigte man 70 - 80 ml. Der Waschpuffer wurde unter dem Abzug angesetzt.

Tab. 7: Zusammensetzung des Waschpuffers (In-situ-Hybridisierung)

Stammlösung	Verdünnung	Endkonzentration	Menge für 200 ml
3 M NaCl	1:10	0,3 M	20 ml
100% deion. Form.	1:2	50%	100 ml
1 M Tris (pH 7,4)	1:50	20 mM	4 ml
0,5 M EDTA	1:500	1 mM	400 µl
1 M DTT	1:100	10 mM	2 ml
DEPC-H_2O			ad 200 ml

3 M Na-Acetat (pH 6 u. 5,2):

40,81 g Natrium-Acetat wurden in 150 ml DEPC-Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde mit Eisessig (100% Essigsäure) auf pH 6 bzw. pH 5,2 eingestellt und das Volumen mit DEPC-Wasser auf 200 ml ergänzt und autoklaviert.

1 M DTT:

3,09 g Dithiothreitol (DTT) wurden in 20 ml 0,01 M Natrium-Acetat (pH = 5,2) gelöst, filtriert und in 1 ml Aliquots bei -20°C eingefroren.

100 x Denhardt's:

2 g Ficoll (Typ 400; Pharmacia) und 2 g PVP (Polyvinylpyrolidone) wurden in 70 ml DEPC-Wasser gelöst und auf 60°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 2 g Bovines Serum Albumin (BSA, Fraktion V) hinzugegeben. Das Volumen wurde auf 200 ml mit DEPC-Wasser ergänzt und in 1 ml Aliquots bei -20°C eingefroren.

20% Dextransulfat in 100% deionisiertes Formamid:

10 mg Dextransulfat wurden in 50 ml deionisiertem Formamid in einem sterilen Gefäß gelöst. Anschließend wurde es bei -20°C eingefroren.

Poly-A:

Die Substanz wurde mit DEPC-Wasser auf eine Konzentration von 10 mg / ml eingestellt und in 1 ml Aliquots bei -20°C eingefroren.

t-RNA (Invitrogen):

Die Substanz wurde mit DEPC-Wasser auf eine Konzentration von 20 mg / ml eingestellt und in 1 ml Aliquots bei -20°C eingefroren.

SS-DNA:

Die Konzentration der Lachssperma-DNA (Invitrogen) wurde mit DEPC-Wasser auf 20 mg / ml eingestellt. Durch 10 maliges Auf- und Abziehen wurde die DNA geschert. Die Aliquots wurden bei -20°C eingefroren. Vor Gebrauch musste die DNA für 5 min im Wärmeblock (95°C) denaturiert, dann auf Eis abgekühlt werden.

Prä-Hybridisierungs-Mix:

Tab. 8: Zusammensetzung Prä-Hybridisierungs-Mix (In situ-Hybridisierung)

Stammlösung	Verdünnung	Endkonzentration	Menge für 6 ml
1 M Tris (pH 7,4)	1:50	20 mM	120 µl
3 M NaCl	1:10	0,3 M	600 µl
0,5 M EDTA	1:500	1 mM	12 µl
1 M DTT	1:10	100 mM	600 µl
100% deion. Form.	1:2	50%	3000 µl
100x Denhardt's	1:100	1x	60 µl
Poly-A (10 mg/ml)	1:100	100 µg/ml	60 µl
SS-DNA (20 mg/ml)	1:40	500 µg/ml	150 µl
t-RNA (20 mg/ml)	1:40	500 µg/ml	150 µl
DEPC-H_2O			ad 6000 µl

Levamisol (SIGMA):

Die Konzentration wurde mit DEPC-Wasser auf 400 mg / ml eingestellt.

NBT/BCIP:

Nitroblue tatrazolium chloride / X-phosphate-5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (NBT/BCIP, Roche), Phosphatase-Substrat.

Nuclear Fast Red:

Der Farbstoff Nuclear Fast Red stammte von der Firma Vector Laboratories, Burlingame, CA. Vor jedem Gebrauch wurde er filtriert

Hybridisierungs-Mix:

Tab. 9: Zusammensetzung Hybridisierungs-Mix (In situ-Hybridisierung)

Stammlösung	Verdünnung	Endkonzentration	Menge für 1 ml
1 M Tris (pH 7,4)	1:50	20 mM	20 µl
3 M NaCl	1:10	0,3 M	100 µl
0,5 M EDTA	1:500	1 mM	2 µl
1 M DTT	1:10	100 mM	100 µl
20% Dextransulfat in 100% deion. Formamid	1:2	10% Dextransulfat in 50% deion. Formamid	500 µl
100x Denhardt's	1:100	1x	10 µl
Poly-A (10 mg/ml)	1:100	100 µg/ml	10 µl
SS-DNA (20 mg/ml)	1:40	500 µg/ml	25 µl
t-RNA (20 mg/ml)	1:40	500 µg/ml	25 µl
DEPC-H_2O			ad 1000 µl
Sonde		50 ng/Schnitt	40 µl

Detektionspuffer-1:

Man benötigt ca. 1 Liter Puffer. Der pH-Wert muss pH 7,4 betragen.

Tab. 10: Zusammensetzung Detektionspuffer-1 (In situ-Hybridisierung)

Stammlösung	Verdünnung	Endkonzentration	Menge für 1 l
1 M Tris (pH 7,4)	1:10	0,1 M	100 ml
3 M NaCl	1:20	0,15 M	50 ml
DEPC-H_2O			ad 1000 ml

Detektionspuffer-2:

Man benötigt 300 ml. Der pH-Wert muss pH 9,5 betragen.

Tab. 11: Zusammensetzung Detektionspuffer-2 (In situ-Hybridisierung)

Stammlösung	Verdünnung	Endkonzentration	Menge für 300 ml
1 M Tris (pH 9,5)	1:10	0,1 M	30 ml
3 M NaCl	1:30	0,1 M	10 ml
1 M $MgCl_2$	1:20	50 mM	15 ml
DEPC-H_2O			ad 300 ml

Detektionspuffer-3 (= Stopp-Puffer):

Man benötigt ca. 200 ml. Der pH-Wert muss pH 7,4 betragen.

Tab. 12: Zusammensetzung Detektionspuffer-3 (In-situ Hybridisierung)

Stammlösung	Verdünnung	Endkonzentration	Menge für 200 ml
1 M Tris (pH 7,4)	1:100	10 mM	2 ml
0,5 M EDTA	1:500	1 mM	400 µl
DEPC-H_2O			ad 200 ml

Detektionslösung:

Tab. 13: Zusammensetzung Detektionslösung (In situ-Hybridisierung)

Stammlösung	Endkonzentration	Menge für 10,16 ml
Detektionspuffer-2		10 ml
TritonX-100	0,3%	30 µl
NBT (100 mg/ml) BCIP (50 mg/ml)	337,5 µg/ml 175 µg/ml	200 µl
Levamisol (400 mg/ml)	2,4 mg/10 ml	16,3 µl

5.1.4. Immunhistochemie

5.1.4.1. Antikörper

Es wurde der monoklonale Maus-Anti-Human-MMP-9-Antikörper (Ab-3, Klon 56-2 A 4) von der Firma Oncogene Research Products (San Diego, USA) verwendet.
Zur Herstellung des Antikörpers diente ein Peptid als Immunogen, das mit den Aminosäuren 626 - 644 des humanen MMP-9-Proteins korrespondierte. Der monoklonale AK reagiert sowohl mit der latenten (92 kDa) als auch mit der aktiven Form (83 kDa) von MMP-9, jedoch mit keiner anderen Matrix-Metalloprotease.

5.1.4.2. Puffer

10x TBST-Puffer:
181,65 g Tris und 262,98 g NaCl wurden in 2 l entionisiertem Wasser vollständig aufgelöst und das Volumen auf 2,5 l aufgefüllt. Dann wurden 15 g Twee-20 (Merck Eurolab, Darmstadt) zugegeben und mit ca. 170 ml 25% iger Salzsäure der pH-Wert auf pH = 7,6 eingestellt. Das Volumen wurde mit entionisiertem auf 3 l aufgefüllt.

5.1.4.3. Lösungen

Es wurden die vorgefertigten Lösungen des DAKO ChemMate™ Detektion Kit (Streptavidin-Biotin-HRP/DAB, #K 5001, DAKO, Glostrup, Dänemark) verwendet:
DAKO ChemMate Antibody Diluent (#S 2022)
Lösung-A
DAKO ChemMate Peroxidase-Blocking Solution (#S 2023)
Lösung-B
DAB (1:50 Verdünnung von Lösung C in Lösung D)

5.1.5. Verbrauchsmaterialien

5.1.5.1. Sonstige Reagenzien und Materialien

BSA (Bovines Serum Albumin) (Sigma-Aldrich)
Entellan (Merck Eurolab)
Ethanol, Isopropanol (Merck Eurolab)
Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,5 μg/ml) (Sigma-Aldrich)
Eukitt® (O. Kindler GmbH, Freiburg, Deutschland)
Hämalaun (Merck Eurolab)
Essigsäure 10% (Merck Eurolab)
Xylol (Fluka)
SuperFrost Plus Objektträger (Menzel-Gläser, Stuttgart, Deutschland)

5.1.5.2. Geräte

Durchlichtmikroskop Leica DMLB (Leica Mikroskopie und Systeme GmbH, Wezlar, Deutschland)
Zeiss Axioplan 2® Lichtmikroskop (Carl Zeiss Meditec AG, Jena, Deutschland)
Dampfkochtopf (Biocare Medical, Concord, USA)
Gel-Dokumentationssystem Intas® (Intas® GmbH, Göttingen, Deutschland)

Gel-Elektrophorese-Anlagen (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland)
Mikrowelle (Promicro, München, Deutschland)
Schüttelwasserbad (Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland)
UV-Spectrometer Ultrospec 2000 (Amersham, Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg, Deutschland)
Zellkultur-Brutschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland)
Zentrifuge (Hettich, Villingen-Schweningen, Deutschland)

5.2. Methoden

5.2.1. Herstellung der Sonden

Die Sonden von TIMP-1 und TIMP-2 wurden freundlicherweise durch Frau Dr. S. Riethdorf zur Verfügung gestellt und mussten für diese Arbeit lediglich markiert werden. Die Sonden von MMP-9 und TIMP-3 wurden für die Dissertation eigens hergestellt. Für TIMP-3 wurden in der Genbank (Genbank-Nummer: NM_000362.4) verschiedene Varianten beschrieben, die in der Länge des 3'-Endes der mRNA variieren, wie in Northern-Blot-Untersuchungen gezeigt werden konnte. Daher entschied man sich bezüglich TIMP-3 zur Herstellung zweier unterschiedlich lokalisierter Sonden, wobei eine Sonde (TIMP-3-Variant) hauptsächlich in der codierenden Sequenz (zwischen den Nukleotiden der 1448. und 1893. Position) und eine weitere Sonde (TIMP-3-3') am 3' Ende (zwischen der 4518. und 5012. Position) lag (siehe Abbildung 3). In den Versuchen konnten allerdings mit der TIMP-3-3'-Sonde keine eindeutig zuzuordnenden und weiterführenden Ergebnisse erreicht werden, und so entschied man sich für die TIMP-3-Variant-Sonde, die gute Resultate lieferte.

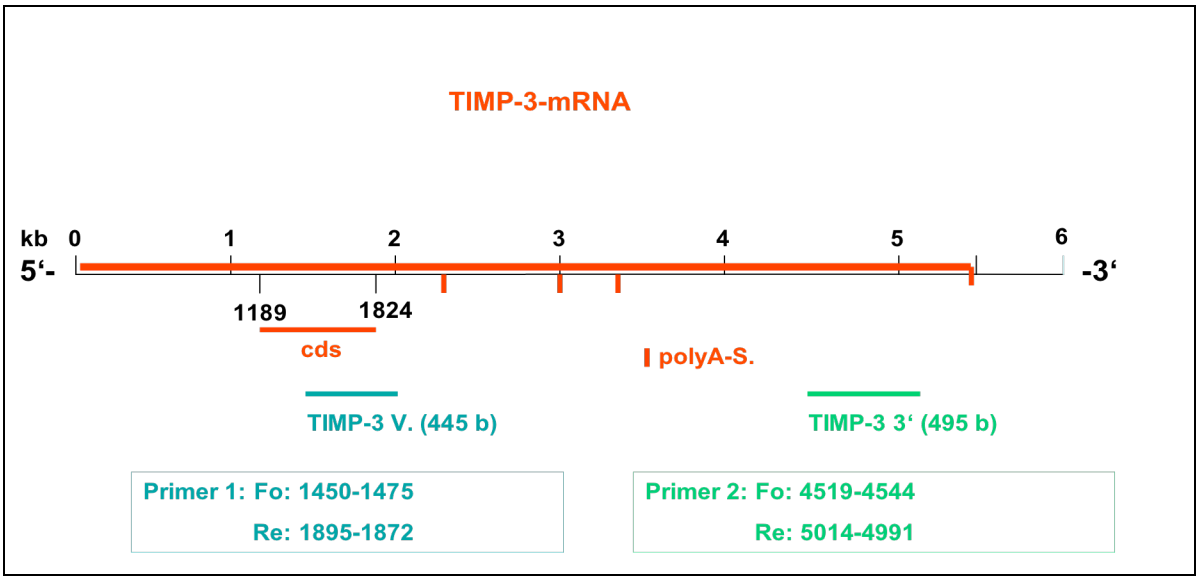


Abb. 4: Konstruktion und Lokalisation der TIMP-3-mRNA-Sonden.

Die Sonde TIMP-3-Variant ist 445 b lang und liegt hauptsächlich in der codierenden Sequenz, die zweite Sonde TIMP-3-3' ist etwas größer (495 b) und befindet sich am 3'-Ende der mRNA von TIMP-3.

5.2.1.1. DNA-Amplifikation über Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist eine Methode, um definierte DNA-Fragmente logarithmisch zu amplifizieren.

Die PCR läuft in drei Schritten ab, die für jede DNA-Synthese nötig sind:

1. Denaturierung der Ausgangs-DNA (Template) in Einzelstränge
2. Annealing: Bindung von Oligonukleotid-Primern an beide Einzelstränge
3. Elongation: Synthese der DNA, ausgehend von den gebundenen Primern.

Als Template wurde cDNA verwendet, die aus humanen HNSCC-Linien (UM SCC 14 C (TIMP-3) und UM SCC 22 A (MMP-9)) gewonnen wurde. Das dNTP-Set wurde von 100 mM je Nukleotid auf 10 mM verdünnt (dNTP-Mix).

PCR-dNTP-Mix: je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
10x PCR-Puffer: 800 mM Tris/HCl, pH 8,9
200 mM (NH4)2SO4
50 mM MgCl2
Taq DNA Polymerase (2,5 U/µl)

In jeder PCR wurden zwei Kontrollen mitgeführt, um Kontaminationen auszuschließen. Es wurde jeweils eine Probe ohne Template und eine Probe ohne Primer angesetzt. In beiden Kontrollen darf kein PCR-Fragment entstehen.

PCR-Procedere:

- Denaturierung 4 Minuten bei 94°C, danach folgten 34 Zyklen à
- Denaturierung 1 Minute bei 94°C
- Hybridisierung der Stränge (Annealing) 1 Minute bei 63,9°C
- Verlängern der Stränge (Elongation) 1 Minute bei 72°C

5.2.1.2. Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe und Analyse der PCR-Produkte wurden Agarosegele verwendet. Die Agarosekonzentration betrug 1 % (w/v). Die erforderliche Agarosemenge wurde in TBE-Puffer aufgekocht und nach dem Abkühlen auf etwa 55°C mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,5 μg/ml) versetzt. Die Lösung wurde in einen Gelträger gegossen und bei Raumtemperatur abgekühlt. Das erstarrte Gel wurde in eine mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt, die Proben mit Probenpuffer (Bromphenolblau, Glycin; Sigma) versetzt und neben einem Marker (Marker 14, Roche) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 5 V/cm durchgeführt. Durch das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid wurden die DNA-Fragmente unter UV-Licht als Banden sichtbar.

5.2.1.3. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Es wurde der Qiaquick-Gel-Extractions-Kit mit den zugehörigen Puffern der Firma Qiagen verwendet.

Das DNA-Fragment wurde unter UV-Licht auf einem Transilluminator mit einem scharfen, sterilen Skalpell aus dem Agarosegel augeschnitten. Das Gelstück wurde in einem durchsichtigen Tube gewogen. Dann wurde 1 ml Puffer QG (Lysepuffer; pH = 7,5) pro Tube dazugegeben. Anschließend wurden die Tubes 10

min bei 50°C inkubiert. Nachdem sich das Gelstück vollständig gelöst hatte, wurde die Farbe der entstandenen Lösung kontrolliert (sie sollte gelb sein wie Puffer QG), denn eine effiziente Adsorption der DNA an die QIAquick-Membran wird nur bei einem pH von 7,5 erreicht. Dem Mix wurden 100µl/100mg Agarosestückchen Isopropanol hinzugefügt. Dieser Schritt erhöht die Ausbeute von DNA-Fragmenten < 500 bp und > 4kb. Das gesamte Volumen wurde auf eine QIAquick-Säule, die in ein zugehöriges 2 ml Zentrifugenröhrchen gesetzt wurde, gegeben und bei 13000 rpm zentrifugiert. Danach wurden 0,5 ml Puffer QG zugefügt und zentrifugiert. Dieser Schritt sollte alle Reste der Agarose lösen und entfernen. Anschließend wurde die DNA 1 min mit 700 µl Puffer PE (enthält Ethanol) gewaschen. Der Durchfluss wurde verworfen und die QIAquick-Säule 1 min zentrifugiert (> 10000 x g bzw. 13000 rpm). Die QIAquick-Säule wurde in ein neues Röhrchen gesetzt. Um die DNA aus dem Filter zu waschen, wurden 30 µl Puffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) in die Mitte der Säule gebracht und 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die effiziente Ausbeute ist pH abhängig, die maximale Ausbeute erreicht man bei einem pH zwischen 7,0 und 8,5.

5.2.1.4. Transformation kompetenter Zellen

200 µl kompetente Zellen (Escherichia coli DH 5α) wurden auf Eis aufgetaut und mit 1 µg Vektor-DNA bzw. einem Ligationsansatz gemischt. Nach 20 minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock von 30 sec bei 42°C. Nach weiteren 2 min auf Eis wurden 250 µl SOC-Medium zugegeben und der Ansatz wurde 60 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 30 µl des Transformationsansatzes auf einer LB-Ampicillin-Agarplatte, die 50-100 µg/ml Ampicillin und je 40µl IPTG / X-Gal enthielt, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit den erhaltenen Kolonien wurden 5 ml LB-Medium, das 200 µg/ml Ampicillin enthielt, angeimpft.

5.2.1.5. Mini- und Maxi-Präparation (nach Qiagen und Sigma)

Die abzentrifugierten E. coli-Zellen wurden mit 200 µl Suspensionspuffer, dem zuvor RNAse A (Boehringer) zugefügt worden war, resuspendiert und anschließend zentrifugiert. Danach wurden 250 µl Puffer P 2 (Lysepuffer) zugegeben und für maximal 5 min vorsichtig geschwenkt. Nach Zugabe von Puffer N3 (Stopppuffer) und mäßigem Schütteln wurde die Lösung trüb. Die Lösung wurde 10 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und so noch vorhandene Zellreste absedimentiert. Der Überstand wurde abgehoben und für weitere für 30 - 60 Sekunden zentrifugiert. Anschließend wurden 0,5 ml Puffer PB dazugegeben und erneut bei 8000 Umdrehungen zentrifugiert. Die DNA wurde dadurch an die Filter-Matrix gebunden. Die QIAprep-Säule wurde danach mit 0,75 ml Puffer PE (Ethanol-Puffer) gewaschen und für 30 - 60 sec zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Säule für weitere 2 min bei 10000 Umdrehungen zentrifugiert, um Überreste des Waschpuffers zu entfernen.
Die Säule wurde in ein neues steriles Zentrifugenröhrchen gestellt und 50 µl Puffer EB (Elutionspuffer, 10 mM Tris-Cl, pH 8,5) in die Mitte der Membran gegeben. Es folgte eine Inkubation von 1 min und anschließend eine einminütige Zentrifugation.

5.2.1.6. Konzentrationsbestimmung von DNA

Photometrische Analyse:
Die photometrische Messung von DNA erfolgte bei 260 nm in einer Quarzküvette gegen TE bzw. Aqua dest. im Biophotometer von Eppendorf. Eine OD 260 von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg / ml doppelsträngiger DNA.

5.2.1.7. Restriktionsverdau mit EcoR I

Zur Verifizierung des einklonierten PCR-Produkts im Vektor pCR®II-TOPO® und zur Bestimmung der Insertgröße wurde eine Restriktionsanalyse mit dem Restriktions-enzym EcoR I durchgeführt.

Pro isoliertem Plasmid wurde folgender Restriktionsansatz gemacht:

1 µl 10x Eco-Puffer
1 µl Restriktionsendonuklease EcoR1
5 µl Plasmid-DNA
3 µl Aqua dest.

Der Ansatz wurde mindestens 1 h bei 37°C inkubiert. Die Analyse des Restriktionsverdaus erfogte mit einem Aliquot im 1% -TBE-Gel. Als Reaktionspuffer wurde der EcoRI Puffer des New England Biolabs (NEB) Puffer Systems verwendet. Diese Puffer werden vom Hersteller als 10x konzentrierte Stammlösungen zusammen mit den Enzymen geliefert.

5.2.1.8. Sequenzierung von Plasmid-DNA

Um die Orientierung des Inserts zu bestimmen, wurde eine Sequenzierung der Plasmid-DNA durchgeführt.
Der Sequenzierungsansatz setzte sich wie folgt zusammen (aus ABI PRISM Big-Dye-Terminator-Kit der Firma Applied Biosystems):

2 µl Big-Dye Terminator Sequenzierungspuffer
4 µl Big-Dye Ready Reaction Premix (mit Fluoreszenz)
4 µl Primer (forward M 13 Primer)
3 µl Plasmid-DNA (zuletzt)
7 µl Aqua dest.

Es folgte eine PCR mit 25 Zyklen: 94°C - 30 sec, 50°C - 15 sec, 60°C - 4 min.
Anschließend wurden zu 20 µl PCR-Produkt 80 µl 75%-iger Isopropanol gegeben, der Ansatz wurde gut gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 20 min Zentrifugation bei 13000 rpm wurde das Pellet mit weiteren 250 µl 75%-igem Isopropanol gewaschen. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 13000 rpm für 5 min. Anschließend wurde das Pellet im Thermoblock 10 min bei 37°C getrocknet.

5.2.1.9. Linearisierung des Plasmids

Die Enzyme, die zur Linearisierung der Plasmide eingesetzt werden, dürfen die Vektoren nur einmal und so nahe wie möglich am Insert spalten. Unter keinen Umständen dürfen die Enzyme das Insert selbst spalten.
Es wurden pro Plasmid 2 Spaltungsansätze pipettiert, um „Antisense“ und „Sense“-Sonden generieren zu können:
80 µl Plasmid
10 µl BamH I-Puffer (für BamH I), NEB-Puffer 2 (für Xho I und Spe I))
1 µl BSA (Bovines Serum Albumin)
4 µl Aqua dest.
5 µl Restriktionsenzym (BamH I, Xho I, Spe I)
Die Reaktionsansätze wurden 4-5 Stunden bei 37°C inkubiert.

5.2.1.10. Aufreinigung der linearisierten Template-DNA

Durch Zugabe von 100 µl Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25 / 24 / 1 (v / v / v)) wurde das gespaltene Plasmid von Proteinen gereinigt. Dazu wurden die Proben 5 min bei 7500 rpm zentrifugiert. Danach wurden 80 µl der wässrigen Phase in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt. Das linearisierte Plasmid wurde danach gefällt.
Dazu wurde folgende Fällungsreaktion angesetzt:

100 µl Plasmid
10 µl 3 M NaCl (pH 6)
220 µl 100% Ethanol (eiskalt)

Die Präzipitation erfolgte für mind. 1 h bei -80°C. Nach Zentrifugieren bei 12000 rpm für 30 min wurde das Pellet mit 70%-igem Alkohol (-20°C) gewaschen, getrocknet und anschließend in 15 µl DEPC-Wasser gelöst.

5.2.1.11. In-vitro-Transkription des gespaltenen Plasmids

Die Transkription der gespaltenen Plasmide wurde mit folgenden RNA-Polymerasen durchgeführt:
- BamH I / Spe I zur Herstellung der antisense-Sonde
- Xho I zur Herstellung der sense-Sonde

Die zu transkribiernde DNA wurde in die Polylinkerregion geeigneter Transkriptionsvektoren (pCR®II-TOPO®, 4.0 kb) kloniert, welche Promotoren für Sp6- / T7-RNA-Polymerasen enthielten. In einer Standard-Reaktion können, ausgehend von 1 μg linearisierter Plasmid-DNA mit einem Insert von ca. 1 kb, etwa 10 μg DIG-markierte RNA synthetisiert werden.

Es wurde folgender DIG-RNA-labeling-Mix angesetzt:

1 µg Plasmid-DNA
2 µl NTP-labeling-Mix
2 µl Transkriptionspuffer
12 µl Aqua dest. (ad 20 µl)
1 µl RNAse Inhibitor
2 µl Sp6/T7-Polymerase (zuletzt)

Nach leichtem Schütteln (Polymerasen sind sehr empfindlich gegen mechanischen Stress!) wurde der Ansatz für 2 h bei 37°C inkubiert.

Die Template-DNA wurde durch Zugabe von 2 μl DNAse1 und Inkubation für 15 min bei 37° C entfernt. Anschließend wurde die Reaktion mit 2,5 µl 0,2 M EDTA (pH 8) gestoppt. Die markierte RNA wurde dann mit 2,5 µl 4 M LiCl (Litiumchlorid) und 75 µl EtOH (100%, eiskalt) über Nacht bei -20°C gefällt. Die RNA wurde dann für 30 min bei 4°C und 12000 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 µl EtOH (70%, -20°C) gewaschen und bei Raumtemperatur 15 min getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 100 µl DEPC-Wasser, dem 1 µl RNAse-Inhibitor zugesetzt war, gelöst.

5.2.1.12. Alkalische Hydrolyse

Die alkalische Hydrolyse ist erst bei Proben, die größer als 300 bp sind, notwendig.

Größen der RNA-Sonden: - MMP-9 = 384 bp
- TIMP-3 Variant = 445 bp
- TIMP-3 3' = 494 bp

Man erechnet die genaue Inkubationszeit der alkalischen Hydrolyse anhand folgender Gleichung: $t = (L_0 - L_f)/(k \times L_0 \times L_f)$

wobei: t = Zeit in min
L_0 = Startlänge der RNA-Probe (kb)
L_f = 0,2 kb (gewünschte Fragmentlänge)
k = 0,11 kb/min

MMP-9: t = (0,384 - 0,2)/(0,11 x 0,384 x 0,2) = 21,78 min

TIMP-3 Variant: t = (0,445 - 0,2)/(0,11 x 0,445 x 0,2) = 25,03 min

TIMP-3 3': t = (0,494 - 0,2)/(0,11 x 0,494 x 0,2) = 27,05 min

Die alkalische Hydrolyse wurde bei 60°C für die errechnete Zeit im Thermoblock durchgeführt. Es wurde folgender Ansatz zur alkalischen Hydrolyse gemacht:

150 µl der Probe
+ 60 µl 200 mM Na_2CO_3 (1,06 g/50 ml in DEPC)
+ 90 µl 200 mM $NaHCO_3$ (0,84 g/50 ml in DEPC)

5.2.1.13 Alkohol-Fällung

Zum Abstoppen der Reaktion und zur Fällung der RNA wurden dem Hydrolyseansatz folgende Kompenenten hinzugefügt:

15 µl 10%-ige Essigsäure
33 µl 3 M Na-Acetat (pH = 6,0)
3 µl t-RNA (10 mg/ml)
3,6 µl 1 M $MgCl_2$
900 µl 100 % Ethanol (-20°C)

Nach vorsichtigem Mischen erfolgte die Fällung der hydrolysierten RNA über Nacht bei -20°C. Die gefällte RNA wurde bei 12000 g und -4°C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet mit 500 µl 70% Ethanol (-20°C) gespült. Nach erneutem Abpipettieren des Überstandes wurde das Pellet 30 min luftgetrocknet. Danach wurde es in 100 µl DEPC-Wasser gelöst, auf 10 Tubes à 10 µl aufgeteilt und bei -80°C gelagert.

5.2.1.14 Quantifizierung der Markierungseffizienz

Die DIG-markierte Kontroll-RNA (ursprüngliche Konzentration: 100 ng / µl) wurde auf 10 ng / µl verdünnt, indem man zu 2 µl DIG-markierter Kontroll-RNA 18 µl RNA-Verdünnungspuffer hinzugab. Es wurde eine Verdünnungsreihe nach folgendem Verdünnungsschema durchgeführt:

Tab. 14: Verdünnungsschema der DIG-markierten Kontroll-RNA (In situ-Hybridisierung)

Tube	RNA (µl)	von Tube	RNA-Verdünnungs-puffer (µl)	insgesamte Verdünnung (von Tube1)	End-Konzentration
T1	-	-	-	keine	10 ng/µl
T2	1	T1	9	1:10	1 ng/µl
T3	1	T2	45	1:100	100 pg/µl
T4	1	T3	45	1:1000	10 pg/µl
T5	1	T4	45	$1:10^4$	1 pg/µl
T6	1	T5	45	$1:10^5$	0,1 pg/µl
T7	1	T6	45	$1:10^6$	0,01 pg/µl

Es wurde je 1 µl von jeder Verdünnungsstufe (T1 - T7) und 1 µl der Kontroll-RNA auf einen schmalen Streifen einer Nylon-Membran (Hybond +, Amershan, Braunschweig), einer Größe von ungefähr 8 x 12 cm, aufgetragen. Durch UV-Licht wurde die RNA an die Nylon-Membran gebunden (Crosslinking). Anschließend

wurde sie 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Die Membran wurde in eine Schale mit 100 ml Puffer 1 (100 ml pro 100 cm^2) gelegt und für 5 min unter Schütteln inkubiert.

Puffer-1 = 10 ml 10 x Stammlösung/100 ml DEPC-Wasser

10x Stammlösung: 1 M Maleinsäure
1,5 M NaCl
pH = 7,5

Puffer-1 wurde verworfen, und die Membran wurde für 30 min in Puffer 2 inkubiert.

Puffer-2 = 1% Blockierungsreagenz in 1x Puffer-1

10% Blockierungsreagenz: 10% (w/v) in Puffer-1, schwer löslich
(löst sich bei 50°C unter Rühren)
Die Lösung wurde autoklaviert und bei 4°C aufbewahrt.

Danach wurde die Membran für 30 min in 10 ml Antikörper-Lösung inkubiert.

Antikörper-Lösung:

Anti-DIG-Alkalische Phosphatase (Roche, vor Gebrauch kurz anzentrifugieren) wurde 1:10000 in Puffer-2 verdünnt, wie für die NBT / BCIP-Detektion empfohlen (1 µl für 10 ml, 2,5 µl für 25 ml). Die Antikörper-Lösung muss jedes Mal frisch kurz vor Gebrauch angesetzt werden.

Die Membran wurde 2 mal 15 min mit je 10 ml Puffer-1 gewaschen. Anschließend wurde die Membran 2 - 5 min in 10 ml Puffer-3 äquilibriert (nicht länger, da der alkalische pH sonst eventuell die Bindung behindern würde).

Puffer-3: 3 ml 1 M Tris-HCL (pH 9,5)
1 ml 3 M NaCl
ad 30 ml mit DEPC-Wasser auffüllen

Es wurden dann 200 µl der fertigen NBT / BCIP-Lösung zu 10 ml Puffer-3 gegeben. Diese Substratlösung muss frisch hergestellt und unter Lichtabschluss aufbewahrt werden. Die Membran wurde zur Entwicklung für 15 min bis 2 h in der

Substratlösung im Dunkeln inkubiert. Während der Farbentwicklung wurde die Schale mit der Nylonmembran nicht geschüttelt. Sobald die Punkte in ausreichender Intensität auf der Membran erschienen, wurde die Reaktion gestoppt, indem die Membran für 5 min mit DEPC-Wasser gewaschen wurde. Anschließend wurde sie luftgetrocknet. Die Intensitäten der Punkte der Verdünnung der neu hergestellten Sonde wurden mit denen der Kontroll-RNA verglichen, und daraus die RNA-Konzentration der Sonde abgeschätzt.

5.2.2. In Situ-Hybridisierung

Nukleinsäuren (NS) werden schon seit einiger Zeit als Sonden zur Untersuchung biologischen Materials eingesetzt.

Man unterscheidet dabei 2 Hauptkategorien von Nukleinsäure-Assays:
a) flüssigkeitsbasierend
b) an festen Oberflächen bzw. Objektträgern, diese können wiederum unterteilt werden in:
   - die sog. In situ-Hybridisierung (ISH, an Zellen oder Geweben)
   - die Hybridisierung auf synthetischen Oberflächen, z. B. Filtern, Membranen (sog. Blots).

Bei der ISH werden die Nukleinsäuren in situ, d. h. in der Zelle, am Ort ihres natürlichen Vorkommens, nachgewiesen. Der große Vorteil der Methode besteht darin, dass sie eine Lokalisation und Zuordnung der hybridisierenden Sonde in der Zelle oder im Gewebe erlaubt. Ein wesentlicher Nachteil der Methode ist jedoch, dass mit der Erhaltung der Morphologie und Struktur der Zellen auch eine eingeschränkte Zugänglichkeit der Nukleinsäuren verbunden ist, die den Nachweis erschwert. Üblicherweise sind die meisten Gewebe, die für die ISH verwendet werden, formalinfixiert und in Paraffin eingebettet. Um die Gewebe für die Hybridisierung der Sonden zugänglich zu machen, erfolgt normalerweise eine proteolytische Vorbehandlung und / oder eine Vorbehandlung mit Hitze. Ein wesentlicher Faktor bei der Auswahl der Sonde und des Detektionssystems ist die

Komplexität der Probe. Je komplexer eine Probe ist, desto wahrscheinlicher ist das Auftreten einer unspezifischen Hybridisierung.
Man kann das Problem der Komplexität bei der ISH auf 2 Wegen lösen:
a) durch Vorbehandlung des Probenmaterials:
- chemische oder enzymatische Vorbehandlung des Gewebes, um einen Teil der unerwünschten NS zu entfernen.
- Vermeidung stark denaturierender Bedingungen zur Minimierung der Kreuzhybridisierung.

b) durch die richtige Wahl der Sonde:
- Sensitivität, Spezifität, Zusammensetzung (DNA, RNA, PNA), Länge der Sonde, Arten der Sondenmarkierung.

5.2.2.1. RNA-In Situ-Hybridisierung

Hierbei werden RNA-Sonden verwendet, die bereits einzelsträngig vorliegen (es ist also zu Beginn keine Denaturierung nötig) und an DNA-Sequenzen (im Vergleich mit ihrem analogen DNA-Gegenstück) besser hybridisieren und dadurch stabilere Hybride bilden.
Einer der wichtigsten Nachteile von RNA-Sonden ist ihre natürliche Instabilität. RNAsen sind fast überall zu finden und sehr schwer zu inaktivieren. Dies erfordert eine spezielle Gewebeasservierung und -vorbehandlung.

5.2.2.2. Vorbehandlung

Es wurden ausschließlich Materialien verwendet, die bei 200°C 4 - 5 h hitzebehandelt worden waren.

5.2.2.3. Vorbereitung der Paraffinschnitte

Ca. 5 µm dicke Paraffinschnitte wurden auf Superfrost Plus®-Objektträger (Menzel-Gläser) in DEPC-Wasser aufgezogen. Von jedem Fall sollten pro Sonde

mindestens 2 Schnitte vorliegen. Die Schnitte wurden in einen Glasträger sortiert (ein separater Träger für jede Sonde). Dann wurden die Schnitte bei 50°C mindestens 1 Stunde vorbehandelt.
Die Paraffinschnitte wurden dann 2 x 10 min in Xylol entparaffiniert und durch eine absteigende Alkoholreihe (100 %, 95 %, 80 %, 30 % Ethanol), in DEPC-Wasser angesetzt) rehydriert. Anschließend wurden die Schnitte in DEPC-Wasser für 5 min gespült. Zur Extraktion von Proteinen und partiellen Hydrolyse wurden die Schnitte mit 0,2 N HCL für 20 min bei Raumtemperatur behandelt.
Die Permeabilisierung erfolgte durch Zugabe von Detergentien. Die Schnitte wurden hierfür bei Raumtemperatur 15 min mit 0,3 % TritonX-100 inkubiert. Danach wurden die Objektträger in Proteinase-K-Puffer bei 37°C für 30 min im Wasserbad inkubiert. Darauf folgte der Verdau von Proteinen, z.B. Histonen, durch Proteinase K in Proteinase-K-Puffer bei 37°C für 30 min im Wasserbad unter Schütteln. Es wurden 40 µl / Küvette (80 ml) Proteinase K (5 µg / ml) hinzugegeben. Die Reaktion wurde in 0,2 % eiskaltem Glycin für 1 min abgestoppt.
Die Post-Fixierung erfolgte in 0,4 % eiskalter Paraformaldehyd-Lösung für 5 min unter dem Abzug. Anschließend wurden die Schnitte mit DEPC-Wasser für 5 min gewaschen. Die Schnitte wurden in 0,1 M Acetylierungspuffer für 3 min äquilibriert, bevor sie mit 1 ml Acetanhydrid / 200 ml Acetylierungspuffer für 10 min inkubiert wurden. Es folgte ein Waschschritt mit 2x SCC / DEPC für 5 min. Danach wurden die Schnitte für mind. 1 h bei 50°C im Hybridisierungsofen getrocknet.

5.2.2.4. Prä-Hybridisierung

Die Prä-Hybridisierung erfolgte zur Reduktion des unspezifischen Hintergrundes.
Es wurde der Prä-Hybridisierungs-Mix angesetzt, wobei die Lachssperma-DNA vor Gebrauch füt 5 min auf 95°C erhitzt wurde. Zur Herstellung der feuchten Kammern wurden Papierstreifen, die mit DEPC-Wasser getränkt wurden, verwendet. Pro Schnitt wurden 150 µl Prä-Hybridisierungs-Mix auf einen Objektträger pipettiert und vollständig auf dem Gewebeschnitt verteilt. Die feuchte Kammer mit den Schnitten wurde mit Parafilm umschlossen und für 2 - 3 h bei 52°C inkubiert.

5.2.2.5. Hybridisierung

Nach Abkippen der Prä-Hybridisierungs-Lösung wurden 25 µl Hybridisierungs-Mix mit 10 ng (0,5 - 1 µl) Sonde („Antisense“ / „Sense“) auf jeden Schnitt pipettiert, mit Cover-Medium (Deckgläschen) abgedeckt. Die Objektträger wurden in die feuchte Kammer gelegt, mit Parafilm umschlossen. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 52°C.

5.2.2.6. Waschen

Nach Entfernen der Deckgläschen wurden die Schnitte in eine Küvette sortiert und mit 2x SCC / DEPC bei Raumtemperatur für 15 min gewaschen. Anschließend wurden sie im Waschpuffer bei 60°C für 10 min gewaschen.
Darauf folgte ein Verdau mit RNAse (100 µl RNAse in 200 ml RNAse-Puffer) für 30 min bei 37°C unter leichtem Schütteln, um einzelsträngige, nicht-hybridisierte RNA zu entfernen. Die Schnitte wurden dann für weitere 30 min in RNAse-Puffer (ohne RNAse) belassen. Danach wurden sie für 3 min in 2x SCC bei Raumtemperatur, für 15 min in 0,1x SCC bei 52°C und für weitere 10 min in 0,1x SCC bei Raumtemperatur gewaschen.

5.2.2.7. Detektion

Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur für 5 min in Detektionspuffer-1 gewaschen. Nach dem Abtropfen wurden die Schnitte in die feuchte Kammer sortiert und mit normalem Schafserum (20 % in Detektionspuffer-1 verdünnt, 150 µl / Schnitt) für 30 min inkubiert. Nach erneutem Waschen in Detektionspuffer-1 für 5 min wurden die Schnitte mit Schaf-Anti-DIG-AP (Roche; 1:5000 verdünnt in Detektionspuffer-1 + 1 % Schafserum + 0,3 % TritonX-100, je 100 µl / Schnitt) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten 2 weitere Waschschritte in Detektionspuffer-1 für je 15 min. Die Schnitte wurden in Detektionspuffer-2 (pH = 9,5) für 15 min äquilibriert.

Danach wurden die Schnitte in die feuchte Kammer sortiert und mit 200 µl Detektionslösung pro Objektträger im Dunkeln inkubiert (bis zu 3 Tage, wobei die Detektionslösung pro Tag 2 x erneuert wurde). Jeder Objektträger wurde nach Farbentwicklung geprüft (Farbumschlag gelb → violett, Vergleich mit Positivkontrolle notwendig) und bei ausreichender Farbentwicklung in Detektionspuffer-3 (= Stopp-Puffer) für 10 min bei Raumtemperatur abgestoppt. Die Zellkerne wurden mit Fast Nuclear Red (vor Gebrauch filtrieren) 5 min gegengefärbt. Anschließend wurden die Schnitte in DEPC-Wasser gewaschen. Die Dehydratation erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30 %, 80 %, 96 %, 100 %) für je 2-5 min und 2 x Xylol für je 10 min. Abschließend wurden die Schnitte mit Entellan® o. Eukitt® (O. Kindler GmbH; Freiburg) eingedeckt.

5.2.3. Immunhistochemie

5.2.3.1. ABC-Methode

Die meisten der heute verwendeten immunhistochemischen Färbemethoden basieren auf der hohen Affinität von Avidin (Hühnereiweiss) bzw. Streptavidin (Streptomyces avidinii) zu Biotin (Vitamin). Wegen der Neigung von Avidin aufgrund seines isoelektrischen Punktes bei physiologischem pH an lectinähnliche, negativ geladene Gewebebestandteile zu binden, wird es heute vielfach durch Streptavidin ersetzt.

Bei der ABC-Methode (Avidin-Biotin-Complex) bzw. SABC-Methode (Streptavidin-Biotin-Complex) wird zuerst das zu untersuchende Gewebe mit einem unkonjungierten Primärantikörper inkubiert. Als zweiten Schritt wird ein biotinylierter Sekundärantikörper dazugegeben, darauf folgt dann der Streptavidin-Biotin-Enzymkomplex. Als letzte Stufe wird eine Substrat-Chromogenlösung dazugegeben. Meerrettichperoxidase und alkalische Phosphatase sind die gebräuchlichsten Enzymmarker.

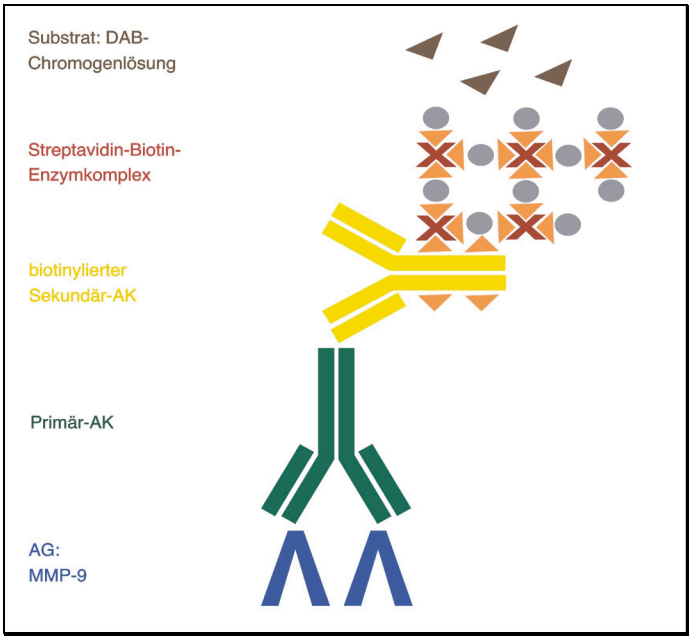


Abb. 5: SABC-Methode der Immunhistochemie (abgeändert nach: Handbuch Immunchemische Färbemethoden, 3. Auflage, DakoCytomation) .
Bei der SABC-Methode reagiert der Streptavidin-Biotin-Enzym-komplex mit dem biotinylierten Sekundärantikörper.

5.2.3.2. Genaue Versuchsbeschreibung

1. Entparaffinierung:

Die Formalin-fixierten und in Paraffin-eingebetteten Gewebe wurden bei 60°C 1 - 4 h vorbehandelt. Anschließend wurden sie in Xylol entparaffiniert (2 x 10 min). Die Rehydrierung erfolgte durch eine absteigende Alkoholreihe (100 %, 96 %, 80 %, 30 %, je 1 min). Die Objektträger wurden mit Aqua dest. für 2 min gut gespült.

2. Hitzevorbehandlung:

Die Schnitte wurden in Plastikküvetten sortiert und bei einer Temperatur von 125°C und einem Druck von >20 bar 5 min in 1x Citratpuffer (DAKO) im Dampfkochtopf (Biocare Medical; Decloaking chamber) gekocht. Dafür wurden 400-500 ml Aqua dest. in den Topf gefüllt. Nach dem Kochen wurden die Schnitte für 15 min in Citratpuffer zum Abkühlen stehengelassen.

3. Waschen:

Nach dem Abkühlen wurden die Schnitte für 5 min in 1x TBST-Puffer gewaschen.

4. Zugabe des Primär-Antikörpers:

Der monoklonale Anti-MMP-9-Antikörper (AK) wurde 1:1000 in Verdünnungsmedium (Dako, Antibody Diluent, S 2022) verdünnt. Die feuchte Kammer wurde mit Papierstreifen ausgelegt und mit Aqua dest. durchtränkt. Auf jeden Objektträger wurden 200 µl der Antikörper-Lösung pipettiert, und der Gewebeschnitt wurde mit einer sterilen Pipettenspitze vollständig mit der Lösung bedeckt. Die Schnitte wurden über Nacht bei + 4°C mit dem Primär-Antikörper inkubiert.

5. Inkubation mit biotinyliertem Sekundär-Antikörper:

Nach Entfernen des Primär-AK wurden die Schnitte 3 mal mit 1x TBST-Puffer für je 5 min gewaschen. Nach Zugabe von je 2 Tropfen der Lösung-A (= link, biotinylated secundary antibody, Brückenantikörper, ein biotinylierter Ziege-anti-Maus/anti-Kaninchen-Antikörper), gekoppelt mit Biotin (= Vitamin)) aus dem DAKO ChemMate Detektion Kit (#K 5001) wurden die Objektträger für 10 min in der feuchten Kammer inkubiert.

6. Blockierung der endogenen Peroxidase:

Es folgten 3 weitere Waschschritte mit 1x TBST-Puffer für je 5 Minuten. Nach Zugabe von 200 µl DAKO ChemMate Peroxidase-Blockierungs-Lösung, erfolgte eine Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur.

7. Zugabe von Streptavidin-Peroxidase:

Die Schnitte wurden erneut 3 mal mit 1x TBST-Puffer für je 5 min gewaschen. Nach Zugabe von je 2 Tropfen Lösung-B (= Streptavidin-Peroxidase-Lösung, Streptavidin-konjugierte Meerrettich-Peroxidase, gebrauchsfertig aus dem DAKO ChemMate Detektion Kit) auf jeden Objektträger erfolgte eine Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur.

8. Zugabe von DAB-Substrat:

Nach weitern 3 Waschschritten in 1x TBST-Lösung für je 5 min wurde das Substrat 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) auf die Schnitte gegeben. Dazu wurde vor Gebrauch Lösung-C (= Substrat) im Verhältnis von 1 : 50 in Lösung D (= Substratlösung, aus dem DAKO ChemMate Detektion Kit) verdünnt. Es wurden 200 µl des verdünnten Substrats auf jeden Objektträger gegeben und es erfolgte eine Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur.

9. Gegenfärbung mit Hämalaun (MERCK):

Anschließend wurde kurz (2 - 5 min) mit Aqua dest. gespült. Die Schnitte wurden in einen Glasschlitten sortiert und in Hämalaun gegengefärbt (ca. 2 Sekunden). Nach der Färbung wurden die Objekträger 2 min in Aqua dest. gewaschen und unter Leitungswasser 2-5 min gebläut. Das Bläuen diente zum Vernetzen der Salze mit Hämalaun, wodurch ein Dunkelfärben der Zellkerne erreicht wurde. Nach dem Bläuen wurden die Schnitte erneut kurz (ca. 2 Sekunden) mit Aqua dest. gespült.

Die Dehydratation erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30 %, 80 %, 96 %, je 2 min, 100 % je 5 min) und Xylol (2 x 10 min). Abschließend wurden die Objektträger mit Entellan o. Eukitt eingedeckt.

5.3. Auswertung

5.3.1. Auswertungskriterien, semiquantitative mikroskopische Auswertung

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte am Hellfeld-Mikroskop. Alle hybridisierten Präparate wurden bei 40-facher Vergrösserung beurteilt. Dabei wurden sowohl die Expressionsmenge (Anzahl der positiven Zellen) als auch die Expressionsstärke (Signalintensität) von TIMP-1, -2, -3 und MMP-9 der einzelnen Tumorpräparate untersucht und miteinander verglichen.

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 - 80% exprimierende Zellen (3); 80 - 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 4 Gruppen zusammengefasst:
0 = keine Expression
1 (1 - 3) = schwache Expression
2 (4 - 8) = mittelstarke Expression
3 (9 - 12) = starke Expression

Auch die Verteilungsmuster sowohl im einzelnen Präparat als auch der dies-bezügliche Vergleich untereinander waren Gegenstand dieser Untersuchungen.
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
7. intratumorale Endothelzellen

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden dann mit den vorhandenen klinischen Daten verglichen.

5.3.2. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm SPSS für Windows. Dabei wurden die Verteilungshäufigkeiten sowie fragliche Zusammenhänge zwischen den einzelnen Parametern und deren statistische Signifikanz betrachtet. Die Untersuchung auf vorhandene Korrelationen erfolgte mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson und dem exakten Test nach Fischer.

Chi-Quadrat-Test:
Mit dem Chi-Quadrat-Test untersucht man Verteilungseigenschaften einer statistischen Grundgesamtheit.
Soll festgestellt werden, ob zwischen dem nominalen Merkmal A mit r Merkmalsausprägungen und dem nominalen Merkmal B mit s Merkmalsausprägungen ein Zusammenhang besteht, kann bei ausreichend grossen Stichprobenumfängen der Chi-Quadrat-Test angewendet werden. P-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet.

Test nach Fisher:
Der Exakte Test nach Fisher ist ein Signifikanztest auf Unabhängigkeit in der Kontingenztafel, welcher auch bei einer geringen Anzahl an Beobachtungen zuverlässige Resultate liefert.
Im Anwendungsbereich entspricht er dem Chi-Quadrat-Test.

5.3.3. Auswertung der Expression von MMP-9 und TIMP-1, -2, -3 in Bezug auf klinisch-pathologische Faktoren

Von 125 Plattenepithelkarzinomen stand Paraffinmaterial zur Verfügung. Bei 114 dieser Tumoren war das Tumorstadium bekannt (43 x T1-Stadium, 35 x T2-Stadium, 12 x T3-Stadium, 24 x T4-Stadium). Angaben zum Differenzierungsgrad lagen bei 120 Tumoren vor (14 x G1, 78 x G2, 28 x G3). Angaben zum Lymphknotenstatus waren bei 95 Tumorpatienten verfügbar (61 Lymphknoten-negative Tumoren, 34 Lymphknoten-positive Tumoren). Die meisten Fälle fielen in die Altersgruppe 3 (> 60 Jahre; 64 von 125 Fällen), ähnlich der natürlichen

Altersverteilung von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region. Auch bezüglich des Geschlechts zeigten sich Ähnlichkeiten mit der natürlichen Geschlechterverteilung dieser Tumoren: 79 von 125 Fällen waren männlich, 42 von 125 Fällen waren weiblich. Lokalisiert waren die meisten Fälle in der Mundhöhle (91 von 125 Fällen), ein kleineres Kollektiv entstammte dem Oropharynx (16 von 125 Fällen), Tumoren aus dem Hypopharynx oder Larynx waren selten. In wenigen Fällen konnte keine genaue Lokalisation zugeordnet werden. Die meisten der Tumoren waren verhornte Plattenepithelkarzinome (76 von 125), ca. 1/3 der Fälle zeigte keine Verhornung (45 von 125). Tabelle s. Anhang.

An dem Paraffinmaterial dieser Plattenepithelkarzinome wurde die mRNA von MMP-9 und TIMP-1, -2, -3 über RNA-in-situ-Hybridisierung (RISH) nachgewiesen. Die Expression von MMP-9 konnte auch immunhistochemisch untersucht werden, da ein geeigneter Antikörper zur Detektion zur Verfügung stand. Gleichzeitig wurden die metastasierten Lymphknoten auf diese Parameter untersucht.
Zudem wurde anhand der statistischen Auswertungen versucht, herauszufinden, ob und welchen Einfluss die Expression von MMP-9 und TIMP-1, -2, -3 auf die Rezidiv- und Überlebensrate hat.

VI. Ergebnisse

6.1. MMP-9-Expression

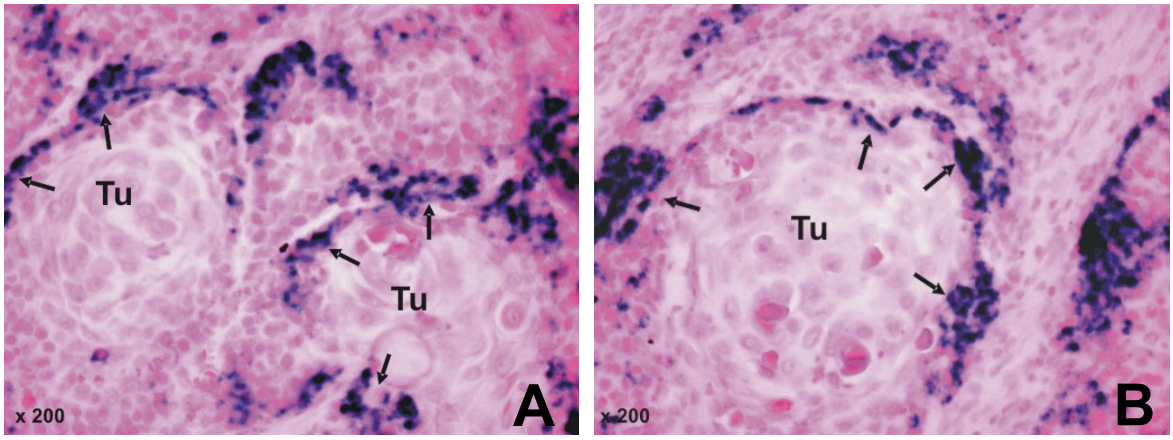
6.1.1. Expressionsmuster von MMP-9

6.1.1.1. Expressionsmuster von MMP-9-mRNA in der in situ-Hybridisierung

MMP-9-mRNA wurde vor allem in Tumorzellen (Tu) an der Invasionsfront, aber auch im Tumorstroma (Str) exprimiert. Das Tumorstroma konnte hierbei als ein wesentlicher Syntheseort von MMP-9-mRNA identifiziert werden, in seltenen Fällen zeigte sich eine hohe Expression im Stroma bei MMP-9-negativem Tumor (Abb. 6, H).

Am häufigsten wurde MMP-9-mRNA jedoch an der Invasionsfront des Tumors beobachtet (Abb. 6, A-F). Zudem zeigte sich eine vermehrte MMP-9-mRNA-Expression auch in einzelnen Tumorzapfen in der Peripherie (Abb. 6, E, Pfeil). In der Tumormitte wurde MMP-9-mRNA seltener und weniger stark exprimiert.

Des Weiteren konnte eine Expression von MMP-9-mRNA auch in tumornahen Leukozyten (L) und Endothelzellen nachgewiesen werden.



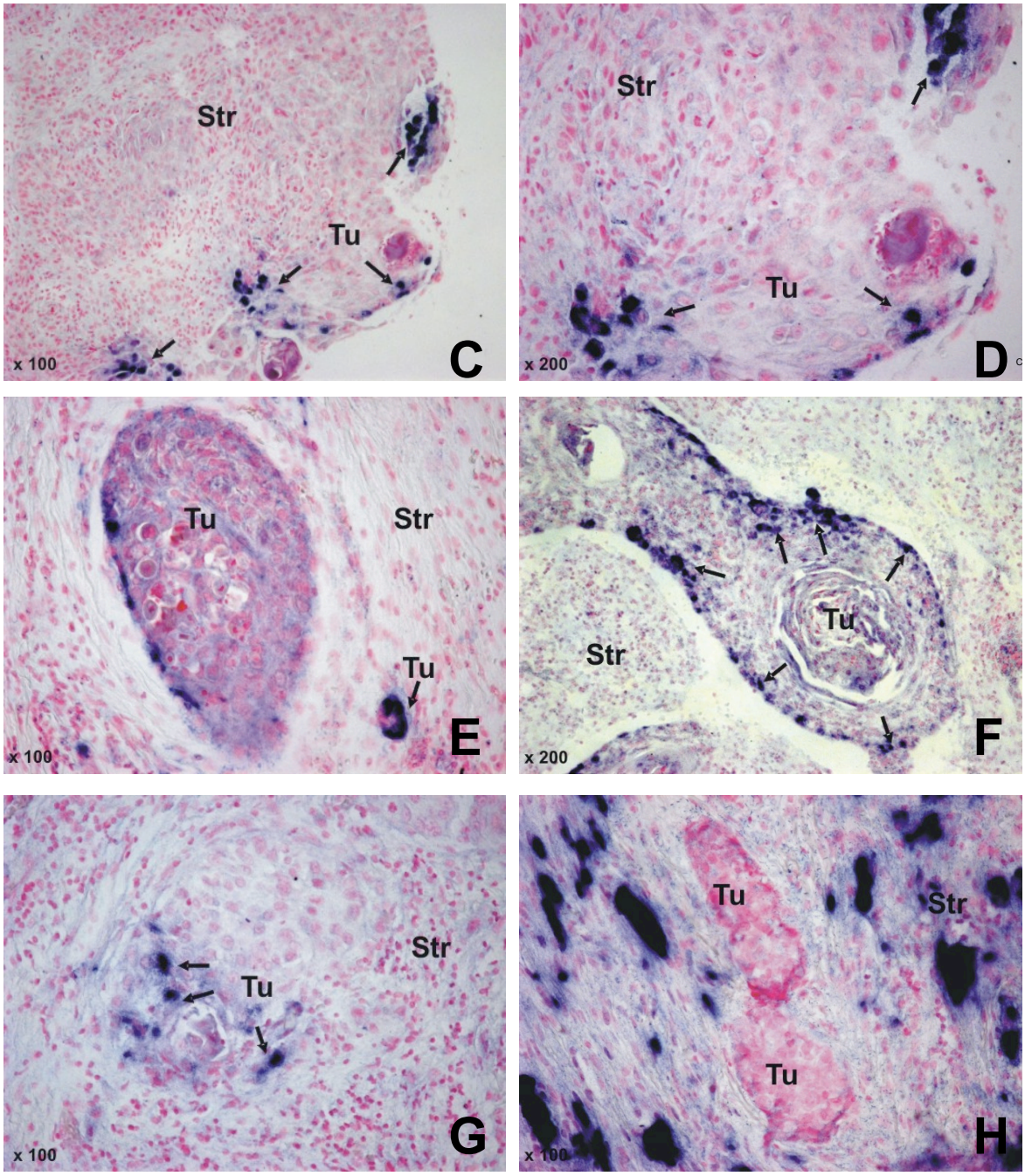


Abb. 6: A-H: Nachweis von MMP-9-mRNA im Tumor und Stroma mittels in situ-Hybridisierung. Dunkelblau: MMP-9-spezifische Signale, Rot: Nuclear Fast Red-Zellkern-Gegenfärbung.

Selten zeigte sich eine Expression von MMP-9-mRNA im morphologisch normal erscheinenden Plattenepithel (PE) und dysplastischen Epithel (Dys). Man konnte jedoch eine Tendenz zur Zunahme der Expression an MMP-9-mRNA analog zur Epithel-Dysplasie-Karzinom-Sequenz erkennen:

Während MMP-9-mRNA im morphologisch normal erscheinenden, tumornahen Plattenepithel in nur 18 % der Fälle exprimiert wurde, war die MMP-9-mRNA im dysplastischen Epithel in bereits 24 % der Fälle nachweisbar. Im Karzinom nahm die Expression von MMP-9-mRNA dann deutlich zu (> 45 %).

Tab. 15: Darstellung der MMP-9-Expression in Abhängigkeit von der Lokalisation in den durch RNA-in-situ-Hybridisierung untersuchten Gewebeproben

MMP-9-mRNA-Expression (ISH)					
Lokalisation	**0**	**1**	**2**	**3**	**Anzahl**
Normales PE	79 (82%)	15 (16%)	2 (2%)	0 (0%)	n=96
Dysplasie	31 (76%)	10 (24%)	0 (0%)	0 (0%)	n=41
Tumor-Peripherie	65 (54%)	42 (35%)	10 (8%)	4 (3%)	n=121
Tumor-Mitte	114 (94%)	5 (4%)	2 (2%)	0 (0%)	n=121
Tumor-Stroma	70 (58%)	34 (28%)	10 (8%)	7 (6%)	n=121
Tumor-Endothel	105 (87%)	13 (11%)	3 (2%)	0 (0%)	n=121

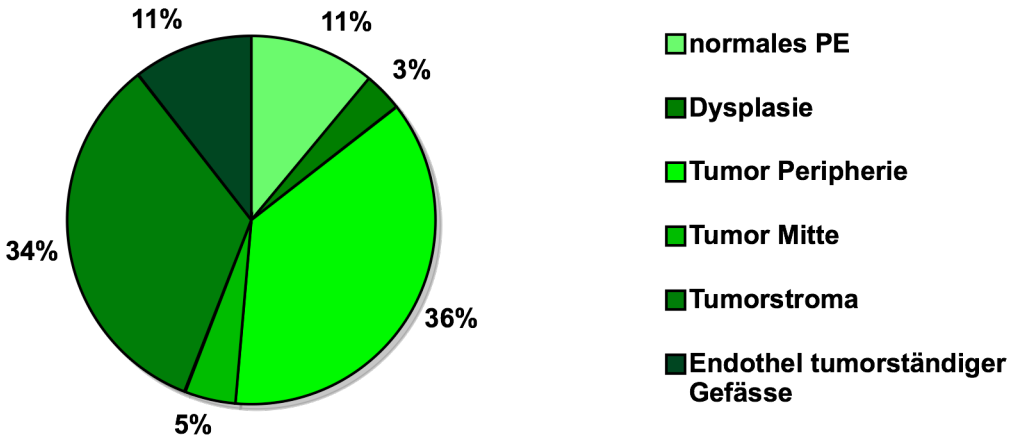
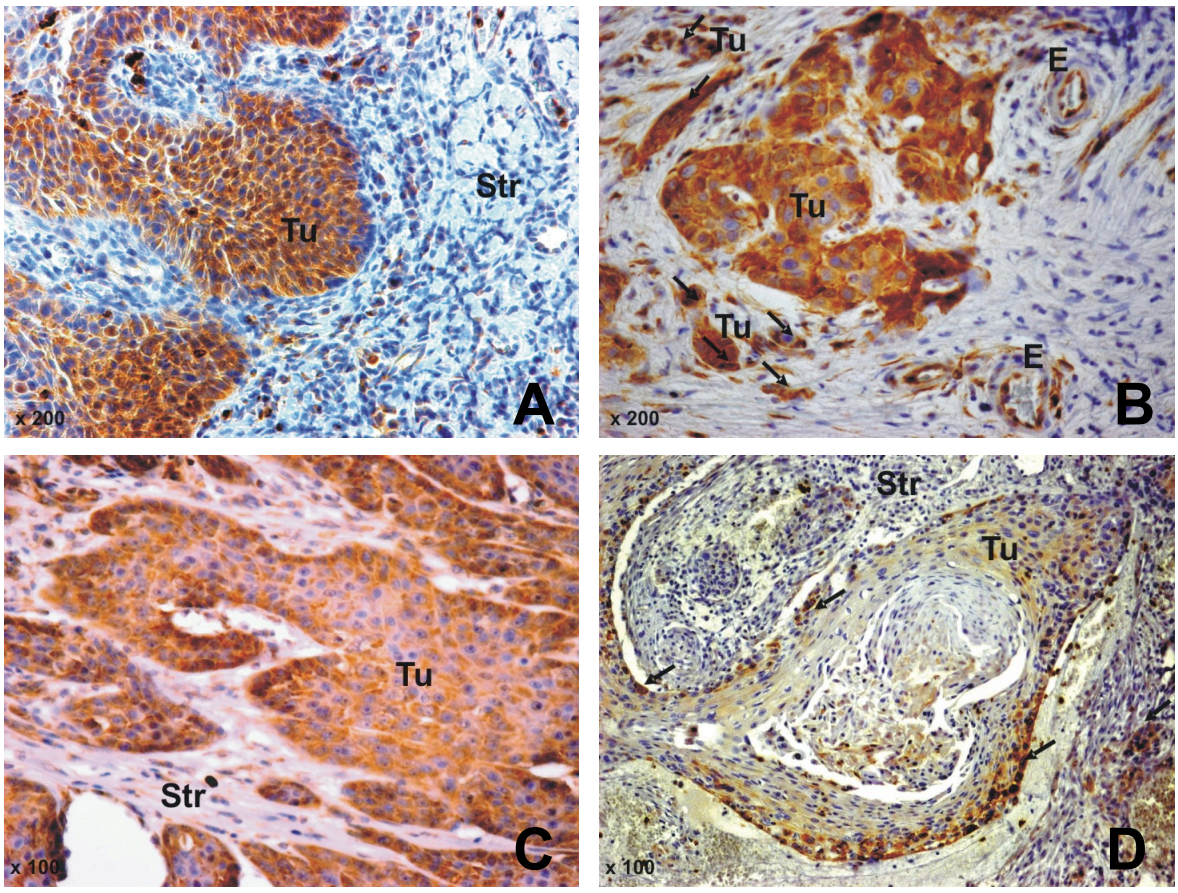


Abb. 7: Graphische Darstellung der MMP-9-mRNA-Expression in verschiedenen Geweben (In situ-Hybridisierung) (zu Tab. 15). Die Prozentzahlen geben anteilmäßig den Wert der MMP-9-mRNA-Expression (Score 1-3 zusammen-gefasst) im jeweiligen Gewebe an.

6.1.1.2. Expressionsmuster von MMP-9-Protein in der Immunhistochemie

Da für den Nachweis von MMP-9-Protein ein geeigneter Antikörper für die Immunhistochemie zur Verfügung stand, konnte zusätzlich zur mRNA auch das Protein nachgewiesen werden. Insgesamt ließ sich MMP-9-Protein in der Immunhistochemie häufiger nachweisen als MMP-9-mRNA durch in situ-Hybridisierung.

MMP-9-Protein wurde vor allem im Tumor (Tu), hier sowohl in der Tumormitte (Abb. 8, Bild A-C) als auch an der Invasionsfront (Abb. 8, D-G) detektiert. Im Gegensatz zur MMP-9-mRNA konnte das Protein auch häufig in der Tumormitte nachgewiesen werden. Auch in der Immunhistochemie zeigte sich eine vermehrte MMP-9-Expression in einzelnen Tumorzapfen in der Peripherie (Abb. 8, G, Pfeil).
In seltenen Fällen zeigte sich eine hohe Expression von MMP-9-Protein im Stroma bei MMP-9-negativem Tumor (Abb. 8, H-J).
Mittels Immunhistochemie konnte zudem eine MMP-9-Expression in Leukozyten (L) sowie im tumornahen Endothel beobachtet werden (Abb. 8, H).



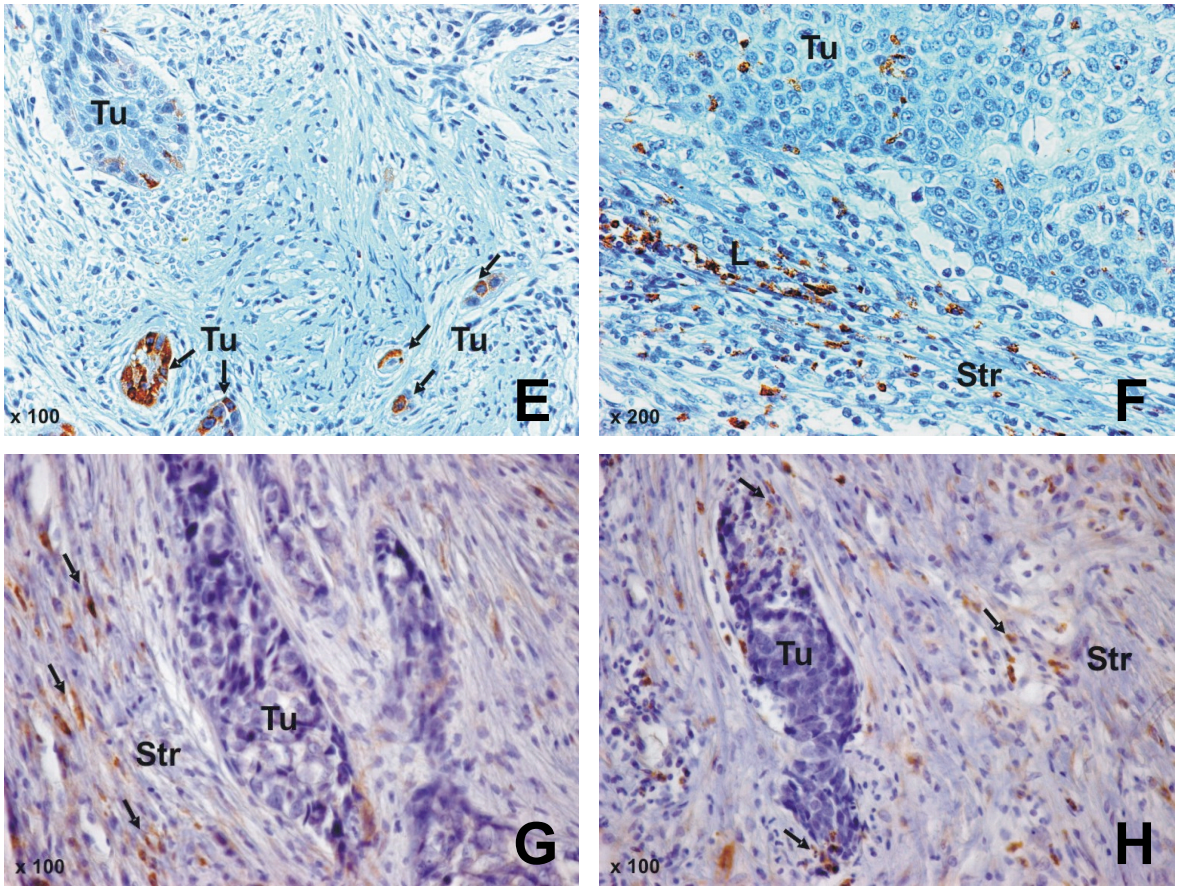


Abb. 8: **A-H: Nachweis von MMP-9-Protein im Tumor und Stroma mittels Immunhistochemie.** Braun: MMP-9-Immunreaktivität, Blau: Hämalaun-Gegenfärbung.

Auffällig war auch, dass MMP-9-Protein bereits vereinzelt im morphologisch unauffällig erscheinenden Plattenepithel (PE) sowie in über der Hälfte der Fälle im dysplastischen Epithel (Dys) nachgewiesen werden konnte (Abb. 9, A, B).

Auch im tumornahen Endothel wurde das Protein mittels Immunhistochemie häufiger detektiert als die für MMP-9 kodierende mRNA mittels in situ-Hybridisierung.

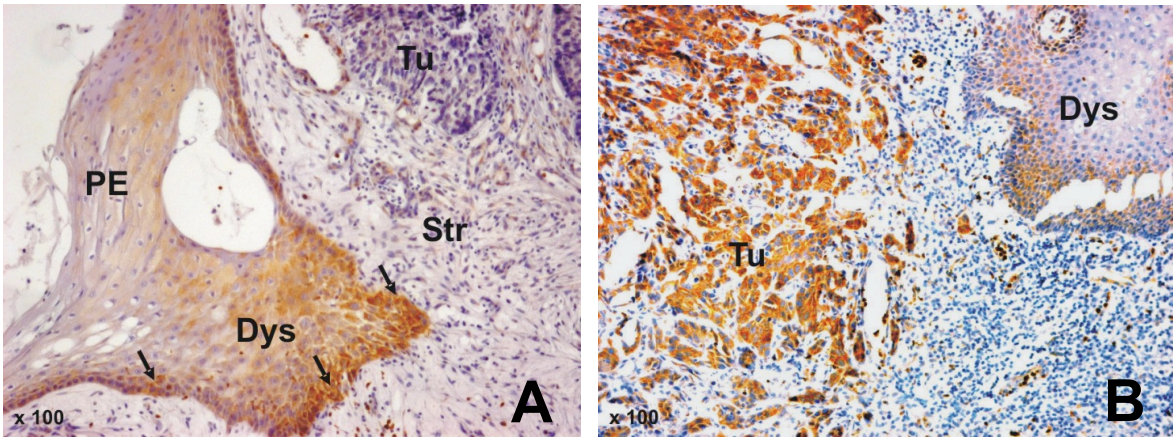


Abb. 9: A,B: Nachweis von MMP-9-Protein in verschiedenen Zelltypen / Geweben mittels Immunhistochemie. Braun: MMP-9-Immunreaktivität, Blau: Hämalaun-Gegenfärbung.

Die folgende Tabelle und das Diagramm geben einen Überblick über die MMP-9-Expression in verschiedenen Geweben.

Tab. 16: Darstellung des Nachweises von MMP-9-Protein in Abhängigkeit von der Lokalisation in den mittels Immunhistochemie untersuchten Gewebeproben

MMP-9-Protein-Nachweis (IHC)					
Lokalisation	**0**	**1**	**2**	**3**	**Anzahl**
Normales PE	84 (90%)	9 (10%)	0 (0%)	0 (0%)	n=93
Dysplasie	19 (46%)	19 (46%)	3 (7%)	0 (0%)	n=41
Tumor-Peripherie	47 (39%)	52 (44%)	20 (17%)	0 (0%)	n=119
Tumor-Mitte	76 (64%)	30 (25%)	13 (11%)	0 (0%)	n=119
Tumor-Stroma	40 (34%)	58 (49%)	17 (14%)	4 (3%)	n=119
Tumor-Endothel	76 (64%)	37 (31%)	6 (5%)	0 (0%)	n=119

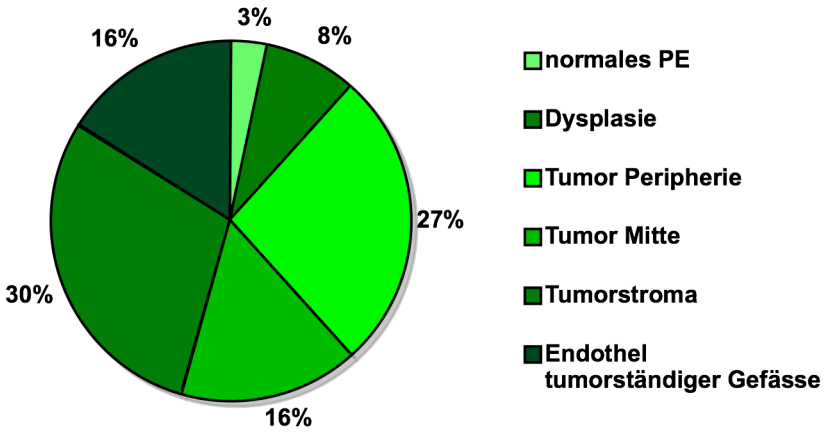


Abb.10: Graphische Darstellung der MMP-9-Protein-Expression in verschiedenen Geweben (Immunhistochemie) (zu Tab. 16). Die Prozentzahlen geben anteilmäßig den Wert der MMP-9-Expression (Score 1-3 zusammengefasst) im jeweiligen Gewebe an.

6.1.2. MMP-9-Expression im Vergleich mit klinisch-pathologischen Faktoren

Die folgenden Tabellen geben einen Überblick über die MMP-9-Expression im Vergleich mit den klinisch pathologischen Faktoren.

Tab. 17-19: Zusammenfassung der Ergebnisse der MMP-9-mRNA-Expression (In situ- Hybridisierung). $p < 0.05$ wurde als signifikant angesehen.

Tab. 20-22: Zusammenfassung der Ergebnisse der MMP-9-Protein-Expression (Immunhistochemie). $p < 0.05$ wurde als signifikant angesehen.

Tabelle 17: Vergleich der MMP-9-mRNA-Expression (negativ vs. positiv) mit klinisch pathologischen Faktoren. Negativ = keine Expression von MMP-9-m-RNA; Positiv = Expression von MMP-9-m-RNA (Grad 1-3 zusammengefasst)

Klinisch-pathologische Faktoren	n	MMP-9 mRNA Tumor Peripherie und Mitte			MMP-9 mRNA Stroma		
		negativ (0)	positiv (1, 2, 3)	p <0.05	negativ (0)	positiv (1, 2, 3)	p <0.05
Tumorstadium				n.s.			n.s.
pT1	40	25	15	0,205	22	18	0,767
pT2	33	18	15		17	16	
pT3	10	5	5		7	3	
pT4	23	8	15		12	11	
Total	106	56	50		58	48	
pT1 + pT2	71	42	29	***0,047***	37	34	n.s.
pT3 + pT4	36	14	22		22	14	0,377
Total	107	56	51		59	36	
Grading				n.s.			n.s.
G1	14	7	7	0,758	6	8	0,438
G2	73	38	35		42	31	
G3	25	15	10		16	9	
Total	112	60	52		64	48	
Tumortyp				n.s.			n.s.
verhornend	70	35	35	0,416	40	30	0,668
nicht verhornend	36	21	15		19	17	
Total	106	56	50		59	47	
LK-Status				n.s.			n.s.
pN0	57	31	26		32	25	
pN1/2	33	14	19		17	16	
Total	90	45	45		49	41	
Fernmetastasenstatus				**0,077**			n.s.
cM0	57	33	24		28	29	0,759
cM1	13	4	9		7	6	
Total	70	37	33		35	35	
Rezidivstatus				n.s.			n.s.
R0	34	18	16	0,471	18	16	0,791
R1	14	9	5		8	6	
Total	48	27	21		26	22	
Alter				n.s.			n.s.
< 60 J.	44	22	22	0,655	24	20	0,566
> 60 J.	70	38	32		42	28	
Total	114	60	54		66	48	
Geschlecht				n.s.			n.s.
männlich	73	39	34	0,821	44	29	0,492
weiblich	41	21	20		22	19	
Total	114	60	54		66	48	

Tabelle 18: Vergleich der MMP-9-mRNA-Expression (negativ/schwach positiv vs. mässig bis stark positiv) mit klinisch pathologischen Faktoren. Negativ/schwach positiv = keine bzw. nur sehr schwache Expression von MMP-9-m-RNA (Grad 0+1); stark = mittelstarke bis starke Expression von MMP-9-m-RNA (Grad 2+3)

Klinisch-pathologische Faktoren	n	MMP-9 mRNA Tumor Peripherie und Mitte			MMP-9 mRNA Stroma		
		negativ / schwach (0,1)	stark (2, 3)	p <0.05	negativ / schwach (0,1)	stark (2, 3)	p <0.05
Tumorstadium				n.s.			n.s.
pT1	40	37	3	0,225	33	7	0,777
pT2	33	29	4		28	5	
pT3	10	10	0		9	1	
pT4	23	18	5		21	2	
Total	106	94	12		91	15	
pT1 + pT2	71	65	6	n.s.	59	12	n.s.
pT3 + pT4	36	30	6	0,203	33	3	0,228
Total	107	95	12		92	15	
Grading				n.s.			n.s.
G1	14	12	2	0,167	12	2	0,972
G2	73	68	5		63	10	
G3	25	20	5		22	3	
Total	112	100	12		97	15	
Tumortyp				***0,047***			n.s.
verhornend	70	59	11		59	11	0,520
nicht verhornend	36	35	1		32	4	
Total	106	94	12		91	15	
LK-Status				n.s.			n.s.
pN0	57	50	7		52	5	
pN1/2	33	28	5		26	7	
Total	90	78	12		78	12	
Fernmetastasen-status				***0,033***			n.s.
cM0	57	52	5		47	10	0,643
cM1	13	9	4		10	3	
Total	70	61	9		57	13	
Rezidivstatus				n.s.			n.s.
R0	34	30	4	0,810	30	4	0,389
R1	14	12	2		11	3	
Total	48	62	6		41	7	
Alter				n.s.			n.s.
< 60 J.	44	38	6	0,727	37	7	0,491
> 60 J.	70	62	8		62	8	
Total	114	100	14		99	15	
Geschlecht				n.s.			n.s.
männlich	73	63	10	0,538	66	7	0,133
weiblich	41	37	4		33	8	
Total	114	100	14		99	15	

Tabelle 19: Vergleich der MMP-9-mRNA-Expression Grad 0-3 mit klinisch pathologischen Faktoren. Grad 0 = Negativ = keine Expression von MMP-9-m-RNA, Grad 1 = schwache Expression von MMP-9-mRNA, Grad 2 = mittelstarke Expression von MMP-9-mRNA, Grad 3 = starke Expression von MMP-9-m-RNA

Klinisch-pathologische Faktoren	n	MMP-9 Tumor mRNA Peripherie und Mitte					MMP-9 mRNA Stroma				
		0	1	2	3	p <0.05	0	1	2	3	p <0.05
Tumorstadium						n.s.					n.s.
pT1	40	25	12	3	0		22	11	5	12	
pT2	33	18	11	3	1		17	11	4	9	
pT3	10	5	5	0	0		7	2	0	0	
pT4	23	8	10	4	1		12	9	0	2	
Total	106	56	38	10	2		58	33	9	23	
pT1 + pT2	71	42	23	5	1	n.s.	37	22	9	3	n.s.
pT3 + pT4	36	14	16	5	1		22	11	0	3	0,131
Total	107	56	39	10	2		59	33	9	6	
Grading						n.s.					n.s.
G1	14	7	5	1	1		6	6	1	1	
G2	73	38	30	4	1		42	21	7	3	
G3	25	15	5	5	0		16	6	1	2	
Total	112	60	40	10	2		64	33	9	6	
Tumortyp						n.s.					n.s.
verhornend (1)	70	35	24	9	2		40	19	8	3	0,321
nicht verhornend (2)	36	21	14	1	0		19	13	1	3	
Total	106	56	38	10	2		59	32	9	6	
LK-Status						n.s.					n.s.
pN0 (1)	57	31	19	6	1		32	20	3	2	
pN1/2 (2)	33	14	14	3	2		17	9	3	4	
Total	90	45	33	9	3		49	29	6	6	
Fernmetastasen-status						n.s.					n.s.
cM0	57	33	19	4	1		28	19	7	3	
cM1	13	4	5	4	0		7	3	1	2	
Total	70	37	24	8	1		35	22	8	5	
Rezidivstatus						n.s.					n.s.
R0	34	18	12	4	0	0,642	18	12	4	0	
R1	14	9	3	2	0		8	3	1	2	
Total	48	27	15	6	0		26	15	5	2	
Alter						n.s.					n.s.
< 60J.		22	16	5	1	0,945	24	13	5	2	0,727
>60J.		38	24	6	2		42	20	4	4	
Total		60	40	11	3		66	33	9	6	
Geschlecht						n.s.					n.s.
männlich (1)	73	39	24	9	1	0,385	44	22	3	4	0,262
weiblich (2)	41	21	16	2	2		22	11	6	2	
Total	114	60	40	11	3		66	33	9	6	

Tabelle 20: Vergleich der MMP-9-Protein-Expression (negativ vs. positiv) mit klinisch pathologischen Faktoren. Negativ = keine Expression von MMP-9-Protein; Positiv = Expression von MMP-9-Protein (Grad 1-3 zusammengefasst)

Klinisch-pathologische Faktoren	n	MMP-9 Protein Tumor Peripherie und Mitte			MMP-9 Protein Stroma		
		negativ (0)	positiv (1, 2, 3)	p <0.05	negativ (0)	positiv (1, 2, 3)	p <0.05
Tumorstadium				n.s.			n.s.
pT1	40	12	28	0,716	15	25	0.196
pT2	32	13	19		12	21	
pT3	10	3	7		3	7	
pT4	22	6	16		3	20	
Total	104	34	70		33	73	n=106
pT1 + pT2	70	24	46	n.s.	27	44	***0,051***
pT3 + pT4	35	10	25	0,555	7	29	
Total	105	34	71		34	73	n=107
Grading				n.s.			n.s.
G1	14	4	10	0,939	4	10	0,729
G2	73	24	49		26	47	
G3	23	7	16		7	18	
Total	110	35	75		37	75	n=112
Tumortyp				***0,043***			n.s.
verhornend	68	17	51		24	46	
nicht verhornend	36	16	20		11	25	
Total	104	33	71		35	71	n=106
LK-Status				n.s.			n.s.
pN0	55	19	36		20	37	
pN1/2	33	8	25		11	22	
Total	88	27	61		31	59	n=90
Fernmetastasen-status				n.s.			n.s.
cM0	56	20	36	0,156	24	33	0,452
cM1	13	2	11		4	9	
Total	69	22	47		28	42	n=70
Rezidivstatus				n.s.			n.s.
R0	32	13	19	0,754	15	19	0,591
R1	14	5	9		5	9	
Total	46	18	28		20	28	n=48
Alter				n.s.			n.s.
< 60 J.	43	15	28	0,512	17	27	0,341
> 60 J.	69	20	49		21	49	
Total	112	35	77		38	76	n=114
Geschlecht				n.s.			n.s.
männlich	71	26	45	0,107	23	50	0,581
weiblich	41	9	32		15	26	
Total	112	35	77		38	76	

Tabelle 21: Vergleich der MMP-9-Protein-Expression (negativ/schwach positiv vs. mässig/stark positiv) mit klinisch pathologischen Faktoren. Negativ/schwach = keine bzw. nur sehr schwache Expression von MMP-9-Protein (Grad 0+1); stark = mittelstarke bis starke Expression von MMP-9-Protein (Grad 2+3)

Klinisch-pathologische Faktoren	n	MMP-9 Protein Tumor Peripherie und Mitte			MMP-9 Protein Stroma		
		negativ / schwach (0,1)	stark (2, 3)	p <0.05	negativ / schwach (0,1)	stark (2, 3)	p <0.05
Tumorstadium				n.s.			n.s.
pT1	40	36	4	0,240	34	6	0,210
pT2	32	27	5		29	4	
pT3	10	7	3		6	4	
pT4	22	16	6		18	5	
Total	104	86	18		87	19	n=106
pT1 + pT2	70	62	8	***0,012***	62	9	***0,053***
pT3 + pT4	35	24	11		26	10	
Total	105	86	19		88	19	n=107
Grading				n.s.			n.s.
G1	14	12	2	0.838	11	3	0,205
G2	73	58	15		63	10	
G3	23	19	4		18	7	
Total	110	89	21		92	20	n=112
Tumortyp				n.s.			n.s
verhornend	68	53	15	0,169	58	12	0,770
nicht verhornend	36	32	4		29	7	
Total	104	85	19		87	19	n=112
LK-Status				n.s.			n.s.
pN0	55	44	11		49	8	
pN1/2	33	29	4		26	7	
Total	88	73	15		75	15	n=90
Fernmetastasen-status				n.s.			n.s.
	56	48	8	0,158	47	10	0,852
cM0	13	9	4		11	2	
cM1	69	57	12		58	12	n=70
Total							
Rezidivstatus				n.s.			n.s.
R0	32	27	5	0,633	29	5	0,263
R1	14	11	3		10	4	
Total	46	38	8		39	9	
Alter				n.s.			n.s.
< 60 J.	43	36	7	0,479	37	7	0,583
> 60 J.	69	54	15		56	14	
Total	112	90	22		93	21	n=114
Geschlecht				n.s.			n.s.
männlich	71	56	15	0,603	60	13	0,822
weiblich	41	34	7		33	8	
Total	112	90	22		93	21	n=114

Tabelle 22: Vergleich der MMP-9-Protein-Expression Grad 0-3 mit klinisch pathologischen Faktoren. Grad 0 = Negativ = keine Expression von MMP-9-Protein, Grad 1 = schwache Expression von MMP-9-Protein, Grad 2 = mittelstarke Expression von MMP-9-Protein, Grad 3 = starke Expression von MMP-9-Protein

Klinisch-pathologische Faktoren	n	MMP-9 Tumor Protein Peripherie und Mitte					MMP-9 Protein Stroma				
		0	1	2	3	p <0.05	0	1	2	3	p <0.05
Tumorstadium						n.s.					n.s.
pT1	40	12	24	4	0	0,452	15	19	5	1	
pT2	32	13	14	5	0		12	17	2	1	
pT3	10	3	4	3	0		3	3	4	0	
pT4	22	6	10	6	0		3	15	2	2	
Total	104	34	52	18	0		33	54	13	4	
pT1 + pT2	70	24	38	8	0	***0,042***	27	35	7	1	***0,084***
pT3 + pT4	35	10	14	11	0		7	19	6	3	
Total	105	34	52	19	0		34	54	13	4	
Grading						n.s.					n.s.
G1	14	4	8	2	0	0,952	4	7	2	1	
G2	73	24	34	15	0		26	37	9	1	
G3	23	7	12	4	0		7	11	3	2	
Total	110	35	54	21	0		37	55	14	4	
Tumortyp						***0,096***					n.s.
verhornend (1)	68	17	36	15	0		24	34	7	3	0,781
nicht verhornend (2)	36	16	16	4	0		11	18	6	1	
Total	104	33	52	19	0		35	52	13	4	
LK-Status						n.s.					n.s.
pN0 (1)	55	19	25	11	0		20	29	5	1	
pN1/2 (2)	33	8	21	4	0		11	15	6	1	
Total	88	27	46	15	0		31	44	11	2	
Fernmetastasen-status						n.s.					n.s.
cM0	56	20	28	8	0	0,218	24	23	8	1	
cM1	13	2	7	4	0		4	7	2	0	
Total	69	22	35	12	0		28	30	10	1	
Rezidivstatus						n.s.					n.s.
R0	32	13	14	5	0	0,882	15	14	3	0	
R1	14	5	6	3	0		5	5	3	1	
Total	16	18	20	8	0		20	19	6	1	
Alter						n.s.					n.s.
< 60J.	43	15	21	7	0	0,705	17	20	5	1	0,751
>60J.	69	20	34	15	0		21	35	10	3	
Total	112	35	55	22	0		38	55	15	4	
Geschlecht						n.s.					n.s.
männlich (1)	71	26	30	15	0	0,145	23	37	8	3	0,711
weiblich (2)	41	9	25	7	0		15	18	7	1	
Total	112	35	55	22	0		38	55	15	4	

6.1.2.1. MMP-9-Expression im Vergleich mit dem Tumorstadium (T1-4)

Eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von MMP-9-mRNA im Tumor bzw. im Tumor umgebenden Stroma und dem Tumorstadium konnte nicht nachgewiesen werden.
Allerdings zeigte sich eine signifikante Korrelation der Expression von MMP-9-mRNA in Tumorzellen mit dem Tumorstadium in späteren Tumorstadien ($p = 0,047$). Während in den frühen T-Stadien T1+T2 fast zwei Drittel der Fälle MMP-9-negativ waren (T1 + T2: 59 % negativ, 41 % positiv), konnte in den späteren Stadien T3+T4 in mehr als der Hälfte der Fälle eine MMP-9-mRNA-Expression nachgewiesen werden (T3 + T4: 39 % negativ, 61 % positiv).

Mittels Immunhistochemie konnte das Protein MMP-9 bereits in frühen Tumorstadien vermehrt im Tumor sowohl an der Invasionsfront als auch in Tumormitte nachgewiesen werden (T1+T2: 66 % positiv, T3+T4: 71 % positiv). Es bestand eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von MMP-9 Protein im Tumor und dem Tumorstadium ($p = 0,042$). Zudem konnte eine signifikante Korrelation bezüglich der Signalintensität (Stärke der Expression Grad 1-3) des MMP-9-Proteins im Tumor und dem Tumorstadium nachgewiesen werden ($p = 0,012$).

In den Stromazellen, die den Tumor umgeben, scheint eine frühe Expression von MMP-9-mRNA und MMP-9-Protein stattzufinden, da sowohl die mRNA als auch das Protein bereits in frühen Tumorstadien häufig nachgewiesen werden konnten.
In den späteren Tumorstadien konnte mittels in situ Hybridisierung keine Steigerung der Expression von MMP-9-mRNA nachgewiesen werden, es zeigte sich in späten Stadien sogar eine geringere MMP-9 Expression (T1 + T2: 52 % negativ, 48 % positiv, T3 + T4: 61 % negativ, 39 % positiv). Bezüglich der Expression von MMP-9-mRNA im Stroma und dem Tumorstadium konnte keine signifikante Korrelation nachgewiesen werden.

In der Immunhistochemie zeigte sich allerdings eine Tendenz zu einer vermehrten Expression von MMP-9 Protein im Stroma in späten Tumorstadien ($p = 0,084$).

Während in den frühen Tumorstadien T1+T2 63 % der Fälle MMP-9-Protein-positiv waren, konnte in den späten Stadien T3+T4 in 83 % der Fälle MMP-9 Protein nachgewiesen werden. Hier ergab sich laut Definition zwar keine signifikante Korrelation (p = 0,051), jedoch ließen die oben angeführten Zahlen eine deutliche Tendenz zu einer Zunahme der Expression von MMP-9-Protein in fortgeschrittenen Tumoren erkennen.
Auch bezüglich der Signalintensität (Expressionsstärke Grad 1-3) bestand eine deutliche Tendenz zur stärkeren Expression von MMP-9 Protein in späten Tumorstadien (p = 0,053).
Sowohl die Anzahl MMP-9-positiver Fälle als auch die Expressionsstärke erwiesen sich in späteren gegenüber früheren Tumorstadien als erhöht.

6.1.2.2. MMP-9-Expression im Vergleich mit dem Differenzierungsgrad

Die Expression von MMP-9-mRNA korrelierte weder im Tumor noch im Stroma signifikant mit dem Differenzierungsgrad (s. Tabellen). Auch in der Immunhistochemie zeigte sich kein Zusammenhang im Sinne einer signifikanten Korrelation oder Tendenz zwischen der Expression von MMP-9-Protein im Tumor bzw. Stroma und dem Grading.

6.1.2.3. MMP-9-Expression im Vergleich zum Tumortyp (verhornend / nicht-verhornend)

Es ergab sich zwischen der Expression von MMP-9-mRNA im Tumor keine signifikante Korrelation zum Tumortyp (verhornende und nicht verhornende Plattenepithel-karzinome).
Bei den verhornten Plattenepithelkarzinomen konnte jedoch häufiger eine Expression der MMP-9-mRNA im Tumor nachgewiesen werden als bei den Plattenepithel-karzinomen ohne Verhornung (verhornend: 50 % negativ, 50 % positiv; nicht verhornend: 58 % negativ, 42 % positiv).
In Bezug auf die Signalintensität (Stärke der Expression Grad 1-3) von MMP-9-mRNA im Tumor zeigte sich eine signifikante Korrelation (p = 0,047): während bei

den verhornten Plattenepithelkarzinomen in 16 % eine starke Expression von MMP-9 nachgewiesen werden konnte, waren es bei den nicht-verhornten Karzinomen lediglich 3 % der Fälle mit starker Expression.

Mittels Immunhistochemie ergab sich eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von MMP-9-Protein im Tumor und dem Tumortyp ($p = 0,043$). Während bei verhornten Plattenepithelkarzinomen 3/4 aller Fälle positiv waren, zeigten bei den unverhornten Karzinomen lediglich die Hälfte der Fälle eine Expression von MMP-9-Protein (verhornend: 25 % negativ, 75 % positiv, nicht verhornend: 45 % negativ, 55 % positiv).

Im Stroma gab es bezüglich der Expression von MMP-9-mRNA und –Protein keine wesentlichen Unterschiede in Plattenepithelkarzinomen mit bzw. ohne Verhornung. Hier konnte sowohl in der in situ Hybridisierung als auch in der Immunhistochemie keine signifikante Korrelation oder Tendenz zur Korrelation nachgewiesen werden.

6.1.2.4. MMP-9-Expression im Vergleich mit dem Lymphknotenstatus

Es ergab sich keine signifikante Korrelation zwischen der Expression von MMP-9-mRNA oder -Protein im Tumor bzw. Stroma und dem Lymphknotenstatus.
Sowohl im Tumor als auch im Stroma konnte in der Hälfte der Fälle eine MMP-9-Expression nachgewiesen werden. Hier zeigte sich kein wesentlicher Unterschied zwischen lymphogen metastasierten und nicht metastasierten Tumoren.

6.1.2.5. MMP-9-Expression im Vergleich mit dem Fernmetastasenstatus

Zwischen der MMP-9-mRNA-Expression im Tumor und dem Fernmetastasenstatus ergab sich eine Tendenz zur Korrelation ($p = 0,077$). Bei den bereits metastasierten Tumoren zeigten 69 % der Fälle eine Expression von MMP-9-mRNA, 31 % davon erwiesen sich als stark positiv. In der Gruppe der nicht metastasierten Tumoren konnte in lediglich 42 % der Fälle eine Expression

von MMP-9-mRNA nachgewiesen werden, wovon 9 % eine starke Expression zeigten. Bezüglich der Signalintensität (Stärke der Expression Grad 1-3) bestand eine statistisch signifikante Korelation (p = 0,033).

Immunhistochemisch konnte keine signifikante Korrelation zwischen der Expression von MMP-9 Protein und dem Fernmetastasenstatus nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch eine deutliche Steigerung der Expression von MMP-9 Protein in metastasierten Fällen (M0: 36 % negativ, 64 % positiv, M1: 15 % negativ, 85 % positiv). Auch bestand eine Zunahme der Expressionsstärke bei metastasierten Tumoren (M0 86 % negativ / schwach positiv, 14 % stark positiv, M1: 69 % negativ / schwach positiv, 31% stark positiv).

Im Stroma konnten keine wesentlichen Unterschiede zwischen der MMP-9-mRNA-Expression in metastasierten und nicht metastasierten Karzinomen nachgewiesen werden, die Hälfte der Fälle zeigte jeweils eine Expression von MMP-9, in einem Viertel der Fälle bestand eine starke MMP-9-Expression.
Immunhistochemisch zeigte sich eine etwas höhere MMP-9-Expression im Stroma , auch hier konnten jedoch keine signifikanten Korrelationen oder wesentliche Unterschiede bezüglich des Metastasenstatus aufgezeigt werden (M0: 41% negativ, 59 % positiv (18 % stark positiv), M1: 31 % negativ, 69 % positiv (15 % stark positiv).

6.1.2.6. MMP-9-Expression im Vergleich mit dem rezidivfreien Überleben

Zwischen der Expression von MMP-9 und dem Rezidivstatus konnte weder in der in situ Hybridisierung noch in der Immunhistochemie eine signifikante Korrelation oder Tendenz zur Korrelation nachgewiesen werden.
In der in situ-Hybridisierung sah man in den Tumoren ohne Rezidiv eine höhere Expression der Metalloprotease (R0: 53 % negativ, 47 % positiv (12 % stark positiv); R1: 64 % negativ, 36 % positiv (14 % stark positiv)).
Immunhistochemisch zeigte sich eine diskrete Zunahme der Expressionsstärke von MMP-9 in Tumoren mit Rezidiven (R0: 41 % negativ, 59 % positiv (12 % stark positiv), R1: 36 % negativ, 64 % positiv (14 % stark positiv)).

Im Stroma zeigten sich in der in situ Hybridisierung und Immunhistochemie keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der MMP-9-Expression in rezidivierenden und nicht rezidivierenden Tumoren, in jeweils der Hälfte der Fälle wurde MMP-9-mRNA nachgewiesen. In Tumoren mit Rezidiv konnte jedoch eine Zunahme der Stärke der Expression beobachtet werden (R0: ISH: 12 % stark positiv, IHC: 15 % stark positiv; R1: ISH: 21 % stark positiv, IHC: 29 % stark positiv).

6.1.2.7. MMP-9-Expression im Vergleich mit weiteren klinisch-pathologischen Faktoren

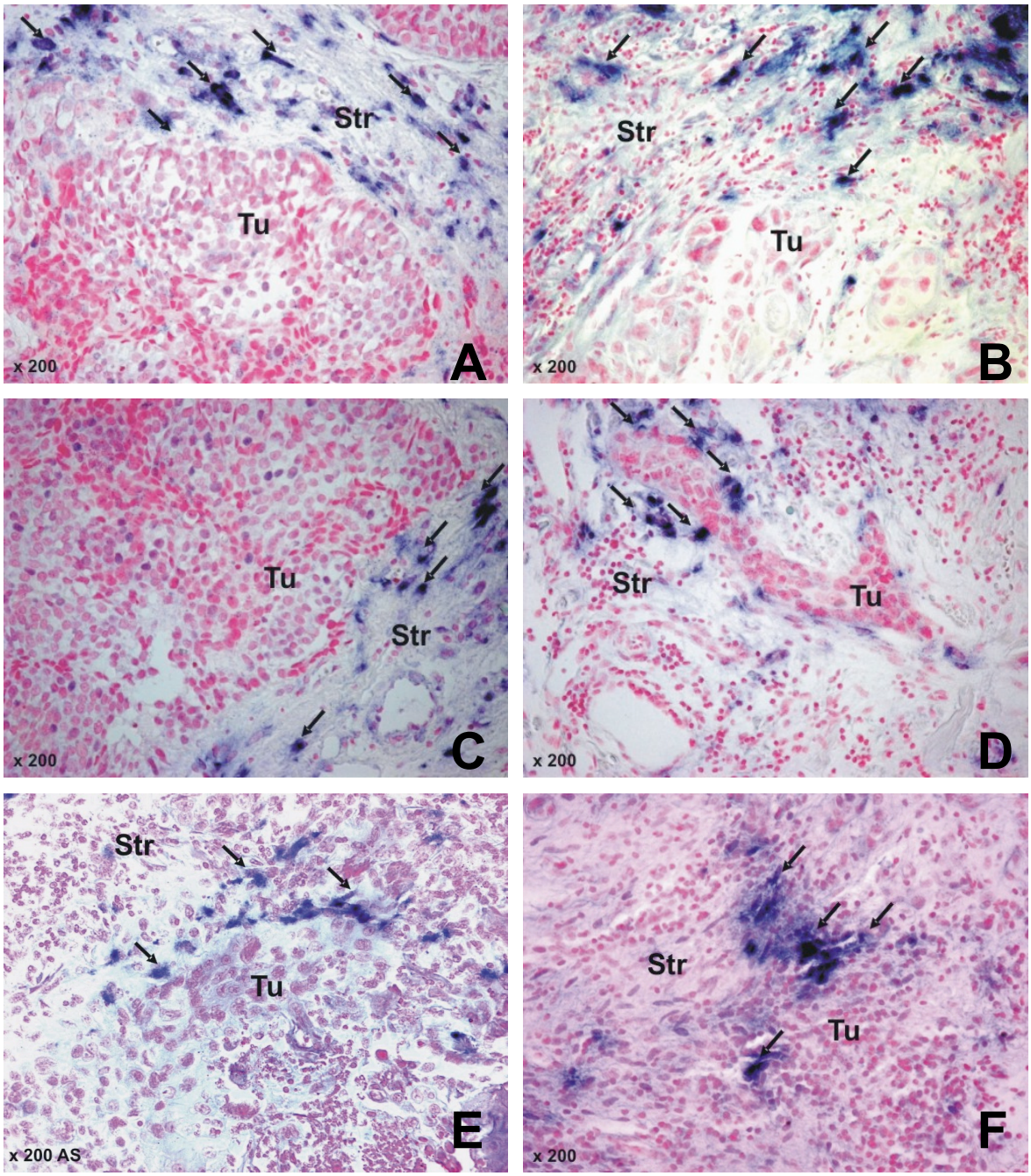
Im Vergleich zwischen der Expression von MMP-9 und klinisch-pathologischen Faktoren wie Geschlecht, Alter, frühere Tumoren, Vorerkrankungen (System-erkrankungen, Erkrankungen der Lunge, Nikotinabusus, Konsum von Alkohol), Lokalisation der Tumoren sowie erfolgter Radio- bzw. Chemotherapie konnten weder mittels in situ-Hybridisierung noch mittels Immunhistochemie eine eindeutige Tendenzen oder signifikante Korrelationen nachgewiesen werden.

6.2. TIMP-1-Expression

6.2.1. Expressionsmuster von TIMP-1-mRNA in der in situ-Hybridisierung

Im morphologisch normal erscheinenden Plattenepithel (PE) konnte TIMP1-mRNA nur selten nachgewiesen werden, meist auch nur mit geringer Signalintensität. Im dysplastischen Epithel (Dys) zeigte sich bereits in über einem Drittel der Fälle eine Expression von TIMP-1-mRNA.
In 30 % der Tumoren konnte eine Expression von TIMP-1-mRNA in Tumorzellen an der Invasionsfront des Tumors nachgewiesen werden (Abb. 11, Bild D-H, Pfeil); allerdings wurde TIMP-1-mRNA nie in der Tumormitte exprimiert. TIMP-1-mRNA wurde sehr viel stärker im Stroma (Str) als im Tumor (Tu) exprimiert.

Die Mehrzahl aller untersuchten Fälle war im Tumorstroma positiv (79 %). Häufig zeigte sich eine starke Expression von TIMP-1-mRNA im Stroma bei TIMP-1-negativem Tumor (Abb. 11, A-C, Pfeil).



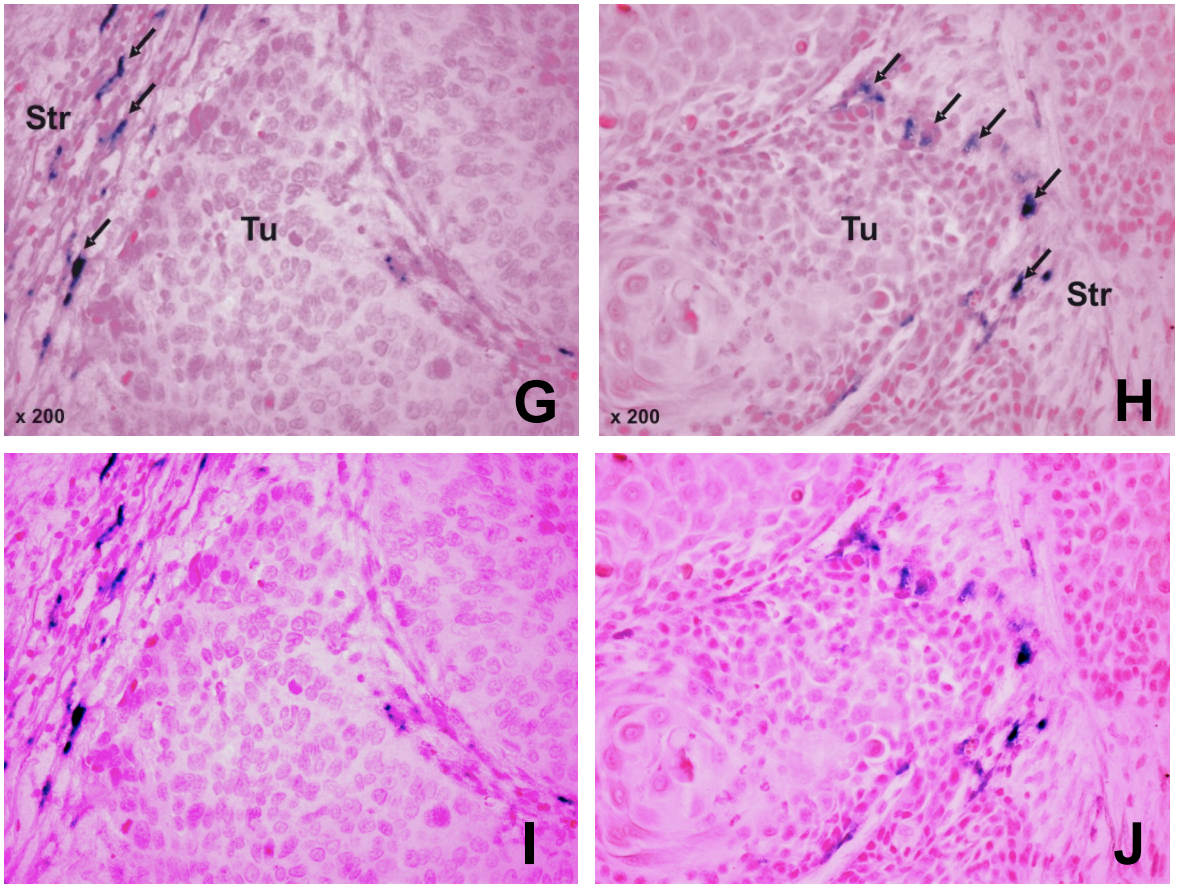


Abb.11: A-J: Nachweis von TIMP-1-mRNA im Tumor und Stroma mittels in situ-Hybridisierung. Dunkelblau: TIMP-1-spezifische Signale, Rot: Nuclear Fast Red-Gegenfärbung.

Die folgende Tabelle und das Diagramm geben einen Überblick der TIMP-1-mRNA-Expression in verschiedenen Geweben.

Tab. 23: Darstellung der TIMP-1-Expression in Abhängigkeit von der Lokalisation in den mittels RNA-in situ-Hybridisierung untersuchten Gewebeproben

TIMP-1-mRNA-Expression					
Lokalisation	**0**	**1**	**2**	**3**	
PE	82 (85%)	13 (14%)	1 (1%)	0 (0%)	n=96
Dysplasie	25 (61%)	14 (34%)	2 (5%)	0 (0%)	n=41
Tumor-Peripherie	85 (70%)	31 (26%)	5 (4%)	0 (0%)	n=121
Tumor-Mitte	121 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	n=121
Tumor-Stroma	26 (21%)	44 (36%)	33 (27%)	18 (15%)	n=121
Tumor-Endothel	93 (77%)	21 (17%)	6 (5%)	1 (1%)	n=121

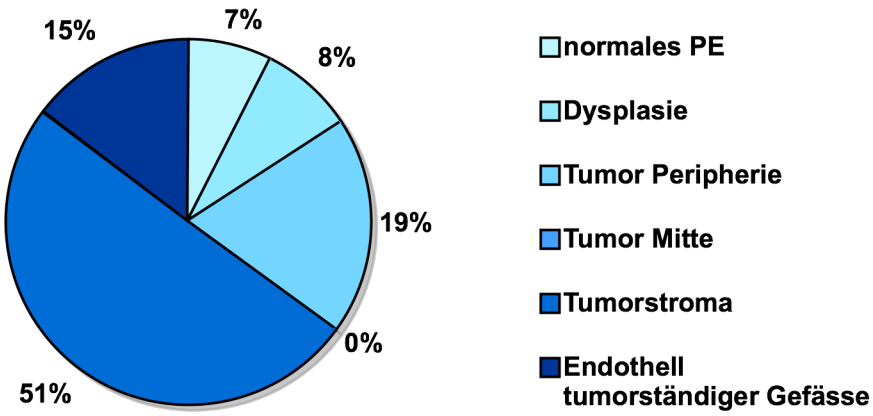


Abb. 12: Graphische Darstellung der TIMP-1-mRNA-Expression in verschiedenen Geweben (in situ-Hybridisierung) (zu Tab. 24). Die Prozentzahlen geben anteilmäßig den Wert der TIMP-1-Expression (Score 1-3 zusammengefasst) im jeweiligen Gewebe an.

6.2.2. Expression von TIMP-1 im Vergleich mit klinisch-pathologischen Faktoren

Die folgenden Tabellen geben einen Überblick der TIMP-1-mRNA-Expression im Vergleich mit den klinisch pathologischen Faktoren.

Tab. 24-26: Zusammenfassung der Ergebnisse d. TIMP-1-mRNA-Expression In-situ-Hybridisierung). $p < 0.05$ wurde als signifikant angesehen.

Tabelle 24: Vergleich der TIMP-1-mRNA-Expression (negativ vs. positiv) mit klinisch-pathologischen Faktoren. Negativ = keine Expression von TIMP-1-m-RNA; Positiv = Expression von TIMP-1-m-RNA (Grad 1-3)

Klinisch-pathologische Faktoren	n	TIMP-1 mRNA Tumor (Peripherie u. Mitte)			TIMP-1 mRNA Stroma		
		negativ (0)	positiv (1, 2, 3)	p < 0.05	negativ (0)	positiv (1, 2, 3)	p < 0.05
Tumorstadium				n. s.			n. s.
pT1	40	26	14	0,896	13	27	0,241
pT2	33	24	9		5	28	
pT3	10	7	3		1	9	
pT4	23	15	8		5	18	
Total	106	72	34		24	82	
pT1 + pT2	71	48	23	n. s.	18	53	n. s.
pT3 + pT4	36	24	12	0,922	6	30	0,309
Total	107	72	35		24	83	
Grading				n. s.			n. s.
G1	14	10	4	0,808	2	12	0,698
G2	73	48	25		18	55	
G3	25	18	7		6	19	
Total	112	76	36		26	86	
Tumortyp				n. s.			n. s.
verhornend	70	46	24	0,699	13	57	0,163
nicht verhornend	36	25	11		11	25	
Total	106	71	35		24	82	
LK-Status				n. s.			n. s.
pN0	57	38	19		18	39	
pN1/2	33	23	10		3	30	
Total	90	61	29		21	69	
Fernmetastasen-status				n. s.			n. s.
cM0	57	37	20	0,210	14	43	0,910
cM1	13	6	7		3	10	
Total	70	43	27		17	53	
Rezidivstatus				n. s.			n. s.
R0	34	27	7	0,948	12	22	0,346
R1	14	11	3		3	11	
Total	48	38	10		15	33	
Alter				n. s.			n. s.
< 60 J.	44	30	14	0,965	8	36	0,351
> 60 J.	70	48	22		18	52	
Total		78	36		26	88	
Geschlecht				n. s.			n. s.
männlich (1)	73	52	21	0,389	17	56	0,870
weiblich (2)	41	26	15		9	32	
Total	114	78	36		26	88	

Tabelle 25: Vergleich der TIMP-1-mRNA-Expression (negativ/schwach positiv vs. mässig/stark positiv) mit klinisch pathologischen Faktoren. Negativ/schwach = keine bzw. schwache Expression von TIMP-1-m-RNA (Grad 0+1) stark = mittelstarke bis starke Expression vonTIMP-1-m-RNA (Grad 2+3)

Klinisch-pathologische Faktoren	n	TIMP-1 mRNA Tumor (Peripherie u. Mitte)			TIMP-1 mRNA Stroma		
		negativ (0) / schwach positiv (1)	stark positiv (2, 3)	p < 0.05	negativ (0) / schwach positiv (1)	stark positiv (2, 3)	p < 0.05
Tumorstadium				n. s.			n. s.
pT1	40	39	1		29	11	0,128
pT2	33	31	2		16	17	
pT3	10	10	0		6	4	
pT4	23	21	2		11	12	
Total	106	101	5		62	44	
pT1 + pT2	71	68	3	n. s.	45	26	n. s.
pT3 + pT4	36	34	2	0,758	18	18	0,184
Total	107	102	5		63	44	
Grading				n. s.			n. s.
G1	14	14	0		7	7	0,124
G2	73	70	3		48	25	
G3	25	23	2		11	14	
Total	112	107	5		66	46	
Tumortyp				n. s.			n. s.
verhornend	70	66	4	0,499	42	28	0,476
nicht verhornend	36	35	1		19	17	
Total	106	101	5		61	45	
LK-Status				n. s.			n. s.
pN0	57	54	3		34	23	
pN1/2	33	32	1		18	15	
Total	90	86	4		52	38	
Fernmetastasen-status				n. s.			n. s.
	57	55	2		34	23	0,900
cM0	13	11	2		8	5	
cM1	70	66	4		42	28	
Total							
Rezidivstatus				n. s.			n. s.
R0	34	33	1		24	10	0,175
R1	14	14	0		7	7	
Total	48	47	1		31	17	
Alter				n. s.			n. s.
< 60 J.	44	42	2	0,947	25	19	0,737
> 60 J.	70	67	3		42	28	
Total	114	109	5		67	47	
Geschlecht				n. s.			n. s.
männlich	73	70	3	0,848	43	30	0,969
weiblich	41	39	2		24	17	
Total	114	109	5		67	41	

Tabelle 26: Vergleich der TIMP-1-mRNA-Expression Grad 0-3 mit klinisch pathologischen Faktoren. Grad 0 = Negativ = keine Expression von TIMP-1-m-RNA, Grad 1 = schwache Expression von TIMP-1-mRNA, Grad 2 = mittelstarke Expression von TIMP-1-mRNA, Grad 3 = starke Expression von TIMP-1-m-RNA

Klinisch-pathologische Faktoren	n	TIMP-1 Tumor (Peripherie und Mitte)					TIMP-1 Stroma				
		0	1	2	3	p <0.05	0	1	2	3	p <0.05
Tumorstadium						n. s.					***0,068***
pT1	40	28	11	1	0		13	16	7	4	
pT2	33	25	6	2	0		5	11	15	2	
pT3	10	7	3	0	0		1	5	1	3	
pT4	23	15	6	2	0		5	6	7	5	
Total	106	75	26	5	0		24	38	30	14	
pT1 + pT2	71	51	17	3	0	n. s.	18	27	20	6	n. s.
pT3 + pT4	36	24	10	2	0	0.852	6	12	10	8	0,220
Total	107	75	27	5	0		24	39	30	14	
Grading						n. s.					n. s.
G1	14	12	2	0	0		2	5	6	1	0,273
G2	73	49	21	3	0		18	30	17	8	
G3	25	18	5	2	0		6	5	8	6	
Total	112	79	28	5	0		26	40	31	15	
Tumortyp						n. s.					n. s.
verhornend (1)	70	48	18	4	0		13	29	20	8	0,208
nicht verhornend (2)	36	26	9	1	0		11	8	11	6	
Total	106	74	27	5	0		24	37	31	14	
LK-Status						n. s.					n. s.
pN0 (1)	57	40	14	3	0		18	16	15	8	
pN1/2 (2)	33	23	9	1	0		3	15	11	4	
Total	90	63	23	4	0		21	31	26	12	
Fernmetastasen-status						n. s.					n. s.
cM0	57	39	16	2	0		14	20	17	6	0,934
cM1	13	7	4	2	0		3	5	3	2	
Total	70	46	20	4	0		17	25	20	8	
Rezidivstatus						n. s.					n. s.
R0	34	27	6	1	0		12	12	10	0	
R1	14	11	3	0	0		3	4	5	2	
Total	48	38	9	1	0		15	16	15	2	
Alter						n. s.					n. s.
< 60 J. (1)	44	31	11	2	0	0,993	8	17	13	6	0,809
=/> 60 J. (2)	70	50	17	3	0		18	24	18	10	
Total	114	81	28	5	0		26	41	31	16	
Geschlecht						n. s.					n. s.
männlich (1)	73	53	17	3	0	0,888	17	26	20	10	0,997
weiblich (2)	41	28	11	2	0		9	15	11	6	
Total	114	81	28	5	0		26	41	31	16	

6.2.2.1. TIMP-1-Expression in Abhängigkeit vom Tumorstadium

Die TIMP-1-mRNA-Expression korrelierte nicht signifikant mit dem Tumorstadium. Im Tumor konnte TIMP-1-mRNA in einem Drittel der Fälle nachgewiesen werden, es zeigte sich hierbei kein Unterschied zwischen der Expression von TIMP-1 in frühen und späten Tumorstadien.
Im Stroma konnte eine Zunahme der Expression von TIMP-1 in späteren Tumorstadien nachgewiesen werden (T1 + T2: 75 % positiv; T3 + T4: 83 % positiv). Hierbei zeigte sich auch eine deutlich stärkere Expression von TIMP-1 in fortgeschrittenen Tumoren (T1 + T2: 37 % stark positiv, T3 + T4: 50 % stark positiv).

6.2.2.2. Expression von TIMP-1 im Vergleich mit dem Differenzierungsgrad

Die TIMP-1-mRNA-Expression korrelierte nicht signifikant mit dem Differenzierungs-grad der Tumoren. Es konnten keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der Expressionsstärke von TIMP-1 in Abhängigkeit vom Grading aufgezeigt werden.

6.2.2.3. TIMP-1-Expression im Vergleich mit dem Tumortyp (verhornend / nicht-verhornend)

Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen der TIMP-1-mRNA-Expression in den Tumor- oder Stromazellen und dem Verhornungsgrad nachgewiesen werden.

Es zeigte sich jedoch sowohl im Tumor als auch im Stroma von verhornenden Plattenepithelkarzinomen im Vergleich zu nicht verhornendenden Karzinomen eine etwas höhere Expression von TIMP-1 (Tumor: verhornend: 34 % im Tumor positiv, 6 % stark positiv, nicht-verhornend: 31 % positiv, 3 % stark positiv; Stroma: verhornend: 81 % positiv, 40 % stark positiv, nicht-verhornend: 69 % positiv, 47 % stark positiv).

6.2.2.4. Expression von TIMP-1 im Vergleich mit dem Lymphknotenstatus

Es konnte weder im Tumor noch im Stroma eine signifikante Korrelation der TIMP-1-mRNA-Expression mit dem Lymphknotenstatus nachgewiesen werden.

Bezüglich der Expression von TIMP-1 im Tumor konnten keine wesentlichen Unterschiede zwischen lymphogen metastasierten und nicht metastasierten Karzinomen festgestellt werden. Im Stroma sah man allerdings eine deutliche Zunahme der Expression von TIMP-1 bei metastasierten Tumoren.
Bei den Karzinomen ohne Lymphknotenmetastasen (N0) zeigten 33 % eine TIMP-1-mRNA-Expression im Tumor (5 % stark positiv); im Stroma hingegen konnte in 68 % eine TIMP-1-Expression nachgwiesen werden (40 % stark positiv).
Bei den bereits lymphogen metastasierten Karzinomen (N1) wurde in 30 % eine TIMP-1-Expression im Tumor (3 % stark positiv) und in 91 % der Fälle im Stroma nachgewiesen (45 % stark positiv).

6.2.2.5. TIMP-1-Expression im Vergleich mit dem Fernmetastasenstatus

Beim Vergleich zwischen der TIMP-1-mRNA-Expression und dem Fernmetastasen-status konnte keine signifikante Korrelation aufgezeigt werden.

Es zeigte sich allerdings eine vermehrte Expression von TIMP-1 im Tumor bei metastasierten Karzinomen (M0: 35 % positiv, 3 % stark positiv; M1: 54 % positiv, 15 % stark positiv). Im Stroma zeigte sich eine insgesamt höhere Expression von TIMP-1, es konnten jedoch keine wesentlichen Unterschiede im Bezug auf den Metastasenstatus nachgewiesen werden (M0: 75 positiv, 40 % stark positiv; M1: 77 positiv, 38 % stark positiv).

6.2.2.6. TIMP-1-Expression im Vergleich mit dem rezidivfreien Überleben

Eine signifikante Korrelation konnte nicht aufgezeigt werden. Im Tumor konnte sowohl bei Tumoren mit Rezidiv als auch bei Tumoren ohne Rezidiv eine TIMP-1-Expression in 21 % der Fälle aufgezeigt werden. Im Stroma war eine vermehrte

Expression in rezidivierenden Tumoren nachzuweisen, hier zeigte sich auch eine deutlich stärkere Expression (R0: 65 % positiv, 29 % stark positiv; R1: 79 % positiv, 50 % stark positiv).

6.2.2.7. TIMP-1-Expression im Vergleich mit weiteren klinisch-pathologischen Faktoren

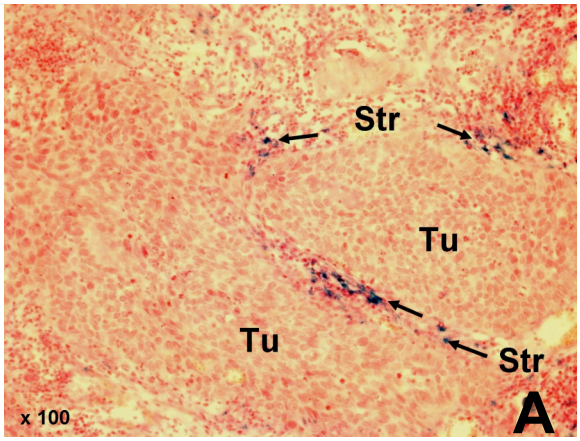
Im Vergleich zwischen der Expression von TIMP-1-mRNA und klinisch-pathologischen Faktoren wie Geschlecht, Alter, frühere Tumoren, Vorerkrankungen (System-erkrankungen, Erkrankungen der Lunge, Konsum von Alkohol), Lokalisation der Tumoren sowie erfolgter Radio- bzw. Chemotherapie konnten weder eine eindeutige Tendenzen noch signifikante Korrelationen nachgewiesen werden.
Im Hinblick auf den Nikotinabusus zeigte sich allerdings eine signifikante Korrelation ($p = 0,038$). Hier konnte bei Nichtrauchern eine Zunahme der Expressionsstärke von TIMP-1 aufgezeigt werden (Nichtraucher: 60 % positiv; Raucher: 33 % positiv).

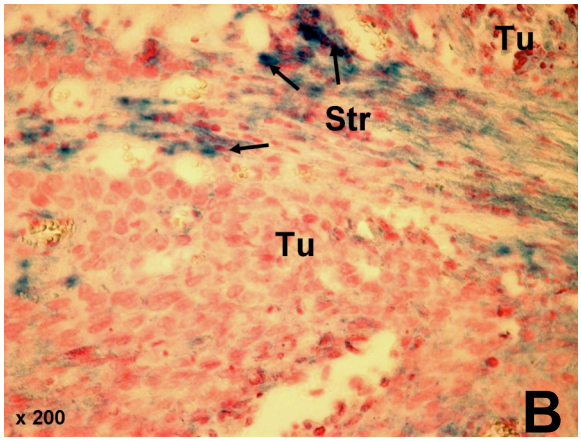
6.3. TIMP-2-Expression

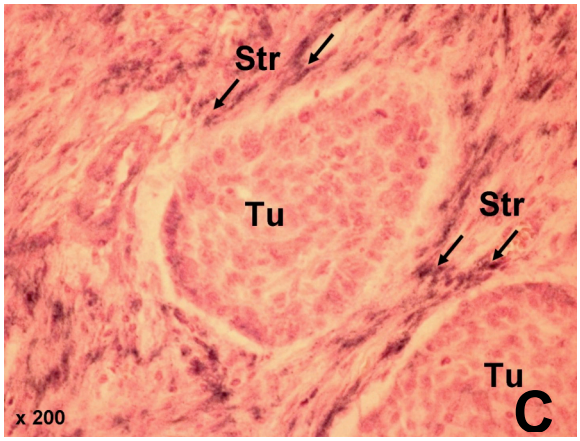
6.3.1. Expressionsmuster von TIMP-2-mRNA in der In situ-Hybridisierung

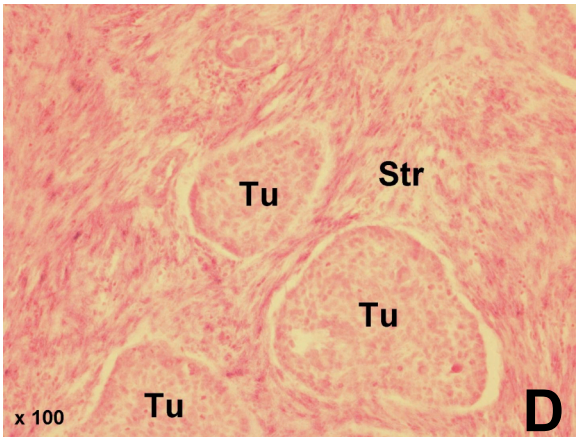
TIMP-2-mRNA wurde sehr viel häufiger im Tumorstroma (Str) (Abb. 13, A-B, Pfeil) als im Tumor (Tu) (Abb. 13, E und G, Pfeil) exprimiert.

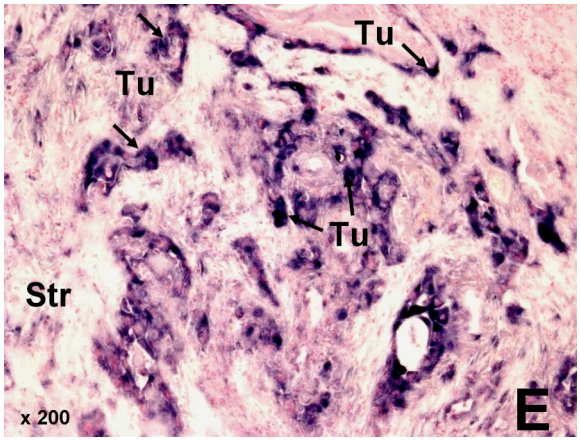
Im Gegensatz zu TIMP-1- konnte TIMP-2-mRNA jedoch auch in wenigen Fällen in der Tumormitte nachgewiesen werden, vorrangig jedoch an der Invasionsfront. Endothelzellen tumorständiger Gefäße exprimierten TIMP-2-mRNA selten (Abb. 13, H). Es zeigte sich jedoch auch eine Expression im Plattenepithel (31 %) sowie im dysplastischen Epithel (42 %).

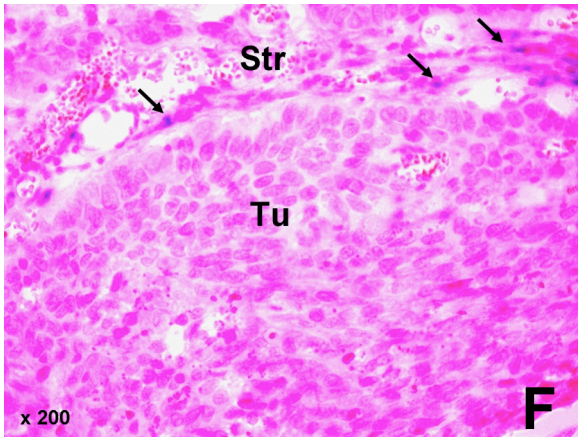

Str
Tu
Tu
Str
x 100
A


Tu
Str
Tu
x 200
B


Str
Tu
Str
Tu
x 200
C


Tu
Str
Tu
Tu
x 100
D


Tu
Tu
Tu
Str
x 200
E


Str
Tu
x 200
F

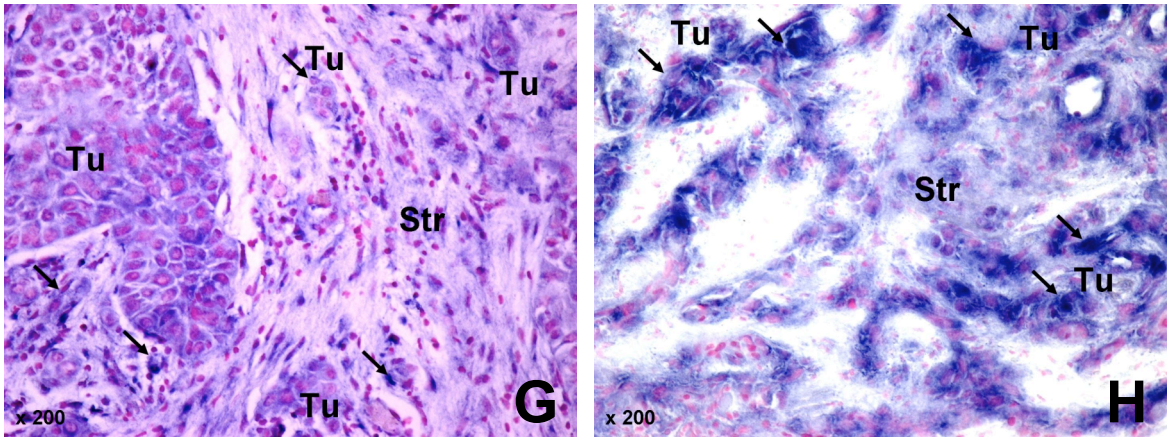


Abb. 13: A-H: Nachweis von TIMP-2-mRNA im Tumor und Stroma mittels in situ-Hybridisierung. Dunkelblau: TIMP-2-spezifische Signale, Rot: Nuclear Fast Red-Gegenfärbung.

Die folgende Tabelle und das Diagramm geben einen Überblick der TIMP-2-mRNA-Expression in verschiedenen Geweben.

Tab. 27: Darstellung der TIMP-2-Expression in Abhängigkeit von der Lokalisation in den mittels RNA-in situ-Hybridisierung untersuchten Gewebeproben

TIMP-2-mRNA-Expression					
Lokalisation	**0**	**1**	**2**	**3**	
PE	66 (69%)	24 (25%)	6 (6%)	0 (0%)	n=96
Dysplasie	24 (59%)	9 (22%)	8 (20%)	0 (0%)	n=41
Tumor Peripherie	85 (70%)	28 (21%)	8 (1%)	0 (0%)	n=121
Tumor Mitte	116 (96%)	3 (2%)	2 (2%)	0 (0%)	n=121
Stroma Tumor	51 (42%)	45 (37%)	16 (13%)	9 (7%)	n=121
Endothel Tumor	106 (88%)	13 (11%)	2 (2%)	0 (0%)	n=121

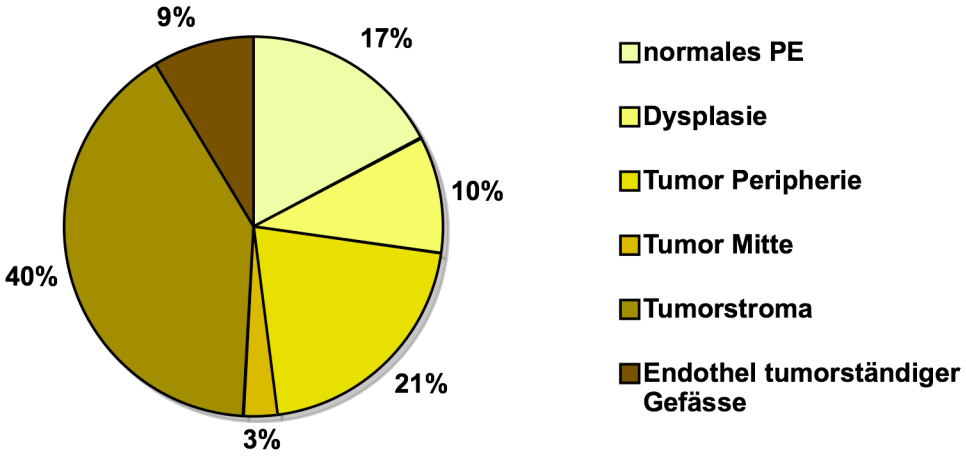


Abb. 14: Graphische Darstellung der TIMP-2-mRNA-Expression in verschiedenen Geweben (in situ-Hybridisierung) (zu Tab. 32). Die Prozentzahlen geben anteilmäßig den Wert der TIMP-2-Expression (Score 1-3 zusammengefasst) im jeweiligen Gewebe an.

6.3.2. Expression von TIMP-2 im Vergleich mit klinisch-pathologischen Faktoren

Die folgenden Tabellen geben einen Überblick über die TIMP-2-mRNA-Expression im Vergleich mit den klinisch pathologischen Faktoren.

Tab. 28-30: Zusammenfassung der Ergebnisse der TIMP-2-mRNA-Expression (In situ-Hybridisierung); $p < 0.05$ wurde als signifikant angesehen.

Tabelle 28: Vergleich der TIMP-2-mRNA-Expression (negativ vs. positiv) mit klinisch pathologischen Faktoren. Negativ = keine Expression von TIMP-2-m-RNA; Positiv = Expression von TIMP-2-m-RNA (Grad 1-3)

Klinisch-pathologische Faktoren	n	TIMP-2- mRNA Tumor Peripherie und Mitte			TIMP-2- mRNA Stroma		
		negativ (0)	positiv (1, 2, 3)	p <0.05	negativ (0)	positiv (1, 2, 3)	p <0.05
Tumorstadium				n.s.			n.s.
pT1	40	25	15	0,747	18	22	0,972
pT2	33	24	9		14	19	
pT3	10	7	3		4	6	
pT4	23	14	9		9	14	
Total	106	70	36		45	61	
pT1 + pT2	71	48	23	n.s.	31	40	n.s.
pT3 + pT4	36	23	13	0,701	14	22	0,637
Total	107	71	36		45	62	
Grading				n.s.			n.s.
G1	14	8	6	0,623	5	9	0,171
G2	73	50	23		29	44	
G3	25	18	7		15	10	
Total	112	76	36		49	63	
Tumortyp				n.s.			n.s.
verhornend	70	45	25	0,595	28	42	0,476
nicht verhornend	36	25	11		17	19	
Total	106	70	36		45	61	
LK-Status				n.s.			n.s.
pN0	57	38	19		25	32	
pN1/2	33	22	11		12	21	
Total	90	60	30		37	53	
Fernmetastasen-status				***0,015***			n.s.
cM0	57	42	15		19	38	0,384
cM1	13	5	8		6	7	
Total	70	47	23		25	45	
Rezidivstatus				n.s.			n.s.
R0	34	24	10	0,369	15	19	0,710
R1	14	8	6		7	7	
Total	48	32	16		22	26	
Alter				***0.035***			n.s.
< 60 J.	44	25	19		19	25	0.973
> 60 J.	70	53	17		30	40	
Total	114	78	36		49	65	
Geschlecht				***0,097***			n.s.
männlich	73	46	27		32	41	0,806
weiblich	41	32	9		17	24	
Total	114	78	36		49	65	

Tabelle 29: Vergleich der TIMP-2-mRNA-Expression (negativ/schwach positiv vs. mässig/stark positiv) mit klinisch pathologischen Faktoren. Negativ/schwach = keine bzw. nur sehr schwache Expression von TIMP-2-m-RNA (Grad 0+1); stark = mittelstarke bis starke Expression vonTIMP-2-m-RNA (Grad 2+3).

Klinisch-pathologische Faktoren	n	TIMP-2- mRNA Tumor Peripherie und Mitte			TIMP-2- mRNA Stroma		
		negativ/ schwach (0,1)	stark (2, 3)	p <0.05	negativ/ schwach (0,1)	stark (2, 3)	p <0.05
Tumorstadium				n.s.			n.s.
pT1	40	36	4		34	6	0,891
pT2	33	31	2		28	5	
pT3	10	9	1		8	2	
pT4	23	22	1		18	5	
Total	106	98	8		88	18	
pT1 + pT2	71	65	6	n.s.	61	10	n.s.
pT3 + pT4	36	34	2	0,591	28	9	0,185
Total	107	99	8		89	19	
Grading				n.s.			n.s.
G1	14	12	2	0,482	11	3	0673
G2	73	68	5		59	14	
G3	25	24	1		22	3	
Total	112	104	8		92	20	
Tumortyp				n.s.			n.s.
verhornend	70	64	6	0,578	56	14	0,678
nicht verhornend	36	34	2		30	6	
Total	106	98	8		86	20	
LK-Status				n.s.			n.s.
pN0	57	52	5		49	8	
pN1/2	33	31	2		24	9	
Total	90	83	7		73	17	
Fernmetastasen-status				n.s.			n.s.
cM0	57	51	6	0,759	45	13	0,575
cM1	13	12	1		11	2	
Total	70	63	7		56	15	
Rezidivstatus				n.s.			n.s.
R0	34	32	2		31	3	0,631
R1	14	13	1		13	2	
Total	48	45	3		44	5	
Alter				n.s.			n.s.
< 60 J.	44	40	4	0,492	35	9	0,632
> 60 J.	70	66	4		59	12	
Total	114	106	8		94	21	
Geschlecht				n.s.			n.s.
männlich	73	68	5	0,925	62	11	0,243
weiblich	41	38	3		32	10	
Total	114	106	8		94	21	

Tabelle 30: Vergleich der TIMP-2-mRNA-Expression Grad 0 bis 3 mit klinisch pathologischen Faktoren. Grad 0 = negativ = keine TIMP-2-mRNA-Expression, Grad 1 = schwache TIMP-2-mRNA-Expression, Grad 2 = mittelstarke TIMP-2-mRNA-Expression, Grad 3 = starke TIMP-2- mRNA-Expression

Klinisch-pathologische Faktoren	n	TIMP-2- Tumor mRNA Peripherie und Mitte					TIMP-2- mRNA Stroma				
		0	1	2	3	p <0.05	0	1	2	3	p <0.05
Tumorstadium						n.s.					n.s.
pT1	40	27	9	4	0		18	16	5	1	
pT2	33	25	6	2	0		14	14	3	2	
pT3	10	7	2	1	0		4	3	0	3	
pT4	23	14	8	1	0		9	8	4	2	
Total	106	73	25	8	0		45	41	12	8	
pT1 + pT2	71	51	14	6	0	n.s.	31	30	7	3	n.s.
pT3 + pT4	36	23	11	2	0	0,430	14	11	6	5	0,181
Total	107	74	25	8	0		45	41	13	8	
Grading						n.s.					n.s.
G1	14	9	3	2	0	0,829	5	6	1	2	0,541
G2	73	52	16	5	0		29	29	10	5	
G3	25	18	6	1	0		15	10	2	2	
Total	112	79	25	8	0		49	41	13	9	
Tumortyp						n.s.					n.s.
verhornend (1)	70	46	18	6	0	0,612	28	27	9	6	0,879
nicht verhornend (2)	36	27	7	2	0		17	13	4	2	
Total	106	73	25	8	0		45	40	13	8	
LK-Status						n.s.					n.s.
pN0 (1)	57	40	12	5	0		25	22	6	4	
pN1/2 (2)	33	22	9	2	0		12	12	7	2	
Total	90	62	21	7	0		37	34	13	6	
Fernmetastasen-status						***0,018***					n.s.
cM0	57	44	7	6	0		19	24	9	5	0,796
cM1	13	6	6	1	0		6	5	1	1	
Total	70	50	13	7	0		25	29	10	6	
Rezidivstatus						n.s.					n.s.
R0	34	25	7	2	0		15	16	2	1	
R1	14	8	5	1	0		7	5	1	1	
Total	48	33	12	3	0		22	21	3	2	
Alter						n.s.					n.s.
< 60J.	44	27	13	4	0	0,194	19	14	7	4	0,829
>60J.	70	54	12	4	0		30	27	8	5	
Total	114	81	25	8	0		49	41	15	9	
Geschlecht						n.s.					n.s.
männlich (1)	73	48	20	5	0	0,167	32	27	8	6	0,834
weiblich (2)	41	33	5	3	0		17	14	7	3	
Total	114	81	25	8	0		49	41	15	9	

6.3.2.1. TIMP-2-Expression in Abhängigkeit vom Tumorstadium

Hinsichtlich der Expression von TIMP-2-mRNA in den Tumorzellen zeigte sich keine statistisch signifikante Korrelation mit dem Tumorstadium.

Es konnte lediglich eine diskrete Zunahme der Expression von TIMP-2 im Tumor in späteren Tumorstadien nachgewiesen werden (T1 + T2: 32 % positiv, 8 % stark positiv; T3 + T4: 36 % positiv, 5 % stark positiv).
Auch bezüglich der Expression von TIMP-2-mRNA im umgebenden Tumorstroma zeigte sich keine signifikante Korrelation zum Tumorstadium. Auch hier zeigte sich eine diskrete Zunahme der Expressionsmenge/-stärke von TIMP-2 im Stroma bei fortgeschrittenen Tumoren (T1 + T2: 56 % positiv, 14 % stark positiv; T3 + T4: 61 % positiv, 25 % stark positiv).

6.3.2.2. TIMP-2-Expression im Vergleich mit dem Differenzierungsgrad

Hinsichtlich des Gradings konnte keine signifikante Korrelation mit der Expression von TIMP-2-mRNA in den Tumor- oder Stromazellen nachgewiesen werden.
Es zeigte sich jedoch eine stärkere Expression von TIMP-2 in gut differenzierten Tumoren, sowohl im Tumor als auch im Stroma (Tumor: G1 43 % positiv (14 % stark positiv), G2: 32 % positiv (7 % stark positiv), G3: 28 % positiv (4 % stark positiv); Stroma: G1: 64 % positiv (21 % stark positiv), G2: 60 % positiv (19 % stark positiv), G3: 40 % positiv (12 % stark positiv)).

6.3.2.3. TIMP-2-Expression im Vergleich mit dem Tumortyp (verhornend / nicht-verhornend)

Auch zwischen der Höhe der TIMP-2-mRNA-Expression und dem Tumortyp (verhornend / nicht verhornend) konnte keine signifikante Korrelation gefunden werden. Es zeigte sich jedoch eine etwas stärkere Expression von TIMP-2 sowohl im Tumor als auch im Stroma in verhornenden Plattenepithelkarzinomen (Tumor: verhornend: Tumor: 36 % positiv (8 % stark positiv), nicht verhornend: 31 %

positiv (5 % stark positiv); Stroma: verhornend: 60 % positiv (20 % stark positiv); nicht-verhornend: 53 % positiv (17 % stark positiv)).

6.3.2.4. TIMP-2-Expression im Vergleich mit dem Lymphknotenstatus

Zwischen der Expression von TIMP-2-mRNA und dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen wurde keine signifikante Korrelation beobachtet.
Sowohl bei lymphogen metastasierten als auch lymphogen nicht metastasierten Tumoren wurde TIMP-2 in einem Drittel der Fälle im Tumor exprimiert, auch bezüglich der Stärke der Expression zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede (N0: 33 % positiv (9 % stark positiv); N1: 33 % positiv (6 % stark positiv)). Im Stroma zeigte sich eine TIMP-2 Expression in über der Hälfte der Fälle mit einer Zunahme der Expressionsstärke in lymphogen metastasierten Karzinomen (N0: 56 % positiv (14 % stark positiv); N1: 58 % positiv (27 % stark positiv)).

6.3.2.5. TIMP-2-Expression im Vergleich mit dem Fernmetastasenstatus

Hier wurde eine signifikante Korrelation zwischen dem Fernmetastasenstatus und der Expressionsmenge von TIMP-2-mRNA in Tumorzellen nachgewiesen ($p = 0,015$).
Bei den nicht-metastasierten Tumoren zeigten lediglich 26 % eine Expression von TIMP-2 im Tumor, 11 % waren stark positiv. Bei den Tumoren mit bereits nachzuweisender Metastasierung sah man eine deutliche Zunahme der TIMP-2 Expression in den Tumorzellen: 62 % waren TIMP-2-positiv, 8 % waren stark positiv.
Im Stroma konnte keine signifikante Korrelation gefunden werden. Hier zeigte sich sowohl bei metastasierten als auch bei nicht metastasierten Tumoren eine hohe Expression von TIMP-2, wobei in Fällen ohne Fernmetastasen eine stärkere Expression zu sehen war (M0: 67 % positiv, 23 % stark positiv; M1: 54 % positiv, 15 % stark positiv).

6.3.2.6. TIMP-2-Expression im Vergleich mit dem rezidivfreien Überleben

Es konnte weder im Tumor noch im Stroma eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von TIMP-2-mRNA und dem Rezidivstatus nachgewiesen werden. Es zeigte sich allerdings eine vermehrte Expression von TIMP-2 bei rezidivierenden Karzinomen (R0: 29 % positiv, R1: 43 % positiv), in selten Fällen zeigte sich dabei eine starke Expression (R0: 6 % stark positiv, R1: 7 % stark positiv).
Im Stroma zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede der TIMP-2 Expression in Bezug auf den Rezidivstatus (R0: 56 % positiv; R1: 50 % positiv).

6.3.2.7. TIMP-2-Expression im Vergleich mit weiteren klinisch-pathologischen Faktoren

Hier zeigte sich eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Expression von TIMP-2 in den Tumorzellen und dem Alter ($p = 0,035$). Bei Patienten unter 60 Jahre zeigte sich eine TIMP-2 Expression in 43 % der Fälle, 9 % waren stark positiv. Bei Patienten über 60 Jahre zeigte sich eine TIMP-2 Expression in lediglich 24 % der Fälle, 6 % waren stark positiv.
Im Stroma gab es keine wesentlichen Unterschiede der TIMP-2 Expression in Bezug auf das Alter (< 60 Jahre: 56 % positiv, 20 % stark positiv; > 60 Jahre: 57 % positiv, 17 % stark positiv).

Im Vergleich der Expression von TIMP-2 mit dem Geschlecht konnte keine signifikante Korrelation nachgewiesen werden, es zeigte sich jedoch eine Tendenz zur vermehrten Expression von TIMP-2 im Tumor bei männlichen Patienten (männlich: 37 % positiv; weiblich: 22 % positiv). Im Stroma zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede der TIMP-2 Expression in Bezug auf das Geschlecht (männlich: 56 % positiv; weiblich 58 % positiv).

Im Vergleich zwischen der Expression von TIMP-2 und klinisch-pathologischen Faktoren wie frühere Tumoren, Vorerkrankungen (Systemerkrankungen, Erkrankungen der Lunge, Nikotinabusus, Konsum von Alkohol), Lokalisation der

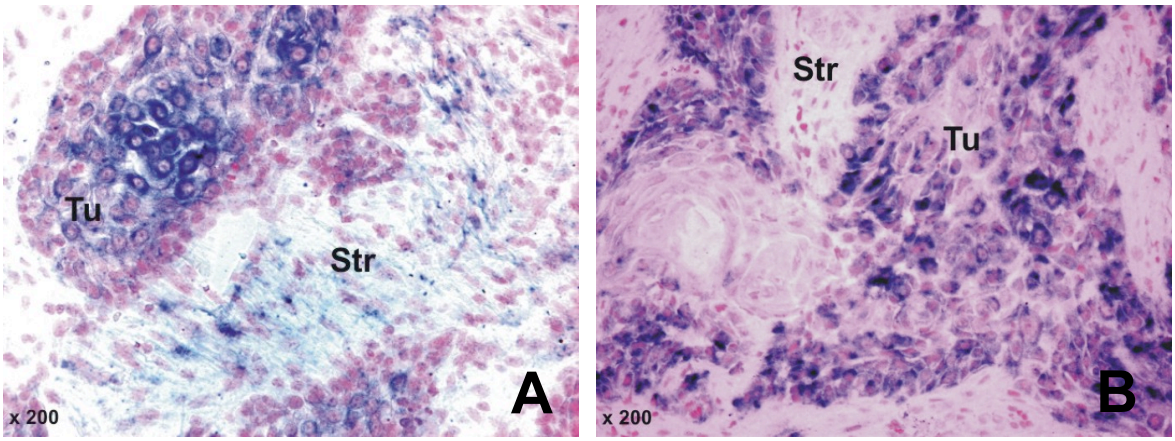
Tumoren sowie erfolgter Radio- bzw. Chemotherapie konnten weder im Tumor noch in dem den Tumor umgebenden Stroma eine eindeutige Tendenz oder signifikante Korrelationen nachgewiesen werden.

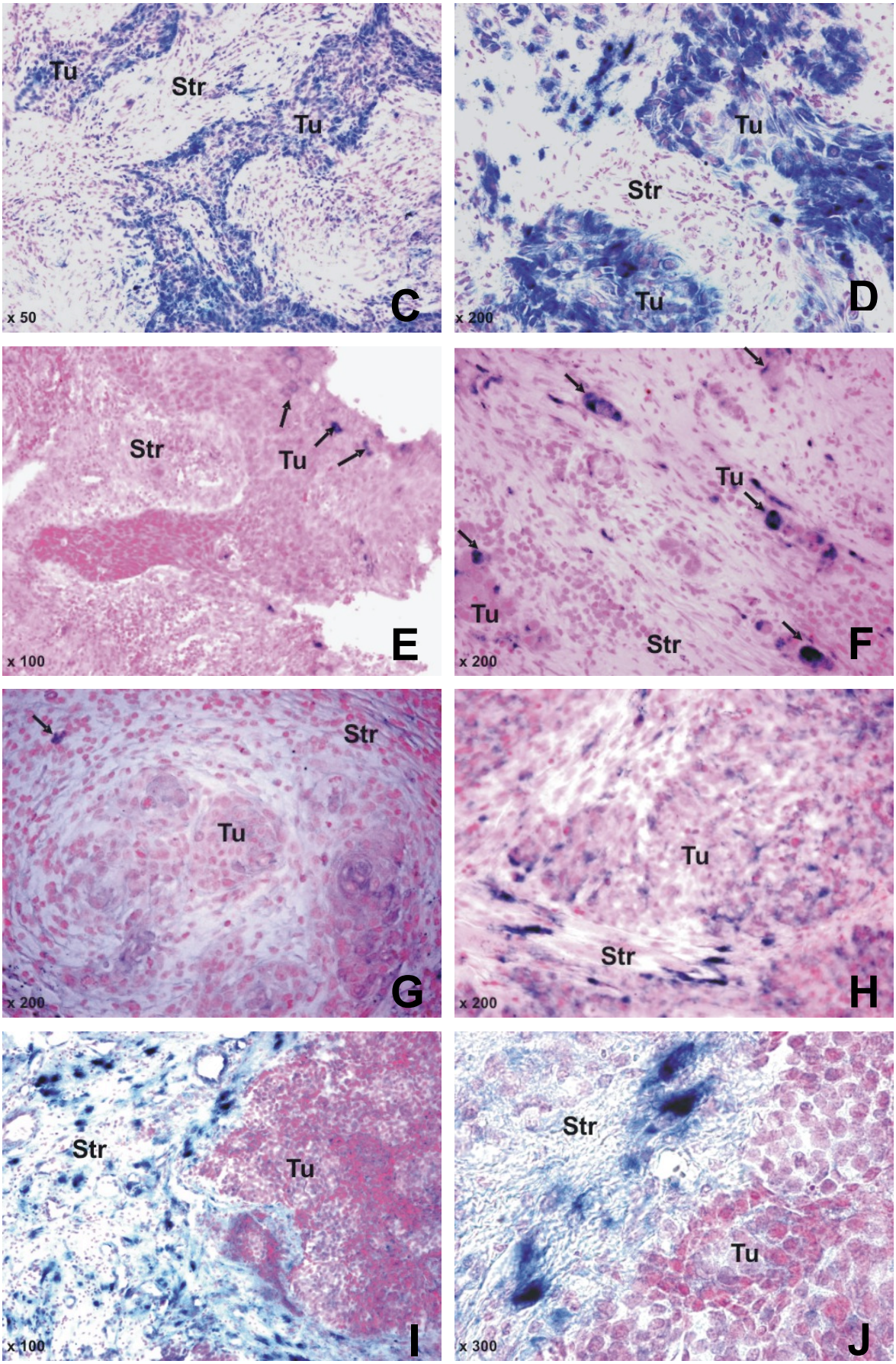
6.4. TIMP-3-Expression

6.4.1. Expressionsmuster von TIMP-3-mRNA in der in situ-Hybridisierung

Im Gegensatz zu TIMP-1 zeigte sich auch eine starke TIMP-3-mRNA-Expression im Tumor, sowohl in Tumormitte (Abb. 15, A, B, D) als auch an der Invasionsfront (Abb. 15, B, C, E). Auch in einzelnen Tumorzapfen in der Peripherie konnte TIMP-3-mRNA detektiert werden (Abb. 15, F, Pfeil).

Am häufigsten wurde TIMP-3-mRNA jedoch, wie auch TIMP-1 und TIMP-2, im tumornahen Stroma (Str) nachgewiesen (Abb. 15, H-L), in einigen Fällen bestand zeitgleich eine Expression von TIMP-3-mRNA an der Invasionsfront des Tumors (Abb. 15, F, H). Einige Fälle zeigten auch im tumornahen Endothel eine TIMP-3-mRNA-Expression.




Tu
Str
Tu
x 50
C
Tu
Str
Tu
x 200
D
Str
Tu
x 100
E
Tu
Tu
Str
x 200
F
Str
Tu
x 200
G
Tu
Str
x 200
H
Str
Tu
x 100
I
Str
Tu
x 300
J

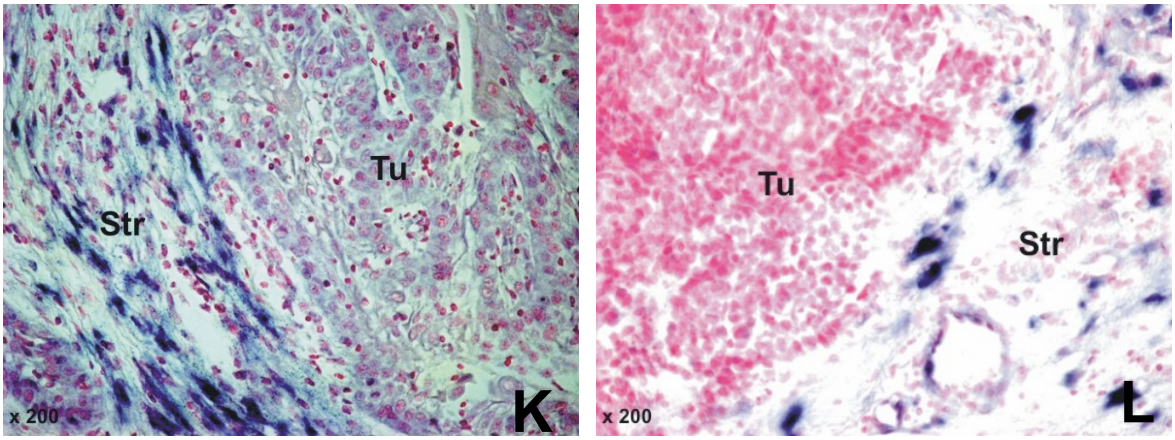
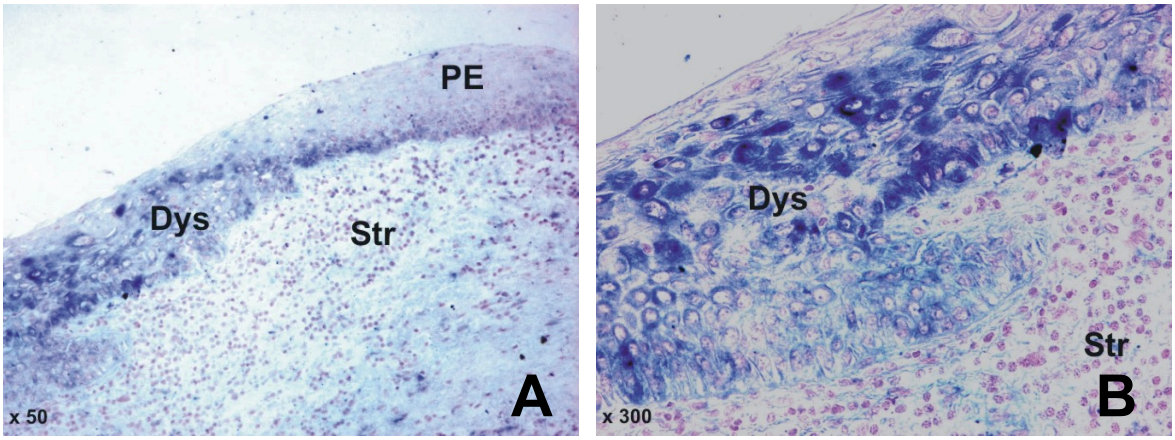


Abb. 15: A-L: Nachweis von TIMP-3-mRNA im Tumor und Stroma mittels in situ-Hybridisierung. Dunkelblau: TIMP-3-spezifische Signale, Rot: Nuclear Fast Red-Gegenfärbung.

Es zeigte sich eine teilweise starke TIMP-3-mRNA-Expression bereits im morphologisch normal erscheinenden Plattenepithel (PE) sowie zunehmend im dysplastischen Epithel (Dys) meist am Übergang zum Tumorgewebe (Abb. 16, A-C). Eine vermehrte TIMP-3-mRNA-Expression wurde zudem in einzelnen Tumorzapfen (Tu) sowie im Tumor umgebenden Stroma (Str) nahe der Invasionsfront beobachtet (Abb. 16, D, Pfeil).



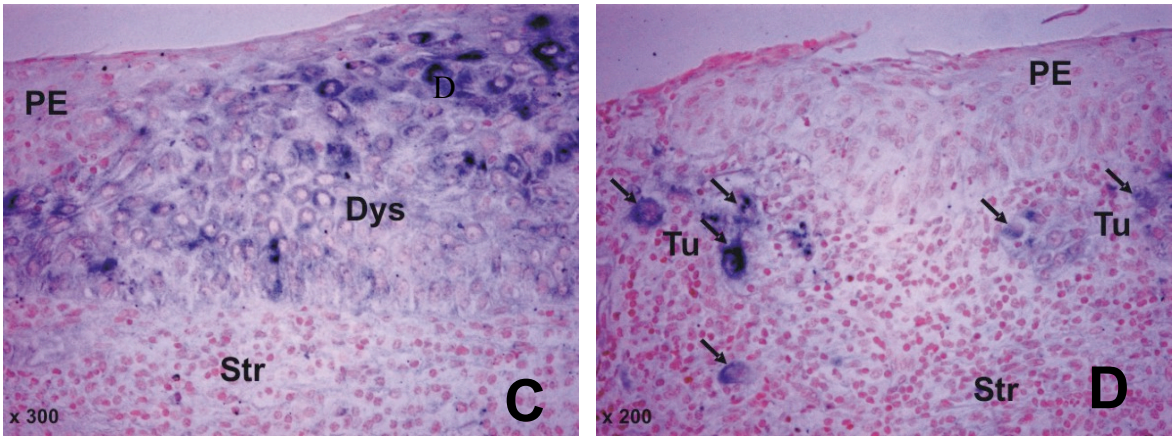


Abb. 16: Nachweis von TIMP-3-mRNA in verschiedenen Zelltypen mittels in situ-Hybridisierung. Dunkelblau: TIMP-3-spezifische Signale, Rot: Nuclear Fast Red-Gegenfärbung.

Die folgende Tabelle und das Diagramm geben einen Überblick über die TIMP-3-mRNA-Expression in verschiedenen Geweben.

Tab. 31: Darstellung der TIMP-3-Expression in Abhängigkeit von der Lokalisation in den mittels RNA - in situ-Hybridisierung untersuchten Gewebeproben

TIMP-3-mRNA-Expression					
Lokalisation	**0**	**1**	**2**	**3**	
PE	83 (86%)	12 (13%)	1 (1%)	0 (0%)	n=96
Dysplasie	27 (66%)	10 (24%)	4 (9%)	0 (0%)	n=41
Tumor-Peripherie	87 (72%)	28 (23%)	6 (1%)	0 (0%)	n=121
Tumor-Mitte	113 (93%)	4 (3%)	2 (2%)	2 (2%)	n=121
Tumor-Stroma	45 (37%)	45 (37%)	17 (14%)	14 (12%)	n=121
Tumor-Endothel	95 (79%)	21 (17%)	5 (4%)	0 (0%)	n=121

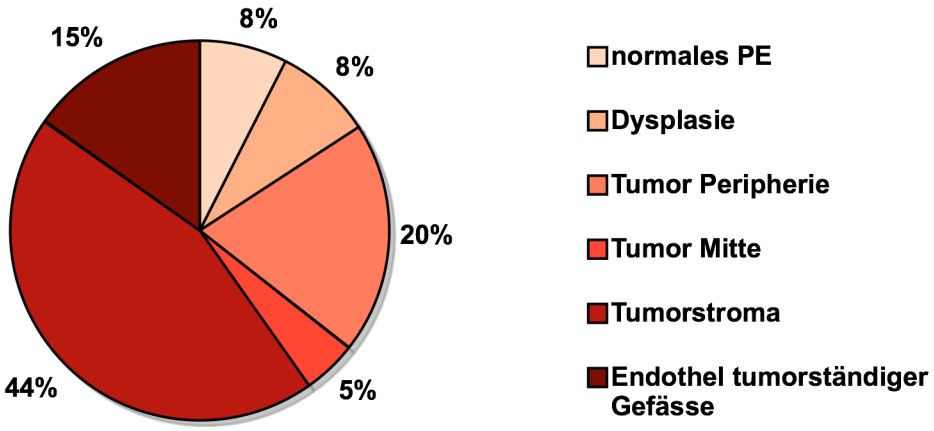


Abb. 17: Graphische Darstellung der TIMP-3-mRNA-Expression in verschiedenen Geweben (in situ-Hybridisierung) (zu Tab. 40). Die Prozentzahlen geben anteilmäßig den Wert der TIMP-3-Expression (Score 1-3 zusammengefasst) im jeweiligen Gewebe an.

6.4.2. Expression von TIMP-3 im Vergleich mit klinisch-pathologischen Faktoren

Die folgenden Tabellen geben einen Überblick über die TIMP-3-mRNA-Expression im Vergleich mit den klinisch pathologischen Faktoren.

Tab. 32-34: Zusammenfassung der Ergebnisse der TIMP-3-mRNA-Expression (In-situ-Hybridisierung)); $p < 0.05$ wurde als signifikant angesehen.

Tabelle 32: Vergleich der TIMP-3-mRNA-Expression (negativ vs. positiv) mit klinisch-pathologischen Faktoren. Negativ = keine Expression von TIMP-3-m-RNA; Positiv = Expression von TIMP-3-m-RNA (Grad 1-3 zusammengefasst)

Klinisch-pathologische Faktoren	n	TIMP-3- mRNA Tumor Peripherie und Mitte			TIMP-3- mRNA Stroma		
		negativ (0)	positiv (1, 2, 3)	p <0.05	negativ (0)	positiv (1, 2, 3)	p <0.05
Tumorstadium				n.s.			n.s.
pT1	40	27	13	0,510	14	26	0,201
pT2	33	27	6		18	15	
pT3	10	8	2		3	7	
pT4	23	16	7		7	16	
Total	106	78	28		42	64	
pT1 + pT2	71	53	18	n.s.	31	40	n.s.
pT3 + pT4	36	25	11	0,567	11	25	0,190
Total	107	78	29		42	65	
Grading				n.s.			n.s.
G1	14	9	5	0,504	8	6	0,237
G2	73	56	17		25	48	
G3	25	17	8		11	14	
Total	112	82	30		44	68	
Tumortyp				n.s.			n.s.
verhornend	70	47	23	0,147	30	40	0,695
nicht verhornend	36	29	7		14	22	
Total	106	76	30		44	62	
LK-Status				n.s.			n.s.
pN0	57	43	14		26	31	
pN1/2	33	20	13		7	26	
Total	90	63	27		33	58	
Fernmetastasen-status				n.s.			n.s.
cM0	57	43	14	0,910	21	36	0,259
cM1	13	10	3		7	6	
Total	70	53	17		28	42	
Rezidivstatus				n.s.			n.s.
R0	34	24	10	0,570	21	13	0,100
R1	14	11	3		5	9	
Total	48	35	13		26	22	
Alter				n.s.			n.s.
< 60 J.	44	33	11	0,563	17	27	0,994
> 60 J.	70	49	21		27	43	
Total	114	82	32		44	70	
Geschlecht				n.s.			n.s.
männlich	73	56	17	0,129	32	41	0,125
weiblich	41	26	15		12	29	
Total	114	82	32		44	70	

Tabelle 33: Vergleich der TIMP-3-mRNA-Expression (negativ/schwach positiv vs. mässig/stark positiv) mit klinisch pathologischen Faktoren. Negativ/schwach = keine/schwache Expression von TIMP-3-m-RNA (Grad 0+1); stark = mittelstarke bis starke Expression vonTIMP-3-m-RNA (Grad 2+3)

Klinisch-pathologische Faktoren	n	TIMP-3- mRNA Tumor Peripherie und Mitte			TIMP-3- mRNA Stroma		
		negativ/ schwach (0,1)	stark (2, 3)	p <0.05	negativ/ schwach (0,1)	stark (2, 3)	p <0.05
Tumorstadium				n.s.			n.s.
pT1	40	38	2		30	10	0,242
pT2	33	31	2		29	4	
pT3	10	10	0		8	2	
pT4	23	21	2		15	8	
Total	106	100	6		82	24	
pT1 + pT2	71	67	4	n.s.	57	14	n.s.
pT3 + pT4	36	33	3	0,594	25	11	0,211
Total	107	100	7		82	25	
Grading				n.s.			***0,098***
G1	14	12	2		14	0	
G2	73	69	4		54	19	
G3	25	24	1		19	6	
Total	112	105	7		87	25	
Tumortyp				n.s.			n.s.
verhornend	70	65	5	0,755	55	15	0,925
nicht verhornend	36	34	2		28	8	
Total	106	99	7		83	23	
LK-Status				n.s.			n.s.
pN0	57	53	4		45	12	
pN1/2	33	31	2		24	9	
Total	90	84	6		69	21	
Fernmetastasen-status				n.s.			n.s.
	57	54	3		40	17	0,291
cM0	13	12	1		11	2	
cM1	70	66	4		51	19	
Total							
Rezidivstatus				n.s.			n.s.
R0	34	33	1		28	6	0,397
R1	14	13	1		10	4	
Total	48	46	2		38	10	
Alter				n.s.			n.s.
< 60 J.	44	42	2	0,413	30	14	0,105
> 60 J.	70	64	6		57	13	
Total	114	106	8		87	27	
Geschlecht				n.s.			n.s.
männlich	73	69	4	0,391	53	20	0,213
weiblich	41	37	4		34	7	
Total	114	106	8		87	27	

Tabelle 34: Vergleich der TIMP-3-mRNA-Expression Grad 0-3 mit klinisch pathologischen Faktoren. Grad 0 = Negativ = keine Expression von TIMP-3-m-RNA, Grad 1 = schwache Expression von TIMP-3-mRNA, Grad 2 = mittelstarke Expression von TIMP-3-mRNA, Grad 3 = starke Expression von TIMP-3-m-RNA

Klinisch-pathologische Faktoren	n	TIMP-3- Tumor mRNA Peripherie und Mitte					TIMP-3- mRNA Stroma				
		0	1	2	3	p <0.05	0	1	2	3	p <0.05
Tumorstadium						n.s.					n.s.
pT1	40	27	11	1	1		14	16	6	4	0,333
pT2	33	27	4	1	1		18	11	1	3	
pT3	10	8	2	0	0		3	5	2	0	
pT4	23	16	5	2	0		7	8	3	5	
Total	106	78	22	4	2		42	40	12	12	
pT1 + pT2	71	53	14	2	2	n.s.	31	26	7	7	n.s.
pT3 + pT4	36	25	8	3	0		11	14	6	5	0,506
Total	107	78	22	5	2		42	40	13	12	
Grading						n.s.					n.s.
G1	14	9	3	2	0		8	6	0	0	0,453
G2	73	56	13	3	1		25	29	10	9	
G3	25	17	7	0	1		11	8	3	3	
Total	112	82	23	5	2		44	43	13	12	
Tumortyp						n.s.					n.s.
verhornend (1)	70	47	18	4	1		30	25	9	6	0,431
nicht verhornend (2)	36	29	5	1	1		14	14	2	6	
Total	106	76	23	5	2		44	39	11	12	
LK-Status						n.s.					n.s.
pN0 (1)	57	43	10	3	1		26	19	5	7	
pN1/2 (2)	33	20	11	2	0		7	17	5	4	
Total	90	63	21	5	1		33	36	10	11	
Fernmetastasen-status						n.s.					n.s.
	57	43	11	2	1		21	19	7	10	0,370
cM0	13	10	2	1	0		7	4	2	0	
cM1	70	53	13	3	1		28	23	9	10	
Total											
Rezidivstatus						n.s.					n.s.
R0	34	24	9	0	1		21	7	2	4	0,199
R1	14	11	2	1	0		5	5	3	1	
Total	48	35	11	1	1		26	12	5	5	
Alter						n.s.					n.s.
< 60J.	44	33	9	1	1		17	13	9	5	0,160
>60J.	70	49	15	5	1		27	30	5	8	
Total	114	82	24	6	2		44	43	14	13	
Geschlecht						n.s.					***0,066***
männlich (1)	73	56	13	2	2		32	21	11	9	
weiblich (2)	41	26	11	4	0		12	22	3	4	
Total	114	82	24	6	2		44	43	14	13	

6.4.2.1. TIMP-3-Expression im Vergleich mit dem Tumorstadium

Bezüglich der TIMP-3-mRNA-Expression im Tumor sowie im Stroma konnte keine signifikante Korrelation nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch sowohl im Tumor als auch im Stroma eine Zunahme der Expressionsstärke in späteren Tumorstadien (T1 + T2: 25 % positiv, 6 % stark positiv; T3 + T4: 31 % positiv, 8 % stark positiv; Stroma: T1 + T2: 56 % positiv, 20 % stark positiv, T3 + T4: 69 % positiv, 31 % stark positiv).

6.4.2.2. TIMP-3-Expression im Vergleich mit dem Differenzierungsgrad

Hinsichtlich des Gradings konnte keine signifikante Korrelation bezüglich der Expression von TIMP-3-mRNA in den Tumorzellen und im Stroma nachgewiesen werden.

Im Tumor zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der Expressionsmenge von TIMP-3 im Hinblick auf das Grading, es zeigte sich lediglich eine etwas stärkere Expression in den gut differenzierten Tumoren (G1: 36 % positiv, 14 % stark positiv; G2: 23 % positiv, 5 % stark positiv; G3: 32 % positiv 4 % stark positiv).

Im Stroma konnte eine Tendenz ($p = 0,098$) zur stärkeren Expression von TIMP-3 in schlechter differenzierten Tumoren nachgewiesen werden (G1: 43 % positiv, 0 % stark positiv; G2: 66 % positiv, 26 % stark positiv; G3: 56 % positiv, 24 % stark positiv). Eine statistisch signifikante Korrelation bestand jedoch nicht.

6.4.2.3. TIMP-3-Expression im Vergleich mit dem Tumortyp (verhornend / nicht-verhornend)

Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen der Expression von TIMP-3 und dem Tumortyp nachgewiesen werden.

Es zeigte sich eine vermehrte Expression von TIMP-3 im Tumor bei verhornenden Karinomen (verhornend: 33 % positiv, 7 % stark positiv; nicht verhornend: 19 % positiv, 5 % stark positiv). Im Stroma konnte kein Unterschied bezüglich der

Expression von TIMP-3 in verhornenden und nicht-verhornenden Karzinomen nachgewiesen werden (verhornend: 57 % positiv, 21 % stark positiv; nicht verhornend: 61 % positiv, 22 % stark positiv).

6.4.2.4. TIMP-3-Expression im Vergleich mit dem Lymphknotenstatus

Es konnte keine signifikante Korrelation bezüglich der Expression von TIMP-3 und dem Lymphknotenstatus nachgewiesen werden.
Es zeigte sich jedoch eine deutliche Zunahme der TIMP-3-Expression bei lymphogen metastasierten Tumoren: sowohl im Tumor als auch im Stroma wurde TIMP-3-mRNA häufiger bei Lymphknoten-positiven Fällen als bei Lymphknoten-negativen Fällen exprimiert (N0: Tumor: 25 % positiv, Stroma: 54 % positiv; N1: Tumor 39 % positiv, Stroma: 79 % positiv). Bezüglich der Stärke der Expression von TIMP-3 gab es hier keine wesentlichen Unterschiede.

6.4.2.5. TIMP-3-Expression im Vergleich mit dem Fernmetastasenstatus

Es konnte weder eine signifikante Korrelation noch eine Tendenz bezüglich der Expression von TIMP-3-mRNA und dem Fernmetastasenstatus nachgewiesen werden.
Im Tumor zeigten sich bezüglich der Expressionsmenge und –stärke keine wesentlichen Unterschiede, sowohl bei metastasierten als auch bei nicht metastasierten Fällen konnte in einem Viertel der Fälle eine TIMP-3 Expression nachgewiesen werden, nur wenige Fälle waren dabei stark positiv (M0: 25 % positiv, 5 % stark positiv; M1: 23 % positiv, 7 % stark positiv). Im Stroma zeigte sich eine stärkere Expression von TIMP-3 bei nicht metatasierten Tumoren (M0: 63 % positiv, 30 % stark positiv; M1: 46 % positiv, 15 % stark positiv).

6.4.2.6. TIMP-3-Expression im Vergleich mit dem rezidivfreien Überleben

Die Korrelation zwischen der Expression von TIMP-3-mRNA und der Rezidivrate zeigte keine signifikanten Ergebnisse.
Im Tumor konnten keine wesentlichen Unterschiede zwischen der Expression von TIMP-3 und dem Rezidivstatus aufgezeigt werden (R0: 29 % positiv, 3 % stark positiv; R1: 21 % positiv, 7 % stark positiv). Im Stroma zeigte sich hingegen eine Zunahme der Expressionsmenge und –stärke von TIMP-3-mRNA in rezidivierenden Karzinomen (R0: 38 % positiv, 18 % stark positiv; R1: 64 % positiv, 29 % stark positiv). Eine signifikante Korrelation bestand jedoch nicht.

6.4.2.7. TIMP-3-Expression im Vergleich mit weiteren klinisch-pathologischen Faktoren

Es zeigte sich jedoch eine Tendenz zur Korrelation zwischen der Expression von TIMP-3 im Stroma und dem Geschlecht ($p = 0{,}066$). Hier zeigte sich eine vermehrte Expression von TIMP-3 in Tumoren von Patienten weiblichen Geschlechts (männlich: 56 % positiv, weiblich 71 % positiv). Eine signifikante Korrelation bestand nicht.

Im Vergleich zwischen der Expression von TIMP-3-mRNA und klinisch-pathologischen Faktoren wie Alter, frühere Tumoren, Vorerkrankungen (Systemerkrankungen, Erkrankungen der Lunge, Nikotinabusus, Konsum von Alkohol), Lokalisation der Tumoren sowie erfolgter Radio- bzw. Chemotherapie konnten weder im Tumor noch in dem den Tumor umgebenden Stroma eine eindeutige Tendenzen oder signifikante Korrelationen nachgewiesen werden.

6.5. Vergleich von MMP-9 und TIMP-1, -2, -3 untereinander

6.5.1. Vergleich der MMP-9-Signale in der in situ-Hybridisierung und Immunhistochemie

Die MMP-9-mRNA wurde von allen untersuchten Sonden in der in situ-Hybridisierung am seltensten nachgewiesen (70% der Fälle MMP-9-mRNA positiv). Das MMP-9-Protein konnte mittels Immunhistochemie häufiger nachgewiesen werden: 86 % der Fälle waren positiv.
Im Vergleich von MMP-9-Signalen in der in situ-Hybridisierung und der Immunhistochemie konnte in 66 % der Fälle sowohl die mRNA als auch das Protein von MMP-9 jeweils im gleichen Tumorgewebeschnitt nachgewiesen werden. 10% der Fälle waren sowohl in der in situ-Hybridisierung als auch in der Immunhistochemie bezüglich MMP-9 negativ. In 52 % der Fälle zeigte sich im gleichen Gewebeschnitt eine sehr starke Expression der MMP-9-mRNA in der in situ-Hybridisierung und des MMP-9-Proteins in der Immunhistochemie.

Im dysplastischen Epithel sowie im Tumorgewebe wurde MMP-9 sowohl mittels in situ Hybridisierung als auch mittels Immunhistochemie vor allem an der Invasionsfront des Tumors nachgewiesen (Abb. 18, A-B, Pfeil).

Im Vergleich zwischen dem MMP-9-Nachweis im Tumor einerseits mittels in situ Hybridisierung, andererseits mittels Immunhistochemie zeigte sich eine übereinstimmende Positivität bzgl. MMP-9-mRNA und MMP-9-Protein in 60 % aller positiven Fälle. Es liegt hier eine signifikante Korrelation ($p < 0,0001$) vor.
Auch im Stroma zeigte sich eine eindeutige Übereinstimmung zwischen der Expression von MMP-9-mRNA und MMP-9-Protein in der überwiegenden Anzahl der Fälle (61 % aller Fälle, 47 % aller positiven Fälle). Auch hier lag eine statistisch signifikante Korrelation vor ($p = 0,001$).

Bezüglich der Stärke der Expression (Intensität) zeigten sich hier jedoch keine statistisch signifikanten Übereinstimmungen ($p = 0,113$). Lediglich 16 % der Fälle stimmten hinsichtlich der Signalintensität Grad 1-3 überein.

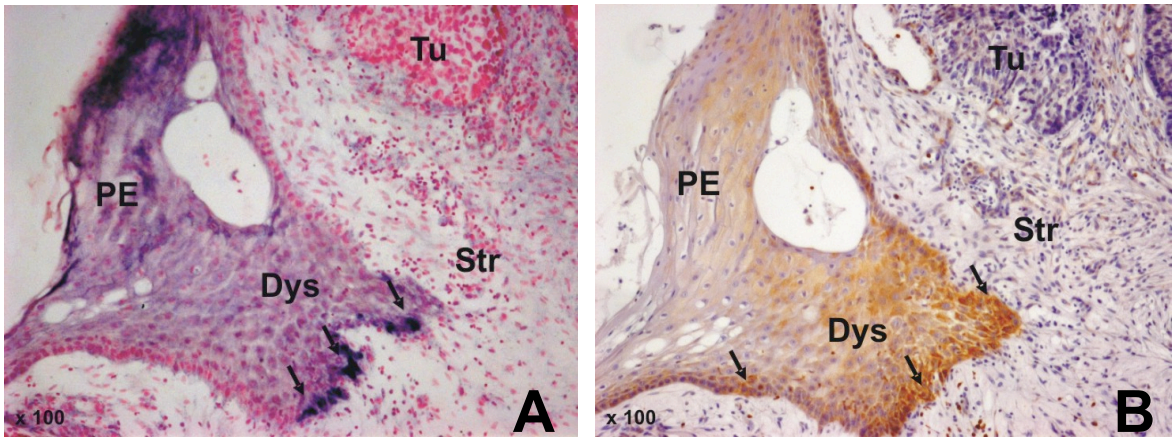


Abb. 18: Vergleich der MMP-9-Signale von ISH (Syntheseort) und IHC (Wirkungsort) in verschiedenen Zelltypen.

Gewebe: Plattenepithel (PE), dysplastisches Epithel (Dys), Tumorzellen (Tu), Tumorstroma (Str).

A: Expression von MMP-9-mRNA (ISH): Dunkelblau: MMP-9-spezifische Signale, Rot: Nuclear Fast Red-Gegenfärbung.

B: Nachweis von MMP-9-Protein (IHC): Braun: MMP-9-Immunreaktivität, Blau: Hämalaun-Gegenfärbung.

Tab. 35: Vergleich und Korrelation des Synthese- und Wirkungsortes von MMP-9 in den Tumorzellen (Nachweis von MMP-9-Signalen mittels in situ-Hybridisierung (ISH) und Immunhistochemie (IHC)). Es liegt eine signifikante Korrelation zwischen der Expression der mRNA und des Proteins von MMP-9 vor ($p < 0,0001$).

	MMP-9 Tumor (IHC)				
MMP-9 Tumor (ISH)	0	1	2	3	p
0	32	24	6	0	n.s.
1	3	29	9	0	
2	2	2	6	0	
3	0	1	3	0	
	MMP-9 Tumor (IHC)				
MMP-9 Tumor (ISH)	negativ		positiv		p
negativ	32		30		***< 0,0001***
positiv	5		50		
	MMP-9 Tumor (IHC)				
MMP-9 Tumor (ISH)	negativ/schwach positiv		stark positiv		p
negativ/schwach positiv	88		15		***< 0,0001***
positiv	5		9		

Tab.36: Vergleich und Korrelation des Synthese- und Wirkungsortes von MMP-9 im Stroma (Nachweis von MMP-9-Signalen mittels in situ-Hybridisierung (ISH) und Immunhistochemie (IHC)). Es liegt eine signifikante Korrelation zwischen der Expression der mRNA und des Proteins von MMP-9 vor (p=0,001).

	MMP-9 Stroma (IHC)				
MMP-9 Stroma (ISH)	0	1	2	3	p
0	33	27	7	3	n.s.
1	3	24	5	0	
2	4	3	1	1	
3	1	2	3	0	
	MMP-9 Stroma (IHC)				
MMP-9 Stroma (ISH)	negativ		positiv		p
negativ	33		38		***0,001***
positiv	8		40		
	MMP-9 Stroma (IHC)				
MMP-9 Stroma (ISH)	negativ/schwach positiv		stark positiv		p
negativ/schwach positiv	87		17		n.s.
stark positiv	10		5		0,113

6.5.2. Expressionsmuster von MMP-9 und TIMP-1, -2, -3 in Primärtumoren

Sowohl MMP-9 als auch TIMP-1, -2, -3 konnten in den untersuchten Gewebeproben auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Allerdings zeigten die einzelnen Gene hinsichtlich der Expressionsstärke und -intensität ihrer mRNA-Signale Unterschiede.

Die folgende Übersicht verdeutlicht, dass TIMP-1-mRNA von allen mittels in situ-Hybridisierung untersuchten Transkripten am häufigsten und auch in der Signalintensität am stärksten nachzuweisen war.

Tab. 37: Darstellung der Expression von MMP-9 und TIMP-1, -2, -3 in den untersuchten Gewebeproben der Primärtumoren.

Expression in den Primärtumoren (n=125)					
	Positive Proben	**Prozent**	**1**	**2**	**3**
MMP-9 (ISH)	88/125	70 %	54/125 (43 %)	22/125 (18 %)	12/125 (10 %)
MMP-9 (IHC)	107/125	86 %	63/125 (50 %)	39/125 (31 %)	5/125 (4 %)
TIMP-1	104/125	83 %	51/125 (41 %)	34/125 (27 %)	19/125 (15 %)
TIMP-2	96/125	77 %	57/125 (46 %)	30/125 (24 %)	9/125 (7 %)
TIMP-3	91/125	73 %	53/125 (42 %)	24/125 (19 %)	14/125 (11 %)

Um die Beziehung zwischen MMP-9 und den Inhibitoren TIMP-1, -2, und -3 zu verstehen, wurde nicht nur jede RNA-Sonde einzeln ausgewertet, sondern auch gleiche bzw. ähnliche sowie inverse Expressionsmuster zwischen jeweils 2 Sonden untersucht.

TIMP-1 und MMP-9 waren in 43 % der Fälle in ihrem Expressionsmuster ähnlich. In 40% zeigte sich in jedoch ein inverses Verhältnis von TIMP-1 und MMP-9; dabei ging eine hohe Expression von MMP-9 mit einer geringen bzw. fehlenden Expression von TIMP-1 einher - und umgekehrt.

Sowohl TIMP-3 als auch MMP-9 konnten in 35 % der Fälle in hoher Expressionsstärke nachgewiesen werden. In 43 % zeigte sich eine inverse Beziehung: Bei hohen MMP-9-Spiegeln war wenig bzw. kein TIMP-3 nachweisbar, wohingegen bei hohen TIMP-3-Spiegeln die MMP-9-mRNA-Expression deutlich reduziert war.

6.5.3. Expressionsmuster von MMP-9 und TIMP-1, -2, -3 in Lymphknotenmetastasen

In den Lymphknotenmetastasen konnte TIMP-1mRNA in 80 % der Fälle und damit bezüglich der Signalstärke am häufigsten von allen untersuchten Sonden nachgewiesen werden.

In 50 % der Fälle konnte im gleichen Gewebeschnitt sowohl von MMP-9-mRNA als auch TIMP-1-mRNA eine starke Expression nachgewiesen werden. In 25 % dieser Fälle zeigte sich ein inverses Verhältnis zwischen der Expression von MMP-9mRNA und TIMP-1-mRNA.

Eine gleichzeitig vorhandene Expression von MMP-9-mRNA und TIMP-2-mRNA ergab sich in nur 45 % der Fälle. In 20 % dieser Fälle zeigte sich ein inverses Verhältnis bei der Expression.

In 55 % der Fälle konnte im gleichen Gewebeschnitt sowohl eine Expression von MMP-9-mRNA als auch TIMP-3-mRNA nachgewiesen werden. Ein inverses Verhältnis zwischen der Expression von MMP-9-mRNA und TIMP-3-mRNA mit hoher TIMP-3-Expression bei geringer MMP-9-Expression - und umgekehrt - lag in lediglich 20 % der Fälle vor.

In den Lymphknotenmetastasen zeigten sich bezüglich des Nachweises von MMP-9 zwischen der in situ-Hybridisierung und der Immunhistochemie nur geringe Unterschiede. In beiden Methoden wurde MMP-9 zu 70 % nachgewiesen.

Tab. 38: Darstellung der Expression von MMP-9 und TIMP-1, -2, -3 in den untersuchten Gewebeproben bei lymphogen metastasierten Tumoren.

Expression in Tumoren mit Lymphknotenmetastasen (n=20)					
	Positive Proben	**Prozent**	**1**	**2**	**3**
MMP-9 (ISH)	14/20	70 %	9/20 (45 %)	2/20 (10 %)	3/20 (15 %)
MMP-9 (IHC)	14/20	70 %	9/20 (45 %)	5/20 (25 %)	0/20 (0 %)
TIMP-1	16/20	80 %	10/20 (50 %)	5/20 (25 %)	1/20 (5 %)
TIMP-2	13/20	65 %	8/20 (40 %)	5/20 (25 %)	0/20 (0 %)
TIMP-3	15/20	75 %	8/20 (40 %)	5/20 (25 %)	2/20 (10 %)

6.5.4. Vergleich der Expression von MMP-9 und TIMP-1, -2, -3

In der folgenden Abbildung (Abb. 19, A-D) ist die Expression von MMP-9 und TIMP-1, -2, -3 im jeweils gleichen Gewebeschnitt nebeneinander dargestellt.

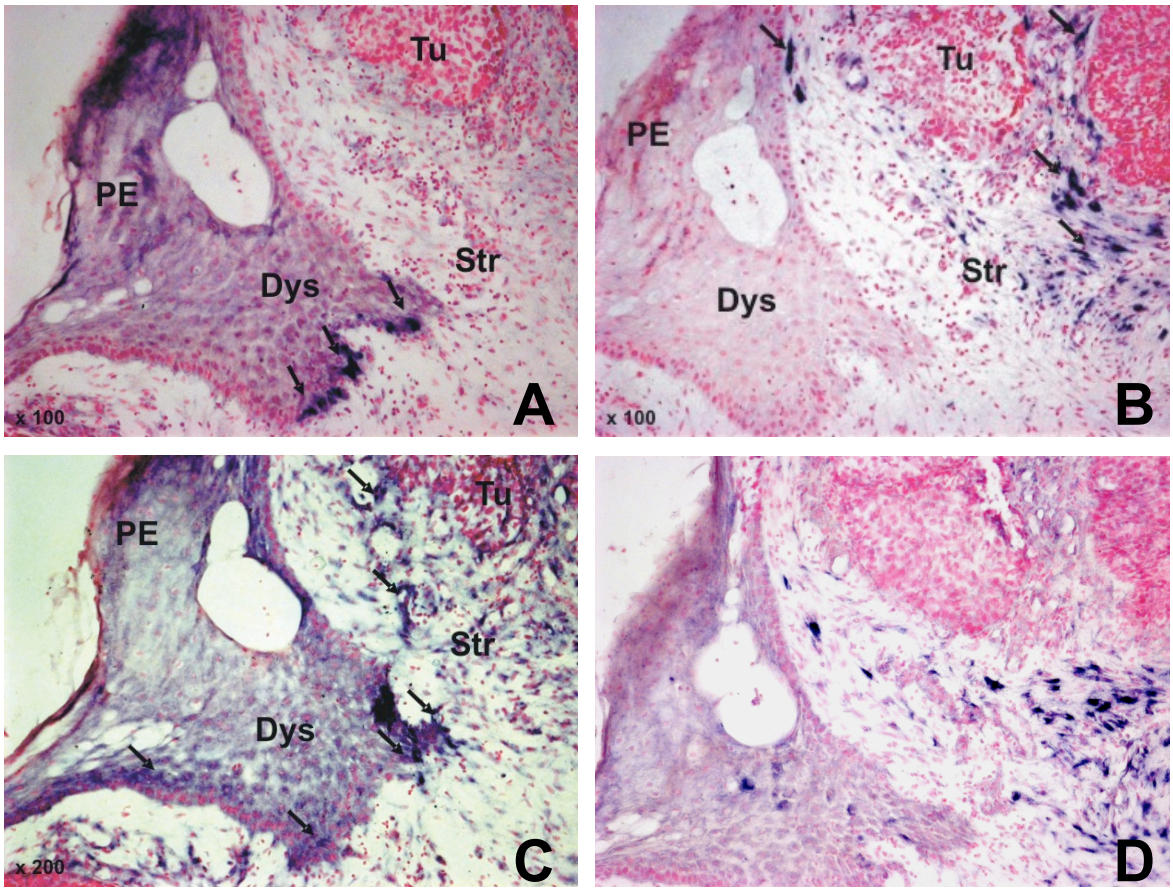


Abb. 19: **Vergleich der mRNA-Expression von MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 in verschiedenen Zelltypen mittels in situ-Hybridisierung.** Dunkelblau: spezifische Signale, Rot: Nuclear Fast Red-Gegenfärbung. Gewebe: Plattenepithel (PE), dysplastisches Epithel (Dys), Tumorzellen (Tu), Tumorstroma (Str). A: Expression von MMP-9; B: Expression von TIMP-1; C: Expression von TIMP-2; D: Expression von TIMP-3.

Es lassen sich hier bereits wichtige Aussagen für jede mRNA treffen:

- MMP-9 konnte vor allem im dysplastischen Epithel (Dys) und an der Invasionsfront des Tumors (Tu) nachgewiesen werden (Abb. 19, A).
- Eine vermehrte TIMP-1-Expression wurde meist im Tumor umgebenden Stroma (Str) nahe der Invasionsfront beobachtet (Abb. 19, B).

- Auch TIMP-2-mRNA wurde mit Abstand am häufigsten im tumornahen Stroma (Str) beobachtet, es zeigte sich jedoch auch eine Expression im dysplastischen Epithel (Pfeil) und Tumor (Abb. 19, C).
- Eine vermehrte TIMP-3-mRNA-Expression wurde sowohl im den Tumor umgebenden Stroma nahe der Invasionsfront (Str) als auch im dysplastischen Epithel (Dys) und Tumor (Tu) nachgewiesen (Abb. 19, D).

6.5.4.1. Vergleich der Expressionsmuster von MMP-9 und TIMP-1

Zwischen der Expression von MMP-9-mRNA und TIMP-1mRNA in den Tumorzellen konnte eine signifikante Korrelation (p = 0,005) nachgewiesen werden. 35 % der Fälle waren sowohl MMP-9-mRNA als auch TIMP-1-mRNA-positiv.
Zwischen der Expression von MMP-9-mRNA und TIMP-1-mRNA im Tumorstroma wurde keine signifikante Korrelation nachgewiesen. Hier gab es zum Teil erhebliche Unterschiede in der Expression der einzelnen mRNAs. Auffallend war eine hohe Expression von TIMP-1-mRNA (76%) bei einer deutlich geringeren Expression von MMP-9-mRNA (40 %).

Tab. 39: Vergleich und Korrelation zwischen der Expression von MMP-9 und TIMP-1 in den Tumorzellen. Es besteht eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von MMP-9 und TIMP-1 in den Tumorzellen (negativ vs. positiv, p = 0,005).

	TIMP-1 Tumor				
MMP-9 Tumor (ISH)	0	1	2	3	p
0	53	10	0	0	n.s.
1	22	15	4	0	
2	8	2	1	0	
3	3	1	0	0	
	TIMP-1 Tumor				
MMP-9 Tumor (ISH)	negativ		positiv		p
negativ	51		12		***0,005***
positiv	32		24		
	TIMP-1 Tumor				
MMP-9 Tumor (ISH)	negativ/schwach positiv		stark positiv		p
negativ/schwach positiv	100		4		n.s.
stark positiv	14		1		

Tab. 40: Vergleich und Korrelation zwischen der Expression von MMP-9 und TIMP-1 im Tumorstroma. Es konnte keine signifikante Korrelation nachgewiesen werden (p = 0,097). Auffallend ist jedoch eine erhöhte Expression von TIMP-1 (76 %) gegenüber MMP-9 (40 %) im Stroma.

	TIMP-1 Stroma				
MMP-9 Stroma (ISH)	0	1	2	3	p
0	18	26	19	8	n.s.
1	8	13	6	6	
2	2	3	4	0	
3	0	1	2	3	
	TIMP-1 Stroma				
MMP-9 Stroma (ISH)	negativ		positiv		p
negativ	18		53		n.s.
positiv	10		38		0,569
	TIMP-1 Stroma				
MMP-9 Stroma (ISH)	negativ/schwach positiv		stark positiv		p
negativ/schwach positiv	65		39		0,097
stark positiv	6		9		

6.5.4.2. Vergleich der Expressionsmuster von MMP-9 und TIMP-2

Zwischen der Expression von MMP-9-mRNA und TIMP-2-mRNA in den Tumorzellen konnte eine statistisch signifikante Korrelation nachgewiesen werden (p = 0,005).
Hier zeigte sich eine Übereinstimmung des Expressionsmusters von MMP-9-mRNA und TIMP-2-mRNA in 35 % der Fälle. 65 % der positiven Fälle waren nur bezüglich einer mRNA positiv, meist war das MMP-9-mRNA.

Beim Vergleich von MMP-9-mRNA und TIMP-2-mRNA im Tumorstroma zeigte sich ebenfalls eine signifikante Korrelation (p=0,007).
Das Expressionsverhalten stimmte in 43 % der positiven Fälle überein. Hier zeigte sich, wie auch schon bei dem Vergleich zwischen der Expression von MMP-9-mRNA und TIMP-1-mRNA, eine deutlich höhere Expression des Inhibitors im Stroma im Gegensatz zur Expression im Tumor selbst.

Tab. 41: Vergleich und Korrelation zwischen der Expression von MMP-9 und TIMP-2 in den Tumorzellen. Es konnte eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von MMP-9 und TIMP-2 nachgewiesen werden (negativ vs. positiv, p = 0,005).

	TIMP-2 Tumor				
MMP-9 Tumor (ISH)	0	1	2	3	p
0	53	7	3	0	n.s.
1	23	14	4	0	
2	7	4	0	0	
3	3	0	1	0	
	TIMP-2 Tumor				
MMP-9 Tumor (ISH)	negativ		positiv		p
negativ	51		12		
positiv	32		24		***0,005***
	TIMP-2 Tumor				
MMP-9 Tumor (ISH)	negativ/schwach positiv		stark positiv		p
negativ/schwach positiv	97		7		0,993
stark positiv	14		1		

Tab. 42: Vergleich und Korrelation zwischen der Expression von MMP-9 und TIMP-2 im Tumorstroma. Es konnte eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von MMP-9 und TIMP-2 nachgewiesen werden (p = 0,007).

	TIMP-2 Stroma				
MMP-9 Stroma (ISH)	0	1	2	3	p
0	37	17	11	6	n.s.
1	8	20	3	2	
2	4	5	0	0	
3	1	2	2	1	
	TIMP-2 Stroma				
MMP-9 Stroma (ISH)	negativ		positiv		p
negativ	37		34		***0,007***
positiv	13		35		
	TIMP-2 Stroma				
MMP-9 Stroma (ISH)	negativ/schwach positiv		stark positiv		p
negativ/schwach positiv	85		19		0,872
stark positiv	12		3		

6.5.4.3. Vergleich der Expressionsmuster von MMP-9 und TIMP-3

Zwischen der Expression von MMP-9-mRNA und TIMP-3-mRNA in den Tumorzellen konnte eine statistisch signifikante Korrelation nachgewiesen werden (p = 0,001). 37 % der positiven Fälle waren sowohl bezüglich MMP-9 als auch TIMP-3 positiv. Insgesamt zeigte sich jedoch eine deutlich höhere Expression von MMP-9-mRNA im Tumor. Bezüglich der Signalintensität (Expressionsstärke Grad 1-3) konnte keine statistisch signifikante Korrelation nachgewiesen werden, es bestand jedoch eine deutliche Tendenz zur Korrelation (p = 0,051).

Im Stroma hingegen konnte keine signifikante Korrelation zwischen der Expression von MMP-9-mRNA und TIMP-3-mRNA nachgewiesen werden.
Lediglich 33 % der positiven Fälle im Stroma stimmten zwischen MMP-9 und TIMP-3 überein. Hier zeigte sich jedoch im Gegensatz zur Expression im Tumor eine deutlich höhere und stärkere Expression von TIMP-3-mRNA im Vergleich zu MMP-9-mRNA-Expression.

Tab. 43: Vergleich und Korrelation zwischen der Expression von MMP-9 und TIMP-3 in den Tumorzellen. Es konnte eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von MMP-9 und TIMP-3 nachgewiesen werden (p = 0,001).

	TIMP-3 Tumor				
MMP-9 Tumor (ISH)	0	1	2	3	p
0	54	8	1	0	n.s.
1	23	13	3	2	
2	7	2	2	0	
3	2	1	1	0	
	TIMP-3 Tumor				
MMP-9 Tumor (ISH)	negativ		positiv		p
negativ	54		9		***0,001***
positiv	32		24		
	TIMP-3 Tumor				
MMP-9 Tumor (ISH)	negativ/schwach positiv		stark positiv		p
negativ/schwach positiv	98		6		***0,051***
stark positiv	12		3		

Tab. 44: Vergleich und Korrelation zwischen der Expression von MMP-9 und TIMP-3 im Tumorstroma. Es konnte keine signifikante Korrelation nachgewiesen werden.

	TIMP-3 Stroma				
MMP-9 Stroma (ISH)	0	1	2	3	p
0	27	25	11	8	n.s.
1	14	15	1	3	
2	4	3	1	1	
3	0	2	3	1	
	TIMP-3 Stroma				
MMP-9 Stroma (ISH)	negativ		positiv		p
negativ	27		44		0,954
positiv	18		30		
	TIMP-3 Stroma				
MMP-9 Stroma (ISH)	schwach positiv / negativ		stark positiv		p
schwach positiv / negativ	81		23		0,131
stark positiv	9		6		

6.5.4.4. Vergleich der Expressionsmuster von TIMP-1 und TIMP-3

Bezüglich der Expression von TIMP-1-mRNA und TIMP-3-mRNA im Tumor konnte keine statistisch signifikante Korrelation aufgezeigt werden, es bestand jedoch eine deutliche Tendenz zur Korrelation (p = 0,073). TIMP-1-mRNA und TIMP-3-mRNA wurden in den Tumorzellen mit gleicher Häufigkeit exprimiert, 25 % der positiven Fälle waren sowohl TIMP-1- als auch TIMP-3-positiv.

Im Tumorstroma ergab sich eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von TIMP-1-mRNA und TIMP-3-mRNA (p = 0,016). Beide Gene zeigten eine starke Expression im Stroma, in 60 % der positiven Fälle konnte sowohl eine Expression von TIMP-1mRNA als auch TIMP-3-mRNA nachgewiesen werden. Auch bezüglich der Signalintensität (Stärke der Expression Grad 1-3) zeigte sich eine deutliche Tendenz zur Korrelation (p = 0,061).

Tab. 45: Vergleich und Korrelation zwischen der Expression von TIMP-1 und TIMP-3 in den Tumorzellen. Es konnte keine signifikante Korrelation nachgewiesen werden (p = 0,073).

	TIMP-3 Tumor				
TIMP-1 Tumor	0	1	2	3	p
0	67	15	4	0	n.s.
1	18	8	2	0	
2	1	1	1	2	
3	0	0	0	0	
	TIMP-3 Tumor				
TIMP-1 Tumor	negativ		positiv		p
negativ	64		19		***0,073***
positiv	22		14		
	TIMP-3 Tumor				
TIMP-1 Tumor	negativ/schwach positiv		stark positiv		p
negativ/schwach positiv	108		6		n.s.
stark positiv	2		3		

Tab. 46: Vergleich und Korrelation zwischen der Expression von TIMP-1 und TIMP-3 im Tumorstroma. Es konnte eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von TIMP-1 und TIMP-3 nachgewiesen werden (p = 0,016).

	TIMP-3 Stroma				
TIMP-1 Stroma	0	1	2	3	p
0	16	9	2	1	n.s.
1	16	17	7	3	0,138
2	10	10	4	7	
3	3	9	3	2	
	TIMP-3 Stroma				
TIMP-1 Stroma	negativ		positiv		p
negativ	16		12		***0,016***
positiv	29		62		
	TIMP-3 Stroma				
TIMP-1 Stroma	negativ/schwach positiv		stark positiv		p
negativ/schwach positiv	58		13		***0,061***
stark positiv	32		16		

VII. Diskussion

7.1. Expression von MMPs und TIMPs in Tumorgeweben

In wissenschaftlichen Arbeiten wurde immer wieder die Frage aufgeworfen, in welchen Zellen innerhalb des Tumors MMPs und TIMPs eigentlich synthetisiert werden. Mittlerweile weiß man durch viele Forschungsarbeiten, dass nicht nur die Tumorzellen selbst die Matrix-Metalloproteinasen und ihre Inhibitoren zur Verfügung stellen, sondern sie auch die umgebenden Stromazellen zur Expression der Enzyme stimulieren können. Gerade MMP-9 ist bereits in anderen Arbeiten sowohl in Tumorzellen als auch in Zellen des Tumorstromas u. a. auch in Makrophagen und Endothelzellen nachgewiesen worden. Die Expression von Enzymen der MMP- und / oder TIMP-Familie in Kopf-Hals-Tumoren sowie ihre Funktion und Wirkung auf das Gewebe bzw. untereinander ist häufig untersucht worden. Jedoch sind Korrelationen der Expression dieser Enzyme mit klinisch-pathologischen Charakteristika bzw. Merkmalen immer noch kontrovers (Katayama A et al., 2004).
Durch ihre zusätzliche Eigenschaft, neben Gelatin, Laminin V und anderen Matrixbestandteilen, auch Kollagen Typ IV, den Hauptbestandteil der Basalmembran, abzubauen, wird MMP-9 immer wieder eine bedeutende Rolle bei der Tumorprogression zugeschrieben. Daher ist MMP-9 häufig Mittelpunkt weiterer Untersuchungen der Matrix-Metalloproteinasen und ihrer Funktion in der Tumortherapie. Korrelationen mit verschiedenen klinischen Parametern oder Überlebensraten wurden bereits aufgezeigt. Die Ergebnisse und Schlussfolgerungen waren jedoch bei weitem nicht einheitlich.

7.2. MMP-9

In der vorliegenden Dissertation konnten MMP-9-Transkripte in 70 % der Primärtumoren und in 70 % der Lymphknotenmetastasen nachgewiesen werden. Das MMP-9-Protein konnte mittels Immunhistochemie in den Primärtumoren sogar zu 86 % nachgewiesen werden.

Ähnliche Ergebnisse zeigten auch andere Untersuchungen zu MMP-9 auf. Miyajima Y et al., konnten bei 27 Hypopharynxtumoren in allen Proben MMP-9 auf RNA-Ebene nachweisen. Magary SP et al. konnten in Primärtumoren erhöhte Expressionswerte für MMP-9-RNA in 57 % der Proben darstellen; die Gesamtzahl von 8 Proben lässt allerdings kaum relevante Schlussfolgerungen zu. Pacheco MM et al. untersuchten 38 Plattenepithelkarzinome und beschrieben größere Mengen an m-RNA von MMP-9 in den Tumoren als in gutartigen Geweben in der Umgebung der Tumoren; höhere Mengen an MMP-9-m-RNA waren dabei mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für ein Rezidiv des Tumors im Halsbereich assoziiert.

7.2.1. Verteilungsmuster von MMP-9

Oft untersucht und immer wieder ähnlich beschrieben wurden das Expressionsmuster und die Verteilung von MMP-9 in den verschiedenen Zelltypen:
Danach soll MMP-9 vorwiegend in Karzinomzellen, angrenzenden Stromazellen, Entzündungszellen (Makrophagen, Neutrophile, Lymphozyten) und Endothelzellen exprimiert werden (Thomas GT et al., 1999). Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden: es zeigte sich eine deutlich erhöhte Expression von MMP-9 in den Tumorzellen, vor allem an der Invasionsfront, teilweise auch in der Tumormitte. Auch in den tumornahen Fibroblasten und z. T. auch in Endothelzellen wurde MMP-9 vermehrt exprimiert.
Geringe Expression zeigte sich im morphologisch normal erscheinenden und dysplastischen Plattenepithel. Man konnte jedoch eine Tendenz zur Zunahme an MMP-9 analog zur Epithel-Dysplasie-Karzinom-Sequenz erkennen: Während MMP-9 im morphologisch normal erscheinenden, tumornahen Plattenepithel in nur 18 % der Fälle exprimiert wurde, war die Metalloproteinase im dysplastischen Epithel in bereits 24 % der Fälle nachweisbar. Im Karzinom nahm die Expression von MMP-9 zu (> 45 %).
Mittels Immunhistochemie konnte das Enzym häufiger und dabei auch mit einer meist stärkeren Signalintensität nachgewiesen werden. Hier zeigte sich eine ähnliche Verteilung bezüglich der verschiedenen Zelltypen mit dem häufigsten Nachweis von MMP-9 an der Invasionsfront. Dabei konnte gezeigt werden, dass

MMP-9 in über der Hälfte der Fälle auch bereits im dysplastischen Epithel nachgewiesen werden kann.

7.2.2. MMP-9-Expression im Vergleich mit klinisch-pathologischen Faktoren

Die MMP-9-Expression korrelierte in anderen Studien v. a. mit fortgeschrittenen Tumorstadien. Höhere Tumorstadien exprimierten demnach größere Mengen an MMP-9-mRNA, wodurch ein Zusammenhang zwischen MMP-9-Expression und stärkerer Tumorinvasion postuliert wurde. Ohashi K et al., zeigten eine gesteigerte Expression und Aktivität von MMP-9 in Ösophagustumoren und stellten einen positiven Zusammenhang mit der Invasionstiefe der betrachteten Tumoren her. Ikebe T et al. wiesen durch ihre Untersuchungen erhöhte MMP-9-Spiegel in stärker invasiven Tumoren nach. Eine Korrelation zwischen einer erhöhten MMP-9-Expression und einer stärkeren Tumorinvasion stellten auch Kurahara S et al. in der Untersuchung von 96 Proben von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle fest.
In der vorliegenden Arbeit konnte mittels in situ-Hybridisierung und Immunhistochemie eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von MMP-9 und dem Vergleich von frühem (T1 & T2) sowie späten Tumorstadium (T3 & T4) im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Ebenso konnte eine signifikante Korrelation im Stroma mittels Immunhistochemie zwischen der Expression von MMP-9 und dem Vergleich von frühem (T1 & T2) sowie späten Tumorstadium (T3 & T4) nachgewiesen werden. Hierbei konnte stets eine deutlich erhöhte Expression von MMP-9 in fortgeschrittenen Stadien verzeichnet werden. Diese Daten deuten somit in die gleiche Richtung wie die o.g. Ergebnisse von Ohashi K et al., Ikebe T et al. und Kurahara S et al.

Eine signifikante Korrelation zwischen der MMP-9 Konzentration und dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen konnte weder durch den m-RNA-Nachweis mittels in situ-Hybridisierung noch durch den Protein-Nachweis in der Immunhistochemie aufgezeigt werden. Bei Patienten ohne Lymphknotenmetastasen waren mehr als die Hälfte aller Fälle MMP-9-negativ.

Bei Patienten mit Lymphknotenmetastasen konnte man in etwas mehr als der Hälfte aller Fälle im Tumor MMP-9 nachweisen.
Ob dies als Hinweis auf die Rolle von MMP-9 bezüglich der Invasivität und Metastasierungstendenz von Tumoren gewertet werden kann, ist fraglich.
Katayama A et al., 2004; Kurahara S et al., 1999; Dünne AA et al. sahen einen Zusammenhang zwischen MMP-9-Expression und dem Lymphknotenstatus. Katayama et al. untersuchten 53 japanische Patienten mit oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen. Patienten mit Lymphknotenmetastasen und/oder Fernmetastasen zeigten signifikant höhere Expressionen von MMP-9 und TIMP-2 als nicht metastasierte Patienten. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass sowohl MMP-9 als auch TIMP-2 einen prädiktiven Wert bezüglich Tumormetastasierung und Überlebensrate haben. Auch Dünne et al. konnten in ihren Untersuchungen an 105 Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren eine signifikante Korrelation zwischen dem Auftreten von MMP-9 und dem positiven Lymphknotenstatus nachweisen und damit die Bedeutung von MMP-9 bezüglich dem Metastasierungsverhalten unterstützen.
Diese Ergebnisse stehen jedoch im Gegensatz zu den von Ikebe T et al. und Riedel F et al. publizierten Resultaten. Ikebe et al. untersuchten die MMP-9-Expression an 57 Proben aus oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen. Dabei wiesen sie MMP-9 vermehrt in invasiven Karzinomen nach, jedoch fand sich keine Korrelation bezüglich der Metastasierung in die Lymphknoten. Das Metastasierungspotential ist nach ihren Ergebnissen nicht von der Gelatinase-Aktivität von MMP-9 abhängig, sondern vielmehr von dem ungleichen Verhältnis zwischen Metalloproteinase und Inhibitor, d. h. hohe MMP-Level und niedrige TIMP-Level gehen mit einer hohen Metastasierungsrate einher. Auch Riedel et al. konnten in ihren Versuchen an 52 HNSCC keine Korrelation zwischen MMP-9 und Lymphknotenstatus finden, jedoch propagierten sie einen Zusammenhang zwischen MMP-9 und einer schlechten Überlebensrate.

Im Zusammenhang mit dem Metastasierungsverhalten von Tumoren wurde gerade MMP-9 in der Literatur sehr häufig beschrieben. Immer wieder fanden Forschergruppen Korrelationen zwischen von MMP-9-Expression und dem Metastasenstatus und schrieben MMP-9 dadurch einen prognostischen Wert zu. Hong SD et al. zeigten in einer Untersuchung an 44 Proben aus

Plattenepithelkarzinomen der oberen Luft- und Speisewege eine signifikante Korrelation zwischen MMP-9-Expression und einer vorhandenen Metastasierung. Ebenso konnten Kawata R et al. Kawamata H et al. Kusukawa J et al. sowie Xu YP et al. in ihren Arbeiten einen Zusammenhang zwischen MMP-9-Spiegeln und dem Metastasenstatus bestätigen. Und wie bereits oben beschrieben kamen auch Katayama A et al., 2004 in ihren Versuchen zu ähnlichen Ergebnissen und belegten einen Zusammenhang sowohl zwischen MMP-9 und lymphogenen Metastasen als auch zwischen MMP-9 und dem Fernmetastasenstatus.
Ikebe T et al. sahen eine Erhöhung der MMP-9-Level bei metastasierten Fällen nur im Zusammenhang mit einem niedrigen TIMP-1-Level. Ihren Ergebnissen zufolge sind die Invasivität und das Metastasierungsverhalten von dem Ungleichgewicht zwischen Metalloproteinase und ihrem Inhibitor abhängig.
Riedel F et al. untersuchten Blut von Patienten mit oralen/oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen und konnten zeigen, dass die MMP-9-Konzentration bei metastasierten Fällen im Serum höher war als bei Fällen ohne Metastasen. Auf der anderen Seite konnten Riedel F et al., keine Korrelation zwischen MMP-9-Mengen und klinisch-pathologischen Charakteristika wie Lokalisation, T- und N-Stadium oder Grad der histologischen Differenzierung ihrer 52 Gewebeproben aus Plattenepithel-karzinomen der oberen Luft- und Speisewege nachweisen. Allerdings stellten sie wie Heissenberg MC et al. eine Gemeinsamkeit zwischen MMP-9-Mengen und der Wahrscheinlichkeit für eine schlechtere Prognose fest. Höhere MMP-9-Spiegel korrelierten laut Riedel F et al. mit einer insgesamt schlechteren Überlebensrate der betroffenen Patienten, während sie gemäß Heissenberg MC et al. mit einer höheren Rezidivrate korrelierten.

In der vorliegenden Dissertation konnte eine signifikante Korrelation zwischen von MMP-9-Expression (Signalintensität) in den Tumorzellen und dem Vorhandensein von Fernmetastasen in der in situ-Hybridisierung nachgewiesen werden. Es konnte eine deutlich vermehrte MMP-9-Expression in metastasierten Tumoren nachgewiesen werden. Mittels Immunhistochemie konnten keine eindeutige Tendenz zur vermehrten MMP-9-Expression in Tumoren mit Fernmetastasen aufgezeigt werden.
Dadurch, dass es bei Tumoren der Kopf-Hals-Region selten und meist erst spät zu Fernmetastasen kommt, stand in dieser Arbeit jedoch nur ein kleines Kollektiv von

Tumoren mit bereits erfolgter Fernmetastasierung zur Verfügung. Daher lässt sich trotz Signifikanz die Rolle von MMP-9 bezüglich dem Metastasierungs-potential nicht mit Sicherheit festlegen, die hier vorgelegten Ergebnisse unterstützen jedoch die Hinweise auf eine Rolle von MMP-9 im Rahmen der Metastasierung eines HNSCC.

7.2.3. Vergleich von MMP-9 und TIMP-1, -2, -3: Ist das Verhältnis zwischen Metalloproteinase und Inhibitor prognostisch entscheidend?

In verschiedenen Arbeiten wurde ein Zusammenhang zwischen dem Verhältnis von MMP-9 und TIMP-1 hinsichtlich des Metastasierungsverhaltens beschrieben. Danach sollte bei hohen MMP-9- und niedrigen TIMP-1-Spiegeln ein stärkeres Potential zur Metastasierung bestehen.
Ikebe T et al. und Heissenberg MC et al. beschrieben in ihren Arbeiten das Verhältnis von Matrix-Metalloproteinase und Inhibitor und folgerten sogar daraus, dass das Verhältnis MMP-9 zu TIMP-1 unter Umständen eine Markerfunktion haben könnte.
In der vorliegenden Arbeit ließ sich eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von MMP-9-mRNA und TIMP-1-mRNA im Tumor nachweisen ($p = 0,005$). Dabei wurde MMP-9 weitaus häufiger und stärker in den Tumorzellen nachgewiesen als TIMP-1. Auffallend war jedoch auch die hohe Expression von TIMP-1 im Stroma (insgesamt 82 positive Fälle) bei einer deutlich geringeren Expression von MMP-9 (insgesamt 48 positive Fälle). Dies könnte als ein Hinweis für einen Kompensationsmechanismus zum Ausgleich der erhöhten MMP-9-Level im Tumor und der damit steigenden Invasionsfähigkeit gedeutet werden.

Trotz der insgesamt hohen Übereinstimmungsrate zwischen MMP-9 und TIMP-1 zeigten sich jedoch in 65 % nur einseitig positive Fälle, die nur bezüglich der Expression eines Transkriptes positiv waren. In 43 % der Fälle konnte ein ähnliches Verteilungsmuster, in 40 % der Fälle ein inverses Verteilungsmuster aufgezeigt werden. Vor diesem Hintergrund stellt sich hier die oben aufgeworfene

Frage, ob und wie TIMP-1 genau in der ihm zugeschriebenen Inhibitor Funktion wirkt.

Ebenfalls konnte eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von MMP-9-mRNA und TIMP-2-mRNA sowohl im Tumor als auch im Stroma nachgewiesen werden (p=0,005). Auch hier bestand ein ähnliches Verteilungsverhältnis: während die Metalloproteinase vor allem im Tumor exprimiert wurde, war der Inhibitor fast ausschließlich im Stroma zu finden.

Auch bezüglich MMP-9 und TIMP-3 zeigten sich in diesen Untersuchungen eine statistisch signifikante Korrelation (p = 0,001) und ein ähnliches Verhältnis, wie bei MMP-9 und TIMP-1 bzw. TIMP-2 bereits beschrieben: MMP-9 war v. a. im Tumor überexprimiert, TIMP-3 hingegen im Stroma.

Das spezielle Verteilungsmuster sowie die inversen Korrelationen zwischen MMP-9 und den Inhibitoren TIMP-1, -2, -3 könnten ein Hinweis auf die eindämmende Funktion der TIMPs sein, das Größenwachstum und Invasionspotential der (MMP-9-überexprimierenden) Tumoren zu kontrollieren.

7.2.4. MMP-9: Ein prognostischer Faktor im Hinblick auf Überlebensrate und Rezidiv?

MMP-9 wurde häufig als prognostischer Indikator für die Aggressivität eines jeweiligen Tumors sowie für ein erhöhtes Rezidivrisiko beschrieben. Auch Heissenberg MC et al., brachten das Auftreten von MMP-9 in 39 Hypopharynx-Tumoren mit einem höheren Rezidivrisiko in Verbindung. Wichtig dabei war das gleichzeitige Fehlen von TIMP-1.
In der vorliegenden Arbeit konnte keine signifikante Korrelation zwischen MMP-9-Expression und dem Rezidivrisiko bzw. der rezidivfreien Zeit gefunden werden. Jedoch war sowohl im Tumor als auch im Stroma eine Tendenz zu höheren MMP-9-Spiegeln bei rezidivierenden Tumoren zu verzeichnen. Ob und in wieweit die Menge an MMP-9 bezüglich des Rezidivrisikos eine Rolle spielt, kann in dieser Arbeit nicht unbedingt beantwortet werden. Sicher ist jedoch, dass die hohe

Rezidivrate bei Tumoren der Kopf-Hals-Region aufgrund der schlechten chirurgischen Therapiemöglichkeiten wohl eines der größten Probleme dieser Tumoren darstellt. Sinnvoller, als die Rezidive genauer zu untersuchen, scheint es, frühzeitig bessere Therapieoptionen zu finden, um dem hohen Rezidivrisiko vorzubeugen.

Oft wurde MMP-9 zudem als ein prognostischer Faktor beschrieben. So soll MMP-9 mit einer schlechten Überlebensrate korrelieren: Patienten mit oralen Karzinomen, die eine erhöhte MMP-2 und MMP-9-Aktivität zeigten, hatten nach Behandlung eine kürzere krankheitsfreie Überlebenszeit als Patienten mit gelatinasefreien Tumoren (Yorioka CW et al. 2002). Katayama A et al. 2004, konnten diese Ergebnisse bestätigen. Sie zeigten, dass eine starke MMP-9-Expression mit einer signifikant kürzeren Überlebensrate korrelierte. Mehr jedoch als MMP-9 sahen sie TIMP-2 als unabhängigsten Faktor für eine schlechte Prognose bereits in frühen Stadien der HNSCC.
In den für diese Arbeit untersuchten Fällen konnte keine signifikante Korrelation zwischen der Menge und Stärke von MMP-9 und der rezidivfreien Überlebenszeit nachgewiesen werden. Ob und inwieweit MMP-9 dadurch als prediktiver Wert für prognostische Aussagen bezüglich Metastasierungspotential und/oder Überlebensrate angesehen werden kann, ist anhand diesen Untersuchungen nicht sicher festzulegen. Jedoch scheint die Metalloprotease eine wesentliche Rolle im Hinblick auf die Prognose der Tumoren zu spielen, entweder bezüglich der Aggressivität, Invasionsverhalten, Metastasierungspotential oder des Rezidivrisikos.

7.3. TIMP-1

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation zeigen TIMP-1-Expression in 83 % der untersuchten Primärtumoren und 80 % der Lymphknotenmetastasen. Dabei wurde TIMP-1m-RNA von allen untersuchten Enzymen am häufigsten und am stärksten nachgewiesen. Wie bei Charous SJ et al. konnte auch in der vorliegenden Dissertation kein Unterschied in der TIMP-1-Expression zwischen Primärtumoren und Metastasen nachgewiesen werden.

Während die weite Verbreitung der TIMPs mit den Ergebnissen anderer Autoren übereinstimmte, zeigten sich bezüglich der Expressionshäufigkeit und -menge der TIMPs Unterschiede auf. In der hier vorgestellten Versuchsreihe wurde TIMP-1 im Schnitt stärker als TIMP-2 und TIMP-3 exprimiert, während Heissenberg MC et al. ein gegenteiliges Ergebnis beschrieben.

7.3.1. Verteilungsmuster von TIMP-1

In der vorliegenden Arbeit verhielt sich TIMP-1 bezüglich der Expression in Geweben unterschiedlichen Malignitätsgrades ähnlich wie MMP-9. Sowohl die Expression von MMP-9-mRNA als auch von TIMP-1-mRNA konnte bereits im morphologisch normal erscheinenden Plattenepithel nachgewiesen werden und nahm im dysplastischen Epithel und im Tumorgewebe analog der Epithel-Dysplasie-Karzinom-Sequenz stetig zu. Das deutet darauf hin, dass mit einer erhöhten Expression von MMPs im Rahmen der Tumorentstehung und Tumorprogression auch eine Hochregulation der TIMPs einhergeht. Eine statistische Signifikanz konnte nicht abgeleitet werden, jedoch weisen die Ergebnisse eine deutliche Tendenz in diese Richtung auf.
Gerade bei der Expression von TIMP-1 in den Tumorzellen war besonders auffällig, dass TIMP-1 in allen 125 Fällen nur an der Invasionsfront des Tumors nachgewiesen werden konnte. Mit Abstand am häufigsten und am stärksten wurde TIMP-1 allerdings im Tumorstroma exprimiert.
Eine vermehrte TIMP-1-Expression im Stroma bei fortgeschrittenen Tumoren könnte einerseits zur Inhibition der Überexpression von MMPs (z. B. hier MMP-9) in späten Tumorstadien eine Rolle spielen, andererseits wäre dies auch im Rahmen einer unterstützenden Funktion von TIMP-1 im Invasionsverhalten zu erklären.

7.3.2. TIMP-1 im Zusammenhang mit der Metastasierung

Ikebe T et al. konnten durch ihre Untersuchungen zeigen, dass Primärtumoren mit erfolgter Metastasierung geringere Spiegel für TIMP-1-m-RNA aufwiesen als Tumoren ohne Metastasen. Es konnte dabei auch ein Zusammenhang zwischen

hohen MMP- und niedrigen TIMP-1-Spiegeln in Primärtumoren hergestellt werden, was wiederum mit einem hohen Metastasierungspotential der jeweiligen Tumoren korrelierte.
Kurahara S et al. kamen zu einem gegenteiligen Ergebnis. Sie untersuchten die Expression von MMPs und TIMPs in Tumoren der Kopf-Hals-Region und konnten dabei unter anderem zeigen, dass Primärtumoren mit vorhandenen Metastasen deutlich höhere Spiegel von TIMP-1 aufwiesen als nicht-metastasierte Tumoren.
In der vorliegenden Arbeit konnte dieses Resultat bestätigt werden. TIMP-1 wurde im Stroma von lymphogen metastasierten Tumoren sowie im Tumor bei Fernmetastasen deutlich stärker exprimiert. Es konnte jedoch keine signifikante Korrelation der Expression von TIMP-1-mRNA mit dem Lymphknoten-/Fernmetastasenstatus nachgewiesen werden.

7.3.3. Welche Rolle spielt TIMP-1 in Bezug auf die Tumorinvasion und -aggressivität?

TIMP-1 wurde schon in anderen Arbeiten eine bedeutende Rolle bezüglich des Invasionsverhaltens zugeschrieben. (Culhaci N et al. Rhee JS et al.)
Culhaci N et al. untersuchten TIMP-1 in 78 Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region und konnten nachweisen, dass eine erhöhte Expression von TIMP-1 statistisch signifikant mit einer gesteigerten Tumorinvasivität einherging.
Rhee JS et al. konnten anhand von Tierversuchen mit Mausmodellen nachweisen, dass TIMP-1 die Tumorentstehung von Plattenepithelkarzinomen fördert, indem es die Keratinozyten zur Hyperproliferation anregt und das Auftreten von chromosomalen Aberrationen in prämalignen Zellen und dadurch auch das Risiko der Entartung, verstärkt. In einigen Studien konnte sogar gezeigt werden, dass erhöhte TIMP-1-Level in verschiedenen Tumoren (z. B. Kolorektale Tumoren, Lymphome, Mamma-karzinome) mit Tumorprogression und einem schlechten Krankheitsverlauf / Prognose einhergehen (Murashige M et al. 1996; Curran S und Murray GI, 1999; Schrohl AS et al. 2003).
Eine detaillierte Betrachtung von TIMP-1 erfolgte auch durch Heissenberg MC et al.. Sie wiesen TIMP-1 in fast allen von ihnen untersuchten Primärtumoren nach. In den Proben von Patienten, bei denen im weiteren Verlauf ein Rezidiv auftrat,

konnte TIMP-1 allerdings in keinem Fall nachgewiesen werden, ebenso nicht in den Rezidivtumoren. Heissenberg MC et al. folgerten daraus, dass ein Fehlen von TIMP-1 (besonders im Zusammenhang mit nachweisbarer Expression von MMP-9) eine höhere Aggressivität der einzelnen Tumoren indiziert, was die Überlegung hinsichtlich eines prognostischen Wertes niedriger TIMP-1-Spiegel nachweisbar unterstützt.

Daher stellt sich immer mehr die Frage, welche Funktion TIMP-1 im Rahmen der Tumorgenese und -ausbreitung tatsächlich zugeschrieben werden soll.
Ruokolainen H et al. beschrieben TIMP-1 sowohl im Plasma als auch im Tumorgewebe als prädiktiven Marker für den klinischen Verlauf und Streuung des Tumors (Ruokolainen H et al. 2005). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Pradhan-Palikhe et al.. Sie beschrieben die TIMP-1-Konzentration im Plasma als Marker für die Überlebensrate (Pradhan-Palikhe et al. 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde keine signifikante Korrelation zwischen TIMP-1-Expression und einer rezidivfreien Überlebenszeit gefunden. Es konnte jedoch, wie bereits in anderen Arbeiten beschrieben, eine höhere Expression von TIMP-1 in prognostisch schlechteren bzw. rezidivierenden Tumoren v. a. im Stroma aufgezeigt werden. In wieweit diese Überexpression im Rahmen der inhibierenden Wirkung auf MMPs und so zur Eindämmung des Invasionsverhaltens des Tumors, oder im Rahmen einer prokanzerogenen Funktion von TIMP-1, wie sie bereits durch Rhee et al. beschrieben wurde, stattfindet, kann nicht abschließend beantwortet werden. Ob diese Tendenz wegweisend ist und welche Funktion TIMP-1 im Rahmen der ebenfalls vermehrten Expression und bezüglich der Prognose letztendlich zu spielen scheint, ist hieraus jedoch nicht ersichtlich.

Im Hinblick auf die komplexe biologische Funktion von TIMP-1, die sich bei weitem nicht auf die Inhibition von MMPs beschränkt, ist die weite Verbreitung des Enzyms auch in höheren Tumorstadien, wo eine Inhibition von MMPs offensichtlich nicht mehr gewährleistet wird, verständlich. Die genaue Funktion der Überexpression von TIMP-1 in fortgeschrittenen Tumorstadien ist jedoch weiterhin fraglich.

Zusammengefasst inhibiert TIMP-1 zwar die gelatinolytische Aktivität im Tumorstroma und wirkt auf die Stabilisierung von Kollagenfibrillen, jedoch scheint es nicht zu einer Hemmung des Überganges von einer Dysplasie in ein Karzinom und auch nicht zu einer Hemmung der Entwicklung von Metastasen zu kommen. Ob sich seine Funktion je nach Tumorstadium ändert, ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Es könnte jedoch durchaus sein, dass TIMP-1 in frühen Stadien der Tumorerkrankung die epitheliale Kanzerogenese fördert, während es in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien die Aktivität der MMPs inhibiert und die extrazelluläre Matrix stabilisiert, ohne sich auf die Streuung von Metastasen auszuwirken (Rhee JS et al. 2004). Wenn TIMP-1 die MMP-Aktivität allerdings so effektiv inhibiert, wie bereits beschrieben, warum ist dann eine verstärkte TIMP-1-Expression fördernd für die Tumorgenese? Rhee et al. kamen in ihren Untersuchungen zu dem Schluss, dass TIMP-1 in der Tumorgenese eindeutig eine prokanzerogene Rolle spielt. Je nach Stadium und Konzentration verhält es sich jedoch funktionell unterschiedlich: z. B. stabilisiert es in frühen Stadien das Tumorstroma, während es in späten Stadien zu einer Steigerung des Entartungsrisikos führt. Das könnte auch die Tatsache bedingen, dass bei Tumorerkrankungen im Spätstadium eine Therapie mit TIMP-1 oder ähnlichen Inhibitoren der Matrix-Metalloproteinasen klinisch nur einen begrenzten Erfolg zeigt (Whittaker M et al. 1999; Hidalgo M und Eckhardt SG 2001; Zucker S et al. 2000; Coussens LMB et al. 2002).

7.4. TIMP-2

TIMP-2 wurde weitgehend im Tumorstroma exprimiert. Im Gegensatz zu TIMP-1 konnte TIMP-2 auch in wenigen Fällen in der Tumormitte nachgewiesen werden, vorrangig jedoch auch an der Invasionsfront. Auffällig war die Expression im normal erscheinenden Plattenepithel und im dysplastischen Epithel. Hier zeigte sich eine deutlich höhere Expression von TIMP-2 im Gegensatz zu TIMP-1 im morphologisch gesunden Plattenepithel wie auch im dysplastischen Epithel. Bezüglich TIMP-2 konnte keine signifikante Korrelation mit dem Tumorstadium gefunden werden.

7.4.1. TIMP-2: Marker für Aggressivität und Metastasierungspotential einesTumors und Indikator für eine schlechte Prognose?

In den Tumoren mit Lymphknotenmetastasen war TIMP-2 lediglich in 65 % der Fälle nachweisbar, am seltensten und am schwächsten von allen TIMPs. Katayama A et al. zeigte eine Korrelation zwischen TIMP-2 und dem Lymphknotenstatus. Dieses konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachvollzogen werden.

Im Zusammenhang mit dem Fernmetastasenstatus ergab sich eine signifikante Korrelation. Es zeigte sich eine deutliche Expressionssteigerung von TIMP-2-mRNA in Tumorzellen bei metastasierten Tumoren. Im Stroma konnte keine signifikante Korrelation nachgewiesen werden. Es fand sich allerdings eine Tendenz bezüglich einer inversen Beziehung im Hinblick auf die Expression von TIMP-2 im Stroma. Hier konnte gerade in nicht-metastasierten Tumoren TIMP-2-mRNA in größeren Mengen nachgewiesen werden als in Tumoren mit erfolgter Fernmetastasierung. In wieweit sich die Funktion von TIMP-2 im Tumor von der im Stroma unterscheidet und warum TIMP-2 bezüglich des Metastasenstatus und der Lokalisation so unterschiedlich exprimiert wird, ist aufgrund der vorliegenden Daten nicht zu beantworten. Ein Grund könnte eine unterschiedliche Funktion in metastasierten und nicht-metastasierten Tumoren sein, z. B. der Versuch die Ausbreitung und Invasion des Tumors in frühen Stadien vom Stroma her einzudämmen, wohingegen in späteren metastasierten Stadien der Angriffspunkt in das Zentrum des Tumor verlegt wird.

Katayama A et al. zeigten in einem Versuch, in dem sie bei 53 Patienten in einem frühen Tumorstadium u. a. TIMP-2 immunhistochemisch nachwiesen, ein ähnliches Ergebnis. Patienten, die regionale Lymphknotenmetastasen oder hämatogene Fernmetastasen entwickelten, zeigten signifikant höhere Expressionswerte von TIMP-2 als Patienten ohne Tumormetastasen. Die stark erhöhten TIMP-2-Werte korrelierten auch mit einer schlechten Prognose/ Überlebensrate. Katayama A et al. folgerten somit, TIMP-2 habe einen prädiktiven Wert sowohl für die Entwicklung von Tumormetastasen als auch für die

Überlebensrate. TIMP-2 sei dabei sogar der unabhängigste Faktor für eine schlechte Prognose in frühen Stadien der Plattenepithelkarzinome.
Zu einem ähnlichen Resultat kamen Yoshizaki T et al., die die Expression von TIMP-2 in 51 Tumorgeweben von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Zunge immunhistochemisch untersuchten und die Ergebnisse mit klinischen Faktoren korrelierten. Die TIMP-2-Expression korrelierte signifikant mit dem Wiederauftreten eines lokalen Rezidivs bzw. Fernmetastasen. Yoshizaki T et al. schrieben aufgrund der Ergebnisse TIMP-2 einen wichtigen prognostischen Wert bei Zungenkarzinomen zu.
Auch Ruokolainen H et al. sahen in einer Serie von 74 Patientien TIMP-2 in Tumorproben als Marker für die Aggressivität des Tumors und als Indikator für eine spätere lymphogene oder hämatogene Metastasierung.

Dies steht im Gegensatz zu der Arbeit von Görögh et al., sie folgerten aus ihren Resultaten an 10 HNSCC und 48 Plattenepithelkarzinomen der Larynxregion (LSCC) dass TIMP-1 und TIMP-2 die Tumorausbreitung bei LSCC hemmen (Görögh et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit konnte ähnlich den oben beschriebenen Ergebnissen eine vermehrte Expression von TIMP-2 in späten Tumorstadien sowie in hämatogen metastasierten und rezidivierenden Tumoren nachgewiesen werden. Eine signifikante Korrelation ergab sich allerdings nicht.
Warum TIMP-2 gerade in Tumoren mit schlechter Prognose vermehrt nachweisbar ist, könnte verschiedene Gründe haben: einerseits könnte durch die Überexpression des Inhibitors ein weiteres Fortschreiten verhindert werden, andererseits könnte damit TIMP-2 auch eine Markerfunktion für eine schlechte Prognose besitzen.

Bisher gibt es nur wenige Studien, die TIMP-2 im Zusammenhang mit dem Metastasierungsverhalten von Tumoren sowie den prognostischen Wert von TIMP-2 untersucht haben. Kanayama et al. konnten nachweisen, dass hohe mRNA-Level von TIMP-2 mit einer schlechten Prognose bei Blasenkarzinomen assoziiert sind. Kikuchi et al. untersuchten kolorektale Tumoren und fanden eine

positive Korrelation zwischen einer erhöhten Expression von TIMP-2 und der Metastasierung in die Lymphknoten.

Andererseits wird in der Literatur jedoch auch immer wieder eine prognostisch günstige Funktion von TIMP-2 im Rahmen der Tumorgenese und Metastasierung beschrieben: Kawamata H et al. konnten eindrücklich zeigen, dass die Transfektion von TIMP-2 in stark metastasierende LMC19-Zelllinien deren Metastasierungspotential reduzieren konnte (Kawamata H et al., 1995). In einem ähnlichen Versuch wurde eine humane Melanomzelllinie mit TIMP-2-cDNA transfiziert und anschließend SCID-Mäusen subkutan transplantiert. TIMP-2 bewirkte ein langsameres Wachstum der Primärtumoren, die Inzidenz von Lymphknoten- und Lungenmetastasen blieb jedoch ebenso wie die Anzahl der Lungenmetastasen unbeeinflusst. Ähnliche Ergebnisse konnten auch McNally et al. zeigen. Sie wiesen einen möglichen positiven Nutzen einer Kombination von Radiotherapie mit ad-TIMP-2 Gentherapie nach (McNally et al. 2009). TIMP-2 bedingt demnach ein langsameres Wachstum der Primärtumoren und eine Reduktion des Metastasierungspotentials.

Ob die Hochregulation der Expression von TIMP-2 zu einer Reduktion des Metastasierungspotentials führen soll, oder ob TIMP-2 in späten Tumorstadien eher progressiv wirkt und das Metastasierungspotential somit verstärkt, kann durch die vorliegenden Versuchsergebnisse nicht eindeutig beantwortet werden.

7.5. TIMP-3

Es wurde gezeigt, dass TIMP-3 ein spezifischer Inhibitor der proteolytischen Aktivität der MMPs und ADAMs ist (Amour A et al. 2000; Amour A et al. 1998; Baker AH et al. 2002; Kornfeld et al. 2011). Generell übt TIMP-3 seine Funktion, die Inhibition der proteolytischen Aktivität, an der Tumorinvasionsfront von infiltrativen HNSCC aus, um eine tumorbedingte Degradierung der extrazellulären Matrix zu verhindern. Ein weiterer wesentlicher Wirkungsort von TIMP-3 ist das tumorumgebende Stroma, wo lösliche Proteasen die extrazelluläre Matrix aufspalten und EZM-gebundene Faktoren, welche die Tumorzellmigration und -

invasion ermöglichen, freisetzen. Eine ausgewogene Balance zwischen proteolytischen Enzymen (z. B. MMPs) und ihren Inhibitoren (z. B. TIMPs) scheint daher für die Tumorinvasion und -ausbreitung von großer Bedeutung zu sein (Cruz-Munoz W et al. 2006; Kurahara S et al. 1999; Wu ZS et al. 2008).
Gerade TIMP-3 ist bisher nur spärlich untersucht, so dass generelle Aussagen dazu nur begrenzt zu treffen sind. Die im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen gewonnenen Ergebnisse weisen aber auf eine ebenfalls nicht unbedeutende Rolle dieses Inhibitors hin.

7.5.1. Verteilungsmuster von TIMP-3

In den untersuchten Tumoren der Kopf-Hals-Region wurde TIMP-3 v. a. in den den Tumor umgebenden Stromazellen exprimiert, in einigen Fällen auch in Tumorzellen an der Invasionsfront, selten, jedoch z. T. auch sehr stark, in der Tumormitte oder in einzelnen Tumorzapfen.
Ein ähnliches Verteilungsmuster der Expression fand sich auch in anderen Studien. Airola K et al. konnten TIMP-3-mRNA sowohl in randständigen Tumorzellen von infiltrativ wachsenden Basaliomen als auch in umgebenden Stromazellen von Plattenepithelkarzinomen der Haut nachweisen, jedoch fand sich keine Expression in benignen Tumoren. Auch in anderen Tumoren, wie z. B. Kolonkarzinomen oder intraduktalen Mammakarzinomen, konnte TIMP-3 in den umgebenden Stromazellen nachgewiesen werden, nicht jedoch in den Tumorzellen. Auffällig dabei war, dass in beiden Tumorentitäten die Expression von TIMP-3 ko-lokalisiert war mit der Expression von TIMP-1 (Airola K et al. 1998).
Bei Miyazaki T et al. konnte TIMP-3 v. a. in oberflächlichen Bereichen des Tumors nachgewiesen werden, während die Expression in tieferen Bereichen deutlich reduziert war. Auffällig war zudem, dass TIMP-3 in keinem der Fälle an der Invasionsfront gefunden werden konnte. Powe DG et al. kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Sie konnten zeigen, dass sich die TIMP-3-Expression am invasiven Rand wenig- bzw. undifferenzierter Adenokarzinome des menschlichen Kolons deutlich verringert.
In allen genannten Studien wurde TIMP-3 hauptsächlich im den Tumor umgebenden Stroma nachgewiesen. Bezüglich der Expression im Tumor ist

bisher noch kein einheitliches Muster beschrieben. Welche Funktion TIMP-3 in der Umgebung der Invasionsfront bzw. im Tumor spielt, ist daher noch unklar.

7.5.2. TIMP-3 im Vergleich mit klinisch-pathologischen Faktoren

In der vorliegenden Arbeit konnte zwischen der m-RNA-Expression von TIMP-3 und den untersuchten klinisch pathologischen Faktoren keine signifikante Korrelation nachgewiesen werden. Es bestand jedoch eine deutliche Zunahme der TIMP-3-Expression in späteren Tumorstadien sowie eine Tendenz zur vermehrten Expression in G2/G3 Tumoren.

Die in dieser Arbeit gefundene Hochregulation von TIMP-3 in fortgeschrittenen Tumorstadien bzw. aggressiveren Kopf-Hals-Tumoren steht im Kontrast zu den Ergebnissen von Worsham MJ et al., die die Tumorsuppressorfunktion von TIMP-3 häufig durch eine Promotor-Hypermethylierung während der Tumorprogression von HNSCC stillgelegt sahen.

Im Gegensatz zu Worsham haben Miyazaki T et al. in ihren Untersuchungen ebenfalls Hinweise auf eine Rolle von TIMP-3 in der Tumorprogression erhalten. Miyazaki T et al. untersuchten die Expression von TIMP-3 in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus in Bezug zu klinisch-pathologischen Faktoren und konnten dabei zeigen, dass eine erniedrigte TIMP-3-Expression signifikant mit der Invasionstiefe, dem infiltrativen Wachstumsmuster, dem Erkrankungsstadium und der Zahl an Lymphknotenmetastasen korrelierte.

Powe DG et al. kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Sie konnten nachweisen, dass sich die TIMP-3-Expression am invasiven Rand wenig- bzw. undifferenzierter Adenokarzinome des menschlichen Kolons deutlich verringert. Sie folgerten daraus, dass ein regionaler Verlust an TIMP-3 zu einer erhöhten Invasivität der Tumoren beitragen kann.

Ähnliche Resultate zeigten Arbeiten an verschiedenen Tumoren, die eine erhöhte TIMP-3-Expression im Zusammenhang mit einer guten Prognose bei Patienten mit Kolonkarzinom, duktalem Mammakarzinom sowie Adenokarzinom des Pankreas beschrieben (Bai YX et al. 2007; Lui EL et al. 2005; Fendrich V et al. 2005).

7.5.3. TIMP-3 und seine Funktion: prognostisch günstig?

Ob ein TIMP-3-Verlust die Aggressivität und das Invasionsverhalten des Tumors steigert, oder gerade eine Hochregulierung von TIMP-3 in metastasierten Tumoren zur Eindämmung stattfindet, ist fraglich.
Signifikante Korrelationen zwischen der Menge an TIMP-3 und dem Rezidivrisiko konnten in der vorliegenden Arbeit nicht gefunden werden. Es zeigte sich jedoch eine deutliche Tendenz zu einer vermehrten Expression von TIMP-3 im Stroma von rezidivierenden Karzinomen. Bezüglich des Metastasierungsverhaltens verhielt sich TIMP-3 unterschiedlich: Bei lymphogen metastasierten Tumoren konnte eine deutliche Zunahme der TIMP-3-Expression verzeichnet werden. Im Hinblick auf den Fernmetastasenstatus wurde jedoch TIMP-3 vermehrt in M0-Tumoren nachgewiesen.
Miyazaki T et al. kamen zu teilweise anderen Ergebnissen. Sie konnten nachweisen, dass Patienten mit TIMP-3-positiven Tumoren signifikant höhere Überlebensraten hatten als Patienten mit TIMP-3-negativen Tumoren. Sie kamen so zu dem Schluss, dass die Expression von TIMP-3 zu einer besseren Prognose führt. Sie folgerten daraus, das Vorhandensein von TIMP-3 sei ungünstig für das Überleben von Tumorzellen, was wiederum zur Folge hat, dass Tumorzellen von höherem Malignitätsgrad (mehr invasive und weniger apoptotische Zellen) kein TIMP-3 exprimieren (Miyazaki T et al. 2004; Baker AH et al. 1999). Das weise daraufhin, dass TIMP-3 bei der Unterdrückung der Invasivität von Tumorzellen eine große Rolle spielen und somit zu neuen therapeutischen Ansätzen führen könnte.

Zu bedenken bezüglich den oben aufgeführten Ergebnissen von Miyazaki et al. ist, dass die vermehrte Expression von TIMP-3 in rezidivierenden Karzinomen bzw. Tumoren mit schlechter Prognose in der vorliegenden Arbeit ausschließlich im Stroma gefunden wurde. Welche Funktion TIMP-3 hier hat und ob die Interpretationen von Miyazaki et al. auch in Bezug auf diese Ergebnisse anzuwenden sind, ist nicht mit Sicherheit zu beantworten. Denkbar ist jedoch eine Überexpression von TIMP-3 im Stroma zur Eindämmung aggressiver Karzinome, während die Tumorzellen kein TIMP-3 mehr exprimieren. Die genauen Beziehungen zwischen der Expression von TIMP-3 und klinischen Merkmalen, wie

z. B. Tumorinvasivität, Metastasierung und Prognose, sind jedoch immer noch unzureichend, um die generelle Wirkungsweise des Enzyms genauer zu beschreiben.

7.6. Auftreten vorhandener Muster von MMP-9 sowie TIMP-1, -2, und -3 im jeweiligen Expressionsverhalten

Arbeiten, die ein derart großes Spektrum an Tumoren mit unterschiedlichen klinischen Stadien einerseits sowie eine Bandbreite der Enzyme aus der Familie der Metalloproteasen und deren Inhibitoren andererseits auf vorhandene Expressionsmuster untersuchen, sind selten. Eine sehr umfassende Untersuchung multipler MMPs und TIMPs wurde von O-Charoenrat et al. publiziert. Keine Korrelation bestand dabei zwischen den MMPs und der Tumorlokalisation. Zusammenhänge bestehen dagegen zwischen den Mengen exprimierter MMP-1, -9 und TIMP-1 und einem fortgeschrittenen Tumorstadium, sowie weiterhin zwischen der Expression von MMP-2, -7, -9 und -11 und dem Lymphknotenstatus der einzelnen Tumoren.

In der vorliegenden Arbeit konnten Zusammenhänge zwischen der Expression von MMP-9 sowie den Inhibitoren TIMP-2 und TIMP-3 und fortgeschrittenen Tumorstadien aufgezeigt werden. Bezüglich dem Auftreten von lymphogenen und/oder hämatogenen Metastasen konnte eine deutliche Zunahme der Expression von MMP-9 sowie den Inhibitoren TIMP-1, -2 und -3 nachgewiesen werden. Bei rezidivierenden Tumoren waren sowohl MMP-9 als auch TIMP-1, -2 und -3 überexprimiert.

Trotz der z. T. unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der Expression und dem Verhalten der MMPs und TIMPs geht man heute davon aus, dass die Überexpression in malignen Tumoren und die Korrelationen mit diversen klinisch-pathologischen Faktoren auf ein bestimmtes Muster im Sinne einer bestimmten Expressionsweise unter bestimmten Bedingungen zurückzuführen sind. Die Breite der von O-Charoenrat et al. angestellten Untersuchungen lässt dabei erste Ansätze im Sinne solcher Expressionsmuster erkennen: So zeigen sich z. B. in Tumoren mit befallenen Lymphknoten wie erwähnt erhöhte Expressionswerte für mehrere MMPs.

Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen im Vergleich zu bereits publizierten Studien über MMPs und TIMPs ähnliche Muster für das Expressionsverhalten sowie Funktion und Auswirkung auf den klinischen Verlaufs erkennen. Das Metastasierungspotential sowie die prognostisch ungünstige Rolle von MMP-9 kann durch diese Ergebnisse bestätigt werden. Die gleichzeitige Hochregulation der Inhibitoren ist jedoch in ihrer Funktion noch unklar; sie scheinen jedoch trotz der vermehrten Expression in prognostisch ungünstigen Tumoren eher eine eindämmende und inhibierende Rolle zu spielen, da sie vermehrt im tumorumgebenden Stroma agieren und im Tumor selbst nur selten nachweisbar sind. Wiederkehrende, klinisch relevante Muster, bei denen immer gleiche Verhältnisse von exprimierten MMP- und TIMP-Mengen sowie ein bestimmtes Verhältnis zwischen MMP und Inhibitor bei gleichen Tumorparametern darstellbar sind, konnten bisher noch nicht nachgewiesen werden. Dabei ist dieser Aspekt im Hinblick auf die Eingangs erwähnten pathophysiologisch nachgewiesenen Funktionen sowie Interaktionen von MMPs und TIMPs bezüglich Tumorprogression und Metastasierung nicht nur interessant, sondern auch durchaus annehmbar. Weiterführende, ähnlich breit angelegte Arbeiten sind daher wünschenswert mit dem Ziel, die Funktion und Interaktion der MMPs und ihrer Inhibitoren in malignen Prozessen genau zu beschreiben, um neue Therapieansatzpunkte und eventuelle prognostische Marker zu finden.

7.7. Prognostische Eignung von MMP-9 und TIMP-1, -2, -3 ?

Eines der Ziele der vielfältigen Untersuchungen war, Aussagen über das Invasions- und Metastasierungspotential des einzelnen Tumors treffen zu können sowie durch neue Therapieoptionen eine bessere Prognose zu erreichen. Die Metalloproteasen und ihre Inhibitoren sind dabei aufgrund ihrer bis jetzt bekannten Funktionen und ihres Beitrags zur malignen Ausbreitung ins Blickfeld gerückt. Bisher ist es jedoch noch nicht gelungen, prognostisch relevante Marker zu etablieren, auch wenn die Ergebnisse mehrerer Studien in diese Richtung zu weisen scheinen (Pradhan-Palikhe et al. 2010; Ruokolainen H 2006; Ruokolainen H 2005).

Nachweisbare Korrelationen / Tendenzen zwischen MMPs und / oder TIMPs und klinisch-pathologischen Faktoren wie Lymphknotenstatus N (TIMP-1 und TIMP-3) oder Fernmetastasenstatus M (MMP-9, TIMP-1 und TIMP-2), die in dieser wie in anderen Arbeiten dargestellt werden konnten, lassen dabei den Schluss zu, dass diese Enzyme als Marker an Bedeutung gewinnen könnten. Zudem spielt das Verhältnis zwischen Metalloprotease und Inhibitoren eine wohl nicht zu unterschätzende Rolle bezüglich des Rezidivverhaltens und Metastasierungspotentials; ein Überwiegen der Metalloprotease würde dabei einen aggressiveren Krankheitsverlauf bedingen (Gohji K et al. 1996 u. 1998; Ruokolainen H 2006).
In vielen menschlichen Tumoren korrelierte jedoch auch eine erhöhte mRNA-Expression der TIMPs mit Malignität und schlechtem klinischen Verlauf (Curran S und Murray GI 1999; Rhee JS et al. 2004, Ruokolainen H 2005 und 2006; Kornfeld et al. 2011). Hohe TIMP-Levels wären somit zwar mit Tumorprogression und schlechter Prognose assoziiert, würden sie jedoch nicht bedingen (Egeblad M und Werb Z 2002).
In einigen experimentellen Studien scheinen TIMPs jedoch auch die Tumorprogression zu begünstigen. Leider sind die Ergebnisse, wie auch die Resultate bereits publizierter Studien noch derart uneinheitlich, dass prognostische Aussagen zu diesem Zeitpunkt nicht zu treffen sind. Die Pathologie der Tumorprogression und Metastasierung sowie der spezielle Beitrag von MMPs und TIMPs, deren Interaktionen untereinander sowie mit Zellen und Faktoren der Umgebung sind noch nicht hinreichend bekannt, um die z. T. widersprüchlichen Ergebnisse umfassend erklären zu können. Einen Ansatz zu diesem Verständnis hat Stokes et al. geliefert. Sie beschrieben die Wirkung von Degradom Komponenten im Umfeld von HNSCC (Stokes et al. 2010).

7.8. MMP-Inhibitoren als Therapieansatz?

Neben der Frage nach prognostischen Markern für Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region ist ein weiteres wichtiges Ziel der genauen Untersuchung von MMPs und TIMPs die Entwicklung neuer spezifischer Therapieformen. Dabei besteht die Überlegung darin, dass eine erfolgreiche Blockade der Matrixmetalloproteasen die Tumorprogression und Metastasierung eindämmen

könnte. Verschiedene Arbeitsgruppen haben sich bereits mit der Synthese spezifischer Inhibitoren beschäftigt. Katori et al. konnten zeigen, dass MMI-166, ein synthetischer Inhibitor von MMP-2 und -9 das Tumorwachstum durch Hemmung der Metalloproteasen sowie der Angiogenese in vivo reduzieren kann. O-Charoenrat et al. verwendeten Marimastat, BB 2516, ein MMP-Inhibitor mit breitem Spektrum, und konnten eine Wachstumshemmung bei Zelllinien von Plattenepithelkarzinomen nachweisen.

Viele MMP-Inhibitoren (MMPI), wie z. B. Marimastat, Prinomastat (AG 3340) und Bay 12-9566, die in Mausmodellen günstige Effekte auf die Tumoreindämmung gezeigt hatten, konnten allerdings in den klinischen Studien gerade bei Patienten mit fortgeschrittener Tumorerkrankung nicht den gewünschten Erfolg zeigen (Zucker S et al. 2000). Es folgten weitere Studien an fortgeschrittenen Karzinomen und der Einsatz der MMPI in der Tumortherapie musste erneut überdacht werden. Anstelle MMPI zur Behandlung von inoperablen Tumoren zu verwenden, sollten sie laut Egeblad M und Werb Z als präventive Medikamente eingesetzt werden. Gerade Patienten mit einer genetischen Veranlagung zu bestimmten Tumoren oder Patienten nach Resektion des Primärtumors ohne Nachweis von Metastasen könnten von der Behandlung mit MMP-Inhibitoren profitieren (Egeblad M und Werb Z 2002). McNally beschrieb einen Ansatz mittels Gentherapie und Radiotherapie der zumindest im Tierversuch positive Resultate versprach (McNally et al. 2009).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeitdeuten darauf hin, dass MMPs und TIMPs nicht nur gute Ziele für eine antineoplastische Therapie darstellen, sondern auch klinischen Nutzen bei der Identifizierung von Subgruppen von Patienten mit einem erhöhten Rezidivrisiko zeigen und somit als Marker der Aggressivität von Tumoren fungieren können (Grignon DJ et al. 1996; Kleiner DE und Stetler-Stevenson WG 1999; Ruokolainen et al. 2005 und 2006)). Um die TIMPs oder andere spezifische Inhibitoren in der Tumortherapie effizient einzusetzen, fehlt momentan jedoch ein einheitliches Expressionsmuster und ein genaues Verständnis bezüglich der Wirkung auf Tumorprogression und Metastasierung.

VIII. Zusammenfassung

In der Kopf-Hals-Region sind mehr als 90 % aller malignen Tumoren Plattenepithelkarzinome. An der insgesamt schlechten Prognose dieser Tumoren, die v. a. vom primären Tumorstadium, vom lokalen Invasionsverhalten und von der Metastasierung abhängig ist, hat sich trotz moderner Behandlungsmethoden in den letzten Jahren wenig geändert. Um bereits präoperativ die Aggressivität des Tumorwachstums und das Risiko einer möglichen Metastasierung einzuschätzen, richten sich die Bemühungen verschiedener Arbeitsgruppen auf die Etablierung molekularer Marker.

Für die mRNA-Detektion wurde die RNA/RNA-in situ-Hybridisierung eingesetzt. Der Proteinnachweis erfolgte über Immunhistochemie mit Hilfe monoklonaler Antikörper.

Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Dissertation die m-RNA-Expression von MMP-9 und TIMP-1, -2, -3 sowie die Proteinexpression von MMP-9 an 120 Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region untersucht.

Von allen mittels in situ-Hybridisierung untersuchten Transkripten konnte von TIMP-1-mRNA am häufigsten nachgewiesen werden (TIMP-1 83 %, TIMP-2 77 %, TIMP-3 73 %, MMP-9 70 %).

MMP-9 wurde am häufigsten und stärksten im Tumor an der Invasionsfront nachgewiesen. Zudem zeigte sich eine vermehrte Expression auch im Tumorstroma, in tumornahen Leukozyten und Endothelzellen, deutlich weniger dagegen im morphologisch normal erscheinenden und dysplastischen Plattenepithel.

TIMP-1 wurde v. a. im Stroma in unmittelbarer Umgebung zum Tumor, z. T. auch an der Invasionsfront des Tumors exprimiert, es ergab sich kein Nachweis von TIMP-1 in der Tumormitte. In über 1/3 der Fälle konnte eine Expression von TIMP-1 bereits im dysplastischen Epithel nachgewiesen werden.

TIMP-2 wurde ebenfalls v. a. im Tumorstroma detektiert. Auffällig war die Expression im normal erscheinenden Plattenepithel u. dysplastischen Epithel, hier bestand eine deutlich höhere Expression von TIMP-2 im Gegensatz zu TIMP-1.

TIMP-3 wurde ebenfalls v. a. im Tumorstroma exprimiert. In wenigen Fällen konnte TIMP-3 auch in der Tumormitte, z. T. mit sehr starker Signalintensität, detektiert werden, vorrangig jedoch auch an der Invasionsfront des Tumors.

Die Expression von MMP-9 korrelierte signifikant mit dem Tumorstadium, dem Grad der Verhornung (Tumortyp) sowie dem Fernmetastasenstatus. Zudem bestand eine Tendenz zur erhöhten Expression von MMP-9 bei lymphogen metastasierten Tumoren sowie Tumoren mit schlechter Prognose.
Im Vergleich von TIMP-1-mRNA Expression mit klinisch pathologischen Faktoren ergaben sich keine signifikanten Korrelationen. Jedoch zeigte sich eine Zunahme der Expression bei lymphogen metastasierten Tumoren (> 90 % der Fälle waren TIMP-1-positiv). Zudem ergaben sich Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen TIMP-1 und dem Fernmetastasenstatus M sowie eine Tendenz zu höheren TIMP-1 Level bei prognostisch ungünstigen Tumoren.
Die TIMP-2-Expression korrelierte mit dem Fernmetastasenstatus ($p = 0,015$). Weitere relevante Korrelationen bzw. Tendenzen ergaben sich zwischen der TIMP-2-Expression und dem Alter ($p = 0,035$) sowie dem Geschlecht ($p = 0,097$).
Bei Vergleich zwischen der Expression von TIMP-3 und klinisch pathologischen Faktoren ergab sich keine signifikante Korrelation. Es bestand allerdings eine Tendenz zur Expressionssteigerung in späteren Tumorstadien sowie bei schlecht differenzierten Tumoren.

Im Vergleich der MMP-9-Signale von in situ-Hybridisierung und Immunhistochemie konnte sowohl in den Tumorzellen als auch im Stroma eine signifikante Korrelation zwischen der Expression der m-RNA und dem Nachweis des Proteins MMP-9 aufgezeigt werden.
Ebenso zeigten sich signifikante Korrelationen zwischen:
- der Expression von MMP-9 und TIMP-1 sowohl in den Tumorzellen ($p = 0,005$) als auch im Tumorstroma ($p = 0,007$),
- der Expression von MMP-9 und TIMP-2 in den Tumorzellen ($p = 0,005$),
- der Expression von MMP-9 und TIMP-3 in den Tumorzellen ($p = 0,001$),
- der Expression im Tumorstroma von TIMP-1 und TIMP-3 ($p = 0,016$).

Sowohl MMP-9 als auch TIMP-1, -2 und -3 waren bei fortgeschrittenen bzw. metastasierten Tumoren deutlich erhöht und können daher Hinweise für das Verhalten dieser Tumoren geben und als Indikatoren der Prognose dienen.

IX. Literaturverzeichnis

AHONEN MA, BAKER AH, KAHARL VM (1998) Adenovirus-mediated gene delivery of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 inhibits invasion and induces apoptosis in melanoma cells. *Cancer Res 58: 2310-2315*

AIMES RT, QUIGLEY JP (1995) Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3⁄4 and 1⁄4 -length fragments. *J Biol Chem. 270 (11): 5872-5876*

AIROLA K, AHONEN M, JOHANSSON N, HEIKKILÄ P, KERE J, KÄHÄRI VM, SAARIALHO-KERE UK (1998) Human TIMP-3 is expressed during fetal development, hair growth cycle, and cancer progression. *J of Histochemistry & Cytochemistry 46: 437-447*

AIROLA K, JOHANSSON N, KARINIEMI AL, KAHARI VM, SAARIALHO-KERE UK (1997) Human collagenase-3 is expressed in malignant squamous epithelium of the skin. *J Invest. Dermatol. 109 (2): 225-231*

AKERVALL JA, JIN Y, WENNERBERG JP ET AL (1995) Chromosomal abnormalities involving 11q13 are associated with poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer 76: 853-859*

ALVI A, MYERS EN, JOHNSON JT (1996) Cancer of the oral cavity. *In: Myers EN, Suen JY, editors. Cancer of the head and neck. 3rd edition. Philadelphia: Mosby, 1996; 321-360*

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures – 1993. Atlanta, Ga, American Cancer Society, 1993, pp 1-23

AMOUR A, SLOCOMBE PM, WEBSTER A, BUTLER M, KNIGHT CG, SMITH BJ, STEPHENS PE, SHELLEY C, HUTTON M, KNAUPER V, DOCHERTY AJ, MURPHY G (1998) TFN-□ converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS Lett 435: 39-44*

AMOUR A, KNIGHT CG, WEBSTER A, SLOCOMBE PM, STEPHENS PE, KNAUPER V, DOCHERTY AJ, MURPHY G (2000) The in vitro activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3. *FEBS Lett 473:275-9*

ANAND-APTE B, BAO L, SMITH R, IWATA K, OLSEN BR, ZETTER B, APTE SS (1996) A review of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) and experimental analysis of its effect on primary tumor growth. *Biochem Cell Biol 74: 853-862*

ANAND-APTE B, PEPPER MS, VOEST E, MONTESANO R, OLSEN B, MURPHY G, APTE SS, ZETTER B (1997) Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Invest Ophthalmol Vis Sci 38: 817-823*

APPARAILLY F, NOEL D, MILLET V, BAKER AH, LISIGNOLI G, JACQUET C, KAISER MJ, SANY J, JORGENSEN C (2001) Paradoxical effects of tissue inhibitor of metalloproteinase 1 gene transfer in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum 44: 1444-1454*

BAI YX, YI JL, LI JF, SUI H (2007) Clinicopathologic significance of BAG1 and TIMP3 expression in colon carcinoma. *World J Gastroenterol 13: 3883-5*

BAKER AH, GEORGE SJ, ZALTSMAN AB, MURPHY G, NEWBY AC (1999) Inhibition of invasion and induction of apoptotic cell death of cancer cell lines by overexpression of TIMP-3. *Br J Cancer 79: 1347-1355*

BAKER AH, EDWARDS DR, MURPHY G (2002) Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci 115:3719-27*

BARAL RN, PATNAIK S, DAS BR (1998) Co-overexpression of p53 and c-myc proteins is linked with advance stages of betel and tobacco related oral squamous cell carcinoma from Eastern India. *Eur J Oral Sci 106(5): 907-913*

BARTKOVA J, LUKAS J, MULLER H ET AL (1995) Abnormal patterns of D-type cyclin expression and G1 regulation in human headand neck cancer. *Cancer Res 55: 949-956*

BECKER JW, MARCY AI, ROKOSZ LL, AXEL MG, BURBAUM JJ, FITZGERALD PM, CAMERON PM, ESSER CK, HAGMANN WK, HERMES JD, SPRINGR JP (1995) Stromelysin-1: three-dimensional structure of the inhibited catalytic domain and of the C-truncated proenzyme. *Protein Sci 4: 1966-1976*

BERG JW, SCHOTTENFELD D (1977) Multiple primary cancers at Memorial Hospital 1949-1962. *Cancer 40: 1801-1805*

BIRCHMEIER W, WEIDNER KM, BEHRENS J (1992) Molecular aspects of the invasion of carcinoma cells. In Metastasis: basic research and its clinical applications. *Rabes H, Peters PE, Munk K, eds. (Basel: Karger), pp. 95-107*

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

BIRKEDAL-HANSEN H, MOORE WGI, BODDEN MK, WINDSOR LJ, BIRKEDAL HB, DECARLO A, ENGLER JA (1993) Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med 4: 197*

BLACK RA (2004) TIMP3 checks inflammation. *Nat. Genet. 36(9): 934-935*

BÖCKER-DENK-HEINTZ Pathologie (Fischer)

BOENNINGHAUS HG, LENARZ T (2001) Mundhöhle und Pharynx. Malignome. *In: Hals – Nasen – Ohren – Heilkunde für Studierende der Medizin. 11. Auflage. Springer, 2001; 382-399*

BOUJRAD N, OGWUEGBU M, GARNIER M, LEE CH, MARTIN BM, PAPADOPOULOS V (1995) Identification of a stimulator of steroid hormone synthesis isolated from testis. *Science 268: 1609-1612*

BOYLE JO, HAKIM J, KOCH W ET AL (1993) The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. *Cancer Res 53: 4477-4480*

BRAMHALL SR, NEOPTOLEMOS JP, STAMP GWH, LEMOINE NR (1997) Imbalance of expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMPs) in human pancreatic carcinoma. *J Pathol. 182: 347-355*

BRENNAN JA, MAO L, HRUBAN RH, BOYLE JO, EBY YJ, KOCH WM, GOODMAN SN, SIDRANSKI D (1995) Molecular assessment of histopathological staging in squamous cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med 332: 429-35*

BREW K, DINAKARPANDIAN D, NAGASE H (2000) Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochem Biophys Acta 1477: 267-283*

BROWN PD, KLEINER DE, UNSWORTH EJ, STETLER-STEVENSON WG (1993) Cellular activation of the 72 kDa type IV procollagenase/TIMP-2 complex. *Kidney Int 43: 163*

BRUMMER O, ATHAR S, RIETHDORF L, LÖNING 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 hybridisation study. *Virchows Arch 435: 566-573*

CAAMANO J, ZHANG SY, ROSVOLD EA ET AL (1993) p53 alterations in human squamous cell carcinomas and carcinoma cell lines. *Am J Pathol 142: 1131-1139*

CARMICHAEL DF, SOMMER A, THOMPSON RC, ANDERSON DC, SMITH CG, WELGUS HG, STRICKLIN GP (1986) Primary structure and cDNA cloning of human fibroblast collagenase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA 83(8): 2407-2411*

CHAMBERS AF, MATRISIAN LM (1997) Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Nat Canc Inst 89: 1260-1270*

CHAROUS SJ, STRICKLIN GP, NANNEY LB, NETTERVILLE JL, BURKEY BB (1997) Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol 106(4): 271-278*

COUSSENS LM, FINGLETON B, MATRISIAN LM (2002) Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science 295: 2387-2392*

COWELL S, KNÄUPER V, STEWART ML, D'ORTHO MP, STANTON H, HEMBRY RM, LOPEZ-OTIN C, REYNOLDS JJ, MURPHY G (1998) Induction of matrix metalloproteinase activation cascades based on membrane-type 1 matrix

metalloproteinase: associated activation of gelatinase A, gelatinase B, and collagenase 3. *Biochem J 15: 453-458*

CROWE DL, HACIA JG, HSIEH CL, SIHNA UK, RICE H (2002) Molecular pathology of head and neck cancer. *Histol Histopathol 17(3): 909-914*

CRUZ-MUNOZ W, SANCHEZ OH, DI GRAPPA M, ENGLISH JL, HILL RP, KHOKHA R (2006) Enhanced metastatic dissemination to multiple organs by melanoma and lymphoma cells in timp-3 -/- mice. *Oncogene 25: 6489-96*

CULHACI N, METIN K, COPCU E, DIKICIOGLU E (2004) Elevated expression of MMP-13 and TIMP-1 in head and neck squamous cell carcinomas may reflect increased tumor invasiveness. *BMC Cancer 4: 42*

CURRAN S, MURRAY GI (1999) Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol 189: 300-308*

DAFTARY DK, MURTI PR, BHONSLE RB ET AL (1991) Risk factors and risk markers for oral cancer in high incidence areas of the world. *In: Johnson NW, editor. Oral cancer, Vol. 2. Cambridge University Press, Cambridge 29-63*

DANØ K, RØMER J, NIELSEN BS, BJØRN S, PYKE C, RYGAARD J, LUND LR (1999) Cancer invasion and tissue remodelling-cooperation of protease systems and cell types. *APMIS 107: 120-127*

DAVID L, NESLAND J, HOLM R, SOBRINHO-SIMOES M (1994) Expression of laminin, collagen IV, fibronectin, and type IV collagenase in gastric carcinoma. An immunohistochemical study of 87 patients. *Cancer 73: 518-527*

DAVIDSON B, GOLDBERG I, KOPOLOVIC J, LERNER-GEVAL, GOTLIEB WH, WEIS B, BEN-BARUCH G, REICH R (1999) MMP-2 and TIMP-2 expression correlates with poor prognosis in cervical carcinoma – a clinicopathologic study using immunhistochemistry and m-RNA in-situ hybridization. *Gynaecol. Oncol. 73: 372-382*

DAVIES B, MILES DW, HAPPERFIELD LC, NAYLOR MS, BOBROW LG, RUBENS RD, BALKWILL FR (1993) Activity of type IV collagenases in benign and malignant breast disease. *Br J Cancer 67: 1126*

DECLERCK YA (2000) Interactions between tumour cells and stromal cells and proteolytic modification of the extracellular matrix by metalloproteinases in cancer. *Eur J of Cancer 36: 1258-1268*

DENHARDT DT, FENG B, EDWARDS DR, COCUZZI ET, MALYANKAR UM (1993) Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP, aka EPA): Structure, control of expression and biological functions. *Pharmacol Ther 59: 329-341*

DERRICO A, GARBISA S, LIOTTA L, ASTRONOVO V, STETLER-STEVENSON WG, GRIGIONI W (1991) Augmentation of type IV collagenase, laminin receptor, and Ki67 proliferation antigen associated with human colon, gastric and breast carcinoma progression. *Mod Pathol 4: 239-246*

DIETMAIER W, HARTMANN A, WALLINGER S, HEINMÖLLER E, KERNER T, JAUCH KW, HOFSTADTER F, RUSCHOFF J (1999) Multiple mutation analyses in single tumor cells with improved whole genome amplification. *Am J Pathol 154: 83-95*

DI NEZZA LA, MISAJON A, ZHANG J, JOBLING T, QUINN MA, ÖSTÖR AG, NIE G, LOPATA A, SALAMONSEN LA (2002) Presence of active gelatinases in endometrial carcinoma and correlation of matrix metalloproteinase expression with increasing tumor grade and invasion. *Cancer 94: 1466-1475*

DUFFY MJ, REILLY D, NUGENT A, MC DERMOTT E, FAUL C, FENNELLY JJ, O'HIGGINS N (1992) Evaluation of proteolytic enzymes implicated in cancer metastasis as prognostic markers in breast cancer. *Eur J Surg Oncol 18 (Suppl.1):21*

DUFFY MJ (1996) Proteases as prognostic markers in cancer. *Clin Cancer Res 2: 613-618*

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

DÜNNE AA, SESTERHENN A, GERISCH A, TEYMOORTASH A, KUROPKAT C, WERNER JA (2003) Expression of MMP-2, -9, -13 in cell lines and fresh biopsies of squamous cell carcinomas of the upper aerodigestive tract. *Anticancer Res 23 (3B): 2233-2239*

EDWARDS DR, MURPHY G (1998) Proteases-invasion and more. *Nature 394: 527-528*

EGEBLAD M, WERB Z (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Reviews Cancer 2: 163-174*

EMILION G, LANGDON JD, SPEIGHT P, PARTRIDGE M (1996) Frequent gene deletions in potentially malignant oral lesions. *Br J Cancer 73: 809-813*

FASSINA G, FERRARI N, BRIGATI C, BENELLI R, SANTI L, NOONAN DM, ALBINI A (2000) Tissue inhibitors of metalloproteases: regulation and biological activities. *Clin Exp Metastasis 18: 111-120*

FENDRICH V, SLATER EP, HEINMOLLER E, RAMASWARMY A, CELIK I, NOWAK O, CHALOUPKA B, GERDES B, BARTSCH DK (2005) Alterations of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP3) gene in pancreatic adenocarcinomas*. Pancreas 30: e40-5*

FERNANDEZ HA, KALLENBACH K, SEGHEZZI G ET AL (1999) Inhibition of endothelial cell migration by gene transfer of tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *J Surg Res 82: 156-162*

FIDLER IJ, HART IR (1982) Biological diversity in metastatic neoplasms: origin and implications. *Science 217: 998-1003*

FOLKMAN J (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications (review). *New Engl J Med 285: 1182-1186*

FORASTIERE A, KOCH W, TROTTI A, SIDRANSKY D (2001) Head and Neck Cancer. *N Engl J Med 345: 1890-1900*

FRANCESCHI S, LEVI F, VECCHIA CL ET AL (1999) Comparison of the effect of smoking and alcohol drinking between oral and pharyngeal cancer. *Int J Cancer 83: 1-4*

FRIEDL P, WOLF K (2003) Tumour-cell invasion and migration: Diversity and Escape mechanisms. *Nature Reviews Cancer 3: 362-374*

FULLMER HM, GIBSON W (1966) Collagenolytic activity in gingivae of man. *Nature 209: 728-729*

FUNKE I, SCHAUT W (1998) Meta-analyses of studies on bone marrow micrometastases: An independent prognostic impact remains to be substantiated. *J Clin Oncol 16: 557-566*

GALLEGOS NC, SMALES C, SAVAGE FJ, HEMBRY RM, BOULES PB (1995) The distribution of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in colorectal cancer. *Brit. J Cancer 81: 287-293*

GANSER GL, STRICKLIN GP, MATRISIAN LM (1991) EGF und TGF alpha influence in vitro lung development by the induction of matrix-degrading metalloproteinases. *Int J Dev Biol 35: 453-461*

GAREWAL H (1995) Antioxidants in oral cancer prevention. *Am. J Clin. Nutr. 62: 1410S-1416S*

GATH HJ, BRAKENHOFF RH (1999) Minimal residual disease in head and neck cancer. *In: Kerbel RS, Hart I, Frost P (eds.) Cancer & Metastasis Reviews 18 (Kluwer Academic Publishers), pp.109-126*

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, FUJII A, KOMIYAMA T, OKAWA J, NAKAJIMA M (1996) Prognostic significance of circulating matrix metalloproteinase-2 to tissue inhibitor of metalloproteinase-2 ratio in recurrence of urothelial cancer after complete resection. *Cancer Res 56: 3196*

GOHJI K, FUJIMOTO N, OHKAWA J, FUJII A, NAKAJIMA M (1998) Imbalance between serum matrix metalloproteinase-2 and its inhibitor as a predictor of recurrence of urothelial cancer. *Br J Cancer 77: 650*

GOLDHABER P (1977) Oral manifestations of disease. *In: Harrison's principles of internal medicine. 8th ed. McGraw-Hill Book Company, New York-Düsseldorf etc.*

GOHLKE U, GOMIS RUTH FX, CRABBE T, MURPHY G, DOCHERTY AJ, BODE W (1996) The C-terminal (haemopexin-like) domain structure of human gelatinase A(MMP-2): structural implications for its function. *FEBS Lett 378: 126-130*

GOLUP LM, LEE HM, RYAN ME ET AL (1998) Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-anti-microbial mechanisms. *Adv Dent Res 12: 12-26*

GOMEZ DE, ALONSO FA, YOSHIJI H, THORGEIRSSON UP (1997) Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol 74: 111-122*

GOMIS-RUTH FX, MASKOS K, BETZ M, BERGNER A, HUBER R, SUZUKI K, YOSHIDA N, NAGASE H, BREW K, BOURENKOV GP, BARTUNIK H, BODE W (1997) Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature 389: 77*

GONZALES MV, PELLO MF, LOPEZ-LARREA C, SUAREZ C, MENENDEZ MJ, COTO E (1995) Loss of heterozygosity and mutation analysis of the p16 (9p21) and p53 (17p13) genes in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res 1: 1043-1049*

GRANDIS JR, TWEARDY D (1993) Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res 53: 3579-3584*

GRANDIS JR, MELHEM MF, GOODING WE ET AL (1998) Levels of TGE-a and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst 90(11): 824-832*

GREENE J, WANG M, LIU YE, RAYMOND LA, ROSEN C, SHI YE (1996) Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J Biol Chem 271: 30375-30380*

GRIGNON DJ, SAKR W, TOTH M, RAVERY V, ANGULO J, SHAMSA F, PONTES JE, CRISSMAN JC, FRIDMAN R (1996) High levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) expression are associated with poor outcome in invasive bladder cancer. *Cancer Res 56: 1654*

GUEDEZ L, MANSOOR A, BIRKEDAL-HANSEN B, LIM MS, FUKUSHIMA P, VENZON D, STETLER-STEVENSON WG, STETLER-STEVENSON M (2001) Tissue inhibitor of metalloproteinase1 regulation of interleukin-10 in B-cell differentiation and lymphomagenesis. *Blood 97: 1796-1802*

GUO H, MAJMUDAR G, JENSEN TC, BISWAS C, TOOLE BP, GORDON MK (1998) Characterization of the gene for human EMMPRIN, a tumor cell surface inducer of matrix metalloproteinases. *Gene 220: 99-108*

GUPTA PC, PINDBORG JJ, MEHTA FS (1982) Comparison of carcinogenicity of betel quid with and without tobacco: an epidemiologic review. *Ecology of Disease 1: 213-219*

HARTY LC, CAPSRASO NE, HAYES RB ET AL (1997) Alcohol dehydrogenase 3 genotype and risk of oral cavity and pharyngeal cancers. *J Natl Cancer Inst 89: 1698-1705*

HAYAKAWA T, YAMASHITA K, TANZAWA K, UCHIJIMA E, IWATA K (1992) Growth promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. *FEBS Lett 298: 29-32*

HAYASAKA A, SUZUKI N, FUJIMOTO N, IWAMA S, FUKUYAMA E, KANDA Y, SAISHO H (1996) Elevated plasma levels of matrix metalloproteinase-9 (92 kD type IV collagenase / gelatinase B) in hepatocellular carcinoma. *Hepatology 24 (5): 1058-1062*

HE Y, ZENG Q, DRENNING SD ET AL (1998) Inhibition of human squamous cell carcinoma growth in vivo by epidermal growth factor receptor antisense RNA transcribed from the U6 promotor. *90 (14): 1080-1087*

HEISSENBERG MC, GÖRÖGH T, LIPPERT BM, WERNER JA (1998) Metalloproteinases and their inhibitors in squamous cell carcinoma of the hypopharynx: indicators of individual tumor aggressiveness. *Otolaryng Polska 5: 521-526*

HIDALGO M, ECKHARDT SG (2001) Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J Natl Cancer Inst 93: 178-193*

HIMMELSTEIN BP, CANETE SOLER R, BERNHARD EJ, MUSCHEL RJ (1994) Induction of fibroblast 92 kDa gelatinase / type IV collagenase expression by direct contact with metastatic tumor cells. *J Cell Sci 107: 477-486*

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: 207-213*

IKEBE T, SHINOHARA M, TAKEUCHI H, BEPPU M, KURAHARA S, NAKAMURA S, SHIRASUNA K (1999) Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase in tumor tissues correlates with the invasiveness of oral cancer. *Clin Exp Metastasis 17 (4): 315-323*

IMPOLA U, UITTO VJ, HAKKINEN L, ZHANG L, LARJAVA H, ISAKA K, SAARIALHO-KERE U (2004) Differential expression of matrilysin-I (MMP-7), 92 kD gelatinase (MMP-9), and metalloelastase (MMP-12) in oral verrucous and squamous cell cancer. *J Pathol 202: 14-22*

INGMAN T, TERVAHARTIALA T, DING Y ET AL (1996) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J Clin Periodontol 23: 1127-1132*

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCERS (1985) Tobacco habits other than smoking: betel quid and areca nut chewing and some related nitrosamines. *In: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Lyon, IARC 37*

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCERS (1986) Tobacco smoking. *In: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans. Lyon, IARC 38*

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCERS (1988) Alcohol drinking. *In: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Lyon, IARC 44*

ITO A, SATO T, IGA T, MORI Y (1990) Tumor necrosis factor bifunctionally regulates matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) production by human fibroblasts. *FEBS Lett 269:93-95*

JARES P, FERNANDEZ PL, CAMPO E ET AL (1994) PRAD-1/cyclin D1 gene amplification correlates with messenger RNA overexpression and tumor progression in human laryngeal carcinomas. *Cancer Res 54: 4813-4817*

JEFFREY JJ (1991) Collagen and collagenase: pregnancy and parturition. *Semin Perinatol 15: 118-126*

JOHANSSON N, SAARIALHO-KERE U, AIROLA K, HERVA R, NISSINEN L, WESTERMARCK J, VUORIO E, HEINO J, KAHARI VM (1997) Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by hypertrophic chondrocytes, periosteal cells, and osteoblasts during human fetal bone development. *Dev Dyn 208(3): 387-397*

JOHNSEN M, LUND LR, RØMER J, ALMHOLT K, DANØ K (1998) Cancer invasion and tissue remodelling: commen themes in proteolytic matrix degradation. *Curr Opin Cell Biol 10: 667-671*

JOHNSON MD, KIM HR, CHESLER L, TSAO-WU G, BOUCK N, POLVERINI PJ (1994) Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase. *J Cell Physiol 160: 194-202*

JONES AS, ROLAND NJ, FIELD JK, PHILLIPS DE (1994) The level of cervical lymph node metastases: their prognostic relevance and relationship with head and neck squamous carcinoma primary sites. *Clin Otolaryngol 19: 63-69*

JUSSAWALLA DJ, DESHPANDE VA (1971)

KAHARI VM, SAARIALHO-KERE U (1997) Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol 6: 199-213*

KANAYAMA H, YOKOTA K, KUROKAWA Y, MURAKAMI Y, NISHITANI M, KAGAWA S (1998) Prognostic values of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in bladder cancer. *Cancer (Phila.), 82: 1359-1366*

KANNO N, NONOMURA N, MIKI T ET AL (1998) Effects of epidermal growth factor on the invasion activity of the bladder cancer cell line. *J Urology 159: 586-590*

KATAOKA H, DE CASTRO R, ZUCKER S, BISWAS C (1993) Tumor cell-derived collagenase-stimulatory factor increases expression of interstinal collagenase, stromelysin, and 72-kDa gelatinase. *Cancer Res 53: 3154-3158*

KATAYAMA A, BANDOH N, KISHIBE K, TAKAHARA M, OGINO T, NONAKA S, HARABUCHI Y (2004) Expression of matrix metalloproteinases in early-stage oral squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastases and prognosis. *Clin Cancer Res 10: 634-640*

KAWAMATA H, KAMEYAMA S, KAWAI K, TANAKA Y, NAN L, BARCH DH, STETLER-STEVENSON WG, OYASU R (1995) Marked ….

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, SHINOMIYA T, YASUDA N, TAKENAKA H, MURAKAMI Y (1996) Matrix metalloproteinase-2 concentrations in squamous cell carcinoma of head and neck and its clinical significance. *Nippon Jibiinkoka Gakkai kaiho 99: 299-305*

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*

KEYSZER G, LAMBIRI I, KEYSSER M, KEYSSER C, NAGEL R, BURMESTER GR, JUNG K (1998) Matrix metalloproteinases, but not cathepsins B, H and L or their inhibitors in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis are potentially useful merkers of disease activity. *Z. Rheumatol. 57: 392-398*

KIKUCHI R, NOGUCHI T, TAKENO S, KUBO N, UCHIDA Y (2000) Immunohistochemical detection of membrane-type-1-matrix metalloproteinase in colorectal carcinoma. *Br. J. Cancer, 83: 215-218*

KIRKEGAARD T, HANSEN A, BRUUN E, BRYNSKOV J (2004) Expression and localisation of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in fistulae of patients with Crohn`s disease. *Gut 53: 701-709*

KLEINER DE, STETLER-STEVENSON WG (1999) Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol 43(Suppl): S42-S51*

KORNFELD JW, MEDER S, WOHLBERG M, FRIEDRICH RE, RAU T, RIETHDORF L, LÖNING T, PANTEL K, RIETHDORF S. Overexpression of TACE and TIMP3 mRNA in head and neck cancer: association with tumour development and progression.
Br J Cancer. 2011 Jan 4;104(1):138-45.

KRAMER IRH, EL-LABLAN D, LEE KW (1978) The clinical features and risk of malignant transformation in sublingual keratosis. *Br Dent J 144: 171-180*

KRAUSE CJ, LEE JG, MC CABE BF (1973) Carcinoma of the oral cavity. *Arch Otolaryngol 97: 354-358*

KURAHARA S, SHINOHARA M, IKEBE T, NAKAMURA S, BEPPU M, HIRAKI A, TAKEUCHI H, SHIRASUNA K (1999) Expression of MMPs, MT-MMPs, and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumor invasion and metastasis. *Head Neck 21 (7): 627-628*

KUSANO K, MIYAURA C, INADA M ET AL (1998) Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, -13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption. *Endocrinology 139: 1338-1345*

KUSUKAWA J, SASAGURI Y, SHIMA I, KAMEYAMA T, MORIMATSU M (1993) Expression of matrix metalloproteinase-2 related to lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. A clinicopathologic study. *Am J Clin Pathol 99 (1): 18-23*

KYOMOTO R, KUMAZAWA H, TODA Y ET AL (1997) Cyclin D1 gene amplification is a more potent prognostic factor than its protein overexpression in human head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer 74: 576-581*

LAFLEUR MA, HANDSLEY MM, EDWARDS DR (2003) Metalloproteinases and their inhibitors in angiogenesis. *Exp Rev Mol Med 5: 1-39*

LAMOREAUX WJ, FITZGERALD MEC, REINER A ET AL (1998) Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro. *Microvascular Res 55: 29-42*

LEONARD JH, KEARSLEY JH, CHENEVIX-TRENCH G, HAYWARD NK (1991) Analysis of gene amplification in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer 48: 511-515*

LIOTTA LA, TRYGGVASON K, GARBISA S, HART I, FOLTZ CM, SHAFIE S (1980) Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature 284: 67-68*

LIOTTA LA, STETLER-STEVENSON WG (1993) Principles of molecular cell biology of cancer. *In: Cancer, Principles and Practice of Oncology, VT DeVita, S Hellman, and SA Rosenberg, editors. Lippincott Co.: Philadelphia. p. 134-149*

LO YM, CHAN LY, LO KW ET AL (1999) Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr virus DNA in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res 59: 1188-1191*

LOVEJOY B, CLEASBY A, HASSEL AM, LONGLEY K, LUTHER MA, WEIGL D, MCGEEHAN G, MCELROY AB, DREWRY D, LAMBERT MH, JORDAN JR (1994) Structure of the catalytic domain of fibroblast collagenase complexed with an inhibitor. *Science 263: 375-377*

LUI EL, LOO WT, ZHU L, CHEUNG MN, CHOW LW (2005) DNA hyper-methylation of TIMP3 gene in invasive breast ductal carcinoma. *Biomed Pharmacother 59 Suppl 2: S363-5*

MAGARY SP, RYAN MW, TARNUZZER RW, KORNBERG L (2000) Expression of matrix metalloproteinases in laryngeal and pharyngeal squamous cell carcinoma: A quantitative analysis. *Otolaryngol Head Neck Surg 122(5): 712-716*

MAO EJ, SMITH CJ (1993) Detection of Epstein-Barr virus (EBV) DNA by the polymerase chain reaction (PCR) in oral mucosa of healthy individuals and patients with squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med 22: 12-17*

MARCHENKO GN, MARCHENKO ND, STRONGIN AY (2003) The human and mouse matrix metalloproteinase MMP-21: structure and the regulation of the gene and the protein. *Biochem J Mar 5*

MARTIN SA, MARKS JE, LEE JY, BAUER WC, OGURA JH (1980) Carcinoma of the pyriform sinus: Predictors of TNM relapse and survival. *Cancer 46: 1974-1981*

MATRISIAN LM (1990) Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodelling: Trends. *Genet 6(4): 121-125*

MASHBERG A, MORRISSEY JB, GARFINKEL L (1973)

MASHBERG A, SAMIT A (1995) Early diagnosis of asymptomatic oral and oropharyngeal squamous cancers. *CA. Cancer J Clin. 45: 328-351*

MAZZIERI R, MASIERO L, ZANETTA L (1997) Control of type IV collagenase activity by components of the urokinase-plasmin system: a regulatory mechanism with cell-bound reactants. *EMBO J 16: 2319-2332*

MCGUIRT WF, MATTHEWS B, KOUFMAN A (1982) Multiple simultaneous tumors in patients with head and neck cancer. A prospective, sequential panendoscopic study. *Cancer 50: 1195-1199*

MENDELSON BC, WOODS JE, BEAHRS OH (1976) Neck dissection in the treatment of carcinoma of the anterior two-thirds of the tongue. *Surg Gynal Obstet 143: 75-80*

MERCHANT A, HUSAIN SSM, HOSAIN M ET AL (2000) Paan without tobacco: an independent risk factor for oral cancer. *Int J Cancer 86:128-131*

MEREDITH SD, LEVINE PA, BURNS JA ET AL (1995) Chromosome 11q13 amplification in head and neck squamous cell carcinoma: association with poor prognosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg 121: 790-794*

METHA FS, HAMMNER III JE (1993) eds. In: Tobacco-related oral mucosal lesions and conditions in India. Basic Dental Research Unit, TIFR, Mumbai, 1993

MIGNATTI P, RIFKIN DB (1993) Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev 73: 161-195*

MIRACCA EC, KOWALSKI LP, NAGAI MA (1999) High prevalence of p16 genetic alterations in head and neck tumours. *Br J Cancer 81: 677-683*

MIYAJIMA Y, NAKANO R, MORIMATSU M (1995) Analysis of expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 in hypopharyngeal squamous cell carcinoma by in situ hybridization. *Ann Otol Rhinol Laryngol 104 (9 Pt 1): 678-684*

MIYAZAKI T, KATO H, NAKAJIMA M, FARIED A, TAKITA J, SOHDA M, FUKAI Y, YAMAGUCHI S, MASUDA N, MANDA R, FUKUCHI M, OJIMA H, TSUKADA K, KUWANO H (2004) An immunohistochemical study of TIMP-3 expression in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer 91: 1556-1560*

MOHAMMED FF, et al. (2004) *Nat. Genet. 36: 969-977*

MOILANEN M, PIRILÄ E, GRENMAN R ET AL (2002) Expression and regulation of collagenase-2 (MMP-8) in head and neck squamous cell carcinomas. *J Pathol 197: 72-81*

MURASHIGE M, MIYAHARA M, SHIRAISHI N, SAITO T, KOHNO K, KOBAYASHI M (1996) Enhanced expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in human colorectal tumors. *Jpn J Clin Oncol 26: 303-309*

MURPHY G, HOUBRECHTS A, COCKETT MI, WILLIAMSON RAO, O'SHEA M, DOCHERTY A (1991) The N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases retains metalloproteinase inhibitory activity. *Biochemistry 30: 8097-8102*

MURPHY G, ALLAN JA, WILLENBROCK F, COCKETT MI, O'CONNELL JP, DOCHERTY AJ (1992) The role of the C-terminal domain in collagenase and stromelysin specificity. *J Biol Chem 267: 9612-9618*

MURPHY G, KNÄUPER V (1997) Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain? *Matrix Biol 15: 511-518*

NAGASE H (1997) Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem 378: 151-160*

NAGPAL JK, MISHRA R, DAS BR (2002) Activation of Stat-3 as one of the early events in Tobacco Chewing Mediated Oral Carcinogenesis. *Cancer 94 (9): 2393-2400*

NAGPAL JK, PATNAIK S, DAS BR (2002) Prevalence of high-risk Human Papilloma Virus Types and its association with p53 Codon-72 polymorphism in tobacco addicted Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) patients of Eastern India. *Int J Cancer 97: 649-653*

NAKAGAWA H, YAGIHASHI S (1994) Expression of type IV collagen and its degrading enzymes in squamous cell carcinoma of the lung. *Jpn. J Cancer Res. 85: 934-938*

NAKANO T, SCOTT PG (1986) Purification and characterization of a gelatinase produced by fibroblasts from human gingiva. *Biochem Cell Biol 64(5): 387-393*

NEGRI E, FRANCESCHI S, BOSETTI C ET AL (2000) Selected micronutrients and oral and pharyngeal cancer. *Int J Cancer 86: 122-127*

NEVILLE BW, DAMM DD, ALLEN CM, BOUQUOT JE (1995) Squamous cell carcinoma. *In: Neville BW (ed) Oral and maxillofacial pathology. Saunders Company, Philadelphia*

NOTANI PN, JAYANT K (1987) Role of diet in upper aerodigestive tract cancer. *Nutr Cancer 10: 103-113*

NOLTENIUS H (1987) Pathologie und Klinik der menschlichen Tumoren. *Tumorhandbuch Band 2. Urban & Schwarzenberg. München, Wien, Baltimore.*

NYBERG P, MOILANEN M, PAJU A ET AL (2002) MMP-9 activation by tumor trypsin-2 enhances in vivo invasionof human tongue carcinoma cells. *J Dent Res 81: 831-835*

NYBERG P, HEIKKILÄ P, SORSA T ET AL (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: 22404-22410*

O-CHAROENRAT, RHYS-EVANS PH, ECCLES SA (2001) Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors correlates with invasion and metastases in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg 127: 813-820*

OHASHI K, NEMOTO T, NAKAMURA K, NEMORI R (2000) Increased expression of matrix-metalloproteinase 7 and 9 and membrane type 1 matrix metalloproteinase in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer 88 (10): 2201-2209*

OVERALL CM, WRANA JL, SODEK J (1991) Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase / type IV collagenase by transforming growth factor-1 in human fibroblasts. *J Biol Chem 266: 14064-14071*

OVERALL CM (1994) Regulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase expression. *Ann NY Acad Sci 732: 51-64*

OVERALL CM, LOPEZ-OTIN C (2002) Strategies for MMP Inhibition in cancer: Innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer 2: 657-671*

PACHECO MM, KOWALSKI LP, NISHIMOTO IN, BRNTANI MM (2002) Differential expression c-jun and c-fos mRNAs in squamous cell carcinomas of the head and neck: association with uPa, gelatinase B, and matrilysin mRNAs. *Head Neck 24 (1): 24-32*

PAGE RC (1991) The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res 26(3 Pt 2): 230-242*

PANTEL K, BRAKENHOFF RH (2004) Dissecting the metastatic cascade. *Nature Reviews Cancer 4: 448-456*

PANTEL K, GATH HJ, HEISSLER E (1995) Micrometastasis in head and neck cancer. *(Letter) N Engl J Med 332: 1788*

PAPADIMITRAKOPOULOU V, IZZO J, LIPPMAN SM ET AL (1997) Frequent inactivation of p16INK4a in oral premalignant lesions. *Oncogene 14: 1799-1803*

PARTRIDGE M, PHILLIPS E, FRANCIS R, LI SR (1999) Immunomagnetic separation for enrichment and sensitive detection of disseminated tumour cells in patients with head and neck SCC. *J Pathol 189: 368-377*

PATERSON IC, EVESON JW, PRIME SS (1996) Molecular changes in oral cancer may reflect etiology and ethnic origin. *Oral Oncol Eur J Cancer 32B: 150-153*

PAVLOFF N, STASKUS PW, KISHNANI NS, HAWKES SP (1992) A new inhibitor of metalloproteinase from chicken: TIMP-3. *J Biol Chem 267: 17321-17071*

PAZ JB, COOK N, ODOM-MARYON T ET AL (1997) Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer: an association of HPV-16 with squamous cell carcinoma of Waldeyer's tonsillar ring. *Cancer 9: 595-604*

PINDBORG JJ, MURTI PR, BHONSLE RB ET AL (1984) Oral submucous fibrosis as pre-cancerous condition. *Scand J Dent Res 92: 224-229*

PLUDA JM (1997) Tumor-associated angiogenesis: mechanisms, clinical implications and therapeutic strategies. *Seminars in Oncology 24: 203-218*

POWE DG, BROUGH JL, CARTER GI, BAILEY EM, STETLER-STEVENSON WG, TURNER DR, HEWITT RE (1997) TIMP-3 mRNA expression is regionally increased in moderately and poorly differentiated colorectal adenocarcinoma. *Br J Cancer 75: 1678-1683*

Practice Guidelines for Squamous Cell Cancers of the Head and Neck. *Philadelphia: National Comprehensive Cancer Network, 2000*

PRESTON-MARTIN S, HENDERSON BE, PIKE MC (1982) Descriptive epidemiology of cancers of the upper respiratory tract in Los Angeles. *Cancer 49: 2201-2207*

PRIME SS, EVESON JW, GUEST PG, PARKINSON EK, PATERSON IC (1997) Early genetic and functional events in thepathogenesis of oral cancer. *Radiat Oncol Investig 5: 93-96*

QI JH, EBRAHEM Q, MOORE N, MURPHY G, CLAESSON-WELSH L, BOND M, BAKER A, ANAND-APTE B (2003) A novel function for tissue inhibitor of

metalloproteinases-3 (TIMP-3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2. *Nat Med 9: 407-415*

RAMCHANDANI AG, D'SOUZA AV, BORGES AM ET AL (1998) Evaluation of carcinogenic / co-carcinogenic activity of a common chewing product, Pan Masala, in mouse skin, stomach and esophagus. *Int J Cancer 75: 225-232*

RAY JM, STETLER-STEVENSON WG (1995) Gelatinase A activity directly modulates melanoma cell adhesion and spreading. *EMBO J 14: 908-917*

REED AL, CALIFANO JA, CAIRNS P, WESTRA WH, JONES RM, KOCH W, AHRENDT S, EBY Y, SEWELL D, NAWROZ H, BARTEK J, SIDRANSKY D (1996) High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res 56: 3630-3633*

RHEE JS, DIAZ R, KORETS L, GRAEME HODGSON J, COUSSENS LM (2004) TIMP-1 alters susceptibility to carcinogenesis. *Cancer Res. 64: 952-961*

RIEDEL F, GOTTE K, SCHWALB J, BERGLER W, HORMANN K (2000) Expression of 92-kDa type IV collagenase correlates with angiogenic markers and poor survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Oncol 17 (6): 1099-1105*

RIEDEL F, GOTTE K, SCHWALB J, HORMANN K (2000) Serum levels of matrix metalloproteinase-2 and -9 in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res 20: 3045-3049*

ROBBINS KT, KUMAR P, REGINE WF ET AL (1997) Efficacy of targeted supradose cisplatin and concomitant radiation therapy for advanced head and neck cancer: the Memphis experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys 38: 263-271*

RUBIN GJ, TWEARDY DJ, MELHEM MF (1998) Asynchronous modulation of transforming growth factor-a and epidermal growth factor receptor protein expression in progression of premalignant lesions in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res 4: 13-20*

SALMELA MT, KARJALAINEN-LINDSBERG ML, PUOLAKKAINEN P, SAARIALHO-KERE U (2001) Upregulation and differential expression of matrilysin (MMP-7) and metalloelastase (MMP-12) and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-3 in Barrett's oesophageal adenocarcinoma. *Brit J Canc. 85: 383-392*

SALO T, LIOTTA LA, KESKI-OJA J ET AL (1982) Secretion of basement membrane collagen degrading enzyme and plasminogen activator by transformed cells – role in metastases. *Int J Cancer 30: 669-673*

SANG QX, BIRKEDAL-HANSEN H, VAN WART HE (1995) Proteolytic and non-proteolytic activation of human neutrophil progelatinase B. *Biochem Biophys Acta 1251: 99-108*

SARANATH D, PANCHAL RG, NAIR R ET AL (1989) Oncogene amplification in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Jpn J Cancer Res 80: 430-437*

SARANATH D, PANCHAL RG, NAIR R ET AL (1992) Amplification and overexpression of Epidermal Growth Factor Receptor gene in human oropharyngeal cancer. *Oral Oncol Eur J Cancer 29B: 139-143*

SARANATH D, TANDLE AT, TENI TR ET AL (1999) p53 inactivation in chewing tobacco induced oral cancers and leukoplakias from India. *Oral Oncol Eur J Cancer 35: 242-250*

SCHEPMAN KP, VAN DER WAAL I (1995) A proposal for classification and *31B: 396-398*

SCHMALBACH CE, CHEPEHA DB, GIORDANO TJ, RUBIN MA, TEKNOS TN, BRADFORD CR, WOLF GT, KUICK R, MISEK DE, TRASK DK, HANASH S (2004) Molecular profiling and the identification of genes associated with metastatic oral cavity/pharynx squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 130: 295-302*

SCHMIDT M, POLEDNIK C, HOPPE F (1999) Proteolytic patterns of head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol 256: 346-350*

SCHROHL AS, CHRISTENSEN IJ, PEDERSEN AN, JENSEN V, MOURIDSEN H, MURPHY G, FOEKENS JA, BRUNNER N, HOLTEN-ANDERSEN MN (2003) Tumor tissue concentrations of the proteinase inhibitors tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) and plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) are complementary in determining prognosis in primary breast cancer. *Mol Cell Proteomics 2: 164-172*

SCULLY C, FIELD JK, TANZAWA H (2000) Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 2: chromosomal aberrations. *Oral Oncol 36: 311-327*

SELTZER JL, ADAMS SA, GRANT GA, EISEN AZ (1981) Purification and properties of a gelatin-specific neutral protease from human skin. *J Biol Chem 256(9): 4662-4668*

SHAH JP, CANDELA FC, PODDAR AK (1990) The patterns of cervical lymph node metastases from squamous carcinoma of the oral cavity. *Cancer 66: 109-113*

SHAPIRO SD, CAMPBELL EJ, KOBAYASHI DK, WELGUS HG (1991) Dexamethasone selectively modulates basal and lipopolysaccharide-induced metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase production by human alveolar macrophages. *J Immunol 146: 2724-2729*

SILVERMAN S, GORSKY M, LOZADA F (1984) Oral leukoplakia and malignant transformation: a follow-up study. *Cancer 53: 563-568*

SLAUGHTER DP, SOUTHWICK HW, SMEJKAL W (1953) Field cancerization in oral stratified squamous epithelium: clinical implications of multicentric origin. *Cancer 6: 963-968*

SNOW GB, BOOM RP, DELEMARRE JF, BANGERT JA (1977) Squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Clin Otolaryngol 2: 93-103*

SOPATA I, WIZE J (1979) A latent gelatin-specific proteinase of human leucocytes and its activation. *Biochem Biophys Acta 571(2): 305-312*

SORSA T, SALO T, KOIVUNEN E (1997) Activation of type IV pro-collagenases by human tumor-associated trypsin-2. *J Biol Chem 272: 21067-21074*

SORSA T, TJÄDERHANE L, SALO T (2004) Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Diseases 10: 311-318*

SPAFFORD MF, KOCH WM, REED AL, CALIFANO JA, XU LH, EISENBERGER CF, YIP L, LEONG PL, WU L, LIU SX, JERONIMO C, WESTRA WH, SIDRANSKY D (2001) Detection of head and neck squamous cell carcinoma among exfoliated oral mucosal cells by microsatellite analysis. *Clin Cancer Res 7: 607-610*

STADLER P, FELDMANN HJ, CREIGHTON C, ZEILHOFFER HF, ZIMMERMANN V, SCHMITT M, MOLLS M (2000) Clinical evidence for correlation in insufficient tissue oxygen supply (hypoxia) and tumor-associated proteolysis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Int J Biol Markers 15: 235-235*

STETLER-STEVENSON WG, KRUTZSCH HC, LIOTTA LA (1989) Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J Biol Chem 264: 17374-17378*

STETLER-STEVENSON WG, AZNAVOORIAN S, LIOTTA LA (1993) Tumor cell interactions with the extracellularmatrix during invasion and metastasis. *Ann Rev Cell Biol 9: 541-573*

STERNLICHT MD ET AL (1999) The stromal proteinase MMP-3 / stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell 98: 137-146*

STERNLICHT MD, WERB Z (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol 17: 463-516*

STOKER M, GHERARDI E (1991) Regulation of cell movement: the motogenic cytokines. *Biochem Biophys Acta 1072: 81-102*

STRICKLIN GP, WELGUS HG (1983) Human skin fibroblast collagenase inhibitors: purification and biochemical characterization. *J Biol Chem 258: 12252-12258*

STRONGIN AY, COLLIER IE, KRASNOV PA, GENRICH LT, MARMER BL, GOLDBERG GI (1993) Human 92 kDa type IV collagenase: functional analysis of fibronectin and carboxyl-end domains. *Kidney Int 43: 158-162*

STUPP R, WEICHSELBAUM RR, VOKES EE (1994) Combined modality therapy of head and neck cancer. *Semin Oncol 21: 349-358*

SUTINEN M, KAINULAINEN T, HURSKAINEN T ET AL (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*

SZPAK CA, STONE MJ, FRENKEL EP (1977) Some observations concerning the demographic and geographic incidence of carcinoma of the lip and buccal cavity. *Cancer 40: 343-348*

TAYLOR AND FRANCIS (2006) Prognosis in Head and Neck Cancer (mit Beiträgen von L. van Velthuysen and T. Löning).

THOMAS GT, LEWIS MO, SPEIGHT PM (1999) Matrix metalloproteinases and oral cancer. *Oral Oncol 35: 227-233*

THORBAN S, RODER JD, NEKARDA H, FUNK A, SIEWERT JR, PANTEL K (1996) Immunocytochemical detection of disseminated tumor cells in bone marrow of patients with esophageal cancer. *J Natl Cancer Inst 88: 1222-1227*

THORGEIRSSON UP, YOSHIJI H, SINHA CC, GOMEZ DE (1996) Breast cancer; tumor neovasculature and the effect of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) on angiogenesis. *In Vivo 10: 137-144*

TOKUMARU 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, TOKUMARU 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 membran type-1 MMP (MT1-MMP) in human head and neck cancer cells. *Cancer Lett 156: 83-91*

TOTH M, GERVASI DC, FRIDMAN R (1997) Phorbol ester-induced cell surface association of matrix metalloproteinase-9 in human MCF10A breast epithelial cells. *Cancer Res 57: 3159-3167*

TYAGI SC (1997) Proteinases and myocardial extracellular matrix turnover. *Molecular and Cellular Biochemistry 168: 1-12*

UITTO VJ, AIROLA K, VAALAMO M, JOHANSSON N, PUTNINS EE, FIRTH JD, SALONEN J, LOPEZ-OTIN C, SAARIALHO-KERE U, KAHARI VM (1998) Collagenase-3 (matrix-metalloproteinase-13) expression is induced in oral mucosa epithelium during chronic inflammation. *Am J Pathol 152(6): 1489*

UITTO VJ, OVERALL CM, MCCULLOCH C (2003) Proteolytic host enzymes in gingival crevice fluid. *Periodontology 2000 31: 77-104*

VÄÄNÄNEN A, SRINIVAS R, PARIKKA M ET AL (2001) Expression and regulation of MMP-20 in human tongue carcinoma cells. *J Dent Res 80: 1884-1889*

VAS'KOVASKAIA GP, ABRAMOVA EI (1981) Cancer development from lichen planus on the oral and labial mucosa. *Stomatologiia (Mosk) 40: 46-48*

WAGENER C. Molekulare Onkologie; Georg Thieme Verlag
-6, -16, -27, -43, -78, -107, -108, -194, -197

WANG H, KEISER JA (1998) Vascular endothelial growth factor upregulates the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells – Role of flt-1. *Circ Res 83: 832-840*

WANG Z, JUTTERMANN R, SOLOWAY PD (2000) TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 in vivo. *J Biol Chem 275: 26411-26415*

WASYLYK C, GUTMAN A, NICHOLSON R, WASYLYK B (1991) The c-Ets oncoprotein activates the stromelysin promoter through the same elements as several non-nuclear oncoproteins. *EMBO J 10: 1127-1134*

WERNER JA, RATHCKE IO, MANDIC R (2002) The role of matrix metalloproteinases in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Exp Metastas 19: 275-282*

WHITTAKER M, FLOYD CD, BROWN P, GEARING AJ (1999) Design and therapeutic application of matrix metalloproteinase inhibitors. *Chem Rev 99: 2735-2776*

WHO Classification of Tumours, Pathology and Genetics. Head and Neck Tumours. Mit Beiträgen von T. Löhning und T. Jäkel. IARC Press 2005.

WILLIAMSON RA, MARSTON FAO, ANGAL S, KOKLITIS P, PANICO M, MORRIS HR, CARNE AF, SMITH BJ, HARRIS TJR, FREEDMAN RB (1990) Disulphide bond assignment in human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP). *Biochem J 268: 267-274*

WITTEKIND CH, MEYER HJ, BOOTZ F: UICC TNM-Klassifikation maligner Tumoren, *6. Auflage, Springer (2002)*

WORSHAM MJ, CHEN KM, MEDURI V, NYGREN AO, ERRAMI A, SCHOUTEN JP, BENNINGER MS (2006) Epigenetic events of disease progression in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg 132: 668-77*

WU ZS, WU Q, YANG JH, WANG HQ, DING XD, YANG F, XU XC (2008) Prognostic significance of MMP-9 and TIMP-1 serum and tissue expression in breast cancer. *Int J Cancer 122: 2050-6*

XU J, GIMENEZ-CONTI IB, CUNNINGHAM JE, COLLET AM, LUNA MA, LANFRANCHI HE, SPITZ MR, CONTI CJ (1998) Alterations of p53, cyclin D1, Rb, and H-ras in human oral carcinmas related to tobacco use. *Cancer 83: 204-212*

XU Q, STAMENKOVIC I (1999) Lokalization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev 13: 35-48*

XU YP, ZHAO XQ, SOMMER K, MOUBAYED P (2003) Correlation of matrix metalloproteinase-2, -9, tissue inhibitor-1 of matrix metalloproteinase and CD44 variant 6 in head and neck cancer metastasis. *J Zhejiang Univ Sci 4 (4): 491-501*

YAMADA E, TOBE T, YAMADA H, OKAMOTO N, ZACK DJ, WERB Z, SOLOWAY PD, CAMPOCHIARO PA (2001) TIMP-1 promotes VEGF-induced neovascularization in the retina. *Histol Histopathol 16: 87-97*

YANG TT, HAWKES SP (1992) Role of the 21-kDa protein TIMP-3 in oncogenic transformation of cultered chicken embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA 89: 10676-10680*

YORIOKA CW, COLETTA RD, ALVES F ET AL (2002) Matrix metalloproteinase-2 and -9 activities correlate with disease-free survival of oral squamous cell carcinoma patients. *Int J Oncol 20: 189-194*

YOSHIZAKI T, MARUYAMA Y, SATO H, FURUKAWA M (2001) Expression of Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinase-2 correlates with activation of Matrix Metalloproteinase-2 and predicts poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.) 95: 44-50*

ZARIDZE DG, BLETTNER M, TRAPEZNIKOV NN, KUVSHINOV JP, MATIAKIN EG, POLJAKOV BP, PODDUBNI BK, PARSHIKOVA SM, ROTTENBERG VI, CHAMRAKULOV FS, CHODJAEVA MC, STICH HF, ROSIN MP, THURNHAM DI, HOFFMANN D, BRUNNEMANN KD (1985) Survey of a population with a high incidence of oral and oesophageal cancer. *Int J Cancer 36: 153-158*

ZBÄREN P, LEHMANN W (1987) Frequency and site of distant metastases in head and neck squamous cell carcinoma. An analysis of 101 cases at autopsy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg 113: 762-764*

ZUCKER S, BISWAS C (1994) Tumour collagenase-stimulating factor: a paracrine stimulator of fibroblast production of matrix metalloproteinases in cancer. *Bull Inst Pasteur 92: 284-290*

ZUCKER S, MIRZA H, CONNER CE (1998) Vascular endothelial growth factor induces tissue factor and matrix metalloproteinase production in endothelial cells – conversion of prothrombin to thrombin results in progelatinase A activation and cell proliferation. *Internat J Cancer 75: 780-786*

ZUCKER S, CAO J, CHEN WT (2000) Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment. *Oncogene 19: 6642-6650*

X. Anhänge

10.1. Lebenslauf

10.2. Danksagung

Prof. Dr. Klaus Pantel möchte ich für die Bereitstellung des Themas und für die Möglichkeit zur Fertigstellung dieser Arbeit danken.

Besonders danke ich PD Dr. Sabine Riethdorf, für ihre liebevolle und ausdauernde Begleitung bei dieser Dissertation.

Danken möchte ich auch Jan Wilhelm Kornfeld, Malgorzata Stoupiec und Dr. Lutz Riethdorf für ihre Hilfe und Unterstützung.

Ganz besonderer Dank geht an meine über alles geliebte Familie und meine grosse Liebe und besten Freund Adrian, die immer an mich glauben und mir Kraft und Mut geben, meine Träume und Ziele zu verwirklichen.

10.3. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdruücklich, dass ich die Arbeit selbstständig 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 nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: ……..