

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik - Innenstadt

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Wolf Mutschler

**Immunhistochemischer Nachweis von Matrix
Metalloproteinase-9 in Primärtumoren von operablen nicht-
kleinzelligen Bronchialkarzinomen: Optimierung der Methodik und
Untersuchung der klinischen Bedeutung**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Joe Hellers

aus

Luxemburg

Jahr

2009

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolf Mutschler

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Rudolf Hatz

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. rer. nat. Heiko Hermeking

Dekan: Priv. Doz. Dr. med. Wulf Siemel

Tag der mündlichen
Prüfung: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

15.10.2009

Meinen lieben Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung:	5
1.1 Das Bronchialkarzinom:.....	5
1.2 Die Matrix Metalloproteinasen:.....	10
1.3 Matrix Metalloproteinase 9:.....	18
2. Fragestellung:	20
3. Patienten und Methoden:	22
3.1. Patienten:.....	22
3.2. Immunhistochemische Analyse:.....	30
Immunhistochemische Nachweismethoden:	30
Methoden der Paraffinvorbehandlung:	34
Anti-MMP-9 Antikörper:.....	35
Protokoll der immunhistochemischen Färbung:.....	38
3.3. Evaluation der Proben:	44
3.4. Statistische Analyse:.....	48
4. Ergebnisse:	50
4.1. Antikörper:.....	51
4.2. Vorbehandlung:.....	54
4.3. Evaluation der immunhistochemisch gefärbten Proben:.....	56
4.4. Überlebensanalysen:.....	66
4.5. Multivariate Analyse:.....	82
5. Diskussion:	84
6. Zusammenfassung:	102
7. Literaturverzeichnis:	105
8. Abkürzungsverzeichnis:	119
9. Lebenslauf:	121
10. Danksagung:	123

1. Einleitung

1.1. Das Bronchialkarzinom

Bronchialkarzinome stellen heute in den westlichen Industrieländern die häufigste Krebstodesursache in allen ethnischen Gruppen dar.^{48,49,98} Sie machen etwa 25 Prozent aller Karzinome aus. Das Bronchialkarzinom ist bei den Männern für ca. ein Drittel und bei den Frauen für knapp 10 Prozent aller Krebstodesfälle verantwortlich. Die Zahl der Neuerkrankungen in Deutschland beträgt ca. 40.000 pro Jahr, entsprechend einer jährlichen Inzidenz von 52 Erkrankungen auf 100.000 Einwohner. Die Geschlechtsverteilung beträgt männlich zu weiblich 3 zu 1. Eine Ausnahme ist hierbei das Adenokarzinom, wo das weibliche Geschlecht mit einer Häufigkeit von 6 zu 1 überwiegt. Der Häufigkeitsgipfel liegt um das 55. bis 60. Lebensjahr. Das Bronchialkarzinom ist der weltweit zweithäufigste bösartige Tumor des Mannes nach dem Prostatakarzinom, während es bei Frauen in der Häufigkeit an dritter Stelle steht nach dem Mammakarzinom und dem Dickdarmkarzinom. Im zurückliegenden Jahrzehnt war die Zahl, der durch ein Bronchialkarzinom bedingten Todesfälle bei Männern leicht rückläufig. Die Sterberate lag zwischen 1985 und 1989 bei 52,4 und zwischen 1990 und 1994 bei 49,8 Todesfällen. Bei Männern zeigt die Sterberate seit 1988 eine leicht abnehmende Tendenz, während bei Frauen ein kontinuierlicher und rascher Anstieg der Mortalität an Bronchialkarzinomen zu verzeichnen ist (Abbildung 1).⁵⁸ Sie lag zwischen 1990 und 1994 bei 14,3 Todesfällen pro 100.000 und Jahr. Bei Frauen wird weiterhin eine starke Zunahme der Erkrankungshäufigkeit beobachtet. Wenn sich diese Entwicklung fortsetzt, könnte der Lungenkrebs bei Frauen vor dem Darmkrebs bald die zweithäufigste Krebstodesursache sein.

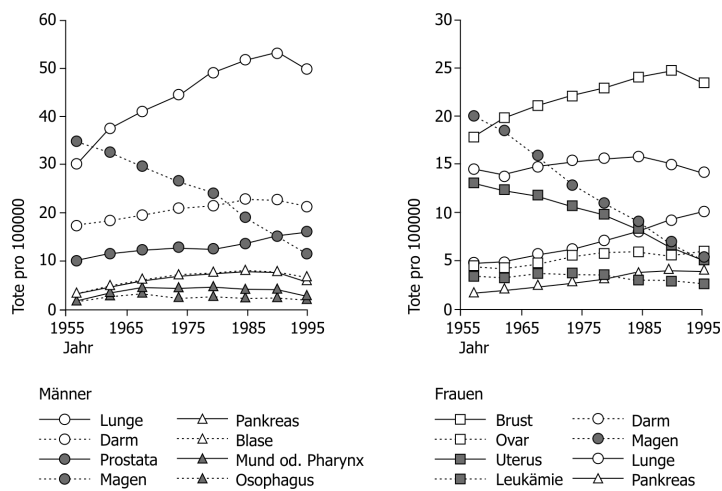


Abbildung 1: Entwicklung der Krebssterblichkeit in der EU

Der ätiologisch wichtigste Faktor für die Entstehung des Bronchialkarzinoms ist das inhalative Zigarettenrauchen. Die Zigarettenrauchinhalation ist für 85 Prozent der Bronchialkarzinome verantwortlich.⁴⁹ Der kausale Zusammenhang zwischen Zigarettenkonsum und Karzinomentwicklung ist insbesondere für das Plattenepithelkarzinom und das kleinzellige Karzinom belegt. Dagegen werden Adenokarzinome häufiger auch bei Nichtrauchern und Frauen nachgewiesen. Es besteht eine enge Beziehung zwischen Dauer und Menge des Rauchens und der Häufigkeit eines Bronchialkarzinoms.⁸⁸ Das Risiko, an einem Bronchialkarzinom zu erkranken, ist bei einem Zigarettenkonsum von mehr als 40 „packyears“ (1 „packyear“ entspricht 20 Zigaretten pro Tag während eines Jahres) im Vergleich zu Nichtrauchern um den Faktor 11 erhöht. Passivraucher scheinen ein allerdings nur geringgradig erhöhtes Risiko zu haben, an einem Bronchialkarzinom zu erkranken.⁶ Passivrauchen erhöht das Risiko für Bronchialkrebs um den Faktor 1,3–2,0. Andere pulmotrope Karzinogene sowie umweltbedingt Kanzerogene spielen bei der Lungenkrebsentstehung bei 15 Prozent eine Rolle (Abbildung 2).

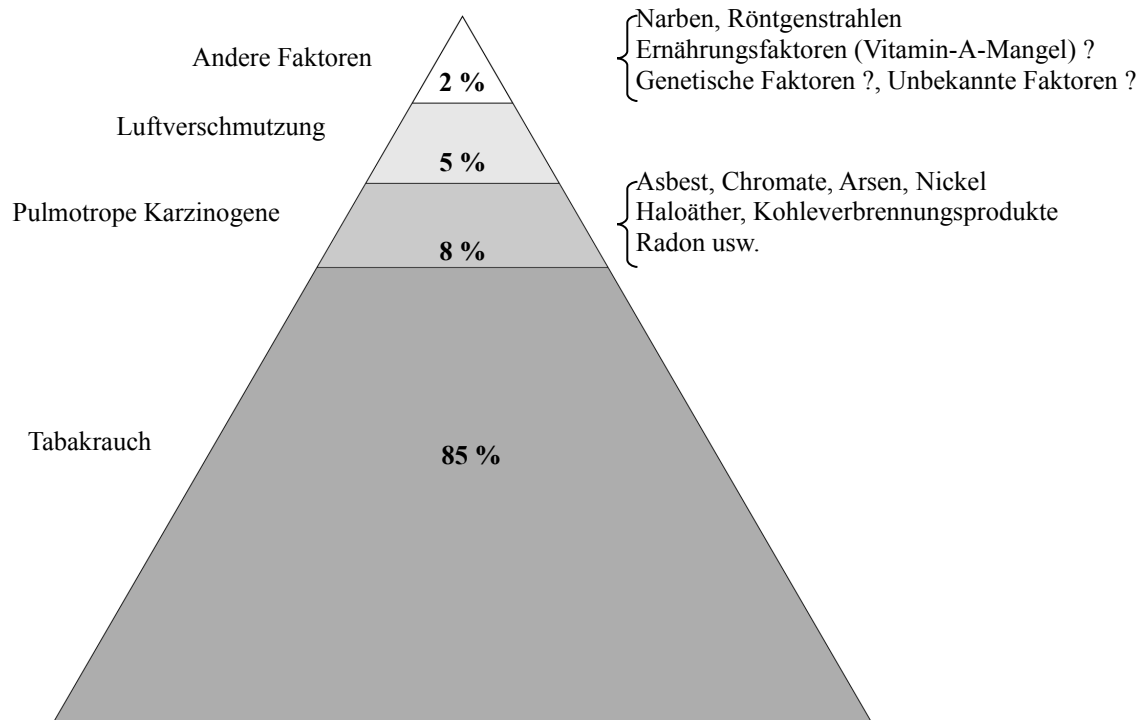


Abbildung 2: Bronchialkarzinom – Risikofaktoren

Die Häufigkeit der sogenannten Narbenkarzinome ist unklar, da oft auch im Resektat oder bei der Sektion nicht sicher zu entscheiden ist, ob ein Karzinom im narbig veränderten Gewebe neu entstanden ist oder ob sich eine Narbe im Bereich eines Karzinoms neu entwickelt hat.

Bronchialkarzinome werden histologisch nach der Klassifikation der World Health Organisation (WHO, Genf, Schweiz) eingeteilt (Tabelle 1).⁹⁶ Wegen der Unterschiede in der Therapie und in der Prognose ist die klinische Unterteilung in das kleinzellige Karzinom (englisch: small cell lung carcinoma, SCLC) und in das nicht-kleinzellige Karzinom (englisch: non small cell lung carcinoma, NSCLC) von besonderer Bedeutung. Die Häufigkeit des Plattenepithelkarzinoms beträgt 30 bis 40 Prozent, des Adenokarzinoms 25 bis 30 Prozent, des kleinzelligen Karzinoms 15 bis 20 Prozent und des großzelligen Karzinoms weniger als 10 Prozent.²⁶ Kombinationen aus den verschiedenen Typen kommen vor.

Tabelle 1: Bronchialkarzinom – Histologie nach WHO⁹⁶

- ◆ kleinzellig
 - Haferzell (oat cell)
 - intermediärer Typ
 - kombiniertes Haferzellkarzinom (mit großzelligen Anteilen eines Adeno- oder Plattenepithelkarzinoms)
- ◆ nicht-kleinzellig
 - Plattenepithelkarzinom
 - Spindelzellkarzinom
 - Adenokarzinom (azinär, papillär, bronchioloalveolär, solide mit Schleimbildung)
 - großzellig (Riesenzellkarzinom, hellzelliges Karzinom)
- ◆ sonstige
 - karzinoid
 - adenoidzystisch
 - mukoepidermoid

Die verschiedenen Bronchialkarzinome weisen unterschiedliche biologischen Charakteristika auf (Tabelle 2).¹⁰³ Kleinzellige Karzinome sind am häufigsten bei starken Rauchern mit frühem Beginn zu finden und bei Beschäftigten im Uranbergbau. 90 Prozent der kleinzelligen Bronchialkarzinome entstehen zentral. Auf Grund der hohen Proliferationsrate und der raschen Metastasierung weist das SCLC unbehandelt eine sehr ungünstige Prognose auf mit einer mittleren Überlebenszeit von 3 bis 5 Monaten und einer Ein-Jahres-Überlebensrate von weniger als 5 Prozent. Grundlage der Behandlung ist vor allem die Polychemotherapie und die Strahlentherapie.⁹⁰

Tabelle 2: Bronchialkarzinom – biologische Charakteristika

Histologie	Lokalisation	Tumorverdopplungszeit
♦ SCLC	zentral	10-50 Tage
♦ NSCLC		
Plattenepithel-CA	zentral	300 Tage
Adeno-CA	peripher	180 Tage

Das Plattenepithelkarzinom ist trotz der zunehmenden Inzidenz der Adenokarzinome immer noch das häufigste Karzinom, das mit Rauchen assoziiert ist. 90 Prozent der Plattenepithelkarzinome sind zentral in Lappen-, Segment- oder Subsegmentbronchien lokalisiert und können somit die Bronchien einengen. Im Gegensatz zum Plattenepithelkarzinom und zum kleinzelligem Karzinom weist das Adenokarzinom keine gleichermaßen strenge Beziehung zum Rauchen auf. Erhöhte Risiken der Adenokarzinomentwicklung bestehen bei bestimmten Berufsgruppen (z.B. Zimmerer, Möbelhersteller, Maler). 75 Prozent der Adenokarzinome liegen peripher und entstehen in Bronchien (Größe < 3 mm), so dass sich ein Bronchusabbruch der Schleimhaut in der Regel nicht nachweisen lässt.

Die Therapie des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms ist stadienabhängig. In den Tumorstadien I und II ist die Operation die Therapie der Wahl. Dabei wird eine Resektion des Tumors mit der anatomischen Einheit (Lobektomie, Bilobektomie seltener Pneumonektomie) mit vollständiger mediastinaler Lymphknotendissektion durchgeführt. Allerdings ist die Fünf-Jahresüberlebensrate auch im Stadium I und II mit 50 bis 60 Prozent nicht zufriedenstellend.^{31,61} Ungefähr 40 Prozent der Stadium I Patienten, die postoperativ als tumorfrei gelten, entwickeln innerhalb von 24 Monaten ein Rezidiv.⁶² Ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen, des Wachstums und der Ausbreitung von Bronchialkarzinomen könnten helfen, Patienten zu identifizieren, die von einer adjuvanten Therapie profitieren könnten.

1.2. Die Matrix Metalloproteinasen

Die Krebsforschung konzentrierte sich bisher vor allem auf die Mutationen der Zellen, die entweder zu einem Funktionsgewinn eines Onkogenes oder zum Funktionsverlust eines Suppressorgenes führte. Es sind jedoch noch viele andere Schritte nötig um malignen Zellen die Invasion, Migration, Ausbreitung und Metastasierung zu ermöglichen. Hierbei spielt vor allem die Degradierung der Extrazellulärmatrix, sowie die Zerstörung und das Durchdringen der Basalmembran eine entscheidende Rolle.²⁵ Die Familie der Matrix Metalloproteinasen (MMP) bildet eine Gruppe von Enzymen mit diesen proteolytischen Eigenschaften. Zurzeit sind beim Menschen mehr als 24 MMP bekannt. Historisch werden die MMP hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivität in fünf Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe, die Kollagenasen spalten Kollagen Typ I, II, III, VII und X; die zweite Gruppe, die Gelatinasen degradieren Gelatine Typ I, IV, V und Kollagen Typ IV; die dritte Gruppe enthält die Stromelysine, die vor allem Proteoglycane, Laminin und Fibronectin degenerieren; die vierte Gruppe schließt die Elastasen ein.⁶⁸ Die Elastasen lösen vor allem das Elastin und das fibrilläre Kollagen auf. Die fünfte Gruppe enthält alle nicht klassifizierbaren MMP (siehe Tabelle 3 und Abbildung 2). Heutzutage werden die MMP in acht verschiedene Strukturklassen unterteilt, wobei fünf sekretiert werden und drei membrangebunden sind (englisch: membrane-type MMP, MT-MMP). Zum Teil besitzen die MT-MMP transmembranöse Anteile in der C-terminalen Sequenz (MMP-14, 15, 16 und 24) oder sind über das Glycosylphosphatidylinositol an die Zellmembran gebunden (MMP-17 und MMP-25). Auch die nicht-membrangebundenen MMP können durch Bindung an Integrine und an CD44 oder durch Interaktionen mit zelloberflächen-assoziierten Sulfatproteoglycanen, Kollagen Typ IV und EMMPRIN (englisch: extracellular matrix metalloproteinase inducer) an der Zelloberfläche lokalisiert sein.²⁵

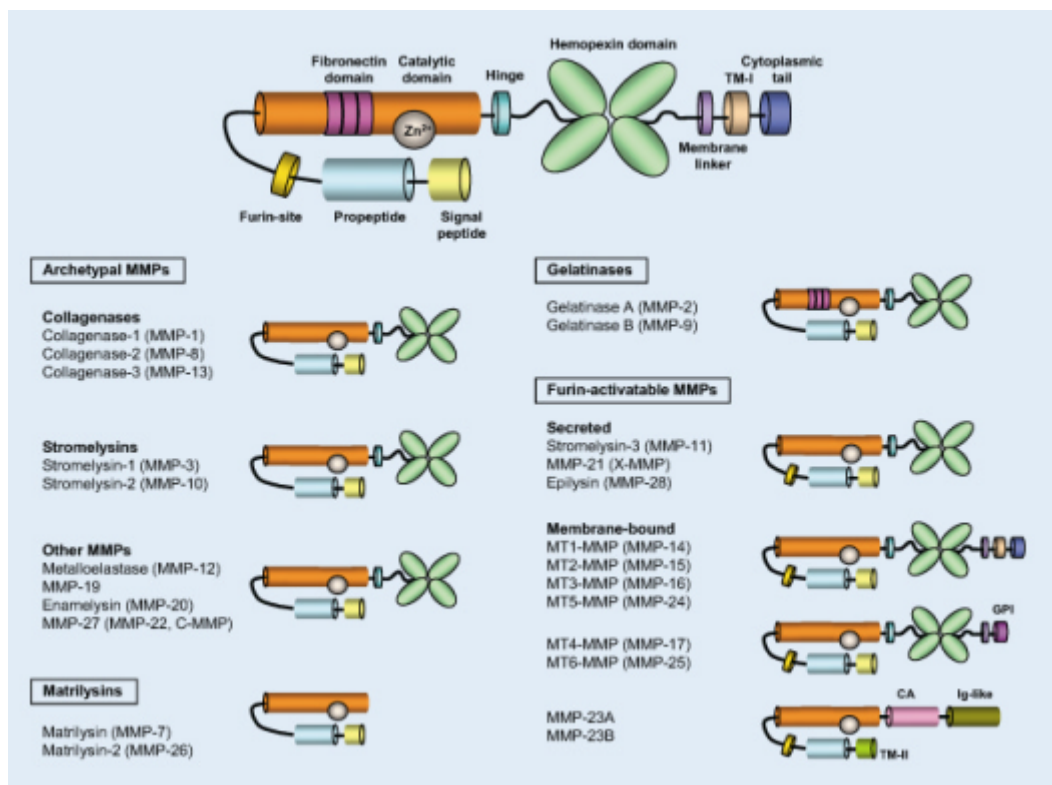


Abbildung 2: Schematischer Bauplan ^a der Matrix-Metalloproteinasen.

^a MMPs, welche eine ähnliche Domainstruktur haben wurden in eine Gruppe eingeteilt. Die Länge der Segmente ist proportional zur Anzahl der Aminosäuren in den Segmenten.

MMP	Synonym	Strukturklasse	Substrate
MMP-1	Interstitielle Kollagenase	Hämopexin Sequenz	Kollagen Typ I, II, III, VII und X
MMP-2	Gelatinase A	Gelatine-bindende Sequenz	Gelatine, Kollagen Typ I, IV, V, X, Laminin V
MMP-3	Stromelysin 1	Hämopexin Sequenz	Kollagen Typ III, IV, IX und X, Gelatine, pro MMP-1, Laminin, Proteoglykane
MMP-7	Matriksin	Minimale Sequenz	Gelatine, Fibronectin, pro MMP-1
MMP-8	Neutrophile Kollagenase	Hämopexin Sequenz	Kollagen Typ I, II, III, VII und X
MMP-9	Gelatinase B	Gelatine-bindende Sequenz	Gelatine, Kollagen Typ I, IV, V, X
MMP-10	Stromelysin 2	Hämopexin Sequenz	Kollagen Typ III, IV, IX und X, Gelatine, pro MMP-1, Laminin, Proteoglykane
MMP-11	Stromelysin 3	Furinerkennungssequenz	Alpha-1-Antitrypsin
MMP-12	Metalloelastase	Hämopexin Sequenz	Elastin
MMP-13	Kollagenase-3	Hämopexin Sequenz	Kollagen Typ I, II, III, VII und X
MMP-14	MT1-MMP	Membrängängig	Pro MMP-2, Gelatine, Kollagen
MMP-15	MT2-MMP	Membrängängig	Pro MMP-2
MMP-16	MT3-MMP	Membrängängig	Pro MMP-2
MMP-17	MT4-MMP	Membrängängig	?
MMP-18	Kollagenase-4 (Xenopus)	Hämopexin Sequenz	?
MMP-19	RASI-1, MMP-18	Hämopexin Sequenz	?
MMP-20	Enamelysin	Hämopexin Sequenz	Amelogenin
MMP-21	ähnlich dem Xenopus XMMP	Vitronectin Sequenz	?
MMP-23	CA-MMP (cysteine array MMP)	Typ II membrängängig	?
MMP-24	MT5-MMP	Membrängängig	?
MMP-25	MT6-MMP	Membrängängig	?
MMP-26	Endometase	Minimale Sequenz	?
MMP-27	-	Hämopexin Sequenz	?
MMP-28	Epilysin	Furinerkennungssequenz	?

Tabelle 3: Die Familie der Matrix Metalloproteinasen (MMP)

Alle Matrix Metalloproteinasen besitzen zwei Schlüsselstrukturen, die bei allen MMP hoch konserviert sind und sie von anderen Metalloproteinasen unterscheiden.^{5,51} Die erste Schlüsselstelle bildet das aktive Zentrum, das ein Zinkion und eine hoch konservierte 50 bis 55 lange Aminosäuresequenz enthält. Diese Aminosäuresequenz enthält drei Histidinaminosäuren, die jeweils eine kovalente Verbindung mit dem Zinkion im Aktivitätszentrum eingehen. Die vierte und somit letzte noch freie Bindungsstelle des Zinkions wird von dem Schwefelatom der Cysteinaminosäure besetzt. Um die MMP in ihrer Funktion zu aktivieren, muss diese Schwefel-Zinkbindung destabilisiert und gebrochen werden. Das Cystein befindet sich in der Prosequenz der Proteinase und ist somit für die Inaktivität der Pro-MMP verantwortlich. Die MMP-Aktivierung erfolgt bei den meisten MMP durch Spaltung der Cys-Zn²⁺ Verbindung (englisch: cysteine switch) und der Abspaltung der Pro-Sequenz.⁵² Des Weiteren enthält das Aktivitätszentrum zur Stabilisierung und zur Expression der enzymatischen Aktivität ein weiteres Zinkion sowie 2 bis 3 Calciumionen. Die C-terminale hämopexinähnliche Sequenz ist von großer Wichtigkeit für die Kollagenasen, weil diese Sequenz die Aufspaltung der dreifachen Helixstruktur des interstitiellen Kollagens ermöglicht.¹⁵ Die Funktion, der an der Aminosäure Prolin reichen Verbindungssequenz, die das aktive Zentrum mit der Hämopexinsequenz verbindet ist bisher nicht bekannt.⁵¹ Das molekulare Modell der MMP lässt jedoch eine Interaktion mit der dreifachen Helixstruktur des Kollagens vermuten. MMP-23 hat anstelle der Hämopexinsequenz eine an den Aminosäuren Cystein und Prolin reiche Sequenz und eine IL-1Rezeptor ähnliche Region.⁵¹

Alle MMP werden als Prepro-Enzyme synthetisiert und in den meisten Fällen als inaktive Zymogene sezerniert.^{25,51,68} Die meisten MMP werden außerhalb der Zellen von anderen MMP oder von Gewebe- beziehungsweise Plasmaproteinasen aktiviert. Die MMP werden nicht intrazellulär gespeichert sondern gleich als Antwort auf ein Signal produziert und ins Interstitium sekretiert. MMP-11, MMP-28, und die MT-MMP können bereits intrazellulär durch intrazelluläre

furinähnliche Serinproteine aktiviert werden. Serinproteine, wie Plasmin oder Urokinase-Typ Plasminogenaktivator können die Aktivierung der meisten MMP bewirken. Verschiedene MMP können auch durch andere Mitglieder der MMP-Familie aktiviert werden. Die MT-MMP, MMP-14, MMP-15, MMP-16 können beispielsweise MMP-2 aktivieren.⁵¹ Bei MMP-2 und MMP-3 konnte gezeigt werden, dass beide in der Lage sind MMP-9 zu aktivieren. Alle MMP mit einer Furinbindungsstelle können durch Furin aktiviert werden. In vitro können auch nicht-proteolytische Mittel, wie SH-reaktive Agens, Quecksilberprodukte, Sauerstoffradikale oder Denaturierungsmittel die MMP aktivieren. Die proteolytische Aktivität der Matrix Metalloproteinasen wird durch die Aktivierung ihrer Vorgängerproteine bestimmt. Der zweite wichtige Kontrollpunkt bezüglich der Regulation der aktiven MMP ist die Inhibierung der aktiven Form durch alpha-Makroglobuline und durch eine Familie von physiologischen Inhibitoren auch TIMPs (englisch: tissue inhibitors of matrix metalloproteinases) genannt.^{23,67} Die TIMPs sind kleine nur 21 bis 28 Kilodalton (kDa) große Proteine, die eine hoch konservierte Gruppe von 6 intramolekularen Disulfidbrücken besitzen. Alle vier bisher bekannten TIMPs besitzen die Möglichkeit MMP zu deaktivieren indem sie enge, nicht-kovalente Komplexe mit den MMP bilden. Um die MMP zu hemmen geht die terminale Aminogruppe der TIMP eine Bindung mit der vierten Bindungsstelle des Zinkions des Aktivitätszentrums ein.³⁴ Die dreidimensionale Struktur der TIMP ist an dieser Stelle wegen zwei naher Disulfidbrücken sehr starr. Dies könnte eine Erklärung für die sehr starke Interaktion zwischen Inhibitor, den TIMPs und den MMP sein. Die TIMPs hemmen die Zellinvasion in vitro, die Tumorgenese, die Metastasierung in vivo sowie die Angiogenese.³³ Nebenbei haben die TIMPs noch andere biologische Funktionen. TIMP-1 und TIMP-2 erhöhen die mitogene Aktivität in verschiedenen Zellen. Trotzdem reduziert die Überexpression von TIMPs das Tumorwachstum. Außerdem induziert TIMP-3 die Apoptose in Krebszellen bei Dickdarntumoren und malignem Melanom.⁶⁸

Matrix Metalloproteinasen nehmen an vielen normalen physiologischen und biologischen Prozessen im Körper teil, wie beispielsweise bei der Embryogenese, bei der Blastozystenimplantation, bei der Ovulation, beim Zyklus des Endometriums, beim Knochenwachstum und Knochenumbau, bei der Wundheilung, bei der Angiogenese, usw.⁶⁸ Auch bei pathologischen Prozessen, die zu einer Gewebeerstörung führen sind die MMP beteiligt. Hier sind einige Beispiele: Arthritis, Krebs, Nephritis, neurologische Erkrankungen, Hautulzerationen, Magengeschwür, Leberfibrose, Emphysem, usw. Matrix Metalloproteinasen werden in niedrigen Spiegeln im normalem adultem Gewebe exprimiert und werden anschließend bei oben genannten physiologischen und pathologischen Prozessen hochreguliert.

Die MMP Genexpression wird durch Wachstumsfaktoren, Zytokine, Stress und onkogenetische Transformationen der Zellen gesteigert.⁶⁸ Die Rolle der Matrix Metalloproteinasen bei den Tumorerkrankungen beruht vor allem auf drei unterschiedlichen Mechanismen, der Degradation der Extrazellulärmatrix und der Basalmembran, dem Einfluss auf die Zellmigration und der Angiogenese.^{51,92} Die Extrazellulärmatrix besteht aus einem dynamischen Gleichgewicht von Strukturproteinen, Wachstumsfaktoren und Enzymen. Die Extrazellulärmatrix und die Basalmembran sind einem ständigem Umbau unterworfen, der auch die Zell-Zellinteraktionen und die Zell-Matrixinteraktionen beeinflusst. Die Degradation der Extrazellulärmatrix und der Basalmembran durch MMP scheint eine entscheidende Rolle beim Tumorwachstum und der Tumormetastasierung zu spielen. Die Gelatinasen sind bekannt für ihre proteolytischen Eigenschaften von Kollagen Typ IV, einem Hauptbestandteil der Basalmembran.^{51,60} Andere Bestandteile der Basalmembran, wie Laminin, Perlekan und Fibronectin werden durch andere Mitglieder der MMP-Familie aufgelöst. MMP-3 degradiert alle nicht-kollagenen Bestandteile der Basalmembran. Auch andere Proteasen, wie verschiedene Kathepsine leisten ebenfalls ihren Teil bei der Degradation der Extrazellulärmatrix in vivo. Durch Zersetzung der Makromoleküle der

Extrazellulärmatrix und der Basalmembran schaffen die MMP ein günstiges Umfeld für die Tumorzellinvasion, -migration und -metastasierung. Ein Tumor kann bis zu einem Durchmesser von ca. 2 mm ohne Bildung von neuen Blutgefäßen wachsen. Zu diesem Zeitpunkt fördern endotheliale Wachstumsfaktoren das Wachstum von Kapillaren. Durch Auflösung der Extrazellulärmatrix können die Endothelzellen schneller und einfacher Richtung Tumor vorwachsen. Der Durchbruch der Basalmembran erlaubt es den Tumorzellen Anschluss zu den Blut- oder Lymphgefäßen zu finden. Somit wird eine entfernte Absiedlung der Tumorzellen ermöglicht. Die intravasale Videomikroskopie zeigte, dass die MMP jedoch nicht für die Extravasation der Tumorzellen benötigt wird.¹³ Tumorzellen können eigenständig die Lymph- oder Blutbahn verlassen und Absiedlungen in entfernten Geweben gründen.

Neben der Zerstörung der Extrazellulärmatrix üben die MMP auch einen direkten Einfluss auf das Zelladhäsionsvermögen aus.⁸⁴ Hierbei spielt vor allem das Gleichgewicht aus MMP und TIMP eine Rolle. Die Modulation der Zell-Zelladhäsion und Zell-Matrixadhäsion ist bis heute jedoch noch unzureichend erforscht. Ray et al. stellten dennoch folgende Hypothesen auf.⁸⁴ Die Bindung einer Zelle zu der Extrazellulärmatrix ist ein Teil der Zellmigration. Deshalb sind Zellen, die nur eine sehr geringe Bindung mit der Extrazellulärmatrix eingehen relativ immobil. Zellen, die sehr fest mit der Extrazellulärmatrix verbunden sind, können sich nicht von der Extrazellulärmatrix lösen und sind somit immobil. Eine optimale Invasion der Zellen erfordert die Modulation der Zelladhäsion. Hierbei spielt das Gleichgewicht der MMP und der TIMPs eine Rolle.

Die MMP üben durch die Degradierung der Extrazellulärmatrix auch einen Einfluss auf die intrazellulären Signale und somit auf die Funktionsweise der Zellen aus, weil die Zellen Rezeptoren für einige Komponenten der Extrazellulärmatrix, wie z.B. für die Integrine besitzen.^{25,51,68} Die Spaltung der Extrazellulärmatrixkomponenten durch MMP führt zu Fragmenten mit neuen

Funktionen. Die Spaltung von Laminin-5 zwischen dem langen und kurzen Arm der gamma-2 Kette und Kollagen Typ IV führt zu löslichen Fragmenten, die die Migration fördern. Nebenbei fördern die MMP die Freisetzung von verschiedenen Wachstumshormonen, wie z.B. IGF aus dem IGF-BP (englisch: insulin like growth faktor binding protein) oder TGF-alpha (englisch: transforming growth factor-alpha) aus seinem an der Zellmembran gebundenen Vorgänger, sowie die Rezeptoren von verschiedenen Wachstumsfaktoren, wie z.B. 2 Mitglieder der EGFR (englisch: epidermal growth factor receptor) -Familie: HER2/neu und HER4. Derweil behindern MMP aber auch die Angiogenese bei Tumorerkrankungen. Bei der Abspaltung eines Teils von Plasminogen durch MMP-3, MMP-7, MMP-9 und MMP-12 entsteht Angiostatin, ein sehr potentes Protein mit antiangiogenetischer Eigenschaften.

MMP besitzen sowohl Eigenschaften, die die Invasivität der Tumoren behindern und Eigenschaften, die das Tumorstadium, die Tumormigration und die Tumormetastasierung fördern. Die Rolle der MMP in der Tumorzellinvasion und Tumorzellmetastasierung ist sehr kompliziert. Der Leitspruch „je mehr desto besser“ gilt nicht für die MMP.

1.3. Matrix Metalloproteinase 9

Die Gelatinasen, MMP-2 und MMP-9 spielen eine Schlüsselrolle bei der Tumordinfiltration und Tumormetastasierung.^{21,51,68} MMP-2 wird ebenfalls als Gelatinase A, 72 kDa Gelatinase oder 72 kDa Typ IV Kollagenase bezeichnet, die Synonyme für MMP-9 lauten Gelatinase B, 92 kDa Gelatinase und 92 kDa Typ IV Kollagenase. Beide Gelatinasen sind in der Lage Kollagen Typ IV, einen Hauptbestandteil der Basalmembran zu degradieren. Der Durchbruch der Basalmembran ist immer ein Hinweis auf ein invasives Karzinom.⁶⁰ Multiple Untersuchungen zeigten erhöhte MMP-2 und MMP-9 Werte bei invasiven, bösartigen Karzinomen sei es durch Nachweis von mRNA mittels *in situ* Hybridisation oder dem Proteinnachweis der MMP-2 oder MMP-9 durch Immunhistochemie. MMP-2 wird physiologisch in den Fibroblasten, MMP-9 in den neutrophilen Granulozyten und Makrophagen gebildet. Beide Gelatinasen haben verschiedene Besonderheiten, die sie von den anderen MMP unterscheiden. MMP-2 und MMP-9 besitzen eine Gelatine bindende Sequenz zwischen der katalytischen Sequenz und dem aktivem Zentrum.⁶⁸ Drei sich wiederholende Fibronectin Typ II Sequenzen sind in die katalytische Sequenz eingefügt. Diese Fibronectin Typ II Sequenz ist für die gelatinolytische Aktivität der Gelatinasen verantwortlich. Des Weiteren aktivieren alle membrangebundenen MMP die Pro-MMP-2. Bei dieser Aktivierung spielt die Hämopexinsequenz von MMP-2 eine große Rolle. MMP-9 wird vor allem von MMP-2 und MMP-3 aktiviert. MMP-9 kommt physiologisch in den inflammatorischen Zellen des Immunsystems vor. In diesen Zellen ist die MMP-9 Expression besonders gut erforscht. Die Expression von MMP-9 wird im T-Zelllymphom durch LFA-1 (englisch: leukocyte function associated antigen-1) und ICAM-1 (englisch: intercellular adhesion molecule-1) induziert. Hierbei kommt es zu Veränderungen in der Zelladhäsion. In den Makrophagen wird die MMP-9 Expression durch aktivierte T-Lymphozyten stimuliert. Als Mediator bei dieser Interaktion funktionieren die Proteine gp39 und CD40. Auch externe Faktoren wie beispielsweise eine UVB-Bestrahlung erhöhen nachweislich die MMP-9

Expression der Fibroblasten in der Haut.⁶⁸ Neben der Stimulierung der MMP-9 Expression gibt es auch einige Besonderheiten in der Hemmung der Gelatinasen. Die TIMP-2 hat die höchste Affinität zu Pro-MMP-2, bindet aber auch MMP-2 in seiner aktiven Form. TIMP-1 inhibiert die Aktivität von MMP-9 indem es eine 1 zu 1 stöchiometrische Bindung mit Pro-MMP-9, dem Zymogen von MMP-9 eingeht.^{23,67}

2. Fragestellung

In früheren Studien wurde bereits eine MMP-2 und MMP-9 Expression bei verschiedenen Krebsarten, wie z.B. beim Mammakarzinom, Kolonkarzinom und Prostatakarzinom untersucht.²⁹ Außerdem berichten einige Studien über eine Expression von MMP-2 und MMP-9 in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen.^{30,31} Die klinische Relevanz der MMP in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen wird weiterhin kontrovers diskutiert.^{32,33} Erste klinische Versuche mit MMP-Inhibitoren waren sehr enttäuschend und wurden teilweise schon vor Abschluss der geplanten Studiendauer auf Grund von schwerwiegenden Nebenwirkungen und Induktion von Malignomen beendet.^{34,35} Selbst Studien, die den prognostischen Wert von MMP-9 im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom durch immunhistochemische Untersuchungen ermittelten sind zum Teil widersprüchlich.^{32,33} In diesen Studien konnte die MMP-9 Expression nicht als unabhängiger Prognosefaktor nachgewiesen werden. Weiterhin soll die Lokalisation von MMP-9 geklärt werden, da hier große Konfusion herrscht. Einige Arbeiten erbrachten den Nachweis von MMP vorwiegend in den Fibroblasten, während andere die Hauptproduktionsstätte den Tumorzellen zuschreiben.^{61,62,63,64,65} Diese Arbeit untersucht die MMP-9 Expression bei 141 Patienten mit operablem nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom mittels Immunhistochemie. Zu diesem Zweck wurde ein monospezifischer, polyklonaler anti-MMP-9 Antikörper mit einem hochsensitivem immunhistochemischem Nachweisverfahren kombiniert. So konnte die Verteilung der MMP in den Tumorzellen des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms und im umliegenden Bindegewebe analysiert werden. Bei der anschließenden statistischen Auswertung wurde nach einer Korrelation zwischen MMP-9 Expression mit klinisch-pathologischen Parametern gesucht. Außerdem wurden die Prognose und die Überlebensrate nach langjährigen Nachsorgeuntersuchungen bei Patienten mit operablem nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom bei MMP-9 Expression ermittelt. Schließlich wurde ein Zusammenhang zwischen der MMP-9 Expression und eines Rezidives untersucht.

Insgesamt zielt die Arbeit ab Patienten zu identifizieren, die eine schlechte Prognose haben um sie einer entsprechenden adjuvanten Therapie zuzuführen, sei es einer konventionellen Chemotherapie oder einer Therapie mit MMP-Inhibitoren.

3. Patienten und Methoden

3.1. Patienten

In dieser Studie konnten nur Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom teilnehmen, weil das kleinzellige Bronchialkarzinom auf Grund seiner hohen Zellproliferationsrate als generalisierte Erkrankung angesehen wird und die chirurgische Resektion als alleinige Therapie nicht in Frage kommt.⁹⁰ Die Differenzierung des SCLC erfolgt in die beiden Stadien „Limited Disease“ (LD: Begrenzung des Tumors auf eine Thoraxhälfte mit oder ohne Befall des Mediastinums und der gleichseitigen supraclavikulären Lymphknoten, ohne Pleuraerguß oder Einflusstauung) und „Extensive Disease“ (ED I: Befall der kontralateralen Hiluslymphknoten; ED II: Befall der kontralateralen Lunge sowie alle übrigen Stadien). Auch im Frühstadium (T1/T2, N0, M0) werden die Patienten zytostatisch nachbehandelt.

Die Patientenrekrutierung begann im September 1989 und die Nachsorgeuntersuchungen wurden im Januar 2002 vervollständigt. Nach Zustimmung des ethischen Komitees der Ludwig-Maximilians-Universität München wurden Tumorproben von 145 Patienten mit vollständig resezierten nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen gesammelt. Vorab wurde das schriftliche Einverständnis der Patienten eingeholt. Alle Patienten, die an der Studie teilnahmen wurden über Sinn und Zweck der Studie informiert. Der letzte Patient wurde im November 1991 operiert und in die Studie aufgenommen. Die histologische Einteilung der Bronchialkarzinome erfolgte nach den Regeln der World Health Organisation (WHO, Genf, Schweiz).⁹⁶ Die Tumoren wurden gemäß der Union Internationale Contre le Cancer (UICC, Genf, Schweiz) in die TNM-Klassifikation eingeteilt (Tabelle 4). Die Stadieneinteilung entsprechend dem TNM-System berücksichtigt die Merkmale des Primärtumors (T), der Lymphknotenausbreitung (N) und der Fernmetastasierung (M).^{64,65} Auf

Grund der TNM-Merkmale erfolgt die klinische Stadieneinteilung nach der UICC (Tabelle 5).^{64,65}

Diese Einteilung hat erhebliche prognostische Relevanz auf die Überlebenszeit.

Tabelle 4: Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom – TNM-Klassifikation

T Primärtumor	
Tx	nicht beurteilbar; oder Nachweis von malignen Zellen im Sputum oder bei Bronchialspülungen; Tumor weder radiologisch noch bronchoskopisch sichtbar
T0	kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor < 3 cm in größter Ausdehnung, umgeben von Lungengewebe oder viszeraler Pleura; kein bronchoskopischer Nachweis einer Infiltration proximal eines Lappenbronchus (Hauptbronchus frei)
T2	Tumor > 3 cm in größter Ausdehnung Tumor mit Befall des Hauptbronchus, 2 cm oder weiter distal der Karina Tumor infiltriert viszerale Pleura assoziierte Atelektase oder obstruktive Entzündung bis zum Hilus, aber nicht der ganzen Lunge
T3	Tumor jeder Größe mit direkter Infiltration einer der folgenden Strukturen: Brustwand (einschließlich Tumoren des Sulcus superior); Zwerchfell; mediastinale Pleura; parietales Perikard oder Tumor im Hauptbronchus weniger als 2 cm distal der Karina, aber Karina nicht befallen oder Tumor mit Atelektase oder obstruktiven Entzündung der ganzen Lunge
T4	Tumor jeder Größe mit Infiltration einer der folgenden Strukturen: Mediastinum, Herz, große Gefäße, Trachea, Ösophagus, Wirbelkörper, Karina oder Tumor mit malignem Pleuraerguß oder Tumor mit Satellitenherd(en) im ipsilateralen tumortragenden Lungenlappen
N regionäre Lymphknoten	
Nx	nicht beurteilbar
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in ipsilateralen peribronchialen Lymphknoten und/oder in ipsilateralen Hiluslymphknoten (einschließlich einer direkten Ausbreitung des Primärtumors)
N2	Metastasen in ipsilateralen mediastinalen und/oder subkarinalen Lymphknoten
N3	Metastasen in kontralateralen mediastinalen, kontralateralen Hilus-, ipsi-, oder kontralateralen Skalenus- oder supraklavikulären Lymphknoten
M Metastasen	
Mx	nicht beurteilbar
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen (PUL Lunge, OSS Knochen, HEP Leber, BRA Hirn, LYM Lymphknoten, MAR Knochenmark, PLE Pleura, PER Peritoneum, ADR Nebenniere, SKI Haut, OTH andere Organe)

Tabelle 5: UICC – Klassifikation

Stadium	T	N	M	5-Jahres- Überlebensrate klinisches Staging	Chirurgisches, patho- anatomisches Staging^a
okkultes Ca	Tx	N0	M0		
Stadium 0	Tis	N0	M0		
Stadium IA	T1	N0	M0	61%	67%
Stadium IB	T2	N0	M0	38%	57%
Stadium IIA	T1	N1	M0	34%	55%
Stadium IIB	T2	N1	M0	24%	39%
	T3	N0	M0	22%	38%
Stadium IIIA	T3	N1	M0	9%	25%
	T1-3	N2	M0	13%	23%
Stadium IIIB	T4	N0-2	M0	7%	-
	T1-4	N3	M0	3%	-
Stadium IV	T1-4	N0-3	M1	1%	

^a Überlebensraten nach chirurgischer Verifikation des Stadiums und operativer Behandlung

Das präoperative Staging aller Patienten ergab resezierbare Tumore (T1-T4) ohne Nachweis von Metastasen (M1) oder kontralateralen oder supraclavicularen Lymphknotenbefall (N3) (Tabelle 6). Das präoperative Staging beinhaltete eine Röntgenaufnahme des Thoraxes, eine Bronchoskopie mit peribronchialen und intraluminalen Biopsien, eine Computertomographie des Thoraxes, des Oberbauches und des Schädels, eine Sonographie des Abdomens und eine Sklettszintigraphie. Patienten mit vergrößerten mediastinalen Lymphknoten, bei denen der axiale Durchmesser mehr als 1 cm betrug, unterzogen sich einer präoperativen Mediastinoskopie und Biopsie um das präoperative Staging zu vervollständigen.

Tabelle 6: Klinische und pathologische Parameter des Patientenkollektives

Variable	n^a	%^b
Patientenzahl	141	100%
Alter		
37-76 Jahre	141	100%
Median (60 Jahre)		
Mittleres Alter (59,4 Jahre)		
Geschlecht		
männlich	108	76,6%
weiblich	33	23,4%
Histologie		
Plattenepithelkarzinom	57	40,4%
Adenokarzinom	58	41,1%
Großzelliges Bronchialkarzinom	13	9,2%
Mischtumore	13	9,2%
Tumorgröße		
T1	24	17,0%
T2	89	63,1%
T3	15	10,6%
T4	13	9,2%
Lymphknotenstatus		
N0	74	52,5%
N1	27	19,1%
N2	40	28,4%
N3	0	0%
Metastasierung		
M0	141	100%
M1	0	0%
UICC-Klassifikation		
Stadium I	68	48,2%
Stadium II	16	11,3%
Stadium IIIa	43	30,5%
Stadium IIIb	14	9,9%
Stadium IV	0	0%
Tumordifferenzierung/Grading ^c		
G1-G2	61	43,3%
G3-G4	53	37,6%
Keine Differenzierung	27	19,1%

^a Patientenzahl

^b prozentuale Verteilung der Patienten

^c Es wurde kein Grading für das großzellige Bronchial-Ca und die Mischtumore vorgenommen (insgesamt 26 Fälle).

Zur Beurteilung der anatomischen Operabilität erfolgte die exakte intrathorakale Tumorausbreitung mittels Computertomographie und Bronchoskopie. Unter Umständen waren weiterführende Untersuchungen notwendig, wie z.B. eine Mediastinoskopie zur Beurteilung des Lymphknotenstatus, eine Oesophagoskopie beziehungsweise ein Oesophagusbreischluck zum Nachweis eines Oesophagusbefalles, eine Pulmonalisangiographie oder Kavernographie zur Beurteilung der zentralen Gefäße oder eine Kernspintomographie bei Infiltration neuronaler Strukturen. Die Untersuchung zur funktionellen Operabilität beinhalteten eine Lungenfunktionsprüfung, eine arterielle Blutgasanalyse, eine Lungenperfusionsszintigraphie sowie ein Belastungs-EKG. Das postoperative forcierte expiratorische Volumen in einer Sekunde (FEV_1) lässt sich angenähert wie folgt kalkulieren: $\text{postop. } FEV_1 = \text{präop. } FEV_1 \times (\% \text{ Perfusion gesunde Lunge} : 100)$. Aus lungenfunktioneller Sicht ist eine Pneumonektomie bei einem präoperativen FEV_1 -Wert größer als 2,5 Liter möglich, eine Lobektomie bei einem FEV_1 über 1,75 Liter, eine Segmentresektion bei einem FEV_1 von mehr als 1,5 Liter. Liegt das vorausberechnete postoperative FEV_1 bei geplanter Pneumonektomie unter 1,0 Liter, ist der Patient als funktionell inoperabel anzusehen. Bei geplanter Lobektomie und Segmentresektion ist Inoperabilität bei einem postoperativen FEV_1 unter 0,8 Liter gegeben. Die kardiopulmonale Eckdaten vor lungenchirurgischen Eingriffen leiten sich aus Abbildung 3 ab. Die Abbildung 3 zeigt den Algorithmus zur Beurteilung der funktionellen Operabilität vor Lungenresektionen nach Schulz, Emslander und Riedel.⁸⁷

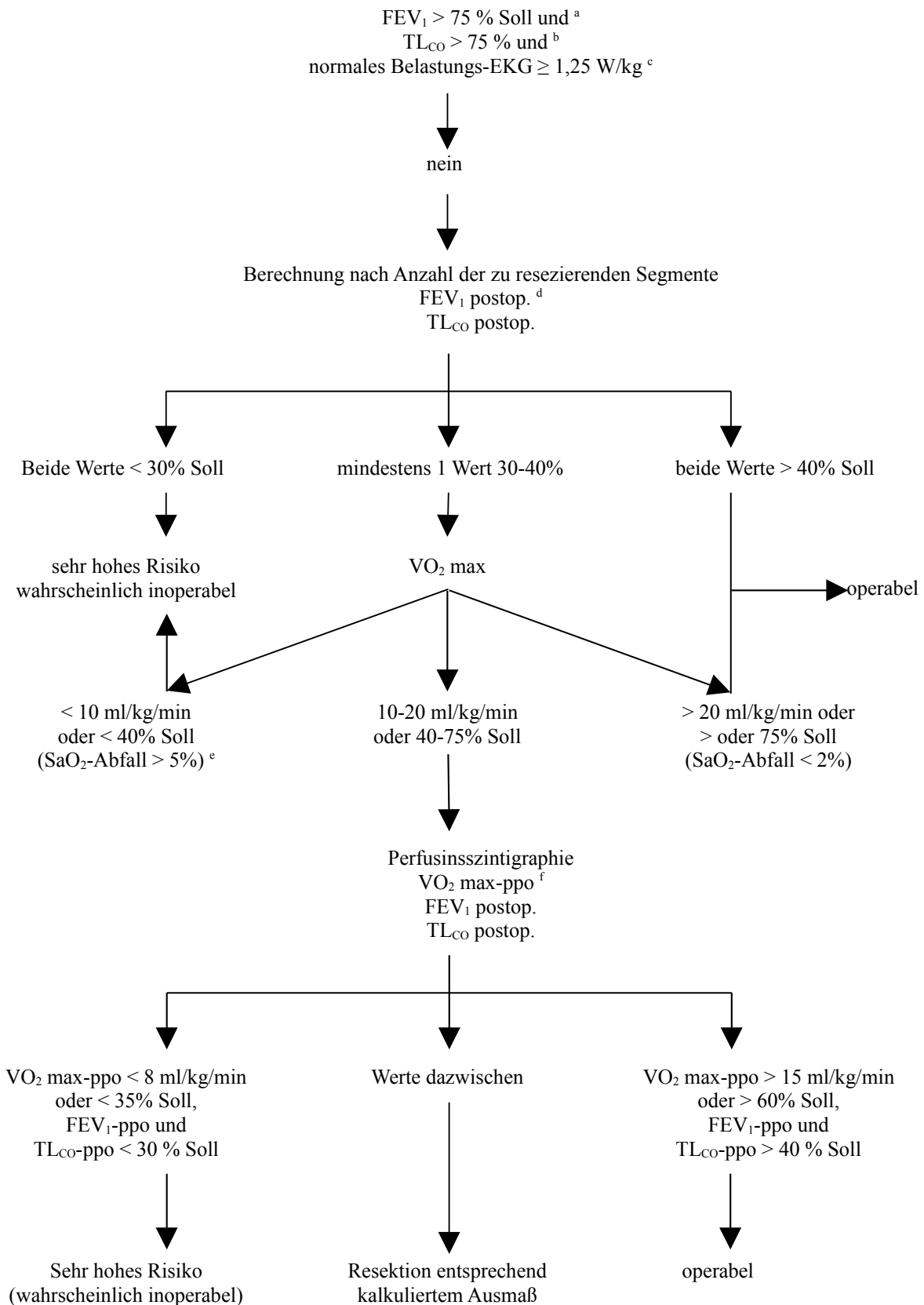


Abbildung 3: Algorithmus zur Beurteilung der funktionellen Operabilität vor Lungenresektionen nach Schulz, Emslander und Riedel

- ^a FEV₁: forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde
- ^b TL_{CO}: Transferfaktor für Kohlenmonoxid
- ^c Normales EKG: stufenweise Belastung (3 Minuten pro Stufe) bis $\geq 1,25$ W/kg ohne KHK-Zeichen
- ^d postop. FEV₁ = präop. FEV₁ x (% Perfusion gesunde Lunge : 100)
- ^e SaO₂: arterielle Sauerstoffsättigung
- ^f VO₂ max: ergospirometrische maximale Sauerstoffaufnahme

Allgemein wurde eine Lobektomie, eine Bilobektomie oder eine Pneumonektomie mit systematischer Ausräumung der hilären, subkarinalen, paratrachealen und mediastinalen Lymphknoten in der Abteilung für Thoraxchirurgie durchgeführt. Nur Patienten ohne Metastasen sowie vollständig reseziertem Tumor, Patienten mit bestätigtem postoperativem M0, R0 Stadium wurden in die Studie aufgenommen. Die endgültige Studie umfasste 33 weibliche und 108 männliche Patienten. Der Altersmedian der Patienten zum Zeitpunkt der Operation betrug 60 Jahre mit einer Spannweite von 37 bis 76 Jahre (Tabelle 6).

Patienten, bei denen der Primärtumor als pT3 oder pT4 klassifiziert wurde, erhielten eine adjuvante perkutane Bestrahlung des Tumorbettes und Patienten mit mediastinalem Lymphknotenbefall (pN2) erhielten eine perkutane Bestrahlung des gesamten Mediastinums. Während der Bestrahlung wurde eine kumulative Dosis von 50 Gray in fraktionierter Megavolttechnik verabreicht. Der durchschnittliche Zeitraum der Nachsorgeuntersuchungen betrug 72 Monate mit einer Spanne von 12 bis 144 Monate. Sie beinhaltete eine körperliche Untersuchung, eine Thoraxröntgenaufnahme und eine Blutentnahme mit Bestimmung der Tumormarker CYFRA 21-1 und/oder CEA in einem 3-monatigen Abstand.^{93,100} Zusätzlich erfolgten nach jeweils 6 Monaten eine Computertomographie des Thoraxes, eine Abdomensonographie und eine Bronchoskopie. Des Weiteren wurden Daten vom Hausarzt bezüglich Rezidiv, Metastasierung oder Tod mittels Fragebogen erhoben. Falls möglich wurde ein Rezidiv in unseren Kliniken bestätigt und mit dem Patienten eine weiterführende Therapie besprochen.

3.2. Immunhistochemische Analyse

Der Nachweis von Matrix Metalloproteinase-9 erfolgte mittels immunhistochemischer Färbung. Der Nachweis eines Antigens mit Fluoreszenzfarbstoffen besitzt in der Immunhistochemie keine große Bedeutung, da die Fluorochrome schnell verblassen, nicht archivierbar sind und somit sofort ausgewertet werden müssen. Des Weiteren ist im Fluoreszenzlicht nur das Fluoreszenzsignal nicht jedoch der Zellverband zu sehen. Deshalb wurde bei dieser Arbeit der Nachweis mit Enzymen gewählt. Zwei Enzyme sind von Bedeutung, die Meerrettich-Peroxidase und die Alkalische Phosphatase. Mehrere unterschiedliche Methoden stehen in der Immunhistochemie zur Verfügung.¹⁷

Immunhistochemische Nachweismethoden

(Abbildung 4)

Die direkte Nachweismethode

Bei der direkten Nachweismethode ist der primäre Antikörper mit einem Fluorochrom oder Enzym markiert. Diese Methode beinhaltet zwei Nachteile. Zum einen ist das Färbesignal meist schwach, weil nicht so viele Fluorochrome bzw. Enzyme pro Antikörper zur Verfügung stehen wie bei der indirekten Methode. Zum anderen muss jeder Antikörper mit einem Fluorochrom oder Enzym konjugiert werden. Dies ist sehr aufwendig und teuer.

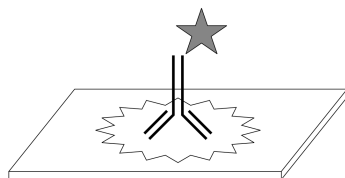


Abbildung 4: Immunhistochemische Nachweismethoden (1)

Die indirekte Nachweismethode

Bei der indirekten Nachweismethode wird der unmarkierte Antikörper über einen Fluorochrom- oder Enzym-markierten Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist nachgewiesen. Da die primären Antikörper aus wenigen Tierarten stammen wie Maus, Kaninchen oder Ziege genügt eine relativ geringe Anzahl konjugierter Sekundärantikörper.

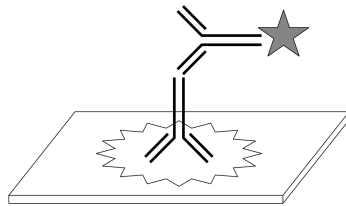


Abbildung 4: Immunhistochemische Nachweismethoden (2)

Die APAAP-/PAP-Methode

Bei dieser indirekten Nachweismethode wird ein Brückenantikörper verwendet, der den Primärantikörper mit dem Alkalische Phosphatase anti-Alkalische Phosphatase-/ Peroxidase anti-Peroxidase-Komplex verbindet. Dieser Komplex bestehend aus Antikörper und Enzym (Alkalische Phosphatase oder Peroxidase) ist gegen den Primärantikörper gerichtet. Es handelt sich also um einen Enzym anti-Enzym Komplex. Der primäre und der gegen das Enzym gerichtete Antikörper stammen von der gleichen Tierart, der Brückenantikörper ist gegen Immunglobuline dieser Tierart gerichtet. Die Intensität und Sensitivität der Immunfärbung ist der direkten und der indirekten Nachweismethode deutlich überlegen.

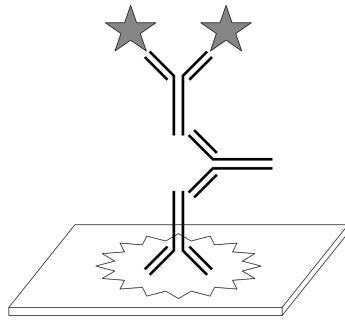


Abbildung 4: Immunhistochemische Nachweismethoden (3)

Die ABC-Methode

Die Avidin-Biotin-Enzym-Komplex Methode beruht auf der hohen Bindungsaffinität von Avidin, einem Hühnereiweiß-Glykoprotein, zum Biotin (Vitamin H). Der ABC-Komplex ist ein Komplex aus Avidin und biotinyliertem Enzym. Dieser Komplex wird über einen biotinylierten Sekundärantikörper an den Primärantikörper (indirekte Nachweismethode) oder über einen biotinylierten Primärantikörper direkt an das Antigen gekoppelt (direkte Nachweismethode). Meistens binden mehrere ABC-Komplexe am Primär- oder Sekundärantikörper. Es werden somit mehrere Marker-Enzymmoleküle am Ort des gewebsgebundenen Antigens nachweisbar und dadurch die Sensitivität erhöht.

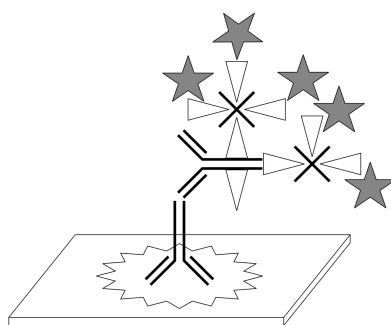








Abbildung 4: Immunhistochemische Nachweismethoden (4)

Legende

	Primärantikörper
	Sekundärantikörper
	APAAP-Komplex
	Biotin
	(Strept-) Avidin
	Enzym

In dieser Arbeit wurde die ABC-Methode benutzt, wobei das Avidin durch das Streptavidin, einem Protein aus *Streptomyces avidinii* ersetzt wurde. Die Streptavidin-Biotin-Enzym-Komplex-Methode (= LSAB-Methode) ist eine sehr sensitive Nachweismethode, die zum Nachweis geringer Antigenmengen geeignet ist.⁵⁷ Das Streptavidin des Biotin-Enzymkomplexes kann jedoch an endogenes Biotin, das vor allem in Gewebe von Leber, Brust, Gehirn und Niere zu finden ist binden und so zu einer unspezifischen Hintergrundfärbung führen. Um eine eventuelle Hintergrundfärbung auszuschließen wurde jeweils eine negative Kontrolle durchgeführt. Außerdem kann eine unspezifische Hintergrundreaktion in den Gewebeschnitte mit reichlich roten und weißen Blutzellen auftreten. Die Erythrozyten, Monozyten, Makrophagen und Granulozyten enthalten alle eine endogene Peroxidase, die für die unspezifische Hintergrundfärbung verantwortlich ist. Deshalb wurden die Paraffinschnitte vor der Inkubation mit dem Primärantikörper mit einer H₂O₂-Lösung behandelt, um eine endogene Peroxidaseaktivität zu inhibieren.

Methoden der Paraffinvorbehandlung

Voraussetzungen für den immunhistochemischen Nachweis von Antigenen in Geweben und Zellen sind die Erhaltung des antigenen Bereichs, die Zugänglichkeit der antigenen Determinanten für den Antikörper und die Aufrechterhaltung struktureller Details. Antigene verhalten sich in Abhängigkeit von ihrer chemischen Struktur gegenüber Fixierungsmitteln unterschiedlich, so dass bei unbekanntem Antigen Vorversuche zur Ermittlung optimaler Bedingungen notwendig sind.¹⁷ Eine Voraussetzung für optimale Färbegergebnisse der Paraffinschnitte ist die Bindung des Primärantikörpers an sein Antigen. Das Antigen kann jedoch im Gewebe zerstört oder maskiert sein. Die Fixierungsbedingungen des Gewebes spielen daher eine besonders große Rolle für optimale Färbegergebnisse und müssen unbedingt bei der Anwendung und Auswertung berücksichtigt werden. Oft ist es notwendig, den entparaffinierten Gewebeschnitt vor Aufbringen des Primärantikörpers vorzubehandeln, da durch die Fixierungsbedingungen die spezifische Bindung des Primärantikörpers an das gewebsständige Antigen blockiert ist. Die Vorbehandlung mit proteolytischen Enzymen, wie z.B. Neuraminidase, Pepsin, Pronase oder Trypsin, bietet die Möglichkeit die Maskierung antigener Epitope aufzuheben und das Antigen nachzuweisen. Eine andere Methode ist die Vorbehandlung von Paraffinschnitten mit Hitze in der Mikrowelle, dem Schnellkochtopf oder dem Autoklaven. Die Hitzebehandlung in Kombination mit geeigneten Pufferlösungen bietet weitere Möglichkeiten, um die Maskierung antigener Epitope aufzuheben und diese Strukturen zu demaskieren.⁹⁵ Bei diesen Methoden führt die einwirkende Hitze zum Aufbrechen, der bei der Formalinfixierung entstehenden Methylbrücken. Diese entstehen durch Quervernetzungen und führen zu Strukturveränderungen von Proteinen mit Verdeckung der gesuchten Antigene. Bei der Behandlung der Paraffinschnitte in der Mikrowelle muss unter allen Umständen eine Austrocknung des Gewebes vermieden werden, da eine Austrocknung der Zellen zu ihrer Zerstörung führt. Somit wäre der Tumor für eine weitere Untersuchung unbrauchbar. Zur

Aufbereitung der Paraffinschnitte und zur Etablierung des Färbeprotokolles wurden drei Methoden miteinander verglichen: die Vorbehandlung mit dem proteolytischen Enzym Pronase, die Vorbehandlung mit dem proteolytischen Enzym Trypsin und die Vorbehandlung mit Hitze in der Mikrowelle.

Anti-MMP-9 Antikörper

In dieser Studie wurde ein nicht-kommerzieller, monospezifischer, polyklonaler primärer anti-MMP-9 Antikörper verwendet. Dieser Antikörper wurde von Dr. Lichtinghagen (Hannover) hergestellt und uns zur Verfügung gestellt.⁵⁹ Der Antikörper erkennt sowohl die latente als auch die aktive Form von MMP-9. Bei der Herstellung wurden die cDNA-Sequenzen, die für schwach konservierten Sequenzen der hämopexinähnlichen Sequenz der 92-kDa Gelatinase codierten, mittels Polymerasekettenreaktion (englisch: polymerase chain reaction, PCR) amplifiziert (Abbildung 5).³⁰ Die gewählte cDNA-Sequenz zeigte die kleinst mögliche Ähnlichkeit auf Proteinbasis mit anderen Mitgliedern der MMP-Familie auf. Als Primer dienten die folgenden Oligonukleotidsequenzen:⁵⁹

5' CGT GGA TCC GAC GAC GTG AAT GGC A 3'

5' TGC GAA TTC ACG TCG AAC CTC CAG AGG 3'

MMP-9

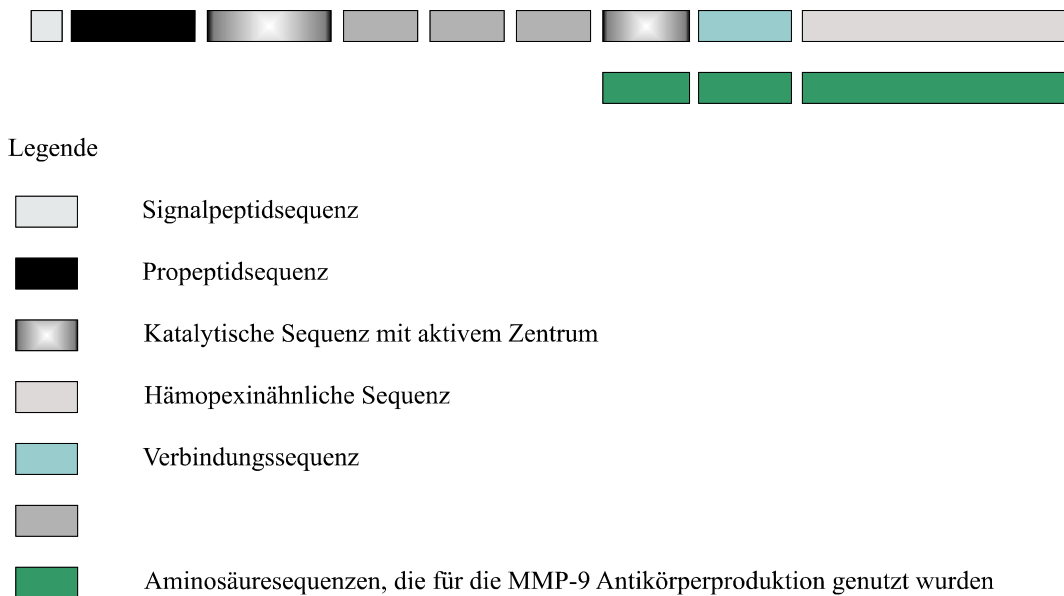


Abbildung 5: Schematischer Bauplan von MMP-9 mit Aminosäuresequenzen der MMP-9 Antikörperproduktion

Die PCR wurde für 35 Zyklen bei 72°C mit einer cDNA Matrix, die aus einer Lebermetastase eines Colonkarzinoms stammt durchgeführt. Die Denaturierungstemperatur betrug 94°C, die Temperatur der Annäherung der DNA-Stränge 54 bis 59°C. Nach Einbringen von verschiedenen Restriktionsendonukleasen und Klonen in den bakteriellen Expressionsvektoren, pGEX-2T, pET-21a(+) und pUR-288 wurden die Klone durch Sequenzierung überprüft. Die Expression der Proteine wurde eingeleitet, hierbei kam es zur Entstehung von verschiedenen Fusionsproteinen: pGEX mit einer 27,5 kDa Glutathion S-Transferase, pET-21a(+) mit einem 18 Aminosäuren großem Peptid und pUR-288 mit einer 116 kDa Beta-Galaktosidase. Drei Stunden später wurden die Zellen lysiert und die entstandenen Fusionsproteine zur Immunisierung eines 4-5 Monate alten Chinchilla-Kaninchens vorbereitet. Anschließend konnte mit dem ELISA-Test bewiesen werden, dass die entstandenen Antikörper MMP-9 spezifisch erkennen und keine Kreuzreaktionen mit anderen humanen MMP zeigten. Weiterhin wurde mit der Western Blot Methode die Spezifität der gewonnenen anti-MMP-9 Antikörper überprüft.⁵⁹ Hierbei zeigte sich bei

92 Kilodalton eine deutliche bandförmige Ausfällung. Das Molekulargewicht von 92 kDa wird in der Literatur für das Proenzym der MMP-9 beschrieben.

Zu Beginn der Arbeit wurden auch andere kommerzielle Antikörper auf ihre Spezifität und auf reproduzierbare Ergebnisse getestet. Der Antikörper gegen MMP-9 Ab-3 wurde von der Firma Oncogene/Calbiochem (Bad Soden, Deutschland) bezogen. Dieser Antikörper wird von der Firma Fuji Chemical Industries, Ltd. (Toyama, Japan) hergestellt. Beim Klon 56-2A4 handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper der Maus. Er wurde durch die Immunisierung von Mäusen mit einem Peptid, das der Aminosäuresequenz 626-644 des humanem MMP-9 entspricht gewonnen. Der Antikörper bindet an die latente (92 kDa) und an die aktive (83 kDa) Form von MMP-9. Der Antikörper reagiert nicht mit anderen humanen MMP. Hohe Antikörper-Konzentrationen erhöhen die Sensitivität, niedrigere Antikörper-Konzentrationen die Spezifität der Ergebnisse.

Die ebenfalls verwendeten Antikörper der Firmen Novus Molecular Inc. (N4040L - CA, USA) und Amersham Bioscience Corp. (Ab-MMP-9 - NJ, USA) sind zurzeit nicht mehr kommerziell erhältlich. Bei beiden Antikörpern handelte es sich um monoklonale anti-MMP-9 Antikörper der Maus. Beide Firmen bescheinigten den Antikörpern eine gute Paraffingängigkeit.

Protokoll der immunhistochemischen Färbung

Falls nicht anders erwähnt, wurden alle Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

- Schritt 1:
- a. Die in 4%-iger gepufferten Formalinlösung fixierten Gewebeschnitte wurden mit 100% Xylol (Merck, Darmstadt) für 6 Minuten entparaffiniert.
 - b. Anschließend wurden die Schnitte für jeweils 2 Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe bis zum Aqua dest. hydratisiert. Zu Beginn wurden die Objektträger für 2 Minuten in eine 100%-ige Ethanol-Lösung (Merck, Darmstadt) getaucht, anschließend wurde die ETOH-Konzentration jeweils um 10% reduziert bis zu einer finalen ETOH-Konzentration von 70%. Schließlich wurden die Objektträger noch für 2 Minuten mit Aqua dest. hydratisiert.
 - c. Die Objektträger wurden danach 3x für jeweils 3 Minuten in einem Pufferbad gewaschen. Der Puffer enthält 0,05 M Tris-HCL (Merck, Darmstadt) und 0,15 M NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland). Zur Einstellung des pH-Wertes auf 7,6 diente eine starke Base aus NaOH (Merck, Darmstadt).
- Schritt 2:
- a. Die Objektträger wurden aus dem Pufferbad genommen und die jeweilige enzymatische Vorbehandlung oder die Mikrowellenvorbehandlung durchgeführt.
 - Die Schnitte wurden mit 0,05% Trypsin (Sigma, Taufkirchen) in Aqua dest. für 30 Minuten bei Raumtemperatur behandelt. Hierzu wurden 100 mg Trypsin in 125 ml H₂O gelöst. Anschließend wurden 0,5 g CaCl (Merck, Darmstadt) der Lösung hinzugefügt.
- Oder
- Die Schnitte wurden mit 0,1% Pronase (Sigma, Taufkirchen) in Aqua dest. für 30 Minuten bei Raumtemperatur behandelt.

Oder

- Die entparaffinierten Schnitte wurden in mikrowelleneignete Plastik- oder Glasgefäße gestellt, die mit 10mM Citratpuffer, pH 6,0 gefüllt waren. Der Puffer wurde mit Na-Citrat (Merck, Darmstadt) hergestellt, zur Einstellung des pH wurde HCl (Merck, Darmstadt) hinzugefügt. Die Gefäße mit den Schnitten wurden in das Mikrowellengerät (Siemens, München) gestellt und das Gerät eingeschaltet. Die Präparate wurden bei 850 Watt für 8 Minuten im Citratpuffer gekocht. Da die Schnitte während des Kochvorganges nicht austrocknen durften, wurde gegebenenfalls der Flüssigkeitsverlust mit Aqua dest. ausgeglichen. Anschließend kochten die Präparate noch zweimal für jeweils 2 Minuten bei 450 Watt. Nach dem Kochen wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für 15 Minuten abkühlen gelassen. Danach wurde Citrat-Puffer hinzugegeben bis die Raumtemperatur erreicht war.

b. Die Objektträger wurden danach 3x für jeweils 3 Minuten in einem Tris-HCl-Puffer gewaschen.

Schritt 3:

a. Um eine unspezifische Gewebereaktion, die vor allem in Paraffinschnitte beobachtet wurden zu vermeiden wurde die endogene Peroxidaseaktivität mit Hilfe einer 7,5% H₂O₂-Lösung (Merck, Darmstadt) blockiert. Um eine bessere Benetzung des Gewebes zu Erreichen wurde vor dem Auftragen der H₂O₂-Lösung das Gewebe mit einem Fettstift (Daido Sangyo Co. Ltd., Tokio, Japan) umrandet. Die Inkubation mit dem 7,5% Wasserstoffperoxid erfolgte für 10 Minuten in einer feuchten Kammer um ein Austrocknen zu verhindern.

b. Die Objektträger wurden zunächst kräftig in H₂O gespült und anschließend 3x für jeweils 3 Minuten im Tris-HCl-Puffer gewaschen.

- Schritt 4:
- a. Die Objektträger wurden aus dem Pufferbad genommen und die überschüssige Feuchtigkeit abgeschüttelt.
 - b. Eine unspezifische Antikörperbindung wurde durch das kommerzielle Blockierungsreagenz des DAKO LSAB-Kits (DAKO Corp., Hamburg) verhindert. Das Blockierungsreagenz des LSAB-Kits wurde in einer feuchten Kammer so aufgetropft, dass die Testfläche vollständig bedeckt war. Das Blockierungsreagenz besteht aus Nonimmunserum von der Ziege in 0,05 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,6, vorverdünnt. Es enthält 6% Trägerprotein und 15 mM Natriumazid als Konservierungsmittel. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 30 Minuten.
 - c. Die Objektträger wurden danach 3x für jeweils 3 Minuten in einem Tris-HCl-Puffer gewaschen.

- Schritt 5:
- a. Die Objektträger wurden aus dem Pufferbad genommen und die überschüssige Feuchtigkeit abgeschüttelt.
 - b. Nach Resuspension des gelieferten Antikörper-Lyophilisat mit sterilem Tris-HCl-Puffer ergab sich eine Antikörperkonzentration der Suspension von 1 mg/ml. Der Antikörper wurde bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Der MMP-9-Antikörper, der von Dr. Lichtinghagen (Hannover) zur Verfügung gestellt wurde, wurde in einer Verdünnung von 1:2000 auf das Gewebe aufgetragen. Die Antikörperkonzentration wurde durch vorhergehende Versuche bestimmt. Hierbei sollte das Flimmerepithel der Bronchien und Bronchioli sich nur schwach anfärben. Dabei diente das Flimmerepithel der Bronchien und Bronchioli als interne Positivkontrolle.⁹⁷ Als Verdünnungsmittel diente ein spezieller Antikörperverdünner, der die Hintergrundfärbung inhibiert, „Antibody diluent with Background Reducing Components (DAKO Corp.,

Hamburg)“.

Oder

Zur Negativkontrolle wurde der MMP-9-Antikörper durch einen „nonimmune“ IgG-Antikörper vom Kaninchen (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, AL, USA) ersetzt. Dieser Antikörper wurde in gleicher Konzentration wie der MMP-9-Antikörper aufgetragen.

- c. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C im Kühlschrank. Die Objektträger befanden sich während der Inkubationszeit in einer feuchten Kammer um die Austrocknung der Präparate zu verhindern.
- d. Nach der Inkubation wurden die Objektträger gründlich 3x für jeweils 3 Minuten in einem Tris-HCl-Puffer gewaschen.

Schritt 6:

- a. Die Objektträger wurden aus dem Pufferbad genommen und die überschüssige Feuchtigkeit abgeschüttelt.
- b. Das zweite Reagenz des DAKO LSAB-Kits, der Brückenantikörper (DAKO Corp., Hamburg) wurde aufgetragen bis die Testfläche vollständig bedeckt war. Bei diesem Brückenantikörper handelt es sich um einen biotinylierten Antikörper gegen Kaninchen- und Mäuseimmunglobuline aus der Ziege in 0,05 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,6, vorverdünnt. Des Weiteren enthält das Reagenz 25% Trägerprotein und 15 mM Natriumazid. Die Inkubationszeit des Brückenantikörpers betrug 30 Minuten bei Raumtemperatur.
- c. Die Objektträger wurden anschließend 3x für jeweils 3 Minuten in einem Tris-HCl-Puffer gewaschen.

Schritt 7:

- a. Die Objektträger wurden aus dem Pufferbad genommen und die überschüssige Feuchtigkeit abgeschüttelt.

- b. Ein Tropfen des mit Peroxidase konjugiertem Streptavidin-Konzentrates (0,05 M Tris-HCl-Puffer, 0,1 NaCl, 15 mM NaN₃, pH 7,2) wurde mit 4 ml des Streptavidin-Verdünnungspuffer (0,05 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,6) (DAKO Corp., Hamburg) vermischt. Nach einer 10 minütigen Inkubation wurde das verdünnte Streptavidin in einer feuchten Kammer auf das Gewebe pipetiert. Das dritte Reagenz des DAKO LSAB-Kits inkubierte für 30 Minuten.
- c. Die Objektträger wurden anschließend 3x für jeweils 3 Minuten in einem Tris-HCl-Puffer gewaschen.

Schritt 8:

- a. Die Objektträger wurden aus dem Pufferbad genommen und die überschüssige Feuchtigkeit abgeschüttelt.
- b. Zur Entwicklung der Peroxidase diente eine Aminoethylcarbazol-Substratlösung (Sigma, Taufkirchen). 16 mg AEC wurden mit 4 ml Dimethylformamid (Sigma, Taufkirchen) gelöst und mit 46 ml Acetatpuffer (0,1 M, pH 5,2) sowie 60 µl H₂O₂ verdünnt. Diese Lösung wurde im Anschluss filtriert um die entstehenden Präzipitate zu entfernen. Der Acetatpuffer setzte sich aus 210 ml 0,1 M Essigsäure (Merck, Darmstadt) und 790 ml 0,1 M Na-Acetat-Lösung (Merck, Darmstadt) zusammen. Der pH-Wert wurde mit einer NaOH-Lösung eingestellt. Die filtrierte AEC-Lösung wurde in einer feuchten Kammer auf das Tumorgewebe aufgetragen und für 30 Minuten inkubiert.
- c. Die Objektträger wurden anschließend 3x für jeweils 3 Minuten in einem Tris-HCl-Puffer gewaschen.

Schritt 9:

- a. Die Objektträger wurden aus dem Pufferbad genommen und die überschüssige Feuchtigkeit abgeschüttelt.
- b. Die Gewebeschnitte wurden in ein Glasgefäß gestellt und in einer 1 zu 10

verdünnten Papanicolaou-Lösung (Merck, Darmstadt) für 90 Sekunden gefärbt.

- c. Anschließend wurden sie zum Bläuen für 30 Sekunden in ein Wasserbad gestellt.

- Schritt 10:
- a. Die gefärbten Präparate wurden nach dem Trocknen in Kaiser's Gelatine (Merck, Darmstadt) fixiert. Die Gelatine wurde zum Verflüssigen in der Mikrowelle erhitzt und mit einer Pipette auf das Gewebe aufgetragen. Anschließend wurden die Präparate mit Deckgläsern (Menzel-Gläser, Braunschweig) eingedeckelt und bis zur Erhärtung der Gelatine an der Luft gekühlt.

3.3. Evaluation der Proben

Die immunhistochemisch gefärbten Tumorschnitte wurden unabhängig voneinander von zwei Untersuchern, die mit den klinischen Daten nicht vertraut waren begutachtet. Die Proben wurden unter einem Leitz Laborlux Lichtmikroskop (Leitz, Wetzlar) mit den Vergrößerungsobjektiven x10 und x40 untersucht.

Die Streptavidin-Biotin-Enzym-Komplex-Methode (DAKO LSAB-Kit, DAKO, Hamburg) wurde gewählt um die MMP-9 Expression nachzuweisen. Die Antigen-Antikörper-Reaktion wurde durch eine Enzym-Substratreaktion sichtbar gemacht. Als Enzym fungierte in dieser Studie die Meerrettich-Peroxidase, als Substrat diente eine Aminoethylcarbazol (AEC)-Substratlösung (Sigma, Taufkirchen, Deutschland). Nach dieser Reaktion wurde ein rosarotes Präzipitat gebildet, das im Lichtmikroskop sichtbar war und die Lokalisation des Antigens in oder auf der Zelle spezifisch nachwies. An der Stelle des gesuchten Antigens, hier MMP-9 entstand bei der Anfärbung mit AEC ein rosarotes Reaktionsprodukt. Gelegentlich war bei der Anfärbung mit AEC eine braunrote statt der rosaroten Reaktion zu beobachten. Das war auf eine unvollständige Oxidation von AEC zurückzuführen und kann als Hinweis auf eine extrem hohe Enzymreaktion beziehungsweise Antigenreaktion, MMP-9 Expression in diesem Areal gelten. Das Enzym Peroxidase ist endogen in roten und weißen Blutzellen (Monozyten, Makrophagen, Granulozyten) enthalten. Um eine unspezifische Hintergrundreaktion in Gewebeschnitten mit diesen Zellen zu vermeiden, wurden die Paraffinschnitten vor der Inkubation mit dem Primärantikörper mit einer 7,5% H₂O₂-Lösung behandelt. Die endogene Peroxidase wird durch das Wasserstoffperoxid inhibiert.

Die Qualität des Antikörpers und der Färbemethode wurde mit Hilfe einer Negativkontrolle und einer positiven Gewebekontrolle ermittelt. In der Negativkontrolle wurde anstelle des

Primärantikörpers gegen MMP-9 der Gewebeschnitt mit IgG-Antikörper vom Kaninchen (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, AL, USA) inkubiert und anschließend mit dem immunhistochemischen Nachweis fortgeföhren. Dadurch wurde die Reaktion des Nachweissystems mit dem Gewebe untersucht. Gleichzeitig zeigte sich ob eine endogene Enzymaktivität vorhanden war. Eine positive Gewebekontrolle wurde zur Etablierung des immunhistochemischen Protokolls durchgeführt. Hierzu wurden Tumorzellen aus der HT 1080 Zellreihe (Fibrosarkom) verwendet. Diese lagen allerdings nur als Gefrierschnitte vor, so dass die Schritte 1 und 2 des Färbeprotokoll entfielen. Die Positivkontrolle musste nicht entparaffiniert und rehydriert werden. Außerdem brauchen die Gefrierschnitte im Gegensatz zu Paraffinschnitten nicht mit proteolytischen Enzymen oder Hitze (Mikrowelle, Schnellkochtopf, Autoklav) vorbehandelt zu werden. In den Gefrierschnitten kommt es nicht zur Maskierung der antigener Epitope durch die Fixierungsmittel. Nach Abschluss und Evaluierung des Färbeprotokoll konnte auf die weitere positive Gewebekontrollen verzichtet werden. Zum einen wurden alle Tumorschnitte, so ausgewählt, dass neben den Tumoranteilen auch Flimmerepithel der Bronchien und Bronchioli und Bindegewebe, vor allem Fibroblasten auf einem Tumorschnitt sichtbar waren. Frühere Untersuchungen anderer Forschergruppen wiesen eine Expression für MMP-9 im Flimmerepithel der Bronchien und Bronchioli nach.^{38,50} Somit fungierte das Flimmerepithel der Bronchien und Bronchioli als interne Positivkontrolle. Eine zweite interne Positivkontrolle in den immunhistochemisch gefärbten Präparaten stellten die häufig zu findenden Makrophagen, Monozyten und Granulozyten dar.

Am Anfang der Arbeit musste die optimale Antikörperkonzentration für das immunhistochemische Protokoll ermittelt werden. Hier zeigte sich bei einer Konzentration des MMP-9 Antikörpers von Dr. Lichtinghagen von 1 zu 2000 eine leichte Anfärbung des Flimmerepithel der Bronchien und der Bronchioli.⁹⁷ Das Bronchialepithel ist bekannt für seine MMP-9 Expression und ist somit als interne Positivkontrolle und als Referenz für die MMP-9 Expression geeignet. Die Färbintensität für eine

MMP-9 Expression in den Tumorzellen und in den Fibroblasten wurde in jedem einzelnen der 145 Tumorschnitte mit der Färbeintensität des an den Tumor angrenzenden normalen Bronchialepithels verglichen. Die Tumorzellen und die Fibroblasten wurden anschließend in drei Kategorien hinsichtlich ihrer Färbeintensität eingeteilt: Färbeintensität geringer als die Färbeintensität des Flimmerepithel, Färbeintensität gleich der Färbeintensität des Flimmerepithels und Färbeintensität stärker als die Färbeintensität des Flimmerepithels. Mittels Mikroskop wurden für jedes Präparat 100 Tumorzellen in der Peripherie und im Zentrum ausgezählt und der prozentuale Anteil der gefärbten Tumorzellen ermittelt. Nur Zellen, die wenigstens eine gleichstarke Färbeintensität wie die interne Positivkontrolle zeigten wurden für die Tumorzellen als gefärbt gewertet. Alle nekrotischen Tumorzellen wurden nicht hinsichtlich der MMP-9 Expression gewertet. Nach Auswertung der Färbeintensität und Auszählen der Tumorzellen wurde die MMP-9 Expression in drei Kategorien unterteilt: eine negative MMP-9 Expression lag vor wenn $\leq 5\%$ der Tumorzellen gefärbt waren, eine heterogene MMP-9 Expression zeigte sich bei einer Tumorzellfärbung zwischen $> 5\%$ und $< 95\%$, eine homogene MMP-9 Expression lag bei einer Färbung der Tumorzellen von $\geq 95\%$ vor (Tabelle 7).

Tabelle 7: MMP-9 Expression in Tumorzellen

Negative MMP-9 Expression	: $\leq 5\%$ der Zellen zeigen eine Färbung ^a
Heterogene MMP-9 Expression	: $> 5\%$ und $< 95\%$ der Zellen zeigen eine Färbung ^a
Homogene MMP-9 Expression	: $\geq 95\%$ der Zellen zeigen eine Färbung ^a

^a Nur Zellen, die die gleiche oder eine stärkere Färbeintensität als das Flimmerepithel der Bronchien und der Bronchioli hatten wurden als gefärbt gewertet.

Im Bindegewebe wurden ebenfalls für jeden Tumorschnitt 100 Fibroblasten unter dem Mikroskop bei 40-facher Vergrößerung ausgezählt und der prozentuale Anteil der gefärbten Tumorzellen ermittelt. Auf Grund des Färbemusters und der geringen Färbeintensität wurde für die Fibroblasten eine andere Einteilung gewählt. Eine MMP-9 Expression lag vor wenn $\geq 10\%$ der Fibroblasten gefärbt waren. Bei einer Färbung von $< 10\%$ der Zellen wurden die Proben hinsichtlich einer MMP-9 Expression als negativ gewertet (Tabelle 8).

Tabelle 8: MMP-9 Expression in den Fibroblasten

Negative MMP-9 Expression	: $< 10\%$ der Fibroblasten zeigen eine Färbung
Positive MMP-9 Expression	: $\geq 10\%$ der Fibroblasten zeigen eine Färbung

Die Präparate mit diskrepanten Untersuchungsergebnissen wurden noch einmal unter dem Mikroskop untersucht und ein Konsens zwischen den unabhängigen Untersuchern getroffen. Dies war bei lediglich 10 (7%) der insgesamt 141 Tumorschnitte der Fall.

3.4. Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit der SPSS Version 13.0 Software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) für Windows XP (Microsoft Corp., Redmond, Washington, USA) durchgeführt. Nach Auswertung der Färbeintensität und der Anzahl der gefärbten Tumorzellen wurden die Präparate wie oben beschrieben in drei Gruppen unterteilt. Die erhobenen Daten für die Fibroblasten und die Tumorzellen wurde zusammen mit den klinischen und histologischen Parametern in eine Datenbank zusammengeführt. Ein Zusammenhang zwischen einer MMP-9 Expression mit klinisch-pathologischen Parametern wurde mittels doppelseitigem Pearson's Chi Quadrat Test untersucht. Alle Variablen wurden dichotomisiert. Folgende klinische und pathologische Parameter wurden bei der statistischen Auswertung berücksichtigt: die Tumorgröße (T-Stadium), der Lymphknotenbefall (N-Stadium), die Fernmetastasierung (M-Stadium), die klinische Einteilung gemäß der UICC, die Tumorhistologie, die Tumordifferenzierung (Grading), das Geschlecht, das Alter, das Lokalrezidiv und die Fernmetastasierung. Die Patienten wurden bezüglich ihrer Variablen in Gruppen unterteilt. Diese Gruppen wurden dann jeweils mittel Pearson's Chi Quadrat Test auf eine statistisch signifikante Häufung der MMP-9 Expression untersucht. Anschließend wurden die Langzeitüberlebenskurven der Patienten mit komplettem Follow-up mit der Kaplan-Meier Methode errechnet. Die Überlebensverteilung der Gruppen wurde durch den log rank Test verglichen. Als primärer Endpunkt wurde das tumorbedingte Überleben, gemessen von Tag der Operation bis zur letzten Nachsorgeuntersuchung oder dem Tod definiert. Die Daten der Patienten, die noch am Leben waren und kein Anhalt für ein Rezidiv hatten wurden zensiert. Patienten mit einem postoperativen Überleben von weniger als 30 Tagen wurden für die Langzeitüberlebensanalyse ausgeschlossen. 13 Patienten (9%) mit unvollständigem Follow-up oder mit nicht tumorbedingtem Tod wurden nicht zensiert sondern für die Analysen des Langzeitüberlebens ausgeschlossen.¹⁶ Die Überlebenskurven wurden für die klinischen und pathologischen Parameter und für die MMP-9

Expression errechnet. Zusätzliche Überlebenskurven bei MMP-9 Expression in verschiedenen Untergruppen wurden bei ausreichend Patienten zusätzlich ermittelt. Zusätzliche Kaplan-Meier Analysen untersuchten die Beziehung zwischen einem Lokalrezidiv oder einer Fernmetastasierung mit der MMP-9 Expression. In diesen Überlebenskurven war der Endpunkt nicht der Tod sondern das Auftreten des Lokalrezidivs oder der Metastasierung. Des Weiteren konnte anhand der Überlebenskurven die Ein-, Drei- und Fünf-Jahres-Überlebensrate eingesehen werden. Die Signifikanzschwelle wurde für alle statistischen Untersuchungen bei 0,05 fixiert. Die MMP-9 Expression wurde im Bindegewebe, in den Fibroblasten und in den Tumoranteilen untersucht. Die Tumoren wurden in einen zentralen und einen peripheren Abschnitt eingeteilt. Deshalb wurden die statistischen Analysen für die unterschiedliche MMP-9 Expressionen im jeweiligen Gewebe getrennt durchgeführt.

Die Beeinflussung des prognostischen Wertes der MMP-9 Expression durch Faktoren, deren prognostische Relevanz bereits bewiesen wurde, wurde mit dem „Cox proportional hazard analysis“ untersucht.^{7,8} Das COX PH Modell wird am häufigsten für multivariate Betrachtungen von Überlebensanalysen in der medizinischen Forschung benutzt. Zu diesem Zweck wurden der pT-Status, pN-Status, Tumorhistologie und Tumorgrading schrittweise in das Modell eingefügt. Dadurch konnte eine Beeinflussung der Kovariablen auf die prognostische Relevanz von MMP-9 Überexpression untersucht werden. Bei der multivariaten Analyse wurden ebenfalls nur Patienten mit vollständiger Nachbehandlung zugelassen.

4. Ergebnisse

Die Streptavidin-Biotin-Enzym-Komplex-Methode (= LSAB-Methode) ist eine sehr sensitive Nachweismethode, die zum Nachweis geringer Antigenmengen geeignet ist.¹⁷ Diese standardisierte Methode wird in den meisten anderen Studien, die MMP-9 untersucht haben verwendet.^{19,89} Allerdings gibt es zwei entscheidende Faktoren, die sich einen unmittelbaren Einfluss auf den MMP-9 Nachweis haben: die Wahl des Antikörpers und die Wahl der Vorbehandlung der Paraffinschnitte.

4.1. Antikörper

Zuerst wurde eine intensive Suche nach einem geeigneten Antikörper für die immunhistochemische Färbung betrieben. Zur Auswahl standen sowohl monoklonale als auch polyklonale Antikörper. Diese Antikörper wurden von kommerziellen Firmen oder von Wissenschaftlern bezogen. Die folgenden monoklonalen, kommerziellen Antikörper wurden ausgiebigst getestet und auf ihre Spezifität und reproduzierbare Ergebnisse geprüft:

N4040L, Novus Molecular Inc., CA, USA

Ab-MMP-9, Amersham Bioscience Corp., NJ, USA

AB-3, Oncogene/Calbiochem, Bad Soden

Der einzige nichtkommerzielle und polyklonale anti-MMP-9 Antikörper, der in dieser Arbeit verwendet wurde, stellte uns freundlicherweise Dr. Lichtinghagen von der Abteilung für Klinische Chemie I der Medizinischen Hochschule Hannover zur Verfügung. Die Wahl des geeigneten Antikörpers bei der Untersuchung von MMP ist von äußerst großer Bedeutung bei der immunhistochemischen Untersuchung. Dies bestätigen auch viele andere Forschergruppen.

Die Antikörper N4040L der Novus Molecular Inc. stellte sich sehr schnell als unbrauchbar für diese Studie heraus. Leider zeigte der Antikörper auf den Paraffinschnitten keine positive Reaktion. Auch sehr hohe Antikörper-Konzentrationen von bis zu 1 zu 10 vermochten keine Färbung zu zeigen. Auch in den internen Positivkontrollen, dem Flimmerepithel der Bronchien, dem Flimmerepithel der Bronchioli und den inflammatorischen Zellen, wie Makrophagen und Monozyten fand keine immunhistochemische Reaktion statt. In Gefrierschnitten mit HT 1080 Zellen zeigte sich lediglich bei Antikörperkonzentration von 1 zu 40 oder höher ein spezifischer

Nachweis von MMP-9. Dieser Antikörper schien nur für Gefrierschnitte bestimmt zu sein, obwohl die Herstellerfirma ihrem Antikörper auch eine Paraffingängigkeit bescheinigte.

Der zweite, getestete Antikörper, der Ab-MMP-9 von Amersham Bioscience Corp. Verhielt sich ähnlich wie der Antikörper N4040L. Eine positive Reaktion konnte nur in den Gefrierschnitten mit HT 1080 Zellen beobachtet werden. Die Paraffinschnitte der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome zeigten auch bei sehr hohen Antikörperreaktionen kein Färbemuster hinsichtlich MMP-9 Expression auf.

Der dritte, kommerzielle Antikörper (AB-3, Oncogene/Calbiochem, Bad Soden) zeigte als einziger kommerzieller Antikörper eine positive Reaktion bei den Paraffinschnitten auf. Jedoch war seine Färbereaktion unspezifisch. Das Färbemuster dieses Antikörpers war mit dem der Negativkontrolle identisch. Somit konnte auch dieser Antikörper nicht für die weitere Studie verwendet werden.

Der einzige Antikörper mit einem spezifischen Färbemuster war der anti-MMP-9 Antikörper, der von Dr. Lichtinghagen hergestellt wurde. Bei diesem Antikörper handelt es sich um einen monospezifischen, polyklonalen Antikörper dessen Affinität für MMP-9 noch gesteigert wurde („affinity purified“). Die Spezifität für MMP-9 wurde durch ELISA und eine Western Blot Analyse bewiesen.^{30,59} Nach Inkubation der Tumorschnitte mit dem Antikörper und den verschiedenen Reagenzien, die im immunhistochemischen Protokoll beschrieben sind, wurde die Antigen-Antikörper-Reaktion durch eine Peroxidase-Substratreaktion sichtbar gemacht. Nach dieser Reaktion wurde ein rosarotes Präzipitat gebildet, das im Lichtmikroskop sichtbar war und die Lokalisation des Antigens in oder auf der Zelle spezifisch nachwies. Die entsprechende Färbereaktion wurde in allen Zellen des Flimmerepithels der Bronchien und Bronchioli sowie in

allen inflammatorischen Zellen beobachtet. Des Weiteren konnte MMP-9 im Zytoplasma der Tumorzellen und der Fibroblasten von verschiedenen Präparaten nachgewiesen werden. Eine unspezifische Färbung der Tumorschnitte wurde in 4 Fällen beobachtet. Diese 4 Fälle wurden von den weiteren Untersuchungen und der statistischen Auswertung ausgeschlossen.

Zusammenfassend wurden sehr unterschiedliche Färbemuster der verschiedenen Antikörper beobachtet (Tabelle 9). Zwei Antikörper zeigten sehr wohl eine spezifische Reaktion gegen MMP-9 in Gefrierschnitten, jedoch keine Reaktion in den Paraffinschnitten der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome. Das Färbemuster eines weiteren kommerziellen Antikörpers war mit seiner Negativkontrolle identisch. Lediglich der anti-MMP-9 Antikörper von Dr. Lichtinghagen reagierte spezifisch mit dem Gewebe. Somit wurde dieser Antikörper für die weiteren Untersuchungen in der Studie verwendet.

Tabelle 9: Färbereaktion der Antikörper gegen MMP-9

Antikörper/Klon	Quelle	Färbereaktion
N4040L	Novus Molecular Inc.	Negativ
Ab-MMP-9	Amersham Bioscience Corp.	Negativ
Ab-3	Oncogene/Calbiochem	Nicht-spezifisch
polyklonaler Antikörper (Kaninchen)	Lichtinghagen	spezifisch

4.2. Vorbehandlung

Neben der sorgfältigen Auswahl des Antikörpers spielt auch die Vorbehandlung der Paraffinschnitte eine Rolle bei dem Färbeergebnis. 3 unterschiedliche Methoden wurden zu Beginn evaluiert. Zwei Methoden basieren auf einer enzymatischen Vorbehandlung des Gewebes mit Trypsin und Pronase, bei der anderen Methode werden die Präparate durch Hitze vorbehandelt. Alle Vorbehandlungen sollen die antigenen Epitope demaskieren und somit die Bindung des Antikörpers an MMP-9 zu erleichtern.

Die Ergebnisse bei der Vorbehandlung mit den Enzymen Trypsin und Pronase waren gleichwertig und können somit zusammengefasst werden. Der Nachweis von MMP-9 konnte bei entsprechend hohen anti-MMP-9 Konzentrationen von 1 zu 100 in den Zellen des Flimmerepithels und des retikulohistiozytären Systems erbracht werden. Die Intensität der Färbereaktion war allerdings nur schwach ausgeprägt. Wenige Antikörper konnten sich an die Epitope der MMP-9 binden. Die Tumorzellen und die Fibroblasten zeigten ebenfalls eine schwach positive Reaktion. Eine Erhöhung der Konzentrationen von den Enzymen Trypsin und Pronase oder eine Verlängerung der Inkubationszeit des Gewebes mit den Enzymen brachten keine besseren Ergebnisse.

Ein anderes Ergebnis stellte sich bei den Tumorproben, die mit Hitze behandelt worden waren heraus. Die Tumorproben wurden dazu mit einer Pufferlösung in die Mikrowelle gegeben und entsprechend dem Färbeprotokoll erhitzt. Die interne positive Kontrolle, das Flimmerepithel der Bronchioli, die Makrophagen und die Monozyten färbten sich bei einer Konzentration von 1 zu 100 kräftig an. Die Färbeintensität der gefärbten Tumorzellen und Fibroblasten war ebenfalls hoch. Zellen, die keine MMP-9 enthielten färbten sich nicht. Einem neuen Ansatz in der Evaluation der MMP-9 Expression folgend wurde die anti-MMP-9 Konzentration auf 1 zu 2000 reduziert. Bei

dieser Konzentration färbte sich das Flimmerepithel der Bronchioli nur noch leicht an. Die Färbintensität der Tumorzellen und der Fibroblasten wurde anschließend mit dem angrenzenden Flimmerepithel verglichen. Dieser Vergleich wurde bereits in anderen Studien verwendet.⁹⁷

4.3. Evaluation der immunhistochemisch gefärbten Proben

Die MMP-9 Expression konnte nicht nur im Tumorgewebe sondern auch im Bindegewebe, in den Fibroblasten nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde jedes Tumorpräparat separat hinsichtlich dieser zwei verschiedenen Orte der MMP-9 Expression ausgewertet. Anschließend wurden die Paraffinschnitte jeweils in drei Gruppen unterteilt. Gemäß der immunhistochemischen Reaktion der zentralen Tumorzellen erfolgte eine Einteilung in eine Gruppe mit negativer MMP-9 Expression, in eine Gruppe mit heterogener MMP-9 Expression und in eine Gruppe mit homogener MMP-9 Expression. Der Cut-Point zur Einteilung der Präparate in die drei Gruppen erfolgte auf Grund von vorhergehenden Evaluationen des immunhistochemischen Färbesystems. Hierbei zeigte sich bei 30% aller Proben des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms eine positive Reaktion von wenigstens 95% der Tumorzellen. In weiteren 30% konnte keine Färbung oder eine Färbung in weniger als 5% der Tumorzellen beobachtet werden. Deshalb wurden die Gewebeproben als negativ hinsichtlich einer MMP-9 Expression im Tumor gewertet, wenn keine Färbung vorlag oder $\leq 5\%$ der Tumorzellen gefärbt waren. Eine heterogene MMP-9 Expression der Präparate wurde bei einer Tumorfärbung von $> 5\%$ und $< 95\%$ der Zellen postuliert. Für die Einteilung in die Gruppe der homogenen MMP-9 Expression mussten $\geq 95\%$ der Tumorzellen MMP-9 exprimieren. Bei dieser Einteilung wurden lediglich die Zellen als positiv gewertet, die die gleiche oder eine stärkere Färbeintensität als das normale Flimmerepithel der Bronchien und der Bronchioli auswiesen. Das Flimmerepithel diente nicht nur als interne Positivkontrolle zur Überprüfung der Färbemethode und Färbereagenzien sondern auch als Referenz hinsichtlich der MMP-9 Expression.⁹⁷ Alle inflammatorischen Zellen in den Präparaten zeigten ebenfalls eine MMP-9 Expression durch die immunhistochemische Färbung. Die Färbeintensität in allen Makrophagen und Monozyten war jedoch schwächer als die des normalen Bronchialepithels. Somit dienten die Immunzellen nicht als Referenz für die MMP-9 Expression in den Tumorzellen.

4 Patienten mussten wegen einer unspezifischen Färbung ihrer Präparate von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen werden. Somit blieben Tumore von 141 Patienten für die weiteren Analysen übrig. Die endgültige Studie umfasste 33 weibliche und 108 männliche Patienten. Das Durchschnittsalter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation betrug 59,4 Jahre mit einer Spannweite von 37 bis 76 Jahre. Der Median für das Alter lag bei 60. Die histologische Untersuchung der Tumorschnitte zeigte 57 Plattenepithelkarzinome, 58 Adenokarzinome, 13 großzellige Karzinome und 13 Misch tumor. Die TNM-Klassifikation ergab bei 24 Patienten einen Tumor mit der Größe T1 und bei 89 Patienten ein T2-Stadium. Tumoren mit der Größe T3 und T4 waren recht selten vertreten mit 15 Patienten beziehungsweise 13 Fälle. Bei 74 Patienten konnte kein Nachweis einer Lymphknoteninfiltration (N0) beobachtet werden. Eine Metastasierung in den ipsilateralen peribronchialen Lymphknoten und/oder in den ipsilateralen Hiluslymphknoten (N1) konnte bei 27 Patienten diagnostiziert werden. In 40 Fällen fanden sich Metastasen in den ipsilateralen, mediastinalen und/oder subkarinalen Lymphknoten (N2). Alle Patienten waren zur Zeit der Operation frei von Metastasen (M0). Das chirurgische Staging der Patienten ergab resezierbare Tumore (T1-T4) ohne Nachweis von Metastasen (M1) oder kontralateralen oder supraclavicularen Lymphknotenbefall (N3). Mit Wissen der TNM-Klassifikation konnte für alle Patienten die Einteilung gemäß der UICC vorgenommen werden. Diese Klassifikation wird vor allem in der Klinik verwendet und hat eine noch größere prognostische Signifikanz als die einzelnen Variablen der TNM-Klassifikation. 68 Patienten befanden sich im Stadium I (T1-2, N0, M0). Weitere 16 Patienten wurden in das Stadium II (T1-2, N1, M0 oder T3, N0, M0) eingeteilt. Das fortgeschrittene Stadium IIIa (T3, N1, M0 oder T1-3, N2, M0) wurde bei 43 Patienten diagnostiziert. Das Stadium IIIb (T4, N0-2, M0) ist mit 14 Fällen nur selten vertreten, weil vor allem die frühen Stadien des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms durch eine chirurgische Resektion behandelt werden. Bei fortgeschrittenen Stadien sind die Patienten bereits oft inoperabel. Außerdem macht die Lobektomie oder Pneumektomie nur noch wenig Sinn, da das Bronchialkarzinom in diesen Stadien als nicht

mehr kurabel gilt. Bei keinem Patienten konnte eine Metastasierung festgestellt werden. Somit lag auch kein Stadium IV (T1-4, N0-3, M1) vor. Die histologische Tumordifferenzierung ergab folgende Werte: G1-G2 in 61 Fälle, G3-G4 in 53 Fälle.

64 (45,4%) der insgesamt 141 Tumorproben zeigten keine MMP-9 Expression. 51 (36,2%) Gewebeschnitten exprimierten MMP-9 mit einem heterogenen Färbemuster. In 26 (18,4%) Fällen wurde eine homogene MMP-9 Expression beobachtet (Abbildung 6).

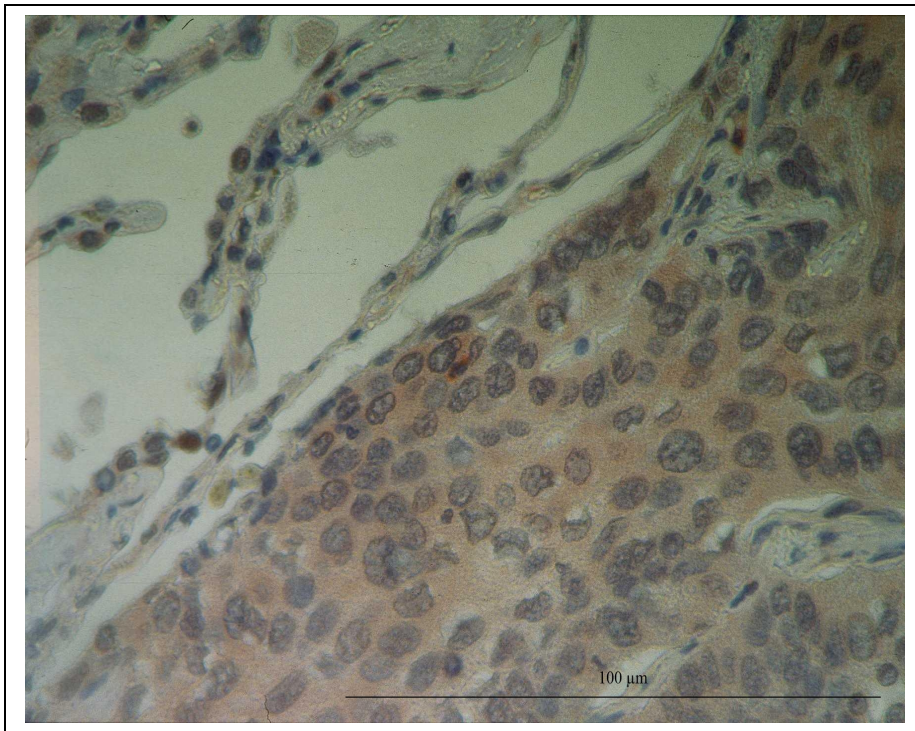


Abbildung 6: Immunhistochemischer Nachweis von MMP-9 ^a

- ^a Die Abbildung zeigt die immunhistochemische Färbung von MMP-9 in einem primären Plattenepithelkarzinom der Lunge. Die Färbeintensität der Tumorzellen ist gleichwertig oder höher als die Färbeintensität des Flimmerepithels. Mehr als 95% der Tumorzellen sind gefärbt. Dieser Tumor zeigt eine homogene MMP-9 Expression.

Anschließend wurden die Gruppen mit negativer, heterogener und homogener MMP-9 Expression mit den klinischen und pathologischen Parametern in Tabelle 10 eingefügt. Dabei sollte das Verhältnis zwischen homogener MMP-9 Expression und den klinisch-pathologischen Parametern untersucht werden. Die doppelseitigen p-Werte wurden mit Pearson's Chi Quadrat Test errechnet. Zu diesem Zweck wurden die Patienten in zwei Gruppen unterteilt. Die eine Gruppe enthielt die Patienten mit einem pathologischen T1- und T2-Stadium, die andere Gruppe enthielt die pT3- und pT4-Stadien. Für die T-Stadien konnte keine statistisch signifikante Differenz zwischen den zwei Gruppe ermittelt werden ($p = 0,17$). Zwei pathologische N-Stadium Gruppen wurden gebildet, wobei eine Gruppe die lymphknotenfreien Patienten (pN0) und die andere Gruppe, die Patienten mit Lymphknotenmetastasen (pN1-pN2). Hier konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der homogenen Expression von MMP-9 nachgewiesen werden ($p = 0,13$). Schließlich wurden ebenfalls die UICC-Stadien zu zwei Gruppen zusammengefasst. Die erste Gruppe enthielt das UICC-Stadium I (68 Patienten), die zweite Gruppe die UICC Stadien II bis III (55 Patienten). Hierbei wurde ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen beobachtet, jedoch eine Tendenz zur homogenen Expression von MMP-9 im fortgeschrittenen Stadium. Der p-Wert lag bei 0,054.

Eine homogene MMP-9 war ebenfalls gleich häufig in den verschiedenen Histologien zu finden ($p = 0,55$). Auch die Tumordifferenzierung scheint keinen Einfluss auf die homogene MMP-9 Expression zu haben. Der Vergleich der Patienten mit einem G1-G2 Grading und den Patienten mit einem G3-G4 Grading erbrachte keine signifikanten Unterschied bei der homogenen MMP-9 Expression ($p = 0,35$). Es fand sich keine signifikante Korrelation zwischen einer homogenen MMP-9 Expression und dem Geschlecht ($p = 0,44$), jedoch mit dem Alter der Patienten ($p = 0,049$). Die Tumorschnitte von Patienten ≥ 60 Jahren zeigten eine signifikant häufigere homogene MMP-9 Expression als Tumorschnitte von Patienten < 60 Jahre.

Zusammenfassend konnte bei dieser Studie keine signifikante Korrelation zwischen der homogenen MMP-9 Expression und dem pT-Stadium, pN-Stadium, Tumorhistologie, Tumordifferenzierung und Geschlecht beobachtet. Im Gegensatz hierzu zeigte sich eine Tendenz zur homogenen MMP-9 Expression bei fortgeschrittenem UICC-Stadium sowie eine statistisch signifikante Korrelation zum Alter.

Anschließend erfolgte die statistische Auswertung der heterogenen und homogenen MMP-9 Expression mit den klinisch-pathologischen Parameter. Bei dieser Einteilung zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen heterogener und homogener MMP-9 Expression mit dem pT-Stadium ($p = 1,00$), pN-Stadium ($p = 0,74$), UICC-Stadium ($p = 1,00$), Tumorhistologie ($p = 0,53$), Tumordifferenzierung ($p = 0,09$), Geschlecht ($p = 0,70$) und Alter ($p = 0,87$).

Tabelle 10: Korrelation zwischen MMP-9 Expression der Tumorzellen und klinisch-pathologischen Parametern

Variabel	Patienten pro Gruppe	n (%MMP-9 Expression ^a)		p-Wert ^b
		Negativ	Homogen	
Total	141	64 (45,4 %)	51 (36,2 %)	26 (18,2 %)
TumorgroÙe				
pT1-pT2	113	51 (36,2 %)	44 (31,2 %)	18 (12,8 %)
pT3-pT4	28	13 (9,2 %)	7 (5,0 %)	8 (5,0 %)
Lymphknotenstatus				p = 0,171
pN0	74	35 (24,8 %)	29 (20,6 %)	10 (7,1 %)
pN1-pN3	67	29 (20,6 %)	22 (15,6 %)	16 (11,3 %)
UICC-Klassifikation				p = 0,131
Stadium I	68	31 (22,0 %)	29 (20,6 %)	8 (5,7 %)
Stadium II-III	73	33 (23,4 %)	22 (15,6 %)	18 (12,8 %)
Tumorhistologie^c				p = 0,054
Adenokarzinom	64	32 (22,7 %)	23 (16,3 %)	9 (6,4 %)
Plattenepithelkarzinom	38	19 (13,5 %)	6 (4,3 %)	13 (9,2 %)
Andere Histologien	26	13 (9,2 %)	9 (6,4 %)	4 (2,2 %)
Tumordifferenzierung^d				p = 0,545
G1-G2	61	22 (15,6 %)	25 (17,7 %)	14 (9,9 %)
G3-G4	53	28 (19,9 %)	17 (12,1 %)	8 (5,7 %)
Geschlecht				p = 0,356
weiblich	33	16 (11,3 %)	13 (9,2 %)	4 (2,8 %)
männlich	108	48 (34,0 %)	38 (27,0 %)	22 (15,6 %)
Alter				p = 0,441
< 60	64	30 (11,3 %)	27 (19,1 %)	7 (5,0 %)
≥ 60	77	34 (24,1 %)	24 (17,0 %)	19 (13,5 %)

- a Negative MMP-9 Expression: ≤ 5 % der Tumorzellen, heterogene Expression: > 5 % und < 95 % der Tumorzellen, homogene MMP-9: ≥ 95 % der Tumorzellen gefärbt mit wenigsten der gleichen Intensität der internen Kontrolle. Patienten mit negativer und heterogener MMP-9 Expression wurden zu einer Gruppe zusammengefasst und mit Patienten mit MMP-9 Überexpression verglichen.
- b Die doppelseitigen p-Werte wurden mit Pearson's Chi-Quadrat Test ermittelt. Die p-Werte die eine signifikante Korrelation zwischen klinisch-pathologischen Parameter und der homogenen MMP-9 Expression zeigen sind hervorgehoben.
- c Die „anderen Histologien“ enthalten 13 großzellige Bronchialkarzinome und 13 Mischtumore.
- d Beim großzelligem Bronchialkarzinom und den gemischten Tumoren wurde kein Grading vorgenommen (26 Fälle).

Die Betrachtung des Fibroblasten im Bindegewebe ergab zum einen keine Immunreaktivität zum anderen konnte bei einigen Proben eine schwache Immunfärbung von maximal 50% der Zellen beobachtet werden. In 16 Fällen konnten nicht ausreichend Fibroblasten zur Evaluation gefunden werden, so dass letztlich 125 Proben zur Verfügung standen. Auch hier wurde die Färbeintensität der Fibroblasten für MMP-9 mit der Färbeintensität des Flimmerepithels der Bronchioli im selben Schnitt verglichen.⁹⁷ In allen Präparaten war die Färbeintensität der Fibroblasten schwächer oder gleich stark als die Färbeintensität des Flimmerepithels der Bronchioli. In keinem einzigen Fall zeigten die Fibroblasten eine stärkere Färbung als die interne Positivkontrolle. Anschließend wurden für jeden Schnitt Fibroblasten ausgezählt und die Prozentzahl der gefärbten Tumorzellen und Fibroblasten ermittelt. 34 (27,2 %) der Tumorproben zeigten keine Färbung der Fibroblasten, 55 (44,0 %) eine Färbung von ≤ 10 %, und 36 (28,8 %) eine Färbung zwischen > 10 % und ≤ 50 %. Der Cut-Point wurde nach Evaluation unseres immunhistochemischen Färbesystems bei 10 % der gefärbten Fibroblasten festgelegt. Die Färbespezifität wurde mittels Negativkontrolle kontrolliert. Eine MMP-9 Expression lag vor wenn mehr als 10 % der Fibroblasten eine Färbung aufzeigten.

Danach erfolgte die statistische Auswertung der MMP-9 Expression in den tumorangrenzenden Fibroblasten mit den klinisch-pathologischen Parameter. Bei dieser Einteilung zeigte sich keine signifikante Korrelation mit dem pT-Stadium ($p = 0,81$), pN-Stadium ($p = 0,24$), UICC-Stadium ($p = 0,12$), Tumorhistologie ($p = 0,60$), Geschlecht ($p = 1,00$) und Alter ($p = 0,24$). In den Präparaten mit einem Grading G1 und G2 wurde MMP-9 statistisch signifikant gehäuft exprimiert im Vergleich zu Präparaten mit einem Grading G3 und G4.

Tabelle 11: Korrelation zwischen MMP-9 Expression der Fibroblasten und klinisch-pathologischen Parametern

Variable	Patienten pro Gruppe	MMP-9 Expression^a	p -Wert^a
Total	125	36 (28,8 %)	
Tumorgröße			
pT1-pT2	98	29 (29,6 %)	p = 0,813
pT3-pT4	27	7 (25,9 %)	
Lymphknotenstatus			
pN0	65	22 (33,8 %)	p = 0,237
pN1-pN2	60	14 (23,3 %)	
Tumorhistologie^b			
Adenokarzinom	49	12 (24,5 %)	p = 0,603
Plattenepithelkarzinom	54	18 (33,3 %)	
Andere Histologien	22	6 (27,3 %)	
Grading^c			
G1-2	33	22 (66,7 %)	p = 0,016
G3-4	39	8 (20,5 %)	
Geschlecht			
weiblich	28	4 (14,3 %)	p = 1,00
männlich	97	22 (22,7 %)	
Alter			
< 60 Jahre	59	20 (33,9 %)	p = 0,244
≥ 60 Jahre	56	16 (28,6 %)	

^a MMP-9 Expression in den Fibroblasten bei einer Färbung > 10 % der Fibroblasten

^b Die doppelseitigen p-Werte wurden mit Pearson's Chi-Quadrat Test ermittelt. Die p-Werte die eine signifikante Korrelation zwischen klinisch-pathologischen Parameter und der MMP-9 Expression zeigen sind hervorgehoben.

^c Die „anderen Histologien“ enthalten großzellige Bronchialkarzinome und Mischtumore.

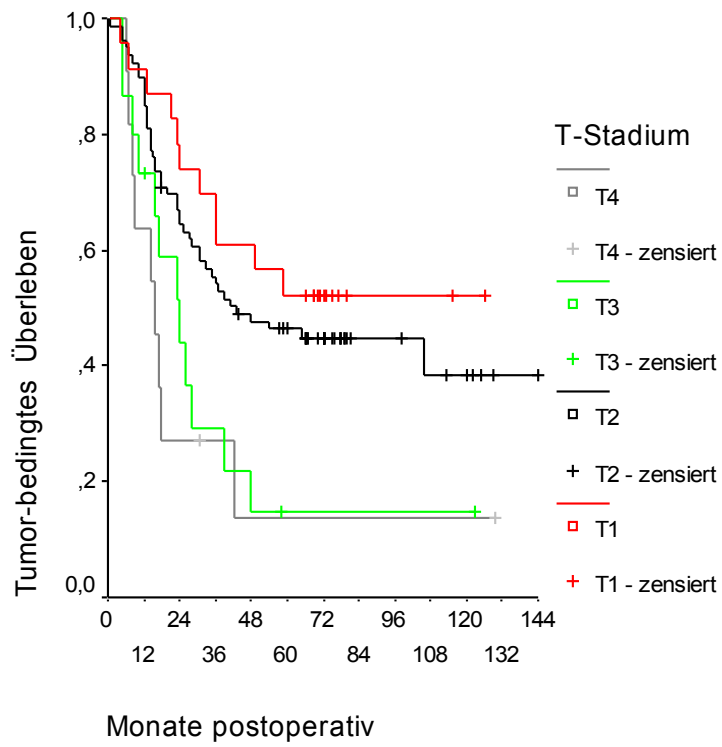
^d Beim großzelligen Bronchialkarzinom und den gemischten Tumoren wurde kein Grading vorgenommen (22 Fälle).

4.4. Überlebensanalysen

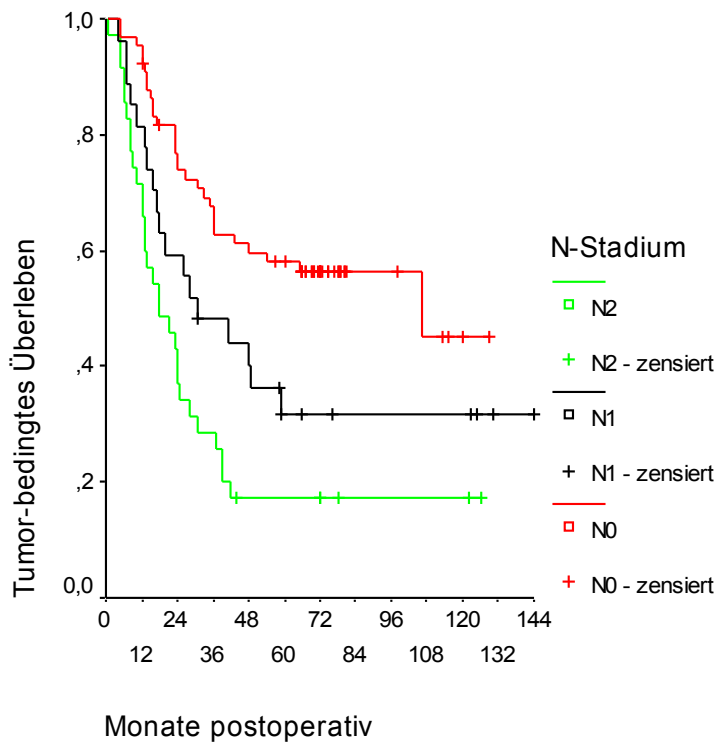
Für die Überlebensanalysen standen insgesamt Daten von 128 Patienten zur Verfügung. 13 der 141 untersuchten Patienten wurden von den Langzeitüberlebensanalysen ausgeschlossen. Bei diesen Patienten waren entweder die Nachsorgeuntersuchungen nicht vollständig oder sie waren an einer nicht-malignombedingten Ursache verstorben. Patienten, die innerhalb von 30 Tagen nach der Operation verstorben waren wurden ebenfalls von den Überlebensanalysen ausgeschlossen, weil diese Patienten an postoperativen Komplikationen verstorben waren und der Tod nicht krebsbedingt war. Der durchschnittliche Zeitraum der Nachsorge betrug 72 Monate mit einer Spannweite von 12 und 144 Monaten.

Bei den Patienten mit kompletten Follow-up wurden anschließend Langzeitüberlebenskurven erstellt. Die Überlebenskurven wurden mit der Kaplan-Meier Methode errechnet, die Überlebensverteilung der verschiedenen Gruppen durch den log rank Test auf ihre Signifikanz überprüft. Die Tumorgröße, die Lymphknotenbeteiligung und das UICC-Stadium haben einen signifikanten Einfluss auf das Überleben. Der jeweiligen p-Werte, der durch den log rank Test ermittelt wurde, betrug $p = 0,0040$, $p = 0,0001$ und $p = 0,0001$. Die Tumorhistologie, die Tumordifferenzierung, das Geschlecht und das Alter hatten bei den Patienten keinen signifikanten Einfluss auf die Prognose ($p = 0,051$, $p = 0,59$, $p = 0,79$, $p = 0,06$). In der Abbildung 7 sind die Überlebenskurven der Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom für die verschiedenen Variablen dargestellt.

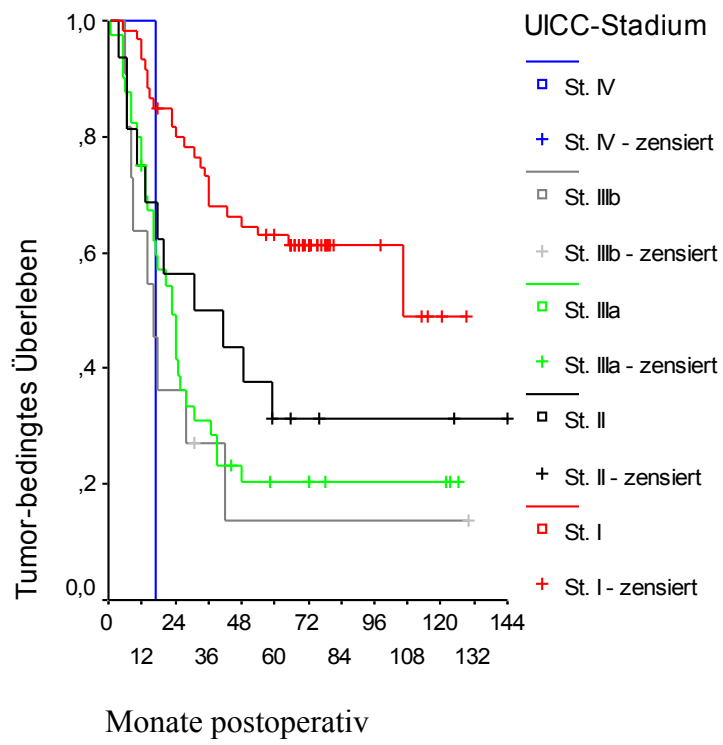
● pT-Status



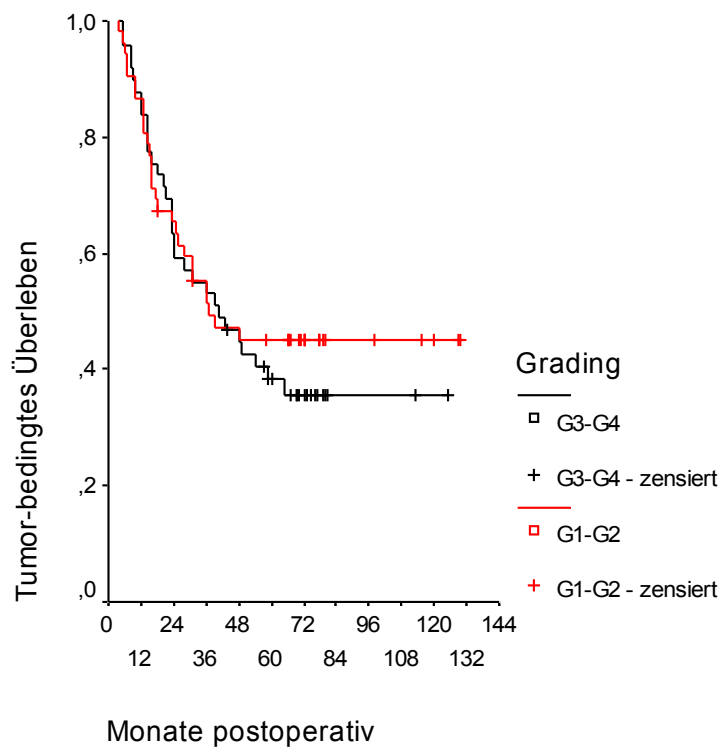
● pN-Status



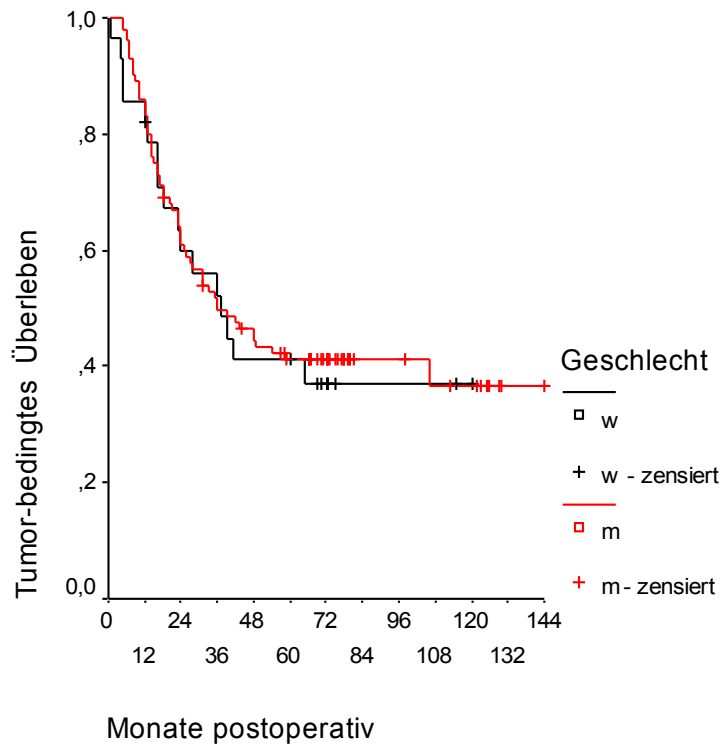
● UICC-Stadium



● Grading



● Geschlecht



● Alter

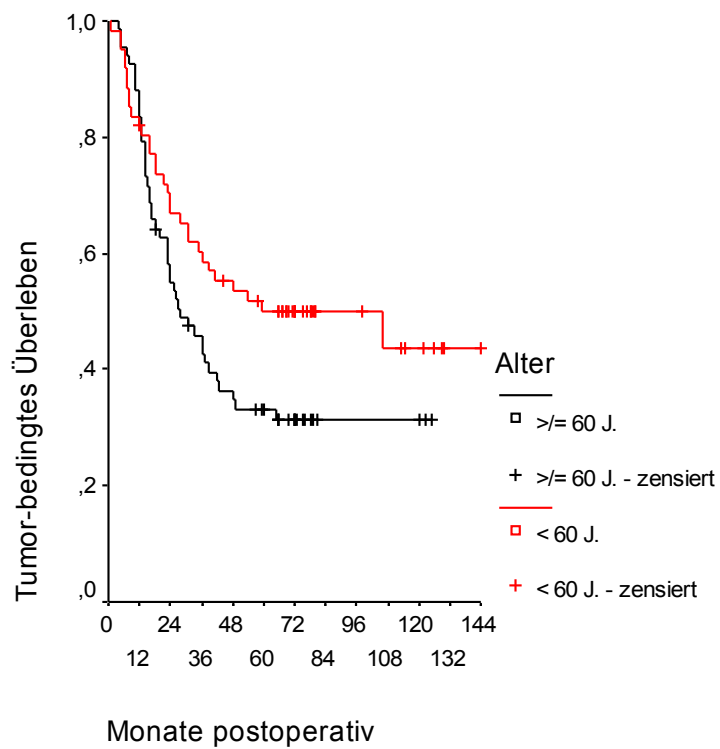
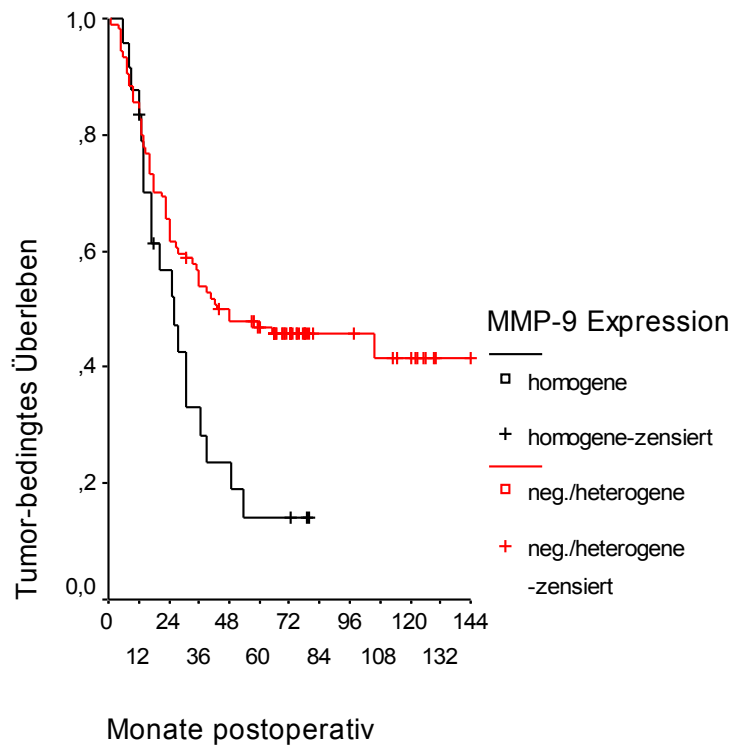


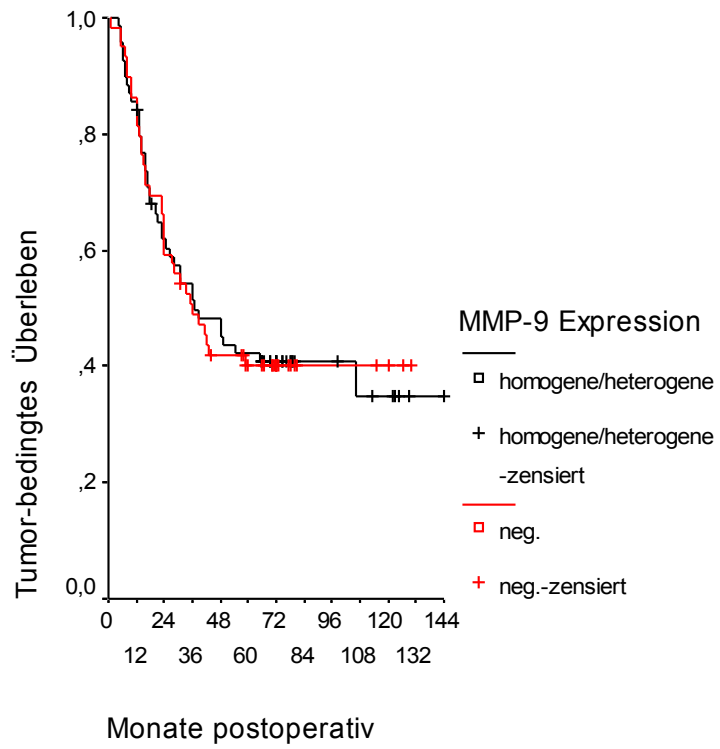
Abbildung 7: Überlebensanalysen von Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom

Schließlich wurde die Patientengruppe mit der homogenen MMP-9 Expression ($n = 24$) und die Patientengruppe mit der negativen und heterogenen MMP-9 Expression ($n = 104$) auf ihren prognostischen Wert mit der Kaplan-Meier Methode untersucht (Abbildung 8). Es konnte eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der homogenen MMP-9 Expression und einem ungünstigen Langzeitüberleben ermittelt werden. Der p-Wert des log-rank Tests lag bei 0,0135. Die univariate Analyse zeigte jedoch keinen Unterschied im Überleben bei Patienten mit heterogener und homogener MMP-9 Expression ($n = 69$) im Vergleich zu den Patienten mit negativer MMP-9 Expression ($n = 59$). In diesem Fall lag der p-Wert des log-rank Tests mit einem Wert von 0,99 nicht im signifikanten Bereich. Lediglich die homogene MMP-9 Expression hatte eine Auswirkung auf den tumorbedingten Tod gezeigt. Die MMP-9 Expression in den Fibroblasten hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben. In 14 Proben fand sich kein Bindegewebe, somit konnten hier lediglich 114 Proben in die Untersuchung eingeschlossen werden. Bei 30 Patienten wurde eine MMP-9 Expression in den Fibroblasten nachgewiesen, 84 Patienten zeigten keine MMP-9 Expression. Der Vergleich der Überlebensverteilung beider Gruppen ergab einen p-Wert von 0,73.

● Homogene MMP-9 Expression



● Heterogene und homogene MMP-9 Expression



● MMP-9 Expression in den Fibroblasten

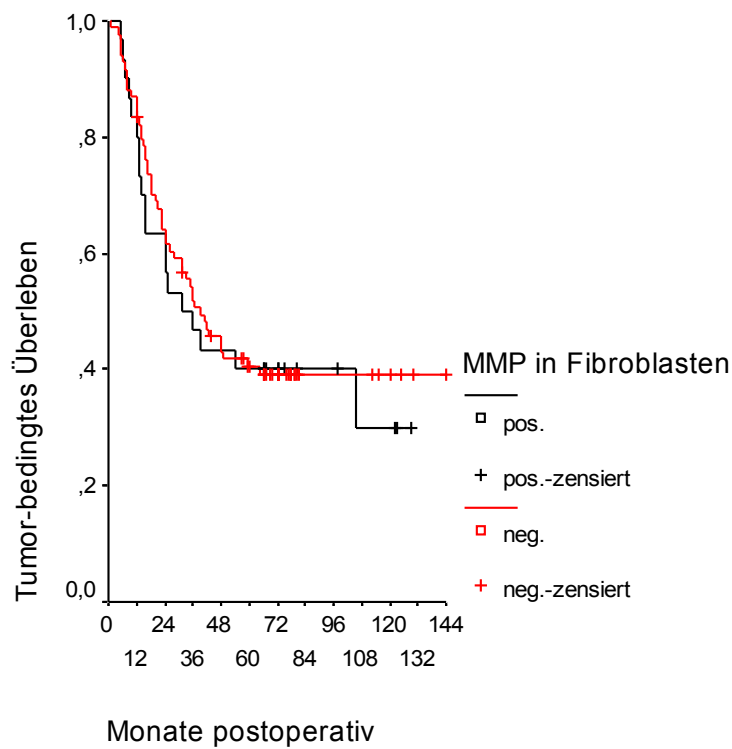


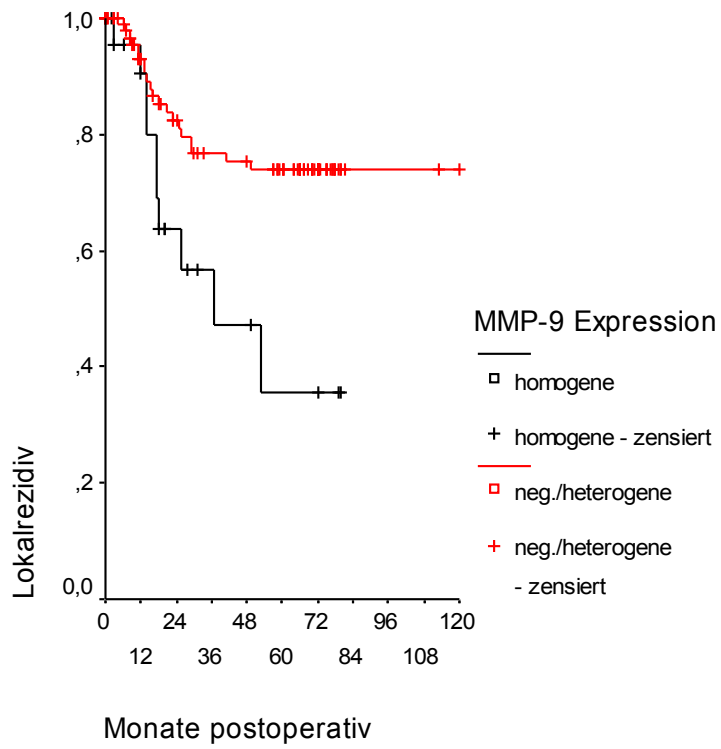
Abbildung 8: Überlebensanalysen von Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom

Weitere Überlebensanalysen zwischen der Patientengruppe mit homogener MMP-9 Expression und der Patientengruppe mit negativer und heterogener MMP-9 Expression konnten in den Untergruppen des Patientenkollektivs leider nicht durchgeführt werden. Die Überlebenskurven von Patienten mit frühen Tumorstadien (T1-, T2-, N0-Stadium) und homogener MMP-9 Expression wurden wegen zu geringen Fallzahlen nicht untersucht werden. Insbesondere könnten hierbei Patienten ermittelt werden, die von einer adjuvanten Therapie mit MMP-Inhibitoren profitieren würden.

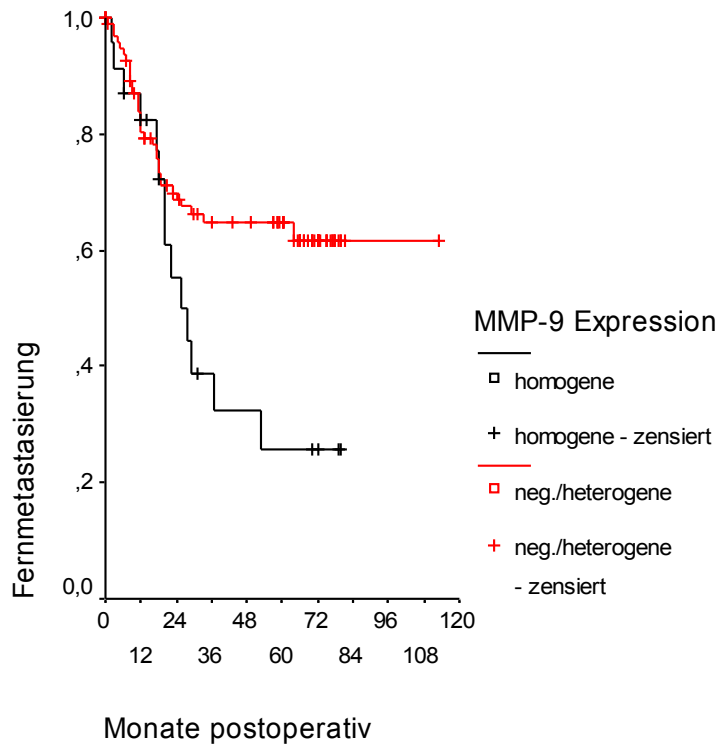
Bei insgesamt 78 Patienten (61%) der 128 zur Verfügung stehenden Patienten wurde ein Rezidiv beobachtet. Ein Rezidiv wurde als Auftreten eines Lokalrezidivs und/oder als Auftreten einer Fernmetastase definiert. In der Periode der Nachsorgeuntersuchungen entwickelten 49 Patienten (38%) dieser 128 Patienten Fernmetastasen und 31 Patienten (24%) ein lokales Rezidiv. Alle 78 Patienten verstarben an ihrem Malignom im weiteren Beobachtungszeitraum.

Die Entstehung eines Lokalrezidivs und einer Fernmetastasierung im Zusammenhang mit einer MMP-9 Expression wurde mit der Kaplan-Meier Methode untersucht. Bei homogener MMP-9 Expression kam es zu einer erhöhten Bildung eines lokalen Rezidives. Der log-rank Test war mit einem p-Wert von 0,0087 statistisch signifikant. Ebenso war die homogene MMP-9 Expression signifikant mit einer Fernmetastasierung assoziiert ($p = 0,0211$; log-rank Test). Ein Rezidiv (Lokalrezidiv und/oder Metastasierung) trat signifikant häufiger auf wenn eine homogene MMP-9 Expression vorlag ($p = 0,0116$, log-rank Test) (Abbildung 9). Die heterogene und homogene MMP-9 Expression war nicht mit einem gehäuften Auftreten eines Lokalrezidivs ($p = 0,59$; log-rank Test), einer Fernmetastasierung ($p = 0,66$; log-rank Test) oder eines Rezidivs ($p = 0,63$; log-rank Test) assoziiert.

● Lokalrezidiv und homogene MMP-9 Expression



● Fernmetastasierung und homogenen MMP-9 Expression



● Rezidiv (Lokalrezidiv und Metastasierung) und homogene MMP-9 Expression

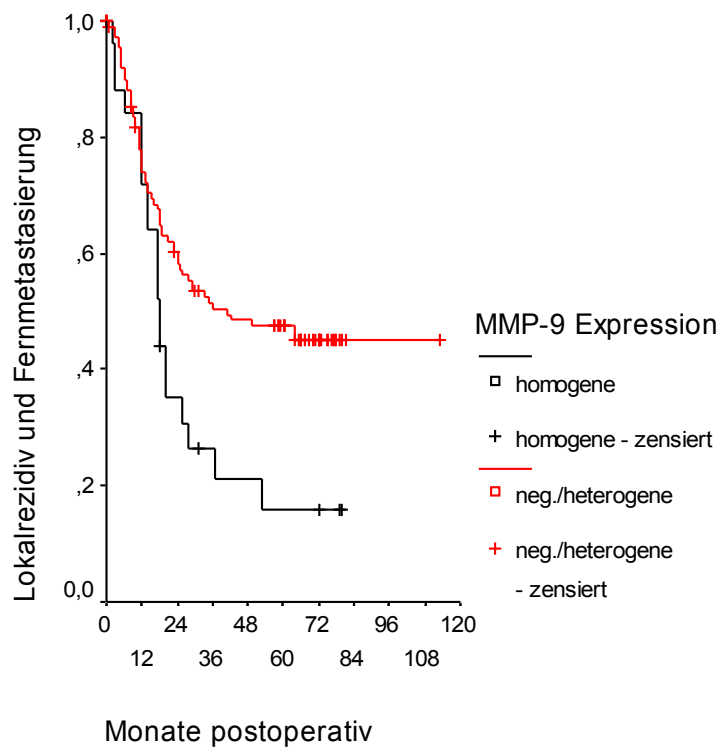


Abbildung 9: Überlebensanalysen von Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom

Eine MMP-9 Expression in den Fibroblasten war nicht mit einem erhöhtem Rezidiv ($p = 0,29$; log-rank Test), einem erhöhtem Lokalrezidiv ($p = 0,29$; log-rank Test) oder einer erhöhten Metastasierung ($p = 0,51$; log-rank Test) vergesellschaftet.

Zusammenfassend zeigte sich aufgrund unserer Untersuchungen ein signifikant verkürztes Überleben bei Patienten mit homogener MMP-9 Expression im Tumor. Diese Patienten entwickeln häufiger ein Rezidiv, ob als Lokalrezidiv oder als Fernmetastase. Eine heterogene MMP-9 Expression im Tumor und eine MMP-9 Expression in den Fibroblasten hatte keinen Einfluss auf das prognostische Überleben.

4.5. Multivariate Analyse

Abschließend wurde eine multivariate Cox-Regressionsanalyse durchgeführt. Mit dieser Analyse konnte festgestellt werden ob die Korrelation der homogenen MMP-9 Expression mit einem verkürzten Überleben auf eine mögliche Verbindung der MMP-9 Expression mit anderen prognostischen Faktoren zurückzuführen ist oder ob die MMP-9 Expression als unabhängiger Prognosefaktor gewertet werden darf (Tabelle 12). Für die multivariate Analyse wurden nur Patienten mit kompletten Follow-up eingeschlossen. Die Patienten durften nur an den Folgen des Bronchialkarzinoms verstorben sein. Somit standen 128 Patienten für die multivariate Analyse zur Verfügung. Die homogene MMP-9 Expression, der pT-Status, der pN-Status, die Tumorphistologie und die Differenzierung des Primärtumors wurden hinsichtlich möglicher Nebeneffekte auf die MMP-9 Expression getestet. Die Berücksichtigung der präoperativen Therapie als eigene Variable war nicht notwendig. Patienten, bei denen der Primärtumor als pT3 oder pT4 klassifiziert wurde, erhielten eine adjuvante perkutane Bestrahlung des Tumorbettes und Patienten mit mediastinalem Lymphknotenbefall (pN2) erhielten eine perkutane Bestrahlung des gesamten Mediastinums. Die Cox-Regressionsanalyse zeigte, dass die homogene MMP-9 Expression ein signifikanter und unabhängiger prognostischer Faktor für ein kürzeres Überleben bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom war. Der p-Wert lag mit 0,045 unterhalb der Signifikanzschwelle von 0,05. Das relative Risiko für einen tumorbedingten Tod war 1,8-fach erhöht bei Patienten mit einer homogenen MMP-9 Expression im Vergleich zu Patienten mit einer negativen oder heterogenen Expression von MMP-9. Das 95% Konfidenzintervall liegt zwischen 1,0 und 3,3. Beim Vergleich der relativen Risiken aller prognostischen klinischen und pathologischen Parameter liegt die homogene MMP-9 Expression an zweiter Stelle. Nur das relative Risiko einer Lymphknotenmetastasierung ist mit 2,5 größer als das relative Risiko bei einer homogenen MMP-9 Expression. Somit ist die homogene MMP-9 Expression der zweitstärkste prognostische Faktor

hinter dem pN-Status.

Tabelle 12: Multivariate Cox-Regressionsanalyse ^a

Risikofaktor	Univariate Analyse p-Wert ^b	Multivariate Analyse ^c		
		Relatives Risiko	95% Konfidenz- intervall	p-Wert
Homogene MMP-9 Expression ^d	0,0135	1,8	1,0-3,3	0,045
pT-Status	0,0040	1,4	1,0-1,9	0,066
pN-Status	0,0001	2,5	1,4-4,4	0,002
Tumor- histologie	0,0508	0,7	0,4-1,2	0,245
Grading ^e	0,5870	1,4	0,8-2,4	0,211

^a Nicht-malignom bedingte Todesursachen und ein nicht vollständiges Langzeitfollow-up führten zum Ausschluss von 13 Patienten. Somit verblieben 128 Patienten für die multivariate Cox-Regressionsanalyse.

^b p-Werte der univariate Analyse wurde mit dem log-rank Test bestimmt.

^c Die multivariate Analyse wurde mit dem Cox proportional-zufalls Modell bestimmt.

^d Tumorproben wurden als positiv bezüglich MMP-9 Überexpression gewertet, wenn sie wenigstens so stark wie die interne Positivkontrolle und ≥ 95 % der Tumorzellen gefärbt waren.

^e Beim großzelligen Bronchialkarzinom und den gemischten Tumoren wurde kein Grading vorgenommen (26 Fälle).

5. Diskussion

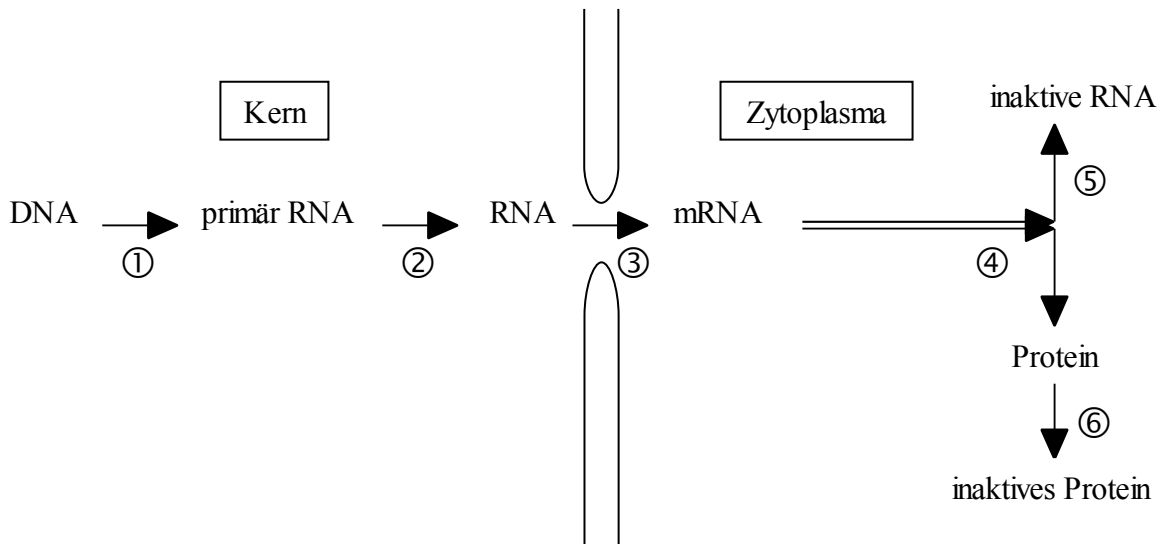
Weltweit gibt es jährlich zirka 1,3 Millionen Neuerkrankungen des Bronchialkarzinoms mit steigender Tendenz bei Frauen und jüngeren Patienten. Jährlich sterben allein in Deutschland über 45000 Personen an den Folgen eines Bronchialkarzinoms.^{48,49,98} Auch in Deutschland ist das Bronchialkarzinom bei den Männern der am häufigsten zum Tode führende maligne Tumor. Statistisch erkrankt jeder 20. Mann an einem Bronchialkarzinom. Bei Frauen steht in Deutschland das Bronchialkarzinom noch hinter dem Mammakarzinom und dem Kolonkarzinom in der Statistik, der durch Malignome bedingten Todesursachen. Aufgrund der zunehmenden Erkrankungshäufigkeit ist jedoch damit zu rechnen, dass in den kommenden Jahren die Todesraten für das maligne Bronchialkarzinom zunehmen werden.⁵⁸ Die Prognose der Patienten mit einem Bronchialkarzinom ist insgesamt schlecht. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate liegt zwischen 8 und 13 Prozent.^{31,62} Wichtige prognostische Parameter beim Bronchialkarzinom sind der histopathologische Typ, die Ausbreitung des Tumors (TNM-Klassifikation) und das UICC-Stadium. Das in dieser Arbeit untersuchte nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom ist in 75 Prozent der Fälle zu finden. Im Vergleich zum kleinzelligen Bronchialkarzinom zeichnet es sich durch eine langsamere Proliferationsrate, eine niedrigere Tumorverdopplungszeit, eine spätere Metastasierung und eine mäßigere Chemosensibilität aus. Bei Patienten mit einem Tumorstadium I beträgt die Fünf-Jahres-Überlebensrate nach kompletter Resektion 50 bis 75 Prozent, im Stadium II beträgt sie nur noch 30 bis 50 Prozent.⁶² Liegt die Fünf-Jahres-Überlebensrate im Stadium IIIA beim T3N1-Status noch bei 30 bis 40 Prozent, so ist die Prognose beim N2-Lymphknotenstatus mit 10 bis 15 Prozent deutlich schlechter.⁴⁴ Tumoröse Lymphknoten in der Hauptbifurkation und paraösophageal sind prognostisch eher ungünstig. Die Patienten mit einem Stadium IIIB sind meisten nicht mehr operabel. Nach alleiniger Strahlentherapie liegt hier die Fünf-Jahres-Überlebensrate bei durchschnittlich 5 Prozent. Die chirurgische Resektion ermöglicht eine kurative Behandlung des nicht-kleinzelligen

Bronchialkarzinoms. Auch bei vollständig resezierten Tumoren kommt es dennoch häufig zu einem Lokalrezidiv oder einer Fernmetastasierung.⁶² Des Weiteren gibt es trotz gleicher Histologie und gleichem Stadium eine große Varianz in der Rezidivhäufigkeit und im Langzeitüberleben bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom.⁴⁴ Ein besseres Verständnis der molekularen und biologischen Mechanismen der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome könnte helfen eine prognostische Vorhersage für jeden Patienten zu treffen. Die Patienten könnten anschließend in Untergruppen unterteilt werden und jede Gruppe einer adjuvanten Therapie zugeführt werden. Diese Therapie würde sich nach der Tumorbiologie richten und konventionelle Chemotherapeutika sowie neue Medikamente enthalten.

Die Transformation eines Carcinoma in situ in ein invasives Karzinom und die Verbreitung der Tumorzellen durch Invasion und Metastasierung sind wichtige Schritte in der Karzinogenese und erfordern die Degradation der Extrazellulärmatrix und der Basalmembran.⁵¹ Die Familie der Matrix Metalloproteinasen und ihre natürlichen Inhibitoren, die TIMPs sind aktiv in die komplexen Prozesse der Tumorprogression eingebunden.^{52,92} Neben der Zerstörung der Extrazellulärmatrix beeinflussen die MMP auch die Migration der Tumorzellen und die Angiogenese. MMP-2 und MMP-9 spielt eine Schlüsselrolle in der Tumorinvasion und der Metastasierung.^{77,92} Die zwei Gelatinasen sind in der Lage Gelatine und Kollagen Typ IV, einen Hauptbestandteil der Basalmembran zu degradieren. Diese Studie untersucht den klinischen Einfluss von MMP-9 bei einem Kollektiv von 141 Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom und langem Follow-up. Zu diesem Zweck wurde eine immunhistochemische Untersuchung zum Nachweis von MMP-9 durchgeführt.

Die Expression von MMP-9 kann durch verschiedene Ansätze und Methoden nachgewiesen werden, zum einen als Polypeptid durch immunhistochemische Nachweisverfahren zum anderen als

Messenger-Ribonukleinsäure durch die in-situ Hybridisation, Northern Blot usw. Hierbei spielt es keine Rolle in welcher Form das Genprodukt vorliegt um den Terminus Expression zu verwenden.⁸³ Dies kann sowohl als mRNA oder Protein sein. Die Genexpression wird als Biosynthese eines spezifischen Genprodukts (RNA oder Protein), die einer Kontrolle, der Genregulation unterliegt definiert. Die Synthese der spezifischen Proteine als Genprodukt erfolgt in zwei Schritten: Transkription und Translation.² Dabei ist es unerheblich, ob und in welchem Umfang die Regulation auf Ebene der DNA oder auf Ebene der RNA erfolgt um den Terminus Expression zu verwenden. Die Genexpression kann vermutlich bei jeder Etappe, von der DNA bis hin zu den Proteinen gesteuert und kontrolliert werden (Abbildung 10).



- ① Kontrolle der Transkription
- ② Kontrolle der Maturation
- ③ Kontrolle des RNA-Transports
- ④ Kontrolle der Translation
- ⑤ Kontrolle der Degradation des RNA
- ⑥ Kontrolle der Aktivität des Proteins

Abbildung 10: Die Kontrolle der Genexpression

Eine Zelle kann die Proteinsynthese beeinflussen, indem sie bestimmt wann und in welchem Zeitabstand die Transkription eines Gens erfolgt (Kontrolle der Transkription).² Anschließend kann die Reifung der heterogenen nukleären RNA (= hnRNA) beeinflusst werden. Bei dem Reifungsprozess kommt es zur Umwandlung des primären Transkriptionsprodukts in funktionsfähige RNA-Moleküle. Dies geschieht vor allem durch Exzision der nicht-kodierenden Sequenzen (Introns) mittels Endonukleasen. Die verbleibenden Exons werden durch Ligasen wieder miteinander verbunden. Dieser gesamte Prozess wird auch Spleißen genannt (Kontrolle der RNA-Reifung).² Weiterhin kann die RNA durch Anhängen der sogenannte „5'-Kappe“ (7-Methyl-GTP-Rest) vor dem Abbau durch Exonukleasen geschützt werden. Durch Selektion der reifen RNA im Zellkern kann der Transport in Richtung Zytoplasma beeinflusst werden (Kontrolle des RNA-Transports). Im Zytoplasma kann eine gezielte Selektion der mRNA zur Translation dieser mRNA führen (Kontrolle der Translation).² Allerdings ist auch eine gezielte Degradation der mRNA möglich die zur Inaktivierung führt (Kontrolle der Degradation der mRNA).² Ein letzter Schritt über die Kontrolle der Genexpression ist die Aktivität der Proteine. Die Kontrolle umfasst die Aktivierung aber auch die reversible Inaktivierung durch Phosphorylation der Proteine und die irreversible Inaktivierung durch proteolytische Degradation (Kontrolle der Aktivität der Proteine).² Die meisten dieser möglichen Kontrollpunkte sind bei der Expression von MMP-9 noch wenig oder gar nicht erforscht. Es ist lediglich bekannt, dass die MMP-9 Genexpression durch Wachstumsfaktoren, Zytokine, Stress und die onkogenetische Transformation der Zellen gesteigert werden kann.⁵² Besser erforscht ist die Aktivierung beziehungsweise Inaktivierung der MMP als Proteine. So werden die MMP durch unterschiedliche Gewebe- oder Plasmaproteinasen, wie Plasmin, Furin oder andere MMP aktiviert. Die Inaktivierung erfolgt vor allem durch ihre physiologische Inhibitoren die TIMPs.^{23,67} Die hier vorliegende Arbeit konnte nur den Nachweis von MMP-9 als Protein erbringen, da alle Tumorschnitte in Paraffin fixiert waren und eine Aufbereitung zur Messung der RNA nicht mehr möglich war.

Der immunhistochemische Nachweis von MMP-9 erfolgte mit einer sehr sensitiven Nachweismethode der Streptavidin-Biotin-Enzym-Komplex-Methode.¹⁷ Die LSAB-Methode ist hervorragend geeignet zum Nachweis geringer Antigenmengen, weil es bei dieser Methode zu einer Amplifikation des Färbesignales kommt. Nach Inkubation mit dem Primärantikörper gegen MMP-9 wurde ein biotinylierter Brückenantikörper auf die Tumorschnitte getropft. Der nun zugeführte Streptavidin-Biotin-Enzym-Komplex wurde über den biotinylierten Sekundärantikörper an den anti-MMP-9 Antikörper gekoppelt. Meistens bilden mehrere Enzym-Komplexe am Brückenantikörper. Mehrere Marker-Enzymmoleküle werden am Ort des gewebegebundenen MMP-9 nachweisbar. Somit wird das entsprechende Färbesignal in seiner Intensität verstärkt und für das menschliche Auge erst sichtbar. Des Weiteren kann durch die LSAB-Methode die Antikörperkonzentration niedrig dosiert werden. Eine unspezifische Färbung wird dadurch verhindert und die Spezifität der Methode erhöht. Ein weiterer Vorteil dieser indirekten Nachweismethode besteht in der Wahl der Antikörper. Der Untersucher kann aus vielen verschiedenen Antikörpern auswählen. Er muss lediglich drauf achten, dass der Primärantikörper und der Sekundärantikörper / Brückenantikörper von der selben Spezies kommen.¹⁷ Trotzdem zeigten alle getesteten, kommerziellen anti-MMP-9 Antikörper gar keine oder eine unspezifische Färbung. Diese Antikörper waren alle monoklonalen Ursprungs. Monoklonale Antikörper können im Vergleich zu polyklonalen Antikörpern weniger sensitiv sein, insbesondere dann wenn die antigene Determinante bei der Gewebefixierung zerstört oder strukturell verändert wurde. Andererseits zeichnen sich monoklonale Antikörper durch ihre sehr hohe Spezifität auf. Kreuzreaktionen mit anderen Antigenen treten nur sehr selten auf. Nur der nicht-kommerzielle, monospezifische, polyklonale Antikörper, der uns von Dr. Lichtinghagen zur Verfügung gestellt wurde zeigte ein spezifisches Färbemuster. Polyklonale Antikörper sind gegen unterschiedliche Bereiche des Antigens, gegen unterschiedliche Epitope, gerichtet und somit heterogen.^{30,59} Durch die Erkennung mehrerer Bereiche erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass die Antikörper auch mit

fixierungsbedingt stark denaturierten Antigenen reagieren. Die Empfindlichkeit der Nachweismethode konnte durch Verwendung dieses Antikörpers gesteigert werden. Eine Kreuzreaktivität zeigte sich in dieser Studie nicht. Diverse andere Studien, die den Antikörper bereits verwendet hatten, konnten keine Kreuzreaktivität mit anderen Antigenen und insbesondere mit anderen MMP feststellen und bescheinigten dem Antikörper eine hohe Spezifität und Sensitivität. Eine Voraussetzung für optimale Färbeergebnisse ist die Bildung des Antikörpers an MMP-9. Das Antigen kann jedoch im Gewebe zerstört oder maskiert sein. Die Fixierungsbedingungen des Gewebes spielen daher eine besonders große Rolle für optimale Färbeergebnisse. Die entparaffinierten Gewebeschnitte wurden vor Aufbringen des Primärantikörpers vorbehandelt, da durch die Fixierungsbedingungen die spezifische Bindung des Primärantikörpers an MMP-9 oft behindert wird. Zum einen wurde in Vorversuchen eine Vorbehandlung mit proteolytischen Enzymen, Pronase und Trypsin durchgeführt um die Maskierung der antigenen Epitope aufzuheben und MMP-9 nachzuweisen. Allerdings waren die Ergebnisse nicht befriedigend. Um eine schwach Färbereaktion zu erhalten, mussten der Antikörper stark konzentriert werden. Ganz andere Resultate wurden bei der Vorbehandlung mit Hitze in der Mikrowelle erzielt. Diese Vorbehandlung bietet die Möglichkeit antigene Epitope aufzuheben und ermöglicht somit eine starke Antigen-Antikörper-Reaktion. Die einwirkende Hitze führt zum Aufbrechen der bei der Formalinfixierung entstehenden Methylbrücken. Diese entstehen durch Quervernetzungen und führen zu Strukturveränderungen von Proteinen mit Verdeckung der gesuchten Antigene. Nur das Zusammenspiel von Färbemethode, Antikörper und Vorbehandlung führt zu guten Färbeergebnissen.

Nach der immunhistochemischen Färbung der Tumorproben erfolgte die Evaluation der Schnitte. Hierbei wurden 100 Zellen des Bindegewebes und des Tumors ausgezählt. Im Tumor wurde des Weiteren die Proben in einen zentralen und einen peripheren Anteil eingeteilt. Sämtliche

Auswertungen wurden für das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom zweimal durchgeführt. Einige Autoren berichten in ihren Arbeiten über eine verstärkte Anhäufung von MMP-9 am Rand des Tumors.²⁰ Bei den vorliegenden gefärbten Tumorschnitten zeigte sich ebenfalls eine intensivere Anfärbung am Tumorrand. Diese Anfärbung kam jedoch sowohl am infiltrierenden Tumorrand mit der Extrazellulärmatrix als auch am randständigen Tumor auf dem Objektträger vor. Trotzdem wurde nach einer Korrelation zwischen MMP-9 Expression mit den klinischen und pathologischen Parametern gesucht und die Überlebensanalyse für MMP-9 im peripheren Tumor errechnet. Diese Ergebnisse waren statistisch nicht signifikant und sind im Ergebnisteil dieser Arbeit nicht ausgeführt. Das unterschiedliche Ergebnis zwischen peripheren und zentralen Tumoranteilen wird wohl auf die stärkere Ausfällung der Antikörper und der restlichen Reagenzien des LSAB-Kits am Rand des Präparates zurückzuführen sein.¹⁷ Diese Probleme wurden ebenfalls in anderen Arbeiten beobachtet, in diesen Arbeiten bezogen sich die Resultate ebenfalls auf die MMP Expression in den zentralen Tumoranteilen.⁷⁷ Die stärkere Färbeintensität am Tumorrand ist also nicht auf eine erhöhte MMP-9 Expression zurückzuführen, sondern lediglich auf eine Amplifikation des Signals. Ob an der Grenze zwischen Tumor und Extrazellulärmatrix vermehrt MMP-9 exprimiert wird, kann wegen der physikalischen Grenzen der Immunhistochemie durch diese Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Hierbei könnte ebenso die Messung der mRNA aus zentralen und peripheren Tumoranteilen hinsichtlich der Quantität Auskunft geben. Ebenso könnte die Film in situ Zymographie die Aktivität der MMP in den zentralen und peripheren Tumoranteilen bestimmen, obwohl die physikalische Auflösung und die Reproduktion der Ergebnisse bei dieser Methode eingeschränkt sind.^{28,46}

Die Einteilung der immunhistochemisch gefärbten Tumorproben berücksichtigt, wie kürzlich vorgeschlagen die Färbeintensität des Flimmerepithels der Bronchioli als interne Kontrolle.⁹⁷ Die Tumorproben wurden hinsichtlich der MMP-9 Überexpression als positiv gewertet,

wenn sie wenigstens so stark wie die interne Kontrolle und mindestens 95 % der Tumorzellen gefärbt waren. Um zwischen einer mittleren Expression und einer Überexpression zu unterscheiden, wurde der Cut-Point gemäß unserer vorhergehenden Evaluation unseres immunhistochemischen Färbesystems gewählt. Hier zeigte sich bei 30 % der Tumorproben eine positive Färbung von wenigstens 95 %. Der Cut-Point orientierte sich also an unserem Wissen über die MMP-9 Färbung in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen. Er wurde nicht durch die minimal p-Methode bestimmt. Bei dieser Methode wird der Cut-Point anhand der Signifikanz beim Langzeitüberleben bestimmt. Dies führt jedoch dazu, dass die MMP-9 Überexpression nicht als prognostischer Faktor gewertet werden kann.³ Der Cut-Point zeigte bei 26 (18,2 %) Patienten einen MMP-9 Überexpression. Dieses Resultat ist vergleichbar mit anderen Studien, in denen ähnliche Prozentzahlen von MMP-9 Überexpression in NSCLC gefunden wurden.⁹⁷ Bei der Ermittlung des Cut-Points bezüglich der Expression von MMP-9 in den Fibroblasten wurde ähnlich vorgegangen. Der Cut-Point wurde nach Evaluation unseres immunhistochemischen Färbesystems bei 10 % der gefärbten Fibroblasten festgelegt.

Die Studie beinhaltete letztlich 141 Patienten. $\frac{3}{4}$ der Patienten waren männlich, dies entspricht der aktuellen Verteilung des Bronchialkarzinoms.⁴⁸ In der Zukunft ist jedoch mit einer Verschiebung hin zum weiblichen Geschlecht zu rechnen.⁵⁸ Der Häufigkeitsgipfel des Bronchialkarzinoms wird um das 55. bis 60. Lebensjahr angegeben. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug in dieser Studie 59,4 Jahre. Histologisch konnten bei 40,4 % ein Plattenepithelkarzinom, bei 41 % ein Adenokarzinom, bei 9,2 % ein großzelliges Karzinom und bei ebenfalls 9,2 % ein Misch tumor nachgewiesen werden. Dies entspricht der Häufigkeitsverteilung der WHO.⁹⁶ Allerdings zeigen sich in den asiatischen Studien mehr Adenokarzinome, in Europa zeigt sich in den Studien eine leichte Übergewichtung der Plattenepithelkarzinome. 48,2 % der operierten Patienten befanden sich im Stadium I, 11,3 % im Stadium II, 30,5 % im Stadium IIIa.

Vor allem Patienten im frühem Tumorstadium profitieren am allermeisten von einer chirurgischen Resektion. Jedoch kommt es im Stadium I immer noch zu Rezidiven in 40 % der Fälle.^{31,61} Die Klassifikation der eingeschlossenen Patienten ist mit den im Anschluss vorgestellten Studien gut vergleichbar.

In der Studie zeigte sich eine MMP-9 Expression bei 54,6 % der Proben, eine homogene MMP-9 Expression war nur in 18,4 % der Fälle zu finden. Eine Korrelation zwischen MMP-Expression oder MMP-9 Überexpression mit dem pT-Stadium, pN-Stadium, Tumorhistologie, Tumordifferenzierung oder Geschlecht ließ sich statistisch signifikant nicht nachweisen. Lediglich in einem höheren UICC-Stadium gab es eine Tendenz zu einer Überexpression von MMP-9. Cox et al. gelang der Nachweis von MMP-9 bei 52 % der Fälle.¹⁹ Hierzu mussten mehr als 20 % der Tumorzellen eine mittel bis starke Färbung nachweisen um als positiv gewertet zu werden. Eine Einteilung in eine heterogene und homogene Expression fand nicht statt. Eine stärkere Färbereaktion zeigte sich an den infiltrativen Tumorgrenzen. Eine Korrelation zu klinisch-pathologischen Werten fanden sich nicht. Shou berichtete über eine MMP-9 Expression bei nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom in 65,5 % von 119 Fällen.⁸⁹ Die Arbeitsgruppe um Shou zeigte eine statistische Signifikanz zwischen der MMP-9 Expression und dem pT-, pN- und UICC-Stadium. In den fortgeschrittenen Tumoren zeigte sich eine vermehrte MMP-9 Expression. Bei uns zeigte sich ebenfalls eine Tendenz zu einer Überexpression von MMP-9 im fortgeschrittenem Tumorstadium. Die MMP-9 Expression konnte bei Nawrocki in 41 von 88 Patienten (46,6 %) geführt werden.⁷² Der Nachweis wurde hier nicht mittels Immunhistochemie sondern durch die mRNA-Bestimmung durchgeführt. Eine Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern fand sich nicht. Die immunhistochemische Studie von Thomas fand eine MMP-9 Expression in 42 % von insgesamt 115 Präparaten.⁹⁷ Die Evaluation der gefärbten Proben erfolgte wie in dieser Arbeit im Vergleich zur internen Positivkontrolle. Wenn mehr als 20 % der Tumorzellen eine stärkere

Färbung als die interne Positivkontrolle aufzeigten, wurde der Terminus Überexpression verwendet. Allerdings zeigte sich eine MMP-9 Überexpression in lediglich in 3 % der Fälle. Signifikante Korrelationen zu klinisch-pathologischen Parametern fanden sich nicht.

Weiterhin wurden in dieser Arbeit Überlebensanalysen bei 128 Patienten durchgeführt. 13 von 141 Patienten mussten ausgeschlossen werden, da entweder das Follow-up nicht vollständig oder die Patienten an einer nicht-malignombedingten Erkrankung verstorben waren. Das durchschnittliche Follow-up betrug 72 Monate. Dies ist doppelt so lange wie in den Vergleichsstudien.^{19,20,89} Die Überlebenskurve wurden mit der Kaplan-Meier Methode errechnet. Die Tumorgröße, die Lymphknotenbeteiligung und das UICC-Stadium haben einen signifikanten Einfluss auf das Überleben ($p = 0,0040$, $p = 0,001$ und $p = 0,0001$). Diese Ergebnisse decken sich mit den Vergleichsstudien, wobei Cox et al. bei der steigender Tumorgröße lediglich eine Tendenz zu einem vorzeitigem Versterben nachweisen konnten.¹⁹ Allerdings besteht bei einem größeren Tumor eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, dass bereits Blut- oder Lymphgefäße infiltriert sind und somit eine Streuung wahrscheinlicher wird. In allen Vergleichsstudien hatten die Tumordinfiltration in die Lymphknoten und das Tumorstadium eine höhere prognostische Signifikanz.^{19,20,89} Ein Lymphknotenbefall deutet bereits auf eine Verschleppung des Tumors hin, auch wenn beim Lymphknotenbefall die Streuung regional begrenzt ist. Andererseits wird von einigen Wissenschaftler der Lymphknotenbefall bereits heute als Metastasierung verstanden und die radikale Lymphknotendissektion immer kritischer gesehen. Insbesondere beim Malignem Melanom und beim Mammakarzinom konnten mehrere Studien zeigen, dass die regionale Lymphknotendissektion keinen Einfluss auf das Langzeitüberleben hat und da bereits von einem systemischen Befall auszugehen ist. Somit kommt nach der chirurgischen Resektion der systemischen Therapie im Anschluss eine große Bedeutung zu.

Bei 24 der 128 eingeschlossenen Patienten konnte eine homogene MMP-9 Expression in den Tumorzellen nachgewiesen werden. Eine statistisch signifikante Korrelation konnte zwischen homogener MMP-9 Expression und ungünstigem Langzeitüberleben gefunden werden ($p = 0,0135$). Die univariate Analyse zeigte jedoch keinen Unterschied im Überleben bei Patienten mit heterogener und homogener MMP-9 Expression ($n = 69$) im Vergleich zu den Patienten mit negativer MMP-9 Expression ($n = 59$). In diesem Fall lag der p-Wert des log-rank Tests mit einem Wert von 0,99 nicht im signifikanten Bereich. Die Vergleichsstudien von Cox oder Shou zeigten ebenfalls eine signifikante Korrelation zwischen einer MMP-9 Expression der Tumorzellen und vorzeitigem Tod.^{19,89} Die p-Werte betragen 0,0023 beziehungsweise 0,0126. Dies unterstreicht die Wichtigkeit der MMP beim Tumorwachstum und Tumormetastasierung. Die gezielte Hemmung der MMP könnte ein weiterer Schlüssel in der Krebstherapie sein. Weiterhin könnte die Identifizierung von Hochrisikopatienten diejenigen identifizieren, die von einer aggressiven Chemotherapie profitieren und den anderen eine Chemotherapie gegebenenfalls ersparen. Lokalrezidive und eine Metastasierung traten statistisch signifikant gehäuft bei den Tumoren mit homogener MMP-9 Expression auf ($p = 0,0078$ und $p = 0,0211$).

Durch eine multivariate Analyse sollte abschließend geklärt werden, ob die homogene Expression als unabhängiger Prognosefaktor gewertet werden darf. Die Cox-Regressionsanalyse zeigte, dass die homogene MMP-9 Expression mit einem p-Wert von 0,045 ein signifikanter und unabhängiger prognostischer Faktor für ein kürzeres Überleben bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom ist. Das relative Risiko für einen tumorbedingten Tod war 1,8-fach erhöht bei Patienten mit einer homogenen MMP-9 Expression im Vergleich zu Patienten mit einer negativen oder heterogenen Expression von MMP-9. Nur das relative Risiko einer Lymphknotenmetastasierung ist mit 2,5 größer als das relative Risiko bei einer homogenen MMP-9 Expression. Somit ist die homogene MMP-9 Expression der zweitstärkste prognostische Faktor

hinter dem pN-Status. Cox konnte ebenfalls die MMP-9 Expression als weiteren unabhängigen prognostischen Faktor neben dem pN-Status identifizieren. Der p-Wert betrug hierbei 0,027, das relative Risiko war 1,7-fach erhöht für einen tumorbedingten Tod.¹⁹ Shou ermittelte MMP-2 als unabhängigen prognostischen Faktor, dieser Nachweis konnte ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe erbracht werden.^{77,89} MMP-9 konnte nicht als unabhängiger prognostischer Wert belegt werden. Eine mögliche Erklärung hierzu ist die starke Expressionsabhängigkeit von MMP-9 zu MMP-2 in dieser Studie.

In dieser Studie konnte belegt werden, dass MMP-9 einen prognostisch Einfluss beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom hat. Weiterhin geht die Expression von MMP-2 und MMP-12 beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom mit einem kürzeren Überleben einher und sind prognostisch unabhängige Parameter.^{41,77} Weitere Untersuchungen der restlichen MMP könnten helfen das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom besser zu charakterisieren. Andere bereits untersuchte prognostische Faktoren bezüglich des Überlebens sind beispielsweise E-Caderine, EGFR (endothelial growth factor), Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA), c-erbB-2 und deuten somit indirekt auf eine aggressivere Tumorform hin.^{19,40,63,102} Durch die Informationen kann abschließend für jeden Tumor eine Art Fingerabdruck erstellt und anschließend Hochrisikopatienten besser identifiziert werden. Der Vorschlag von Cox zur Etablierung eines prognostischen Modells beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom geht sicherlich in die richtige Richtung.²⁰ In seinem Modell sollen beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom die Expression von MMP-2, MMP-9, EGFR und c-erbB-2 untersucht werden. Die Untersuchung dieser 4 Parameter wäre zudem nicht zu zeitaufwendig und kostenintensiv. Allerdings steht eine Überprüfung des prädiktiven Wertes dieses Modells noch aus.

Vorherige Studien, die die Lokalisation der wichtigsten MMP untersuchten, kamen zu

unterschiedlichen Ergebnissen. Die Studien mit immunhistochemischen Nachweismethoden zeigten eine MMP Expression in Proteinform vorwiegend in den Tumorzellen, die Studien mit in situ Hybridisationstechniken kamen zum Schluss, dass die MMP vor allem in den Fibroblasten des umliegenden Gewebes produziert werden.^{39,72,77,81,82} Diese Schlussfolgerung gelang durch den Nachweis von mRNA in den Fibroblasten. Heppner et al. lokalisierten beispielsweise MMP-3 im Zytoplasma der Tumorzellen, während der korrespondierende mRNA-Nachweis lediglich in den Fibroblasten erfolgte.³⁹ Die mRNA der Gelatinase A (MMP-2) konnte durch die in situ Hybridisation beim nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom in den Fibroblasten nachgewiesen werden.⁷² Der mRNA Nachweis für MMP-2 gelang ebenfalls bei Patienten mit einem Kolonkarzinom in den Fibroblasten.⁸² Passlick et al. beobachteten jedoch mit immunhistochemischen Färbemethoden MMP-2 in den Fibroblasten und im Zytoplasma der Tumorzellen.⁷⁷ Hier wurde eine enge Kooperation zwischen Tumorzellen und Fibroblasten während der Degradation der Extrazellulärmatrix postuliert.⁷⁸ Die präzise Quelle der MMP-9 Produktion beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom ist zurzeit weiterhin unklar und wird kontrovers diskutiert. Nawrocki wies die mRNA von MMP-9 bei 41% der Proben in den Tumorzellen nach.^{72,81} Bei weiteren morphologischen Analysen mittels in situ Hybridisation zeigte sich die MMP-9 Expression lediglich in den Fibroblasten, die in engem Kontakt mit dem Tumor standen. Diese Beobachtung unterschied sich jedoch von anderen Forschungsgruppen, die eine Distribution von MMP-9 sowohl in den Fibroblasten als auch in den Tumorzellen nachgewiesen hatten.⁶⁹ Diese Studie zeigte eine intensive Färbung der Tumorzellen bei 26 (18,2%) Patienten. Eine mRNA Untersuchung der Tumorzellen wurde beim Patientenkollektiv nicht durchgeführt. Eine mRNA Extraktion war auf Grund der zur Verfügung stehenden Paraffinschnitte leider nicht möglich. Das MMP-9 Zymogen war im normalen Flimmerepithel der Bronchien und Bronchioli in allen Präparaten nachweisbar. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen von Hayashi et al. und Kawano et al. Überein.^{38,50} Beide wiesen die immunhistochemische Expression von MMP-9 im

normalen Flimmerepithel des Bronchialbaumes nach. Alle inflammatorischen Zellen exprimierten MMP-9. Der Nachweis von MMP-9 in den umliegenden Fibroblasten gelang bei 36 Patienten (28,8 %). Die Färbeintensität der Fibroblasten war im Vergleich zum Referenzgewebe gleich oder schwächer, so dass nur von einer eher geringen MMP-9 Expression ausgegangen werden kann.

Diese Arbeit erbrachte den Beweis für das Vorhandensein von MMP-9 in den Tumorzellen beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom. In den Fibroblasten konnte MMP-9 in 28,8 % der Fälle in niedrigen Konzentrationen festgestellt werden, so dass die Expression von MMP-9 eher in den Tumorzellen des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms anzusiedeln ist. Allerdings fiel in den statistischen Untersuchungen erstmals auf, dass eine statistisch signifikante Expression von MMP-9 in den Fibroblasten vor allem bei Bronchialkarzinomen mit hoher Differenzierung (G1 und G2) stattfand. Möglicherweise benötigen diese hoch differenziert Tumoren zur Proliferation, Angiogenese, Invasion, Metastasierung und zur Degeneration der Extrazellulärmatrix MMP-9 und stimulieren die Fibroblasten zur MMP-9 Produktion. Eine weitere statistisch signifikante Korrelation zwischen Expression von MMP-9 in den Fibroblasten und anderen klinisch-pathologischen Parametern konnte nicht gefunden werden. Auf das Langzeitüberleben hatte die Expression von MMP-9 in den Fibroblasten keinen Einfluss. Cox beobachtete eine MMP-9 Expression der Fibroblasten in 47 % der Fälle.¹⁹ Vor allem zeigte sich eine vermehrte Expression beim Plattenepithelkarzinom und bei gleichzeitiger MMP-9 Expression in den Tumorzellen. Die MMP-9 Expression in den Fibroblasten hatte keinen prognostischen Wert hinsichtlich Überleben. Thomas wies MMP-9 in 26 % der Proben in den Fibroblasten nach, eine Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern sowie der prognostische Wert hinsichtlich Langzeitüberleben sind in der Arbeit nicht erwähnt. Weder Shou noch Nawrocki bestimmten eine MMP-9 Expression in den Fibroblasten, so dass eine Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern nicht möglich war.

In dieser Arbeit konnte MMP-9 vorwiegend im Zytoplasma der Tumorzellen lokalisiert werden. Spuren einer MMP-9 Expression fanden sich in einigen Fibroblasten. Viele morphologischen Analysen mittels in situ Hybridisation zeigten eine MMP-Produktion, die vorwiegend von den umliegenden Fibroblasten ausgeht, während die Immunhistochemie die MMP in höheren Raten in den Tumorzellen lokalisiert.^{39,72,77,81,82} Eine mögliche Erklärung dieser unterschiedlichen Ergebnissen ist die unterschiedliche Translationsrate der mRNA in den Zellen und die unterschiedliche intrazelluläre Speicherkapazität.¹⁰⁵ Die unterschiedlichen Resultate zwischen der Immunhistochemie und der in situ Hybridisation in den Studien über die MMP unterstreichen die Wichtigkeit der immunhistochemischen Studien in der Erforschung der MMP, weil die Proteinexpression funktionell einen größeren Stellenwert hat. Allerdings kann die Immunhistochemie nicht zwischen der aktiven und der latenten Form der MMP unterscheiden.

Um zwischen der aktiven und inaktiven Form der MMP zu unterscheiden, wurde im Jahre 2000 eine neue Technik vorgestellt, die Film in situ Zymographie (FIZ).^{45,53} Die inaktive Form der MMP beinhaltet sowohl die Pro-MMP, die MMP-Vorstufen als auch die MMP, die an die TIMPs, ihre physiologischen Inhibitoren gebunden sind. Mit dieser viel versprechenden Technik ist es möglich die gelatinolytisch Aktivität in normalem oder pathologischem Gewebe zu messen. Die FIZ ermöglicht somit vor allem die Bestimmung der lokalen Aktivität der Gelatinasen A und B. Ein Vorteil dieser Technik ist der Erhalt der Gewebestruktur mit der gelatinolytischen Aktivität. Nachteile ergeben sich aus der Reproduzierbarkeit und der Evaluation der Ergebnisse.⁴⁵ Bei der FIZ werden Gefrierschnitte auf einen dünnen Polyesterfilm, der mit einer Gelatineschicht bedeckt ist aufgetragen.⁷³ Während der Inkubationszeit in einer Feuchtkammer wird die Gelatine von Proteinase, die Gelatine als Substrat haben angedaut (Abbildung 11). Diese Proteinase sind vor allem die Gelatinasen A und B, aber auch MMP-3, MMP-7 oder Trypsin sind in der Lage Gelatine zu degradieren. Nach der Inkubationszeit bei 37°C für 4 bis 24 Stunden wird der Gelatinefilm mit

einer Biebrich Scarlet- oder Amido Blacklösung gefärbt. Durch die Färbung werden nun die Stellen mit einer lokalen Gelatinaseaktivität sichtbar. Die FIZ muss auf zwei verschiedenen Polyesterfilmen durchgeführt werden. Der eine Film enthält lediglich eine Gelatineschicht an der Oberfläche, der andere Film ist mit einem Gelatinefilm, der ebenfalls einen Breitband-MMP-Inhibitor (1,10-Phenanthrolin) enthält, beschichtet.⁷³ Nur so ist es möglich zwischen der gelatinolytischen Aktivität der MMP und der gelatinolytischen Aktivität von anderen Proteasen, wie beispielsweise Trypsin zu unterscheiden. Im Zusammenspiel mit immunhistochemisch gefärbten Tumorpräparaten und den FIZ-Filmen können Aussagen über die Aktivität von MMP-2 und MMP-9 gemacht werden. Weiterhin kann durch den Erhalt der Gewebestruktur auf den Ort der gelatinolytischen Aktivität geschlossen werden. Studien, die die FIZ beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom untersucht hat, sind unseres Wissens noch nicht erschienen. Jedoch sind die bereits existierenden FIZ-Studien hinsichtlich des MMP Entstehungsortes ebenfalls nicht ganz eindeutig. Koyama et al. zeigten eine gelatinolytische Aktivität bei Oesophaguskarzinomen in 43,3 % nur in den Tumorzellen, in 40 % in den angrenzenden Fibroblasten und in 16,7 % in den Tumorzellen sowie im angrenzendem Bindegewebe.⁵³ Allerdings zeigte sich in den immunhistochemischen Untersuchung in 60 % eine Expression von MMP-2 und MMP-9 in den Tumorzellen. Nicht alle Zellen mit positiver MMP Immunreaktion zeigten also eine gelatinolytische Aktivität. Ein Teil der MMP liegt demnach in seiner inaktiven Form oder gebunden an ihre Inhibitoren in den Zellen vor und kann somit nicht an der Degradation der Extrazellulärmatrix teilnehmen.⁵³ Bei einer FIZ Untersuchung des Schilddrüsenkarzinoms beobachtete Nakamura nur eine gelatinolytische Aktivität in den Tumorzellen, während dem er bei den Fibroblasten keine Aktivität verzeichnen konnte.⁷⁰ Aus logistischen Gründen waren in unserer Arbeitsgruppe keine Gefrierschnitte dieser sehr gründlich charakterisierten Patientenpopulation mit einem Follow-up von 12 Jahren vorhanden um die gelatinolytische Aktivität zu bestimmen.

Die homogene MMP-9 Expression korreliert bei den Patienten mit einem schlechteren Überleben, so dass von einer erhöhten Aktivität der MMP bei einer homogenen MMP-9 Expression auszugehen ist. Eine Überprüfung dieser These könnte helfen Patienten, die von einer adjuvanten Therapie profitieren könnten zu identifizieren. Weiterhin sollte in zukünftigen Studien vor allem der Nachweis der aktiven Form von MMP-9 erfolgen, da lediglich die aktive Form von MMP-9 gelatinolytische Aktivität besitzt. Uns ist jedoch bis dato kein Antikörper bekannt, der nur den Nachweis der aktiven MMP-9 erbringt.

Ziel aller Untersuchungen ist die Tumorentstehung, das Tumorwachstum und schließlich die Tumormetastasierung besser zu verstehen. MMP-9 spielt beim Tumorwachstum und bei der Tumormetastasierung nach heutigem Kenntnisstand eine große Rolle. Allerdings bestehen auch heute noch viele Wissenslücken bezüglich der genauen Tumorbiologie. Viele Prozesse sind weiterhin nicht ausreichend durch die Wissenschaft untersucht und erklärt. Die weitere Charakterisierung der Karzinome kann vermutlich helfen, eine für jeden Patienten spezifische Therapie anzubieten und den Tumor besser und effektiver zu bekämpfen. Die Tatsache unter dem Schlagwort MMP in der Medlinedatenbank mehr als 19.000 Artikel zu finden, zeigt die Wichtigkeit der MMP im menschlichen Körper. Allerdings ist die Aufgabe der MMP, wie früher angenommen nicht nur auf den Abbau der Extrazellulärmatrix beschränkt. Somit beeinflussen die MMP nicht erst im Spätstadium die Tumorerkrankung. Vielmehr beteiligen sich die MMP bereits in den frühen Tumorstadien an der Schaffung einer komplexen Mikroumwelt, die die Transformation zu malignen Tumorzellen fördert.²⁷ MMP können über verschiedene Mediatoren Wachstumsfaktoren aktivieren, die Zellapoptose unterdrücken, das Immunsystem durch Zerstörung von Zytokinen schwächen oder die Angiogenese fördern.^{25,42} Diese Untersuchungen zeigen, dass auf dem Gebiet der MMP noch enormer Forschungsbedarf besteht. Viele MMP spielen bei der Tumorgenese eine große Rolle, jedoch exprimieren unterschiedliche Tumoren zu unterschiedlichen Zeitpunkte unterschiedliche

MMP. Für jede Tumorentität und zu unterschiedlichen Zeitpunkten sollten somit die Tumorzellen auf eine Expression der MMP untersucht werden.¹⁸ Durch ein besseres Verständnis der Tumorbiologie können zum einen Hochrisikopatienten besser identifiziert und einer aggressiveren Therapie zugeführt werden. Zum anderen könnten durch die Entdeckung weiterer Tumorstoffwechselwege neue Angriffspunkt für Medikamente gefunden werden.

Der Einfluss von MMP-9 bei malignen Tumoren und insbesondere beim nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom konnte durch mehrere Studien wissenschaftlich belegt werden.^{12,32,51,91,92,94} Bisher wurde die Expression von MMP-9 allerdings immer postoperativ aus entnommenem Gewebe nachgewiesen. Yang et al. konnten MMP-9 mittels ELISA ebenfalls im Plasma bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom nachweisen.¹⁰² Die Konzentrationen von MMP-9 gegenüber einem gesunden Gesamtkollektiv waren statistisch signifikant erhöht. Das Bronchialkarzinom wird in vielen Fällen erst sehr spät diagnostiziert, oft in einem lokal bereits fortgeschrittenem Stadium, da es initial oft keine Symptome zeigt. Es stellt sich nun die berechnigte Frage, ob MMP-9 in einem entsprechenden Risikokollektiv als Tumormarker angeboten werden sollte. Diese Frage können wir ganz eindeutig mit Nein beantworten, da MMP-9 leider ein zu unspezifischer Marker ist um als Tumormarker zu fungieren. Neben dem Einfluss der Matrixmetalloproteinasen bei der Krebsentstehung spielen sie ebenfalls bei vielen physiologischen Prozessen, wie der Embryogenese, der Wundheilung, der Arthritis, der Osteoporose,... eine entscheidende Rolle.^{51,68} Selbst das Rauchen führt bereits zu einer messbaren und signifikanten Erhöhung der MMP-9 Spiegel im peripheren Plasma.⁷¹ Diese Tatsache könnte bereits erklären warum das Rauchen ein Hauptrisikofaktor bei der Entstehung von einem Bronchialkarzinom darstellt. Die Expression von MMP-9 im Plasma kann jedoch als prognostischer Marker sowie unter Umständen Tumormarker zur Verlaufsbeobachtung einzusetzen.^{56,102,104} In einer Studie von Ondo zeigt sich kein Unterschied in der Expression von MMP-9 im peripheren Blut bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom postoperativ

mit oder ohne Rezidiv.⁷⁵ Allerdings war der Anteil von aktivierter MMP-9 im Verhältnis zur Gesamtkonzentration bei Patienten mit Rezidiv statistisch signifikant erhöht. In seiner Studie postulierte der Autor, dass die Tumorzellen vor allem aktivierte MMP-9 ausscheiden, und dass von anderen Zellen produzierte MMP-9 schwerer zu aktivieren ist. Schulz konnte bereits bei MMP-2 zeigen, dass diese Proteinase nur im Tumorgewebe und nicht in normalem Lungengewebe aktiviert wird.⁸⁶ Um MMP-9 bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom als Verlaufsparameter zu nutzen, werden weitere Studien mit deutlich größeren Patientenkollektiven notwendig sein, um die Sensitivität und Spezifität zu überprüfen. Weiterhin sollte die aktive MMP-9 in allen weiteren Studien untersucht werden, da vor allem die Aktivität von MMP-9 eine große Rolle zu spielen scheint. Neben dem Verhältnis aktive MMP-9/Gesamt-MMP-9 scheint das Verhältnis von MMP-9 zu den natürlichen Gegenspielern den TIMPs von Bedeutung zu sein.⁷⁴ Allerdings ist uns bis dato kein Antikörper bekannt, der selektiv die aktivierte MMP-9 nachweist. Die Konzentration von MMP-9 im Plasma war vor allem bei fortgeschrittenem Tumorstadium erhöht.¹⁰² Im fortgeschrittenen Stadium besteht bereits ein Zugang des Tumors zu dem Lymph- und / oder Gefäßsystem, der ihm dann die Ausscheidung von MMP-9 in die Lymph- und / oder Blutbahn ermöglichen. Die Bestimmung von MMP-9 im Plasma wäre gegebenenfalls als Verlaufsparameter in fortgeschrittenen Stadien sinnvoll, um beispielsweise die Wirksamkeit von Chemotherapeutika zu bestimmen.^{100,101} MMP-9 konnte bei allen durch bronchoskopische Lavage gewonnenen Proben nachgewiesen werden, ein spezifisches Expressionsmuster zeigte sich jedoch nicht.⁸⁵ Der Nachweis gelang sogar ebenfalls in dem nicht vom Tumor befallenen Lungenflügel. Eine Überexpression von MMP-2 bei gleichzeitiger Abwesenheit von TIMP-2 konnte lediglich beim Adenokarzinom der Lunge und bei pulmonalen Metastasen festgestellt werden. Unseres Erachtens scheidet die bronchopulmonale Lavage zum Nachweis von MMP-9 aus.

Die Therapie des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms stellt nach wie vor eine

Herausforderung an die interdisziplinären Zusammenarbeit von Thoraxchirurgen, Onkologen und Strahlentherapeuten dar.^{44,55} Die Prognose hängt vor allem vom Tumorstadium ab. Die zur Verfügung stehenden Behandlungsmethoden aus der Chirurgie, der Chemotherapie und der Bestrahlung differieren je nach Stadium der Erkrankung.⁴⁷ Die Operation stellt die effektivste Therapieform dar, um eine Kuration zu erzielen. Insgesamt entwickeln über zwei Drittel der Patienten trotz kompletter Resektion Fernmetastasen und könnten somit von einer adjuvanten Chemotherapie profitieren. Auch Patienten mit lokal begrenztem Tumor im Stadium I erleiden in 40 % der Fälle ein Rezidiv.⁶² Der Stellenwert einer adjuvanten Chemotherapie ist im Stadium I und II noch nicht abschließend beurteilbar, sodass der Einsatz außerhalb von Studien nicht zu empfehlen ist.⁵⁵ Prognostischen Faktoren kommt in den frühen, lokal begrenzten Stadien eine wichtige Rolle zu, um Subgruppen mit ungünstigem Risikoprofil zu definieren und gegebenenfalls gezielt adjuvant therapieren zu können.^{31,61} Die aktuelle Datenlage zeigte für die Strahlentherapie bei R0-Resektion im Stadium I und II keine Vorteile. MMP-9 wurde durch diese Arbeit als unabhängiger Prognosemarker, der mit einem schlechteren Überleben einhergeht bestätigt, so dass Patienten mit Tumoren, die MMP-9 homogen exprimieren insbesondere im Stadium I und II von einer adjuvanten Therapie profitieren könnten. Weitere prognostische Marker, die zur Identifikation von Risikopatienten dienen könnten, wurden bereits früher zitiert.

Neue Möglichkeiten zur Krebsbekämpfung konnten durch die Grundlagenforschung aufgezeigt werden. Viele dieser möglichen Therapien, wie z.B. die Verabreichung von Angiostatin oder Antikörpern gegen Rezeptoren sind bis dato jedoch nur in vitro oder im Tiermodell möglich.^{14,76} Mehreren Studien zeigten den Einfluss von MMP auf die Tumorprogression, so dass die Beeinflussung der MMP durch Regulation der Transkription, durch Verhinderung der Aktivierung der Proenzyme, durch endogene Inhibitoren oder durch die Gabe von MMP-Inhibitoren einen möglichen Angriffspunkt gegen den Krebs darstellten.¹⁸ Die Entwicklung eines

Angriffspunktes auf genetischer Ebene scheint bis dato durch das Fehlen eines universellen Mechanismus, der die MMP-Expression steuert utopisch. Die MMP-Expression findet zum Teil in den Tumorzellen statt, kann jedoch auch in den Fibroblasten, zum Teil auch in Endothelzellen oder inflammatorischen Zellen stattfinden.²² Weiterhin können eine Vielzahl von Faktoren (Zytokine, Wachstumsfaktoren,...) die MMP-Produktion induzieren oder hemmen.⁹⁹ Die Regulation der Transkription scheint aktuell nur in vitro Erfolgs versprechend zu sein.²⁷ MMP werden als inaktive Zymogene hergestellt und erst im Verlauf aktiviert. In vivo werden die MMP vor allem durch andere Proteasen aktiviert.⁶⁸ Allerdings können MMP sich ebenfalls gegenseitig aktivieren.^{51,68} Vor allem die membrangebundenen MMP verfügen über dieses Potenzial.^{5,52} Durch diese Vielzahl an potenziellen Aktivatoren scheint eine Regulation auf dieser Ebene schwierig. In vitro konnte durch die Gabe eines selektiven Antikörper gegen MT1-MMP die Aktivierung von proMMP bereits deutlich reduziert werden.⁴³ Neben unspezifischen Proteaseinhibitoren wie α 2-Makroglobulin verfügen Säugetiere über 4 spezifische und endogene MMP-Inhibitoren, die TIMPs. Niedrige Spiegel von TIMP gingen in mehrere Studien mit einer erhöhten Tumorgenese, hohe Spiegel von TIMP reduzierten die Metastasierung im Tierexperiment signifikant.^{18,25,27} Bisher verhinderten vor allem technische Schwierigkeiten die Herstellung von TIMP als Medikament. Im Verlauf wurde synthetische MMP-Inhibitoren hergestellt. Die ersten MMP-Inhibitoren waren Pseudopeptide, die Teile von zink-bindendem Hydroxamat enthielten und somit um den Zinkkomplex des aktiven Zentrums der MMP konkurrierten.²⁷ Batimastat (BB-94), ein Breitband auf Hydroxamat basierender MMP-Inhibitor wurde der erste beim Menschen getestete synthetische MMP-Inhibitor.¹⁰¹ Die geringe Bioverfügbarkeit, Batimastat wurde intraperitoneal bei Pankreaskarzinomen verabreicht sowie der ausbleibende Erfolg führten zum Austausch der Substanz gegen Marimastat (BB-2516). Marimastat konnte oral eingenommen werden, sein Wirkspektrum richtete sich gegen MMP-1, -2, -3, -7, -9, -12 und -13. Erstmalig traten bei der Verabreichung von MMP-Inhibitoren in den Phase I Studien, die der Medikamentensicherheit dienen, auch erhebliche Nebenwirkungen, wie das

„Muskeloskeletale Syndrom“ auf.¹³⁴ Das „Muskeloskeletale Syndrom“ trat immer erst 28 Tage nach kontinuierlicher Einnahme auf und war dosisabhängig. Hauptsymptome waren Gelenkschmerzen, Steifigkeit der Gelenke, Ödeme, Hypopigmentierung der Haut und eingeschränkte Mobilität. Die Symptome beginnen typischerweise an den kleinen Gelenken der Hand oder im Schultergürtel der dominanten Seite. Eine Therapie mit Corticosteroiden ergab keine Befundbesserung, die Symptome waren nach Absetzen der MMP-Inhibitoren reversibel.⁷⁹ Der genaue Pathomechanismus zur Ausbildung des Muskeloskeletalen Syndroms ist noch nicht bekannt. Bei allen von Hydroxamat abstammenden MMP-Inhibitoren trat dosisabhängig das „Muskeloskelatale Syndrom“ auf. Bei neueren MMP-Inhibitoren, wie BMS-275291 ein Thiolderivat konnten diese Nebenwirkungen nicht beobachtet werden.⁷⁹

Phase II Studien, die die Effektivität der MMP-Inhibitoren überprüfen, stellten sich als problematisch heraus. MMP-Inhibitoren sind zytostatische Substanzen, das Wachstum der Zelle wird verhindert, die Zelle bleibt jedoch lebensfähig. Die Prüfung der Effektivität von zytotoxischen Substanzen nutzt die Reduktion der Tumorgröße als Zielgröße. Bei den MMP-Inhibitoren fehlt derzeit ein Marker um die Medikamentenaktivität zu messen. Zur Bestimmung der Wirksamkeit der MMP-Inhibitoren wurden in einigen Studien die Tumormarker im Serum gemessen, bei allen oral verfügbaren MMP-Inhibitoren konnten pharmakologisch aktive Medikamentenspiegel im Serum nachgewiesen werden.⁷⁸ Allerdings zeigen ebenfalls mehrere Studien, dass die Abnahme von Tumormarkern im Serum nicht unbedingt mit einer Tumorregression einhergehen.^{18,24} So wurden oft nach Beendigung der Phase I Untersuchungen gleich Phase II und III Kombinationsstudien angeschlossen ohne den Nachweis einer Studie über die Effektivität geführt zu haben. Die ersten Studien verglichen die alleinige Gabe von MMP-Inhibitoren mit der Standardchemotherapie, erst später wurde der Effekt mit zusätzlicher Gabe eines MMP-Inhibitors im Vergleich zur Standardtherapie überprüft.^{18,78} Die Resultate der ersten Phase III Studien waren enttäuschend.

Lediglich in drei Studien konnte ein positiver Effekt erzielt werden, in einer Studie war der Effekt mit einem p-Wert von 0,07 statistisch nicht signifikant. Marimastat zeigte im Vergleich zur konventionellen Therapie mit Gemcitabin beim Pankreaskarzinom ähnliche Ergebnisse und konnte beim fortgeschrittenem Magenkarzinom die Tumorprogression stoppen.^{9,10} Marimastat in Kombination mit Temozolomid konnte bei Patienten mit multiformen Glioblastom das Überleben im Vergleich zur Monotherapie mit Temozolomid signifikant verlängern.³⁷ Alle weiteren Studien erbrachten keinen sichtbaren Vorteil, daraufhin wurden viele Studien abgebrochen.^{4,24,80} In einer Studie traten nach Gabe des MMP-Inhibitors Batimastat vermehrt Lebermetastasen in einem Tiermodell auf.⁵⁴ Dies veranlasste einige Pharmafirmen die Entwicklung ihrer MMP-Inhibitoren ruhen zu lassen. Trotzdem bleiben viele Experten optimistisch, dass MMP-Inhibitoren hilfreich im Kampf gegen den Krebs sind. Hierzu müssen allerdings einige Kriterien erfüllt sein. Die bisher verwendeten MMP-Inhibitoren haben unterschiedliche MMP in unterschiedlichem Masse inhibiert. Ziel weiterer Forschung sollte die Entwicklung spezifischer MMP-Inhibitoren sein. Die MMP-Inhibitoren müssen in einer ausreichenden Dosierung über einen langen Zeitraum (Jahre) verabreicht werden können, ohne Nebenwirkungen auszulösen. Bisher wurden MMP-Inhibitoren vorwiegend bei fortgeschrittenen Tumorstadien bei hochmalignen Tumoren (fortgeschrittenes Pankreas-Ca, Magen-Ca, fortgeschrittenes kleinzelliges Bronchialkarzinom) eingesetzt.^{9,10,101} Weiterhin hatten die meisten dieser Tumoren eine infauste Prognose, eine wirksame Standardtherapie gibt es für viele dieser Tumor nicht. Eine Gabe von MMP-Inhibitoren in frühen Tumorstadien könnte ein weiteres Wachstum und Metastasierung des Tumors verhindern. Des Weiteren muss die Aktivität und Effektivität von MMP-Inhibitoren durch Marker überprüfbar sein. Tumormodelle zum Test von MMP-Inhibitoren sollten weiter verbessert werden. Die hohen Erwartungen, die durch den Einsatz von MMP-Inhibitoren im Labor geweckt worden, hielten in der Klinik leider nicht stand. Durch den Einsatz von MMP-Inhibitoren mit anderen Proteaseinhibitoren könnte die Effektivität gesteigert werden.⁷⁸

6. Zusammenfassung

Bronchialkarzinome stellen heute in den westlichen Industrieländern die häufigste Krebstodesursache in allen ethnischen Gruppen dar.^{48,49,98} Bei 75 Prozent der Bronchialkarzinome findet sich histologisch ein nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom.⁹⁶ Die Prognose des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms ist im Vergleich zum kleinzelligen Bronchialkarzinom deutlich besser.⁹⁰ In frühen Tumorstadien ist die Operation die Therapie der Wahl. Allerdings ist die Fünf-Jahresüberlebensrate auch im Stadium I und II mit 50 bis 60 Prozent nicht zufriedenstellend.^{31,61} Ungefähr 40 Prozent der Stadium I Patienten, die postoperativ als tumorfrei gelten, entwickeln innerhalb von 24 Monaten ein Rezidiv.⁶² Ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen, des Wachstums und der Ausbreitung von Bronchialkarzinomen könnten helfen, Patienten zu identifizieren, die von einer adjuvanten Therapie profitieren könnten.

Die Familie der Matrix Metalloproteinasen (MMP) scheint durch ihre proteolytischen Eigenschaften eine Schlüsselrolle bei der Invasion, Migration, Ausbreitung und Metastasierung von malignen Zellen zu spielen. Hierbei spielt vor allem die Degradierung der Extrazellulärmatrix, sowie die Zerstörung und das Durchdringen der Basalmembran eine entscheidende Rolle.²⁵ MMP-9 ist in der Lage Kollagen Typ IV, einen Hauptbestandteil der Basalmembran zu degradieren.^{21,51,68} Die klinische Relevanz der MMP in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen wird weiterhin kontrovers diskutiert.^{32,33}

Diese Studie untersucht den klinischen Einfluss von MMP-9 bei einem Kollektiv von 141 Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom und langem Follow-up. Zu diesem Zweck wurde eine immunhistochemische Untersuchung zum Nachweis von MMP-9 durchgeführt. Zu Beginn der Arbeit wurde das immunhistochemische Verfahren optimiert. Nach sorgfältiger Auswahl

des Antikörpers und Demaskierung der Epitope durch Wärmebehandlung zeigte sich die LSAB-Methode hervorragend geeignet zum Nachweis geringer Antigenmengen.¹⁷ Als Antikörper diente ein monospezifischer, polyklonaler primärer anti-MMP-9 Antikörper, der sowohl die aktive als auch die latente Form von MMP-9 erkennt.⁵⁹

Eine homogene MMP-9 Expression fand sich in 18,4 % der Fälle. Eine Korrelation zwischen homogener MMP-9 mit dem pT-Stadium, pN-Stadium, Tumorhistologie, Tumordifferenzierung oder Geschlecht ließ sich statistisch signifikant nicht nachweisen. 128 Patienten konnten bei einem durchschnittlichen Follow-up von 72 Monaten in weitere Überlebensanalysen eingeschlossen werden. Eine statistische signifikante Korrelation konnte zwischen homogener MMP-9 Expression und ungünstigem Langzeitüberleben gefunden werden ($p = 0,0135$). Ebenso traten Lokalrezidive und eine Metastasierung statistisch signifikant gehäuft bei den Tumoren mit homogener MMP-9 Expression auf ($p = 0,0078$ und $p = 0,0211$). Die Cox-Regressionsanalyse zeigte, dass die homogene MMP-9 Expression mit einem p-Wert von 0,045 ein signifikanter und unabhängiger prognostischer Faktor für ein kürzeres Überleben bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom ist.

Der genaue Entstehungsort der MMP-9 kann durch diese Arbeit nicht abschließend beantwortet werden. In dieser Arbeit zeigte sich eine heterogene und homogene MMP-9 Expression bei 54,6 % vorwiegend in den Tumorzellen beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom. In den Fibroblasten konnte MMP-9 in 28,8 % der Fälle in niedrigen Konzentrationen festgestellt werden, so dass die Expression von MMP-9 eher in den Tumorzellen des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms anzusiedeln ist.

Die homogene MMP-9 Expression geht mit einer schlechten Prognose, einem höherem

Lokalrezidivrisiko, einer höheren Metastasierung und einem kürzerem Überleben beim nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom einher. Die homogene MMP-9 Expression konnte als unabhängiger Prognosefaktor bezüglich des Überlebens ausgewählt werden. Aktuell bietet die TNM-Klassifikation beim nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom den besten prognostischen Wert. Allerdings zeigt sich in frühen Tumorstadien (Stadium I und II) bereits eine deutliche Heterogenität bezüglich des Überlebens.³¹ Obwohl diese Patienten kurativ durch Lobektomie und Lymphadenektomie behandelt worden sind, kommt es bei einem nicht unerheblichen Teil zu Lokalrezidiven oder zu Fernmetastasierungen, so dass bei einigen Patienten auch in frühen Stadien von einer systemischen Erkrankung ausgegangen werden muss.⁶² Möglicherweise kann die Expression von MMP-9 Patienten mit aggressiveren Bronchialkarzinomen identifizieren. Vor allem Patienten mit dem Stadium I oder II könnten von einer adjuvanten Chemotherapie oder von neueren Therapien, wie zum Beispiel dem Einsatz von spezifischen MMP-Inhibitoren profitieren. In der Zukunft könnten mit Hilfe weiterer Prognosefaktoren die Tumoren besser differenziert und die sich daraus ableitende Therapie weiter verbessert werden. Ziel dieser Grundlagenforschung sollte die Etablierung eines genetischen und biologischen „Fingerabdruckes“ eines jeden Tumors sein um besonders aggressive Formen zu identifizieren und dann spezifisch zu behandeln. Vermutlich werden diese Prognosefaktoren den Einzug in den klinischen Alltag finden und die Therapie des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms wesentlich beeinflussen. Durch die bessere Identifikation von Risikopatienten könnte die vollständige Remission und die Fünf-Jahres-Überlebensrate erheblich gesteigert werden. Außerdem konnte der wichtige Stellenwert der Immunhistochemie durch diese Arbeit gezeigt werden. Die Immunhistochemie ist eine technisch einfache und relativ kostengünstige Methode zur Bestimmung der wichtigsten Prognose- und Prädiktivfaktoren. Weiterhin ist die Methode wenig personalintensiv und könnte problemlos in den klinischen Alltag bei den histopathologischen Untersuchungen der Präparate mit integriert werden.

7. Literaturverzeichnis

01. Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. Chest 2003; 123: 21-49. Review.
02. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Biologie Moléculaire de la Cellule. Troisième Édition. Flammarion Médecine-Sciences 1995; 195-474.
03. Altman DG, Lausen B, Sauerbrei W. Dangers of using "optimal" cutpoints in the evaluation of prognostic factors. J Natl Cancer Inst 1994; 86: 829-835.
04. Bayer corp. Bayer halts clinical trials evaluating MMPI. Press Release, 1999.
05. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. Crit Rev Oral Biol Med 1993; 4: 197-250. Review.
06. Boffetta P, Agudo A, Ahrens W, Benhamou E, Benhamou S, Darby SC, Ferro G, Fortes C, Gonzalez CA, Jockel KH, Krauss M, Kreienbrock L, Kreuzer M, Mendes A, Merletti F, Nyberg F, Pershagen G, Pohlabein H, Riboli E, Schmid G, Simonato L, Tredaniel J, Whitley E, Wichmann HE, Saracci R, et al. Multicenter case-control study of exposure to environmental tobacco smoke and lung cancer in Europe. J Natl Cancer Inst 1998; 90: 1440-1450.
07. Bradburn MJ, Clark TG, Love SB, Altman DG. Survival analysis part II: Multivariate data analysis – an introduction to concepts and methods. Br J Cancer 2003; 89: 431-436.

08. Bradburn MJ, Clark TG, Love SB, Altman DG. Survival analysis part III: Multivariate data analysis – choosing a model and assessing its adequacy and fit. *Br J Cancer* 2003; 89: 605-611.
09. Bramhall SR, Hallissey MT, Withing J, Scholefield J, Tierney G, Stuart RC, Hawkins RE, McCulloch P, Maughan T, Brown PD, Baillet M, Fielding JW. Marimastat as maintenance therapy for patients with advanced gastric cancer: a randomised trial. *Br J Cancer* 2002; 86:1864-1870.
10. Bramhall SR, Rosemurgy A, Brown PD, Bowry C, Buckels JA. Marimastat as first-line therapy for patients with unresectable pancreatic cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3447-3455.
11. British Biotech Plc.: Reports of clinical studies with matrix metalloproteinase inhibitors in cancer. Press Release, 2001.
12. Brown PD, Bloxidge RE, Stuart NS, Gatter KC, Carmichael J. Association between expression of activated 72-kilodalton gelatinase and tumor spread in non-small cell lung carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 574-578.
13. Chambers AF, Matrisian LM: Changing views of the role of matrix metalloproteases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1260-1270.
14. Ciardiello F, Bianco R, Damiano V. Antitumor activity of sequential treatment with topotecan and anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody C225. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 909-916.

15. Clark IM, Cawston TE. Fragments of human fibroblast collagenase. Purification and characterization. *Biochem J* 1989; 263: 201-206.
16. Clark TG, Bradburn MJ, Love SB, Altman DG. Survival analysis part I: Basic concepts and first analyses. *Br J Cancer* 2003; 89: 232-238.
17. Coulter-Immunotech Diagnostics. *Immunhistologie – Handbuch* -. Ausgabe August 1998: 1-11.
18. Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. Matrix Metalloproteinase Inhibitors and Cancer: Trials and Tribulations. *Science* 2002; 295: 2387-2392.
19. Cox G, Jones JL, O'Byrne KJ. Matrix metalloproteinase 9 and the epidermal growth factor signal pathway in operable non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2349-2355.
20. Cox G, Jones JL, Andi A, Wallner DA, O'Byrne KJ. A biological staging model for operable non-small cell lung cancer. *Thorax* 2001; 56: 561-566.
21. Cox G, Steward WP, O'Byrne KJ. The plasmin cascade and matrix metalloproteinases in non-small cell lung cancer: an immunohistochemical study on cryosections. *Br J Cancer* 1996; 74: 86-91.
22. De Wever O, Mareel M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol* 2003; 200: 429-447.
23. Denhardt DT, Feng B, Edwards DR, Cocuzzi ET, Malyankar UM: Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP, aka EPA): Structure, control of expression and biological functions. *Pharmacol Ther* 1993; 59: 329-341.

24. Duivenvoorden WCM, Hirte HW, Singh G. Quantification of matrix metalloproteinase activity in plasma enrolled in a Bay 12-9566 phase I study. *Int J Cancer* 2001; 91: 857-862.
25. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 161-174.
26. el-Torky M, el-Zeky F, Hall JC. Significant changes in the distribution of histologic types of lung cancer. A review of 4928 cases. *Cancer* 1990; 65: 2361-2367.
27. Folgueras AR, Pendas AM, Sanchez LM, Lopez-Otin C. Matrix Metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol* 2004; 48: 411-424.
28. Furuya M, Ishikura H, Nemori R, Shibata M, Fujimoto S, Yoshiki T. Clarification of the active gelatinolytic sites in human ovarian neoplasms using in situ zymography. *Hum Pathol* 2001; 32: 163-168.
29. Garbisa S, Scagliotti G, Masiero L, Di Francesco C, Caenazzo C, Onisto M, Micela M, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA. Correlation of serum metalloproteinase levels with lung cancer metastasis and response to therapy. *Cancer Res* 1992; 52: 4548-4549.
30. Geisler S, Lichtinghagen R, Boker KH, et al. Differential distribution of five members of the matrix metalloproteinase family and one inhibitor (TIMP-1) in human liver and skin. *Cell Tissue Res* 1997; 289: 173-183.

31. Ginsberg RJ, Rubinstein LV. Randomized trial of lobectomy versus limited resection for T1 N0 non-small cell lung cancer. Lung Cancer Study Group. *Ann Thorac Surg* 1995; 60: 615-622.
32. Gohji K, Hirano H, Okamoto M, Kitazawa S, Toyoshima M, Dong J. Expression of three extracellular matrix degradative enzymes in bladder cancer. *Int. J Cancer* 2001; 95: 295-301.
33. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997; 74: 111-122. Review.
34. 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. Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature* 1997; 389: 77-81.
35. Gonzalez-Avila G, Iturria C, Vadill, F, Teran L, Selman M, Perez-Tamayo R. 72-kD (MMP-2) and 92-kD (MMP-9) type IV collagenase production and activity in different histologic types of lung cancer cells. *Pathobiology* 1998; 66: 5-16.
36. Grigioni, WF, D'Errico A, Fiorentino M, Baccarini P, Onisto M, Caenazzo C, Stetler-Stevenson WG, Garbisa S, Mancini AM. Gelatinase A (MMP-2) and its mRNA detected in both neoplastic and stromal cells of tumors with different invasive and metastatic properties. *Diagn.Mol.Pathol.* 1994; 3: 163-169.
37. Groves MD, Puduvalli VK, Hess KR, Jaeckle KA, Peterson P, Yung WK, Levin VA. Phase II trial of temozolomide plus the matrix metalloproteinase inhibitor,

marimastat, in recurrent and progressive glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1383-1388.

38. Hayashi T, Stetler-Stevenson WG, Fleming MV, Fishback N, Koss MN, Liotta LA, Ferrans VJ, Travis WD. Immunohistochemical study of metalloproteinases and their tissue inhibitors in the lungs of patients with diffuse alveolar damage and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 1996; 149: 1241-1256.
39. Heppner KJ, Matrisian LM, Jensen RA, Rodgers WH. Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response. *Am J Pathol.* 1996; 149: 273-282.
40. Herbst RS, Yano S, Kuniyasu H, Khuri FR, Bucana CD, Guo F. Differential expression of E-cadherin and type IV collagenase genes predicts outcome in patients with stage I non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 790-797.
41. Hofmann HS, Hansen G, Richter G, Taeye C, Simm A, Silber RE, Burdach S. MMP-12 expression correlates with local recurrence and metastatic disease in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1086-1092.
42. Hojilla CV, Mohammed FF, Khokha R. Matrix Metalloproteinases and their tissue inhibitors direct cell fate during cancer development. *Br J Cancer* 2003; 89: 1817-1821.
43. Hotary KB, Allen ED, Brooks PC, Datta NS, Lang MW, Weiss SJ. Membrane type I matrix metalloproteinase usurps tumor growth control imposed by the three-dimensional extracellular matrix. *Cell* 2003; 114: 33-45.

44. Huber R. Manual Tumoren der Lunge und des Mediastinums. Tumorzentrum München. W. Zuckschwerdt Verlag, München Wien New York, 2006.
45. Ikeda M, Maekawa R, Tanaka H, Matsumoto M, Takeda Y, Tamura Y, Nemori R, Yoshioka T. Inhibition of gelatinolytic activity in tumor tissues by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor: application of film in situ zymographie. Clin Cancer Res. 2000; 6 :3290-3296.
46. Iwata H, Yamamoto M, Nemori R, Mizutani M, Iwase T, Miura S, Obata Y, Hara Y, Omoto Y, Toyama T, Yamashita H, Iwase H, Kobayashi S. Localization of Gelatinolytic Activity can be Detected in Breast Cancer Tissues by Film in situ Zymography. Breast Cancer 2001; 8: 111-115.
47. Janssen-Heijnen ML, Coebergh JW. The changing epidemiology of lung cancer in Europe. Lung Cancer 2003; 41: 245-258.
48. Janssen-Heijnen ML, Gatta G, Forman D, Capocaccia R, Coebergh JW. Variation in survival of patients with lung cancer in Europe, 1985-1989. EURO CARE Working Group. Eur J Cancer 1998; 34: 2191-2196.
49. Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiware RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer statistics, 2005. CA Cancer J Clin 2005; 55: 10-30.
50. Kawano N, Osawa H, Ito T, Nagashima Y, Hirahara F, Inayama Y, Nakatani Y, Kimura S, Kitajima H, Koshikawa N, Miyazaki K, Kitamura H. Expression of gelatinase a, tissue inhibitor of matrixmetalloproteinases-2, matrilysin, and trypsin(ogen) in lung neoplasmas: an immunohistochemical study. Hum Pathol 1997; 28: 613-622.

51. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; 43 (Suppl): 42-51.
52. Kleiner DE Jr, Stetler-Stevenson WG. Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteases. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5: 891-897. Review.
53. Koyama H, Iwata H, Kuwabara Y, Iwase H, Kobayashi S, Fujii Y. Gelatinolytic activity of MMP-2 and MMP-9 in oesophageal carcinoma; a study using in situ zymography. *Eur J Cancer* 2000; 36: 2164-2170.
54. Krüger A, Soeltl R, Sopov I, Kopitz C, Arlt M, Magdolen V, Harbeck N, Gänsbacher B, Schmitt M. Hydroxamate-type matrix metalloproteinase inhibitor Batimastat promotes liver metastasis. *Cancer Res* 2001; 61: 1272-1275.
55. Laack E, Hossfeld DK. Therapie des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms. *Deutsches Ärzteblatt* 2000; 97: 295-306.
56. Laack E, Kohler A, Kugler C, Dierlamm T, Knuffmann C, Vohwinkel G. Pretreatment serum levels of matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor in non-small cell lung cancer. *Ann Oncol* 2002; 13: 1550-1557.
- 57.. Lebeau A, Nerlich AG, Sauer U, Lichtinghagen R, Löhrs U. Tissue distribution of major matrix metalloproteinases and their transcripts in human breast Carcinomas. *Anticancer Res* 1999; 19: 4257-4264.
58. Levi F, Lucchini F, La Vecchia C, Negri E. Trends in mortality from lung cancer in the European Union, 1955-1994. *Lancet* 1999; 354: 742-743.

59. Lichtinghagen R, Helmbrecht T, Arndt B et al. Expression pattern of matrix metalloproteinases in human liver. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995; 33: 65-71.
60. Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 1980; 284: 67-68.
61. Martini N, Bains MS, Burt ME, Zakowski MF, McCormack P, Rusch VW, Ginsberg RJ. Incidence of local recurrence and second primary tumors in resected stage I lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 109: 120-129.
62. Minna JD, Sekido Y, Fong, KM, Gazdar AF. Cancer of the lung. In VTJ De Vita, S Hellman, and SA Rosenberg (eds.). *Cancer: Principles & Practise of Oncology*, fifth edition. Philadelphia: Lippincott- Raven Publishers, 1997; 858-911.
63. Montuori N, Mattiello A, Mancini A, Taglialatela P, Caputi M, Rossi G. Urokinase-mediated posttranscriptional regulation of urokinase-receptor expression in non small cell lung carcinoma. *Int J Cancer* 2003; 105: 353-360.
64. Mountain CF: A new international staging system for lung cancer. *Chest* 1986; 89: 225-233.
65. Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest* 1997; 111: 1710-1717.
66. Mungall BA, Pollitt CC. In situ zymography: topographical considerations. *J Biochem Biophys Methods*; 2001; 47: 169-176.

67. Murphy G, Willenbrock F, Crabbe T, O'Shea M, Ward R, Atkinson S, O'Connell Docherty A. Regulation of matrix metalloproteinases activity. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 732: 31-41. Review.
68. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274: 21491-21494. Review.
69. Nakagawa H, Yagihashi S. Expression of type IV collagen and its degradating enzymes in squamous cell carcinoma of lung. *Jpn J Cancer Res* 1994; 85: 934-938.
70. Nakamura H, Ueno H, Yamashita K, Shimada T, Yamamoto E, Noguchi M, Fujimoto N, Sato H, Seiki M, Okada Y. Enhanced production and activation of progelatinase A mediated by membrane-type 1 matrix metalloproteinase in human papillary thyroid carcinomas. *Cancer Res.* 1999; 59: 467-473.
71. Nakamura T, Ebihara I, Shimada N, Koide H. Effect of cigarette smoking on plasma metalloproteinase-9 concentration. *Clin Chim Acta* 1998; 276: 173-177.
72. Nawrocki B, Polette M, Marchand V. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human brochopulmonary carcinomas: quantitative and morphological Analyses. *Int J Cancer* 1997; 72: 556-564.
73. Nemori R, Miura K, Nagashima M, Kaji H, Ishii M, Teruya C: Technical information on precoated films for film in situ zymographie. Fuji Photo Film Co., LTD., Tokyo, Japan.
74. Nuovo GJ, MacConnell PB, Simsir A. Correlation of the in situ detection of polymerase chain reaction-amplified metalloproteinase complementary DNAs and

their inhibitors with prognosis in cervical carcinoma. *Cancer Res* 1995; 55: 267-275.

75. Ondo K, Sugio K, Yamazaki K, Yamaguchi M, Yano T, Yoshino I, Maehara Y. The significance of serum active matrix metalloproteinase-9 in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2004; 46: 205-213.
76. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994; 79: 315-328.
77. Passlick B, Sienel W, Seen-Hibler R, Wöckel W, Thetter O, Mutschler W, Pantel K. Overexpression of Matrix Metalloproteinase 2 predicts unfavorable outcome in early stage non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2000; 6: 3944-3948.
78. Pavlaki M, Zucker S. Matrix Metalloproteinase inhibitors (MMPi): The beginning of phase I or the termination of phase III clinical trials. *Cancer and Metastasis Reviews* 2003; 22: 117-203.
79. Peterson JT. Matrix metalloproteinase inhibitor development and the remodeling of drug discovery. *Heart Failure Reviews* 2004; 4: 63-79.
80. Pfizer corp. Pfizer discontinues Phase III trials of prinomastat in advanced cancers but continues multiple Phase II trials. Press Release, 2000.
81. Polette, M., Nawrocki, B., Gilles, C., Sato, H., Seiki, M., Tournier, J. M., and Birembaut, P. MT-MMP expression and localisation in human lung and breast cancers. *Virchows Arch.* 1996; 428: 29-35.

82. Poulson, R., Pignatelli, M., Stetler-Stevenson, W. G., Liotta, L. A., Wright, P. A., Jeffery, R. E., Longcroft, J. M., Rogers, L., and Stamp, G. W. Stromal expression of 72 kda type IV collagenase (MMP-2) and TIMP-2 mRNAs in colorectal neoplasia. *Am.J.Pathol.* 1992; 141: 389-396.
83. Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. De Gruyter 1998; 561.
84. Ray JM, Stetler-Stevenson WG. TIMP-2 expression modulates human melanoma cell adhesion and motility. *Ann NY Acad Sci* 1994; 732: 233-247.
85. Reichenberger F, Eickelberg O, Wyser C, Perruchoud AP, Roth M, Tamm M. Distinct endobronchial expression of matrix-metalloproteinases (MMP) and their endogenous inhibitors in lung cancer. *Swiss Med Wkly* 2001; 131: 273-279.
86. Schulz A, Schneidenbach D, Aust G. Differential expression and activity status of MMP-1, MMP-2 and MMP-9 in tumor and stromal cells of squamous cell carcinoma of the lung. *Tumor Biol* 2002; 23: 179-184.
87. Schulz CH, Emslander HP, Riedel M. Beurteilung der funktionalen Operabilität von Patienten mit Bronchialkarzinom. *Pneumologie* 1999; 53: 337-347.
88. Shopland DR, Pechacek TF, Cullen JW. Toward a tobacco-free society. *Semin Oncol* 1990; 17: 402-412.
89. Shou Y, Hirano T, Gong Y, Kato Y, Yoshida K, Ohira T, Ikeda N, Konaka C, Ebihara Y, Zhao F, Kato H. Influence of angiogenetic factors and matrix metalloproteinases upon tumor progression in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 2001; 85: 1706-1712.

90. Stahel RA, Ginsberg R, Havemann K. Staging and prognostic factors in small cell lung cancer: a consensus report. *Lung Cancer* 1989; 5: 119-126.
91. Stearns ME, Wang M. Type IV (Mr 72,000) expression in human prostate: Benign and malign tissue. *Cancer Res* 1993; 53: 878-883.
92. Stetler-Stevenson WG. Progelatinase A activation during tumor cell invasion. *Invasion Metastasis* 1994; 14: 259-268. Review.
93. Strauss MG, Skarin AT. Use of tumor markers in lung cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 1994; 8: 507-532. Review.
94. Suzuki M, Iizasa T, Fujisawa T, Baba M, Yamaguchi Y, Kimura H. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases in non-small cell lung cancer. *Invasion Metastasis* 1998-99; 18: 134-141.
95. Takes PA, Kohrs J, Krug R, Kewley S. Microwave technologie in immunohistochemistry: application to avidin-biotin staining of diverse antigens. *J Histotechnol* 1989; 12: 95-98.
96. The World Health Organisation. The World Health Organisation histological typing of lung tumors. *Am J Clin Pathol* 1982; 77: 123-136.
97. Thomas P, Khokha R, Shepherd FA, et al. Differential expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in non-small cell lung cancer. *J Pathol* 2000; 190: 150-156.
98. Weir HK, Thun MJ, Hankey BF, Ries LA, Howe HL, Wingo PA, Jemal A, Ward E, Anderson RN, Edwards BK. Annual report to the nation on the status of cancer,

1975-2000, featuring the uses of surveillance data for cancer prevention and control.
J Natl Cancer Inst 2003; 95: 1276-1299. Review.

99. Westermarck J, Kahari VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *Faseb J* 1999; 13: 781-792.
100. Wieskopf B, Demangeat C, Purohit A, Stenger R, Gries P, Kreisman H, Quoix E. Cyfra 21-1 as a biologic marker of non-small cell lung cancer. Evaluation of sensitivity, specificity, and prognostic role. *Chest* 1995; 108: 163-169.
101. Wojtowicz-Praga S, Low J, Marshall J, Ness E, Dickson R, Barter J, Sale M, McCann P, Moore J, Cole A, Hawkins MJ. Phase I trial of a novel matrix metalloproteinase inhibitor batimastat (BB-94) in patients with advanced cancer. *Invest New Drugs* 1996; 14: 193-202.
102. Yang SF, Hsieh YS, Lin CL, Hsu NY, Chiou HL, Chou FP, Chu SC. Increased plasma levels of urokinase plasminogen activator and matrix metalloproteinase-9 in nonsmall cell lung cancer patients. *Clin Chim Acta* 2005; 354: 91-99.
103. Yesner R. Lung cancer, pathogenesis and pathology. *Clinics in chest medicine* 1993; 14: 17-30.
104. Ylisirnio S, Hoyhtya M, Turpeenniemi-Hujanen T. Serum matrix metalloproteinases-2, -9 and tissue inhibitors of metalloproteinases-1, -2 in lung cancer – TIMP-1 as a prognostic marker. *Anticancer Res* 2000; 20 (2B): 1311-1316.
105. Yu, A. E., Hewitt, R. E., Kleiner, D. E., and Stetler-Stevenson, W. G. Molecular regulation of cellular invasion--role of gelatinase A and TIMP-2. *Biochem. Cell Biol.* 1996; 74: 823-831.

8. Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Enzym-Komplex
AEC	Aminoethylcarbazol
APAAP	Alkalische Phosphatase anti-Alkalische Phosphatase
CEA	Carcino-Embryonales Antigen
c-erbB-2	Onkogen
COX PH Modell	Cox proportionnal hazard analysis
CYFRA	Cytokeratin-Fragment 19
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
ED	Extensive Disease
EGFR	epidermal growth factor receptor
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMMPRIN	extracellular matrix metalloproteinase inducer
FEV ₁	forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde
FIZ	Film in situ Zymographie
GTP	Guanosintriphosphat
hnRNA	heterogeneous nuclear RNA, Präkursor-mRNA
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
IGF-BP	insulin like growth faktor binding protein
kDa	Kilodalton
LD	Limited Disease
LFA-1	leukocyte function associated antigen-1
LSAB-Methode	Streptavidin-Biotin-Enzym-Komplex-Methode
MMP	Matrix Metalloproteinase
MMP-2	Gelatinase A, 72 kDa Gelatinase, 72 kDa Typ IV Kollagenase
MMP-9	Gelatinase B, 92 kDa Gelatinase, 92 kDa Typ IV Kollagenase
mRNA	messenger RNA
MT-MMP	membrane-type MMP
NSCLC	non small cell lung carcinoma, nicht- kleinzelliges Bronchialkarzinom
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion

PEP	Peroxidase anti-Peroxidase
RNA	Ribonukleinsäure
SaO ₂	arterielle Sauerstoffsättigung
SCLC	small cell lung carcinoma, kleinzelliges Bronchialkarzinom
TGF-alpha	transforming growth factor-alpha
TL _{CO}	Transferfaktor für Kohlenmonoxid
TIMP	tissue inhibitors of matrix metalloproteinases
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
uPA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
VO ₂ max	ergospirometrische maximale Sauerstoffaufnahme
WHO	World Health Organisation

9. Lebenslauf

Persönliche Information	<ul style="list-style-type: none">♦ <i>Name: Joe Hellers</i>♦ <i>Geburtstag: 30.05.1978</i>♦ <i>Geburtsort: Luxemburg (L)</i>♦ <i>Nationalität: luxemburgisch</i>
Schulbildung	<p><i>1984-1990: Grundschule in Luxemburg-Cents</i></p> <p><i>1990-1997: Gymnasium (Athénée de Luxembourg) in Luxemburg</i> Abschluß: Abitur (Beurteilung: gut)</p>
Studium	<p><i>1997-1998: Studium der Humanmedizin am Centre Universitaire de Luxembourg (Luxemburg/L)</i></p> <p><i>1998-1999: Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München</i></p> <p><i>09.1999: Ärztliche Vorprüfung</i></p> <p><i>1999-2000: Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München</i></p> <p><i>08.2000: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung</i></p> <p><i>2000-2002: Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München</i></p> <p><i>09.2002: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung</i></p> <p><i>2002-2003: Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München</i></p> <p>Praktisches Jahr:</p> <ul style="list-style-type: none">♦ <i>Radiologie: Institut für Klinische Radiologie, Klinikum Großhadern, LMU München, Direktor: Prof. Dr. med. Maximilian Reiser</i>♦ <i>Innere Medizin: Medizinische Poliklinik, Klinikum Innenstadt, LMU München, Direktor: Prof. Dr. med. Detlef Schlöndorff</i>♦ <i>Chirurgie: Städtisches Krankenhaus München-Harlaching, Chefarzt: Prof. Dr. med. Johannes Horn (Abt. für Allgemein- und Viszeralchirurgie), Prof. Dr. med. Hans Hertlein (Abt. für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie)</i> <p><i>10.2003: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: sehr gut)</i></p>
Beruflicher Werdegang	<p><i>01.2004: AiP in der Chirurgischen Klinik und Poliklinik, Campus Innenstadt, Universität München (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. W. Mutschler)</i></p> <p><i>Abteilung für Plastische und Handchirurgie</i></p> <p><i>Leiter: Prof. Dr. med. W. Stock</i></p> <p><i>Nußbaumstraße 20</i></p>

80336 München

10.2004: Assistenzarzt in der Chirurgischen Klinik und Poliklinik

Campus Innenstadt, Universität München

(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. W. Mutschler)

Abteilung für Plastische und Handchirurgie

Leiter: Prof. Dr. med. W. Stock

Nußbaumstraße 20

80336 München

02.2006: Assistenzarzt in Chirurgischen Klinik und Poliklinik

Campus Innenstadt, Universität München

/ (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. W. Mutschler)

01.2007 Intensivmedizin

Leiter: PD. Dr. med. B. Heindl

Nußbaumstraße 20

80336 München

02.2007: Stationsarzt in Chirurgischen Klinik und Poliklinik

Campus Innenstadt, Universität München

(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. W. Mutschler)

Plastische und Ästhetische Chirurgie, Handchirurgie

Leiter: Prof. Dr. med. W. Stock

Nußbaumstraße 20

80336 München

04.2008: Stationsarzt in Chirurgischen Klinik und Poliklinik

Campus Innenstadt, Universität München

(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. W. Mutschler)

Plastische und Ästhetische Chirurgie, Handchirurgie

Komm. Leiter: Dr. med. S. Deiler

Nußbaumstraße 20

80336 München

10. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Wolf Mutschler für die Überlassung des Themas sowie die Unterstützung bei der Durchführung meiner Forschungsarbeit.

Großer Dank gilt Herrn PD Dr. Wulf Sienel, dessen Ideen und Anregungen bei der Planung und Durchführung der Experimente sehr wichtig waren. Für die fachliche Begleitung bei der Auswertung und Veröffentlichung der Forschungsergebnisse danke ich Herrn Prof. Dr. Bernward Passlick. Gleichzeitig möchte ich mich bei den Leitern des Chirurgischen Forschungslabors, Herrn Dr. Sattler und Herrn Dr. Neth für die freundliche Aufnahme in ihrem Labor bedanken. Ich danke der MTA, Frau Claudia Huber für die Unterstützung bei der experimentellen Arbeit im Labor.

Für die finanzielle Unterstützung bei dem Projekt danke ich dem Sonderforschungsbereich 469 der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Meinen Eltern sowie meinem Bruder Yves gilt an dieser Stelle ganz großer Dank dafür, dass sie mir das Studium ermöglicht haben und mich immer wieder mit Unterstützung auf diesem Weg begleitet haben.