

Aus dem Med. Zentrum für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde  
der Philipps-Universität Marburg  
Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. J. A. Werner

**Expression der  
Matrix-Metalloproteinasen MMP-2, -7, -9 und -13  
und ihrer Inhibitoren TIMP-1, -2 und -3  
in Plattenepithelkarzinomen  
des oberen Aerodigestivtraktes**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin  
dem Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Sonja Falkenberg  
aus Bochum

Marburg, 2004

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg am 04. November 2004

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. J. A. Werner

Korreferent: PD Dr. G. H. Lüers

Meinen Eltern



4.3 Gemeinsamkeiten in der MMP-Expression zwischen Tumorgewebe und Zelllinien	33
5. Diskussion	34
5.1 Allgemeine Einführung	34
5.1.1 Pathophysiologische Grundlagen der Metastasierung	34
5.1.2 Struktur und Funktion der Matrix-Metalloproteinasen	35
5.1.3 Struktur und Funktion der Inhibitoren von Matrix-Metalloproteinasen	36
5.1.4 Regulation von MMPs	38
5.1.4.1 Regulation von Transkription und Translation	38
5.1.4.2 Aktivierung latenter MMPs	39
5.1.4.3 Inhibition aktiver MMPs	40
5.1.5 Beitrag von MMPs zur Progression maligner Tumore	40
5.1.5.1 Degradation der Extrazellulärmatrix	40
5.1.5.2 MMPs und Angiogenese	41
5.2 Kritische Betrachtung der verwendeten Methoden	41
5.3 Expression von MMPs und TIMPs in Tumorgeweben	43
5.3.1 Expression von MMP-2 und MMP-9 unter Berücksichtigung ihrer biologischen Eigenschaften	43
5.3.2 Expression von MMP-13	47
5.3.3 Expression von MMP-7 mit Blick auf charakteristische Fähigkeiten	49
5.3.4 Expression von TIMPs	51
5.3.5 Expression von MMPs und TIMPs in Abhängigkeit von der Tumorlokalisation	53
5.3.6 Auftreten vorhandener Muster in der Expression	54
5.4 Expression von MMPs und TIMPs in Zelllinien	54
5.5 Prognostische Eignung von MMPs und Therapieansätze	56
6. Zusammenfassung	58
7. Literaturverzeichnis	60
8. Anhang	75

9. Danksagung	81
10. Verzeichnis der akademischen Lehrer	83

## 1. Einleitung

Plattenepithelkarzinome des oberen Aerodigestivtraktes stehen in Europa mit der Häufigkeit ihres Auftretens an sechster Stelle, wie Crowe et al. [1] darstellen, weit hinter den großen Gruppen der Karzinome von Lunge, Brust und Darm. Über 90 % aller malignen Tumoren der oberen Luft- und Speisewege sind Plattenepithelkarzinome, vereinzelt treten undifferenzierte Karzinome, Lymphome, Sarkome oder andere Seltenheiten auf. Zu den Risikofaktoren für die Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms im Kopf-Hals-Bereich zählen nach Xu et al. [2] in erster Linie Tabakrauch und der regelmäßige Konsum alkoholischer Getränke.

Karzinome der oberen Luft- und Speisewege sind in Abhängigkeit vom histologischen Grading verschieden aggressiv und infiltrieren umgebende Strukturen je nach Dicke subepithelialer Schichten verschieden schnell. Die primär angestrebte Therapie besteht in einer vollständigen operativen Entfernung des Befundes, die bei Bedarf mit einer nachfolgenden Strahlentherapie kombiniert werden kann, oder aber in einer definitiven Radio(chemo)therapie. Wie bei anderen malignen Tumoren stellt sich auch bei Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes die Frage nach eventuellen Mikrometastasen trotz einer auf Grundlage moderner bildgebender Verfahren vermuteten präoperativen Metastasenfreiheit. Die Metastasierung erfolgt primär lymphogen entlang der physiologischen Lymphknotenstationen des Halses [3]. Zur hämatogenen Metastasierung kommt es dagegen trotz reichlicher Vaskularisation von Kopf und Hals erst in späteren Stadien, dann vor allem in die Lunge [4]. Diese Fernmetastasen werden nahezu niemals ohne vorausgegangene Lymphknotenmetastasierung beobachtet.

Die Prognose fortgeschrittener Karzinome der oberen Luft- und Speisewege ist trotz verbesserter operativer Methoden inklusive einer partiellen oder totalen Halslymphknotenentfernung (Neck dissection) mäßig. Zudem ist sie in hohem Maße von der Lokalisation des Primärtumors im Kopf-Hals-Bereich abhängig. Während z.B. die 5-Jahres-Überlebensrate eines Patienten mit einem glottischen Larynxkarzinom im Stadium T1 fast 100 % beträgt, fällt sie bei einer laryngealen T4-Situation auf unter 50 % ab. Die Prognose eines supraglottischen Larynxkarzinoms ist dagegen noch schlechter: hier beträgt die 5-Jahres-

Überlebensrate für Patienten mit T1-Karzinomen etwa 70 – 80 %, mit T4-Karzinomen nur noch 30 – 40 % [4]. Die Tumorgröße ist allerdings keineswegs der einzige prognostische Faktor. So gibt es nicht selten kleine Karzinome mit einer fortgeschrittenen Metastasierung. Hierfür ursächlich angenommen werden Faktoren, die zu einer bereits frühzeitigen Metastasierung beitragen. Zu diesen Gewebefaktoren gehören auch Vertreter der Matrix-Metalloproteinasen.

Matrix-Metalloproteinasen (MMP) bezeichnen eine Familie substratspezifischer Endopeptidasen unterschiedlicher Struktur, denen ein ionisiertes Zinkatom im aktiven Zentrum gemeinsam ist. Durch Spaltung von Peptidbindungen zur Proteindegeneration fähig, sind sie in der Lage, verschiedene Faserstrukturen der Extrazellulärmatrix wie Kollagene und Elastase abzubauen [5]. Matrix-Metalloproteinasen sind seit etwa 25 Jahren bekannt. 1979 beschrieben Sopata und Mitarbeiter [6] eine Gelatinase in menschlichen Leukozyten. Seltzer et al. [7] spezifizierten zwei Jahre später eine neutrale Gelatin-spezifische Proteinase, die menschlichen Fibroblasten entstammte. Die Gelatinase wurde als MMP-2 identifiziert. Neben in Leukozyten und Fibroblasten konnte MMP-2 auch in einer Reihe anderer Gewebe dargestellt werden, so in Synovialflüssigkeit [8] und in verschiedenen tierischen Geweben wie Kaninchenknochen [9]. Nakano und Mitarbeiter [10] stellten eine weitere, von Fibroblasten der Gingiva produzierte Gelatinase dar, deren Gewicht Johansson et al. [11] auf 72 kDa bestimmten. Zuvor hatte die Arbeitsgruppe um Mercer et al. [12] einen Metalloproteinaseinhibitor im Synovialfluid von Patienten mit rheumatoider Arthritis entdeckt, dessen Struktur von Carmichael et al. [13] beschrieben wurde.

Mittlerweile sind mehr als 20 unterschiedliche Matrix-Metalloproteinasen bekannt [14]. Sie werden in verschiedene Unterklassen eingeteilt, wobei die Einteilung anhand einer Kombination aus struktureller und Substrathomologie der einzelnen MMPs vorgenommen wird [15]. Auf diesen Kriterien basierend werden Kollagenasen, Stromelysine, Gelatinasen, Matrilysin und Membran-Typ MMPs (=MT-MMP) unterschieden, wobei mittlerweile auch Überschneidungen zwischen den einzelnen Unterklassen gefunden wurden. So kann z.B. die Gelatinase MMP-2 analog zu den Kollagenasen der MMP-Familie fibrilläre Kollagene abbauen [16]. Die ersten vier genannten Mitglieder der Familie degradieren als freie Enzyme verschiedene Bestandteile der Extrazellulärmatrix, wie Kollagene, Laminin und Gelatin. MT-MMPs dagegen werden nicht sezerniert, sondern sind membrangebundene



Enzyme [17]. Soweit bis jetzt bekannt ist, spielen sie unter anderem eine wichtige Rolle bei der Aktivierung latenter MMP-Vorstufen [18].

Physiologische Antagonisten der MMPs sind die „Tissue Inhibitors of Matrix-Metalloproteinases“, TIMPs. Mercer und Mitarbeiter [12] entdeckten 1985 einen Metalloproteinaseninhibitor im Synovialfluid von Patienten mit rheumatoider Arthritis, dessen Struktur von Carmichael [13] beschrieben wurde. Inzwischen sind vier verschiedene TIMPs bekannt, die in verschiedensten Geweben und Körperflüssigkeiten nachzuweisen sind und allesamt MMP-inhibitorische Aktivität besitzen [19].

Mit ihrer Fähigkeit zum Abbau unterschiedlicher extrazellulärer Faserstrukturen nehmen Matrix-Metalloproteinasen an den verschiedensten Umbauprozessen des Gewebes teil. Zum einen kann es sich dabei um physiologische Vorgänge handeln, z.B. embryonale und fetale Entwicklung [20;14], post-partale Umbauvorgänge [21], altersbedingte Involutionsprozesse [22] oder Wundheilungen [23]. Aber auch bei verschiedenen Krankheiten, die mit Modifizierungen von Gewebsstrukturen und Entzündungen einher gehen, lassen sich MMPs nachweisen, z.B. in Systemerkrankungen wie rheumatoider Arthritis [24;25], in zirrhotischem Lebergewebe [26] und arteriosklerotisch veränderten Gefäßen bei koronarer Herzkrankheit [27], bei chronischen Entzündungen [28] oder bei Periodontitis [29]. Von besonderer Bedeutung sind Matrix-Metalloproteinasen im Zusammenhang mit malignen Tumoren: Matrix-Metalloproteinasen lassen sich in ganz unterschiedlichen Tumoren, wie zum Beispiel von Ösophagus [30], Magen [31], Dickdarm [32;33], Pankreas [34], Leber [35], Lunge [36;37], Haut [23;38], Genitaltrakt [39] und oberem Aerodigestivtrakt [40] nachweisen. Dérrico et al. [41] führen das jeweilige Vorkommen der MMPs auf ihre Fähigkeit zum Abbau von Kollagen Typ IV zurück. Die Bedeutung der Degradation von Kollagen Typ IV, einem wichtigen Baustein der Basalmembran, wurde durch Liotta et al. [42] und seitdem wiederholt beschrieben, weshalb man Matrix-Metalloproteinasen eine entscheidende Bedeutung in der Ausbreitung maligner Prozesse zuschreibt.

Vor diesem Hintergrund wurden Matrix-Metalloproteinasen in den letzten Jahren in zweierlei Hinsicht untersucht. Zum einen stellt sich die Frage, inwieweit Matrix-Metalloproteinasen als Angriffsort neuer Chemotherapeutika von Wert sind: Entweder in Form synthetischer Inhibitoren der proteolytischen Aktivität von MMPs oder als Inhibito-

ren der Signaltransduktion, die zur Expression von MMPs in Tumorzellen führt [43;44;45]. Der andere Schwerpunkt besteht in einer Evaluation von Matrix-Metalloproteinasen als prognostische Faktoren für den Verlauf einer Tumorerkrankung. Verschiedenste Arbeitsgruppen wiesen auf Zusammenhänge zwischen der Menge an vorhandenen MMPs und prognoserelevanten Kriterien hin, so Heissenberg et al. [46] für Plattenepithelkarzinome des Hypopharynx, Bianco et al. [47] für Patienten mit Urothelkarzinomen, Airola et al. [48] für das maligne Melanom und Herbst et al. [49] für den nicht-kleinzelligen Lungenkrebs. Trotz intensiver Forschung auf diesem Gebiet hat sich bis jetzt noch kein abschließendes Bild hinsichtlich der Bedeutung von MMPs in malignen Tumoren ergeben, weswegen weitere Untersuchungen zu diesem Thema vonnöten sind.

## 2. Fragestellung

Mit Blick auf die eben aufgezeigte Problematik war es das Ziel der vorliegenden Dissertation, folgende Fragen zu beantworten:

- Wird die RNA der Matrix-Metalloproteinasen MMP-2, -7, -9 und -13 und ihrer Antagonisten TIMP-1, -2 und -3 in den betrachteten Proben aus Tumorgewebe und Zelllinien exprimiert?
- Wie stellt sich das nachgewiesene Expressionsverhalten bei genauerer Betrachtung dar: Ist es möglich, bestimmte, wiederkehrende Muster zu erkennen?
- Welche Korrelationen ergeben sich zwischen den nachgewiesenen Expressionsmustern der Primärtumorgröße, dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen zum Diagnosezeitpunkt oder dem histologischen Differenzierungsgrad sowie der Lokalisation des Primärtumors?

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Gewebe – Proben**

Insgesamt wurden 30 Tumorgewebe-Proben von 28 verschiedenen Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der oberen Luft- und Speisewege untersucht. Von diesen Patienten waren 25 männlich, 3 weiblich; das mittlere Alter betrug 54,8 (+/- 7,96) Jahre, mit einer Spannweite zwischen 43 und 68 Jahren. Zum Operationszeitpunkt befand sich die Mehrheit der Patienten (n = 22) in einem fortgeschrittenen Stadium ihrer Erkrankung (T3 oder T4). Die Gewebeproben wurden im Rahmen der operativen Therapie an der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Philipps-Universität in Marburg zwischen Mai 1998 und Juli 1999 gewonnen. Eine Chemo- oder Strahlentherapie ging bei keinem der Patienten der Operation voraus. In 22 Fällen stammten die Proben von einem operativ entfernten Primärtumor. Sechs Proben wurden aus Metastasen entnommen; drei Proben aus Lymphknotenmetastasen, drei aus Metastasen im Weichteilgewebe. In einem Fall handelte es sich um eine Lymphknotenmetastase bei CUP-Syndrom (cancer of unknown primary) mit unbekanntem Primärtumor, die sich in einem Halslymphknoten des Patienten befand. Bei zwei Patienten konnten Gewebeproben sowohl aus dem Primärtumor als auch aus einer Metastase gewonnen werden. Die histologische Sicherung der Diagnose eines Plattenepithelkarzinoms sowie die Einteilung anhand des Differenzierungsgrads (G1 - G4) erfolgte bei jedem Resektat durch die Pathologische Abteilung des Universitätsklinikums (Leiter Prof. Dr. R. Moll). Unmittelbar nach der Entnahme wurden die Proben schockgefroren und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert. Die Probengewinnung erfolgte in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Ethikkommission der Philipps-Universität Marburg.

#### **3.2 Zelllinien**

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden sieben Plattenepithelkarzinom-Zelllinien verwendet, die der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten freundlicherweise von T. Carey (UM-SCC-27, UM-SCC-3) und R. Grénman (UT-SCC-24A, UT-SCC-24B, UT-

SCC-19B, UT-SCC-16A, UT-SCC-16B) zur Verfügung gestellt wurden. Desweiteren wurde als Kontrolle eine Keratinozyten-Zelllinie gesunder Mundschleimhaut mitgeführt.

### **3.2.1 Zellkultur**

Um die notwendigen sterilen Bedingungen in der Anzucht von Zellkulturen zu gewährleisten, wurden alle Arbeiten an einem Reinraum-Arbeitsplatz (Köttermann Uetze, Typ 8581) durchgeführt. Alle Übertragungen von Zellen oder Medien erfolgten mit einer Pipettierhilfe (Pipetus-Akku, Hirschmann Laborgeräte, Ebersdorf) und sterilen serologischen Einmalpipetten (Nalge Nunc, Wiesbaden, Größen 5, 10 und 25 ml). Die Kultur von Tumorzellen und Keratinozyten unterscheidet neben dem Anzuchtprotokoll vor allem die Wahl verschiedener Medien, die im Anschluss beschrieben sind.

#### **Tumorzellen**

Das für die Anzucht der Tumorzellen benötigte Medium wurde unter sterilen Bedingungen angesetzt (siehe Teil 2.8), mit 0,1 mol NaOH bzw. HCl auf einen pH-Wert von genau 7,40 titriert und nach sterilem Filtrieren (Bottle Filter Systems, Costar Bodenheim) bei 4°C gelagert. Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zelllinien waren zum Schutz vor dem Gefrieren mit Dimethylsulfoxid 10 % versehen worden, welches vor der Verwendung entfernt werden musste. Dazu waren die Zellen im indirekten Wasserbad bei 37°C aufzutauen und umzulagern. Die erhaltene Zellsuspension musste mit frischem Kulturmedium auf insgesamt 10 ml Volumen aufgefüllt und bei 700 U/min für 10 Minuten zentrifugiert werden (Medifuge, Heraeus Instruments Hanau). Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert, die Zellen mit 5 ml Medium resuspendiert, in die Kulturflaschen ausgesät und weitere 10 ml Medium hinzugefügt. Die Zellen wurden nun bei 37°C, 5 % atmosphärischem Kohlendioxid und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank (Begasungsbrutschrank BB 16, Heraeus Instruments) inkubiert und regelmäßig unter dem Lichtmikroskop (Telaval 31, Zeiss Jena) auf Verunreinigungen, Bakterienbefall und Wachstumsstand kontrolliert. Der Wechsel des Nährmediums fand alle drei Tage statt. Bei am Flaschenboden festgewachsenen Zellen wurde das alte Medium abgossen und die Flasche mit 10 ml neuen Mediums wieder gefüllt. Schwimmende Zellen mussten durch Zentrifugation vom alten Medium getrennt, in neuem Medium resuspendiert und wieder in die Brutflasche gegeben werden.

## Keratinocyten

Das serumfreie Keratinocyten-Medium enthielt epidermalen Wachstumsfaktor EGF 5 ng/ml und Rinderhypophysenextrakt BPE 50 µg/ml; eine prophylaktische Antibiose aus 500 µl Amphotericin B (250 µg/ml) , 200 µl Mycoplasma Removal Agent MRA und 5 ml Penicillin/Streptomycin (10.000 IU / 10.000 µg/ml) wurde nach der Lieferung hinzu gegeben. Der Ansatz wurde steril filtriert, in 10 ml Portionen aliquotiert und bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C aufbewahrt. Zur Kultivierung von Keratinocyten wurde normale Mucosa sofort nach der Resektion noch im OP in eine Petrischale mit DMEM gegeben, mit einem Skalpell zerkleinert und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C gelagert. Nach Abgießen des Mediums wurde die Schleimhaut dreimal mit PBS-Lösung gewaschen und bei 37°C für 1 h mit Dispase (3 ml á 3 Units/ml) und 7,5 µl Penicillin/Streptomycin behandelt. Es erfolgte ein weiterer Waschgang mit PBS-Lösung. Anschließend konnte die Epidermis von der Dermis getrennt werden und mit Trypsin-PBS-Lösung (0,05 % Trypsin) 20 – 30 Minuten lang bei 37°C zur Lyse der epidermalen Zellverbände inkubiert werden. Das Lysat wurde 5 Minuten lang bei 1000 U/min zentrifugiert und der Trypsin-Überstand verworfen. Danach wurde das Lysat zweimal mit FCS 10 % gewaschen, um die Aktivität eventuell verbliebenen Trypsins zu stoppen, und wieder zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und die Zellen im Bodensatz durch Zugabe von 5 ml Keratinocyten-Medium wieder aufgeschwemmt. Die Zellen konnten nun mitsamt des Nährmediums ausplattiert und im Brutschrank inkubiert werden. Der Medium-Wechsel mit Keratinocyten-Nährmedium erfolgte erst nach fünf Tagen und verlief im übrigen wie bei den Tumorzellen. Zur Etablierung einer Zelllinie und zur Anzucht von Zellen in größerer Menge war ein Passagieren der Keratinocyten unerlässlich. Dabei wurden die Zellen zunächst wie zur Ernte abgelöst und nach der Zentrifugation mit 4 ml Medium resuspendiert. Diese Suspension wurde gleichmäßig auf neue Kulturflaschen verteilt. Pro Ansatz kamen noch 2 – 3 ml Medium hinzu, dann wurden die Proben inkubiert. Nach drei Tagen erfolgte eine Kontrolle und bei erfolgreichem Anwachsen ein normaler Wechsel des Mediums.

### 3.2.2 Zellernte

Nach durchschnittlich 7 – 10 Tagen (Keratinocyten benötigen länger als Tumorzellen) bildeten die Zellen einen dichten Verband am Boden der Kulturflasche. Zur Ernte war zunächst das alte Medium abzugießen, die Zellen mit PBS zu spülen und mit 2 ml 0,05 %

Trypsin zu inkubieren. Wenn sich, abhängig von der jeweiligen Kultur, nach 30 – 60 Minuten alle Zellen vollständig vom Boden abgelöst hatten, wurden 5 – 10 ml Medium als „Trypsinstopper“ hinzu gegeben. Die Zellsuspension war jetzt für nachfolgende Untersuchungen zu gebrauchen.

### 3.3 RNA-Extraktion aus Gewebe

Vor Extraktion der RNA aus den Proben musste das Gewebe zunächst zerkleinert und genau abgewogen werden, um die RNA mit Hilfe des Qiagen RNeasy Kits (Qiagen, Hilden) gemäß des beigefügten Protokolls von den übrigen Gewebebestandteilen trennen zu können. Die Pulverisierung erfolgte per Hand in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten, sauberen Mörser. Erst durch die Zugabe von 350 µl (bei weniger als 20 mg Gewebe) bzw. 600 µl (bei 20 – 30 mg Gewebe) RLT-Puffer taute das Gewebe auf, das bis zu diesem Schritt zur Verhinderung einer RNA-Denaturierung durch ubiquitäre RNAsen gefroren bleiben musste. Nach Homogenisierung des entstandenen Lysats wurde drei Minuten lang bei 15000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und dieselbe Volumeneinheit 70-prozentigen Ethanol zugefügt. 700 µl der Probe inklusiv eventuell entstandener Präzipitate wurden in einer „RNeasy mini spin column“ für 15 Sekunden bei 10000 U/min zentrifugiert und die ausgetretene Flüssigkeit verworfen. Bei mehr als 700 µl Lysat wurde dieser Schritt entsprechend wiederholt. Im nächsten Schritt musste 700 µl RW1-Puffer auf die RNeasy-Säule pipettiert und wieder für 15 Sekunden bei 10000 U/min zentrifugiert werden. Zum Auswaschen der Säule wurde mit 500 µl RPE-Puffer 15 Sekunden lang bei 10000 U/min und bei der Wiederholung des Waschvorgangs für zwei Minuten bei maximaler Geschwindigkeit (15000 U/min) zentrifugiert. Nach Verwerfen des Eluats erfolgte eine vollständige Trocknung der Säule während einer weiteren Minute Zentrifugation bei Höchstgeschwindigkeit. Die Säule enthielt dann die extrahierte RNA, die mit 50 µl RNase-freien Wassers nach Zugabe von 1 µl RNase-Inhibitors eluiert wurde. Nach der Eluation erfolgte sofort eine photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration im Eluat (Photometer: Pharmacia, LKB Ultrospec III), um so die absolute Menge an gewonnener RNA berechnen zu können. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei  $-28^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **3.4 Erstellung einer cDNA**

Für die reverse Transkription der extrahierten RNA in eine cDNA wurde zunächst ein Master-Mix mit Reagenzien aus dem „1<sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)“ (Boehringer Mannheim) erstellt. Das dann zuzufügende Volumen an eluierter RNA musste genau 1 µg RNA entsprechen. Steriles, RNase-freies Wasser in entsprechenden Anteilen füllte den Reaktionsansatz auf das notwendige konstante Volumen von 20 µl auf. Die Inkubation im PCR-Gerät (Hybaid Omni Gene, Nr. 2613) folgte dem Temperatur-Zeit-Protokoll von Boehringer-Mannheim: 10 min bei 25°C, dann für 60 min bei 42°C. Die Denaturierung der Reversen Transkriptase für 5 Minuten bei 99°C war notwendig, um eine mögliche Störung späterer Arbeitsschritte durch das Enzym zu verhindern. Nach dem Abkühlen auf 4°C für 5 Minuten konnte die neuentstandene cDNA direkt weiter verwendet oder bei 4°C einige Wochen lang aufbewahren werden.

### **3.5 Polymerase-Kettenreaktion**

Im Anschluss an die Herstellung der cDNA erfolgte deren Amplifikation in der Polymerase-Kettenreaktion mit einem in einer vorausgegangenen Versuchsreihe ausgetesteten Reaktionsansatz. Die verwendeten Primer waren zuvor nach Sequenzangaben im Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung an der Philipps-Universität Marburg synthetisiert worden und lagen in einer Konzentration von 0,04 µMol vor. Zu diesem Grundansatz (jeweils 95,0 µl) kamen immer 5,0 µl der aus den einzelnen Proben gewonnenen cDNA. Ein Tropfen reinen Mineralöls als Abdeckung verhinderte ein Verdunsten des Ansatzes während des PCR-Prozesses. Die anschließende cDNA-Amplifikation verlief nach folgendem Temperatur- und Zeitprotokoll: Zunächst eine dreiminütige Inkubation der Probe bei 94°C, dann folgten 35 Reaktionszyklen, von denen jeder einzelne aus Denaturierung bei 94°C für eineinhalb Minuten, Anlagerung bei 58°C für eine Minute und Primer-Verlängerung bei 72°C für zwei Minuten bestand. Im Anschluß daran wurden nach einer letzten Verlängerungsphase, fünf Minuten bei 72°C, weitere Reaktionen durch Abkühlung auf 4°C gestoppt. Die Probe konnte jetzt bis zur geplanten Verwendung für einige Zeit bei 4°C gelagert werden.



### **3.6 Gel-Elektrophorese**

Die Identifikation der amplifizierten DNA erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung der Proben auf einem mit 0,003 % Ethidiumbromid versetzten 2-prozentigen Agarose-Gel im Flachbettelektrophoresegerät (Kodak BioMax MP 015). Zur Herstellung der Gele sowie zur Elektrophorese war TEA-Puffer in einer definierten Konzentration zu verwenden. Die Stammlösung musste dabei zum endgültigen Gebrauch kurz vorher auf ein Fünftel der Ausgangskonzentration verdünnt werden. Die Geltaschen wurden mit jeweils 15 µl DNA-Lösung und 3 µl eines 6-fach Probenpuffers befüllt. Bei jeder Elektrophorese lief als Größenstandart 1 µg eines ebenfalls mit 6-fach Puffer gemischten 100 bp DNA-Ladders sowie eine Probe mit Aktin-cDNA mit. Die Laufzeit eines Gels betrug 110 Minuten bei einer Spannung von 100 Volt. Die einzelnen Banden konnten an verschiedenen Stellen unter ultraviolettem Licht sichtbar gemacht und ihre DNA wegen der unterschiedlichen Größe verschiedenen MMPs bzw. TIMPs zugeordnet werden; dabei entsprach Aktin 788 bp, MMP-2 485 bp, MMP-7 784 bp, MMP-9 638 bp, MMP-13 490 bp, TIMP-1 551 bp, TIMP-2 427 bp, TIMP-3 455 bp. Die Fotografie der im UV-Licht aufleuchtenden Banden erfolgte mit einer Polaroid-Handkamera, Blende 8, Belichtungszeit 1,5 Sekunden; Entwicklungsdauer 50 – 55 Sekunden.

### **3.7 Auswertung**

#### **3.7.1 Allgemeine Hinweise**

Die Auswertung der gewonnenen Ergebnisse erfolgte semiquantitativ, d.h. das Signal der exprimierten RNA-Menge wurde im Verhältnis zum Signal der jeweils exprimierten beta-Aktin-RNA betrachtet, weil die Expression der Aktin-kodierenden Gene in Zellen konstant bleibt, unabhängig vom Malignitätsgrad des Gewebes. Dabei entspricht die Signalstärke der in der untersuchten Probe vorhandenen Aktin-RNA einer willkürlich festgelegten Menge von 100 %, das nachgewiesene MMP- (bzw. TIMP-) RNA-Signal beträgt im Vergleich dazu in Prozent

0 (= nicht nachweisbar),

25 (= Signal schwach nachweisbar),

50 (= nachweisbares Signal schwächer als das von Aktin),

100 (= MMP- / TIMP-RNA-Signal entspricht etwa Aktin),

150 (= Signal stärker) und

200 (= Signal sehr viel stärker als das von Aktin).

### **3.7.2 Statistische Auswertung**

Zur Auswertung wurde das Programm SPSS 11.2 für Windows 98 verwendet. Dabei wurden Verteilungshäufigkeiten sowie fragliche Zusammenhänge zwischen den einzelnen Parametern und deren statistische Signifikanz betrachtet. Eine Untersuchung auf vorhandene Korrelationen erfolgte mit dem tau-b-Test nach Kendall und dem rho-Test nach Spearman.

## **3.8 Methodischer Anhang**

### **3.8.1 Reaktionsansätze**

Tumorzellmedium

Zur Herstellung des Mediums für die Tumorzellen einschließlich Antibiose sind:

2,38 g HEPES (Hydroxyethyl-Piperazin-Ethansulfonsäure)

0,375 g NaHCO<sub>3</sub>

4,86 g MEM (Minimal Essential Medium)

50 ml FCS (Fetal Calf Serum) 10%

5 ml L-Glutamin 200 mM

5 ml Penicillin/Steptomycin (10000 IU/ml / 10000 µg/ml)

250 µg Amphotericin B (250 µg/ml)

200 µl Mycoplasma Removal Agent

mit destilliertem Wasser auf 500 ml Gesamtvolumen aufzufüllen.

Vor Ansetzen des Mediums muss das Komplementsystem des FCS durch Inkubation bei konstant 56°C über 30 Minuten inaktiviert werden.

cDNA-Master-Mix

2,0 µl 10X Reaction Buffer: 100 mM Tris, 500 mM KCl; pH 8,3

4,0 µl Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>): 25 mM

2,0 µl Desoxynucleotid-Gemisch: je 10 mM dATP, dCTP, dTTP, dGTP  
 2,0 µl Random Primer p(dN)<sub>6</sub>: 0,04 A260 units/µl (2 µg/µl)  
 1,0 µl RNase-Inhibitor: 50 units/µl  
 0,7 µl AMV Reverse Transcriptase

#### PCR-Master-Mix

10 µl PCR 10x ReactionBuffer  
 2,0 µl Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>): 2,5 mM  
 2,0 µl Gelatine  
 je 1 µl 5'- und 3'- Primer  
 0,5 µl Taq  
 78,5 µl RNase-freies destilliertes Wasser

Tabelle 1: Basenabfolge der bei der PCR eingesetzten Primer

beta-Aktin	S	5`-GAT GAT GAT ATC GCC GCG CTC GTC GTC-3`
	AS	5`-GTG CCT CAG GGC AGC GGA ACC GCT CA-3`
MMP-2	S	5`-CCA CGT GAC AAG CCC ATG GGG CCC C-3`
	AS	5`-GCAA GCC TAG CCA GTC GGA TTT GAT G-3`
MMP-7	S	5`-CCT GGC AGC CTG GCC CTG CCG CTG CCT-3`
	AS	5`-AAT GAA TGG ATG TTC TGC CTG AAG TTT C-3`
MMP-9	S	5`-GGT CCC CCC ACT GCT GGC CCT TCT ACG GCC-3`
	AS	5`-GTC CTC AGG GCT CTG CAG AAT GTC ATA GGT-3`
MMP-13	S	5`-GAC TTC ACG ATG GCA TTG CTG-3`
	AS	5`-GCA TCA ACC TGC TGA GGA TGC-3`
TIMP-1	S	5`-TGC ACC TGTT GTC CCA CCC CAC CCA CAG ACG-3`
	AS	5`-GGC TAT CTG GGA CCG CAG GGA CTG CCA GGT-3`
TIMP-2	S	5`-AAG GAA GTG GAC TCT GGA AAC G-3`
	AS	5`-TTG ATG CAG GCG AAG AAC TTG G-3`
TIMP-3	S	5`-ATC AAG TCC TGC TAC TAC CTG C-3`
	AS	5`-TCA TTC TTT CTG GCA TGG CAC C-3`

Legende: S = sense; AS = antisense (Leserichtung der Gensequenzen)

A = Adenosin; C = Cytosin; G = Guanosin; T = Thymidin

#### TEA – Puffer

24,2 g Trisbase

5,7 ml Eisessig

3,7 g Natrium-EDTA in einem Liter destilliertem Wasser

#### 6-fach Probenpuffer

50 % Glycerin

1 mM EDTA

0,4 % Bromphenolblau

0,4 % Xylencyanol in destilliertem Wasser

### 3.8.2 Produkte und Chemikalien

#### 1) Zellkultur

Amphotericin B 250 µl/ml lyophilized, Seromed®, Biochrom KG Berlin

Gentamycin 10 mg/ml, rekonstituiert mit 5 ml sterilem aqua dest, Seromed®, Biochrom KG

Penicillin / Streptomycin 10.000 IU / 10.000 µg/ml, Seromed®, Biochrom KG

Dispase auf der Basis: Bacillus Polymicos I + II Neutrale Protease, Boehringer Mannheim

serumfreies Medium für Keratinozyten, Life-Technologies Paisley Schottland, enthält: Epidermalen Wachstumsfaktor EGF 5 ng/ml

Rinderhypophysen-Extrakt BPE 50 µg/ml

FCS fetales Kälberserum, auf Mycoplasmen getestet, Seromed®, Biochrom KG

DMEM Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium, BioWhittaker Europe

PBS-Lösung, Seromed, Biochrom KG, enthält:

6,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,5 mM KCl, 140 mM NaCl, pH 7,25

MRA mycoplasma removal agent, ICN Biomedicals Meckenheim

DMSO, Merck Darmstadt

2) RT-PCR

RNeasy Kit, Quiagen

„1<sup>st</sup> strand cDNA synthesis kit for RT-PCR (AMV)“, Boehringer Mannheim

3) Elektrophorese

100 bp DNA-Ladder, New England Biolabs

Die übrigen zur Zubereitung der Puffer und bei der Gel-Elektrophorese verwendeten Chemikalien wurden alle von Merck, Darmstadt bezogen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Expressionsverhalten von MMPs und TIMPs in Tumorgeweben

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die gesamte MMP- und TIMP-RNA-Expression in allen untersuchten Tumorgewebeproben (n = 30).

	positive Proben	Prozent	Mittelwert in Prozent	Standardfehler	Median
MMP-2	21	70	24,17	3,49	25
MMP-7	16	53	39,17	10,43	25
MMP-9	23	77	63,33	10,90	50
MMP-13	29	97	107,50	10,11	100
TIMP-1	30	100	100,83	5,42	100
TIMP-2	30	100	80,00	5,14	100
TIMP-3	30	100	45,00	2,78	50

Tabelle 2: Statistische Darstellung der Signale von MMPs und TIMPs in der Gesamtheit der untersuchten Tumorgewebeproben

Die Übersicht verdeutlicht, dass alle in Frage stehenden MMPs und TIMPs in den untersuchten Gewebeproben auf RNA-Niveau vorhanden sind. Allerdings zeigen die einzelnen MMPs und TIMPs sowohl in Häufigkeit als auch in Intensität ihrer RNA-Signale Unterschiede. Während die TIMPs alle gleich häufig in allen Proben (= 100%) nachweisbar sind, unterscheiden sie sich erheblich im Hinblick auf die jeweils tatsächlich vorhandene Signalstärke: Der Mittelwert schwankt zwischen 100 % (für TIMP-1) und 45 % (für TIMP-3). Noch größere Differenzen finden sich bei den MMPs. Die am häufigsten exprimierte MMP ist MMP-13 in 97 % der Proben; zugleich zeigt sie mit ihrem Mittelwert von 107,5 % auch das stärkste Signal aller MMPs. MMP-9 zeigt den zweithöchsten Mittelwert aller MMPs (63,3 %) und ist mit 77 % positiver Proben auch am zweithäufigsten vorhan-

den. MMP-2 ist zwar in 70 % aller Fälle nachzuweisen, hat aber nur eine durchschnittliche Signalstärke von 24,17 %. MMP-7 schließlich wird zwar im Schnitt mit einer Intensität von 39,17 % dargestellt, aber nur in 53 % aller Proben.

Die graphische Darstellung (Abbildung 1) zeigt die Mittelwerte der Signalintensitäten aller betrachteten MMPs und TIMPs in der Gesamtprobenmenge.

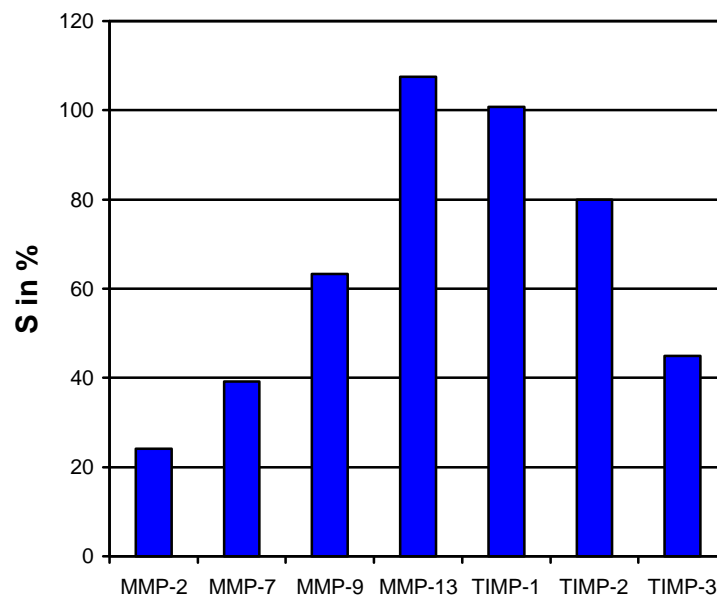


Abbildung 1: Mittelwerte der Signalintensitäten S der MMPs und TIMPs in der Gesamtprobenmenge in Prozent

Ein etwas anders gewichtetes Bild ergibt sich bei isolierter Betrachtung der MMP- und TIMP-RNA-Signalhäufigkeiten und -intensitäten in den vierundzwanzig untersuchten Primärtumorproben (Tabelle 3).

	positive Proben	Prozent	Mittelwert in Prozent	Standardfehler	Median
MMP-2	18	75	25,00	3,69	25
MMP-7	16	67	48,96	12,27	25
MMP-9	18	75	54,17	11,13	50
MMP-13	23	96	113,54	11,75	100
TIMP-1	24	100	101,04	6,81	100
TIMP-2	24	100	79,17	5,14	100
TIMP-3	24	100	42,71	2,37	50

Tabelle 3: Statistische Darstellung der Signale von MMPs und TIMPs in der Gruppe der Primärtumoren

MMP-13 weist mit 113,54 % den höchsten aller Mittelwerte in der Signalintensität auf. MMP-9 ist in drei Vierteln der Proben zu finden; allerdings beträgt der Mittelwert von MMP-9 bei der isolierten Betrachtung der Primärtumorgruppe 54,17 %. MMP-7 wird bei den Primärtumoren in 67 % der Fälle nachgewiesen. Der Mittelwert liegt bei 49 %. MMP-2 findet sich nun in 75 % der Fälle, der Mittelwert beträgt 25,00 %. Abbildung 2 zeigt die Verteilung der Mittelwerte der Signalintensitäten der untersuchten MMPs und TIMPs.

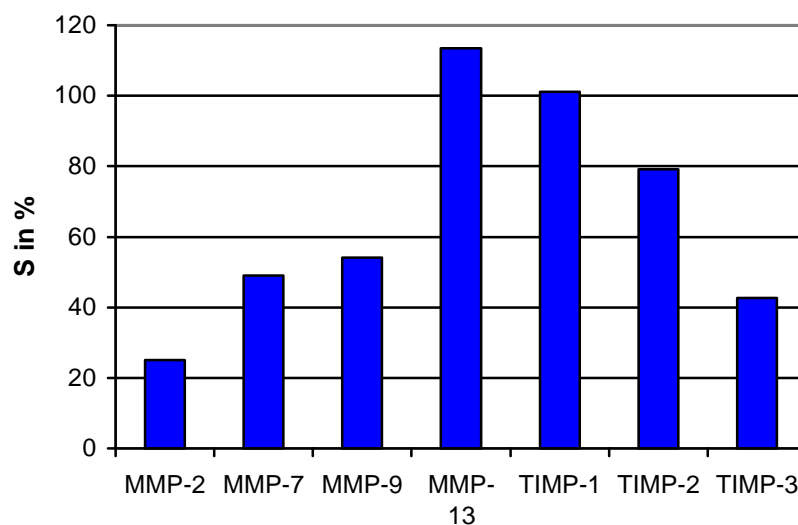


Abbildung 2: Mittelwerte der Signalintensitäten S in Prozent in der Primärtumorgruppe



Betrachtet man nun das Verhalten von MMP- und TIMP-Signalen im untersuchten Metastasengewebe allein, verschieben sich die oben beschriebenen Verteilungen zum Teil deutlich.

Tabelle 4 fasst Menge und Häufigkeit der nachgewiesenen RNA-Signale von MMPs und TIMPs in den Proben, die aus Metastasen stammen (n = 6), zusammen:

	positive Proben	Prozent	Mittelwert in Prozent	Standardfehler	Median
MMP-2	3	50	20,83	10,04	12,50
MMP-7	0	0	0	0	0
MMP-9	5	83	100	28,87	100
MMP-13	6	100	83,33	16,67	75
TIMP-1	6	100	100	0	100
TIMP-2	6	100	83,33	16,67	75
TIMP-3	6	100	54,17	10,04	50

Tabelle 4: Statistische Darstellung der Signale von MMPs und TIMPs in den Metastasen

Auch im untersuchten Metastasengewebe sind Signale der drei TIMPs 1, 2 und 3 in 100 % der Fälle nachzuweisen. TIMP-1 ist mit einem Mittelwert von 100 % die am stärksten nachgewiesene Inhibitor-RNA; zugleich ist diese Signalstärke sehr konstant – der Standardfehler beträgt 0. In allen untersuchten Proben lässt sich die gleiche Intensität an TIMP-1-RNA-Signal zeigen. Der Mittelwert von TIMP-2 liegt mit 83,33 % ähnlich hoch wie in der Gruppe der Primärtumoren (79,17 %), und zeigt somit im Signalverhalten wenig Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Das gleiche gilt in eingeschränktem Maß für TIMP-3.

In der Gruppe der Metastasen zeigen die Signale der MMPs eine andere Verteilung als in der Gruppe der Primärtumoren. Bei den Metastasen ist MMP-13 zwar immer noch die am häufigsten vorhandene MMP (100 % der Proben gegenüber 96 % in Primärtumoren), mit einem Mittelwert von 83,33 % gegenüber 113,54 % aber nicht mehr die am stärksten exprimierte. In Metastasen ist das stärkste Signal das von MMP-9 (Mittelwert 100 %), wo-

bei der Standardfehler von 28 auf eine sehr breite Varianz innerhalb der RNA-Menge hinweist. MMP-2 lässt sich in der Hälfte der Fälle (50 %) darstellen, der Mittelwert beträgt etwa 20 %. Sehr einheitlich ist dagegen das fehlende Signal von MMP-7, das in keiner der untersuchten Metastasen nachweisbar ist. Diese Tatsache unterstreicht den zuvor gezeigten Unterschied in der Signalfrequenz von MMP-7-RNA zwischen der Gesamtmenge und der Gruppe der Primärtumoren. Insgesamt ist der Mittelwert der RNA-Signalintensität - bis auf die beiden homogenen Fälle TIMP-1 und MMP-7 - mit einem großen Standardfehler behaftet, der auf eine starke Schwankungsbreite der jeweiligen Mengen an RNA schließen lässt.

#### **4.1.1 Muster und Korrelationen von MMP-Expressionen**

Feststehende wiederkehrende Expressionsmuster innerhalb der untersuchten MMPs lassen sich in den vorliegenden Proben nicht mit letzter Sicherheit aufzeigen. Die Expression von RNA einer MMP hängt nicht von anderen MMPs ab. Auch ist die Menge an RNA einer MMP unabhängig von der anderer MMPs. Statistisch signifikante Korrelationen zwischen einzelnen MMPs konnten weder nach Spearman-rho noch nach Kendall-tau-b dargestellt werden.

Demgegenüber treten die drei TIMPs gemeinsam in 100 % aller Tumorproben auf. Die Signalintensitäten von TIMP-2 und -3 weisen eine statistisch signifikante positive Korrelation auf: Der Korrelationskoeffizient beträgt nach Kendall-tau-b 0,324 (Signifikanz  $p = 0,036$ ), nach Spearman-rho 0,327 ( $p = 0,039$ ). Ein starkes TIMP-2 Signal geht also mit erhöhten Werten für TIMP-3 einher. Für TIMP-1 kann dagegen kein derartiger Zusammenhang nachgewiesen werden.

Korrelationen existieren ebenfalls zwischen den RNA-Mengen einzelner TIMPs und MMPs. Bei den Primärtumor-Proben allein besteht zwischen MMP-7 und TIMP-2 eine signifikante negative Korrelation: Der Korrelationskoeffizient beträgt  $-0,353$  ( $p = 0,045$ ) nach Spearman-rho, bzw.  $-0,318$  ( $p = 0,045$ ) nach Kendall-tau-b. Geringe Werte an MMP-7-RNA treten also gemeinsam mit hohen Werten für TIMP-2 auf und umgekehrt. In der Gruppe der Metastasen sind die RNA-Mengen von MMP-13 und TIMP-2 durch eine positive Korrelation miteinander verbunden: Die RNA beider Enzyme wird demnach innerhalb

einer Gewebeprobe entweder stark oder schwach exprimiert. Der Korrelationskoeffizient liegt bei 0,727 ( $p = 0,037$ ) nach Kendall-tau-b und 0,850 ( $p = 0,016$ ) nach Spearman-rho.

Hinweise für weitere möglicherweise bestehende Korrelationen finden sich bei den Primärtumoren zwischen MMP-2 und -7, sowie MMP-2 und -9. In beiden Fällen handelt es sich um positive Korrelationen mit Koeffizienten von 0,281 (Kendall-tau-b) und 0,299 (Spearman-rho), bzw. 0,252 (Kendall-tau-b) und 0,285 (Spearman-rho). Allerdings liegen die Werte für  $p$  in beiden Fällen knapp über 0,05 (MMP-2 und -7  $p = 0,058$  (Kendall-tau-b) bzw. 0,078 (Spearman-rho) sowie MMP-2 und -9  $p = 0,083$  (Kendall-tau-b) bzw. 0,089 (Spearman-rho)), weshalb diese Korrelationen innerhalb der hier betrachteten Datenmenge statistisch nicht signifikant sind und nur als Hinweise betrachtet werden können.

#### **4.1.2 Korrelationen zwischen MMPs und klinisch-pathologischen Faktoren**

Die Frage nach Zusammenhängen zwischen der Menge der exprimierten RNA und tumorspezifischen Faktoren wie Primärtumorgröße T, Lymphknotenstatus N und Fernmetastasenstatus M sowie histologischem Grading G und dem Alter des Patienten lässt sich wiederum mit Hilfe von Korrelationsberechnungen nach Kendall-tau-b und Spearman-rho beantworten. Statistisch signifikante Korrelationen finden sich zwischen dem Lymphknotenstatus und MMP-13, dem Fernmetastasenstatus und MMP-9, dem Fernmetastasenstatus und dem histologischen Grading des Tumors sowie dem Grading und MMP-13.

Die Korrelation zwischen dem Lymphknotenstatus und der Menge an exprimierter MMP-13-RNA ist negativ, d.h. mit zunehmender Ausbreitung von metastatisch befallenen Lymphknoten sinkt die Menge an MMP-13 ab. Nach Kendall-tau-b beträgt der Korrelationskoeffizient  $-0,404$  ( $p = 0,016$ ), nach Spearman-rho  $-0,448$  ( $p = 0,014$ ). Ebenfalls negativ ist die Korrelation zwischen der Menge an MMP-13-RNA und dem histologischen Grading G. Je undifferenzierter der Tumor ist (höheres G-Stadium), desto weniger MMP-13 wird auf RNA-Niveau exprimiert. Der Koeffizient dieser Korrelation liegt bei  $-0,291$  mit  $p = 0,049$  (Kendall-tau-b) bzw.  $-0,333$  mit  $p = 0,048$  (Spearman-rho). Die beiden anderen genannten Korrelationen sind positiver Natur. Mit ansteigendem M, also zunehmender systemischer Ausbreitung der Tumorerkrankung, nimmt die Menge an nachweisbarer MMP-9-RNA ebenfalls zu: Koeffizient 0,341 mit  $p = 0,025$  nach Kendall-tau-b und 0,377

mit  $p = 0,024$  nach Spearman-rho. Die letzte Korrelation – Grading G und Fernmetastasen M – tritt unabhängig von der Expression von MMP auf. Hier liegt Kendall-tau-b bei 0,361,  $p = 0,034$ , Spearman-rho bei 0,373,  $p = 0,033$ . Mit höherem Grad an histologischer Undifferenziertheit steigt also die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Fernmetastasen.

Eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Primärtumorgröße T und der RNA-Menge einer der untersuchten MMPs oder TIMPs ist nicht nachzuweisen. Ein Hinweis auf eine eventuell bestehende negative Korrelation findet sich zwar bei TIMP-1: Koeffizienten nach Kendall-tau-b  $-0,239$  bzw. nach Spearman-rho  $-0,263$ , aber mit  $p = 0,083$  bzw.  $0,084$  liegt die Signifikanz über dem statistisch relevanten Wert von 0,05 und ist damit auf die untersuchten Proben bezogen nicht signifikant. Die übrigen MMPs und TIMPs, wenn mit T korreliert, weisen Signifikanzen von  $p > 0,1$  auf und geben so in diesem Rahmen keinen Hinweis auf statistische Zusammenhänge in der Ausprägung dieser Parameter.

#### 4.1.3 Tendenzen in der Expression in Abhängigkeit von der Primärtumorgröße T

Eine andere Gewichtung der Ergebnisse gibt eine prozentuale Berechnung durchschnittlicher Signalintensitäten für MMPs in den verschiedenen Primärtumorgrößen T, wie in Tabelle 5 dargestellt.

durchschnittliche Signalstärke in %	T2	T3	T4
MMP-2	25	30	20
MMP-7	81,25	40	45
MMP-9	37,5	45	70
MMP-13	100	122,5	110
TIMP-1	125	97,5	95
TIMP-2	62,5	85	80
TIMP-3	50	40	42,5

Tabelle 5: Durchschnittliche Signalintensität  $S_d$  der MMPs und TIMPs bei verschiedenen Primärtumorgrößen

Bei dieser Betrachtung lassen sich grundsätzliche Tendenzen in den einzelnen Ergebnissen aufweisen. Die nur geringe Anzahl von Proben  $n$  in den so entstandenen Gruppen macht eine detaillierte statistische Berechnung nicht sinnvoll.

Wie aus Tabelle 5 ersichtlich, liegt die durchschnittliche Signalintensität von MMP-2-RNA in T2-Tumoren bei 25 % und in T3-Tumoren bei 30 %, ist also bei fortgeschrittenem T-Stadium stärker. In T4-Tumoren beträgt  $S_d$  allerdings nur 20 %. Insgesamt sind die für MMP-2 aufzeigbaren Signale auch bei Betrachtung der durchschnittlichen Intensität am schwächsten. Für MMP-7 ergibt sich das folgende Bild: Das Signal für diese RNA ist mit durchschnittlich 81,25 % in Tumoren im Stadium T2 am stärksten, während es in den höheren T-Stadien deutlich schwächer ist, und zwar 40 % in T3- und 45 % in T4-Tumoren. Dagegen nimmt die durchschnittliche Signalintensität  $S_d$  für MMP-9-RNA mit einer Zunahme des T-Stadiums ebenfalls zu. Im Stadium T2 beträgt  $S_d$  im Schnitt 37,5 %, in T3 45 % und in T4 70 %. Die Signalintensität für die RNA von MMP-13 ist die stärkste aller untersuchten MMPs. Im Stadium T2 beträgt sie 100 %, während sich in T3-Tumoren Durchschnittswerte von 122,5 % und in T4-Tumoren von 110 % nachweisen lassen. Abbildung 3 verdeutlicht diese Verteilungen noch einmal.

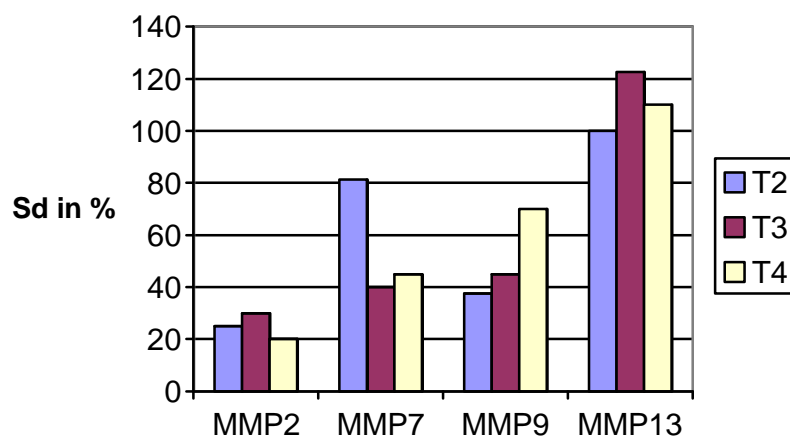


Abbildung 3: Durchschnittliche Signalintensitäten  $S_d$  der MMPs bei verschiedenen Primärtumorgrößen in Prozent

Die Signalintensitäten der untersuchten TIMPs verhalten sich wie folgt:  $S_d$  der TIMP-1-RNA nimmt mit zunehmendem Tumorstadium ab. In T2-Tumoren beträgt  $S_d$  im Schnitt 125 %, während es in T3-Tumoren auf 97,5 %, in T4-Tumoren dann auf 95 % absinkt.

Umgekehrt nimmt  $S_d$  für TIMP-2 zu: 62,5 % bei Tumoren im Stadium T2 steigt auf 85 % bei T3- und liegt bei 80 % bei T4-Tumoren. Das Signal der TIMP-3-RNA schließlich zeigt in T2-Tumoren eine durchschnittliche Intensität von 50 %, in T3-Tumoren von 40 % und in T4-Tumoren von 42,5 %. Eine konstante Auf- bzw. Abwärtsbewegung in den Werten für  $S_d$  lässt sich auch bei dieser Betrachtungsweise nur für MMP-9 bzw. TIMP-1 darstellen. Allerdings werden für die übrigen MMPs und TIMPs Trends erkennbar:  $S_d$  für MMP-2 und -13 sowie TIMP-2 nimmt mit Zunahme des T-Stadiums zu, während es für MMP-7 und TIMP-3 abnimmt (Abbildung 4).

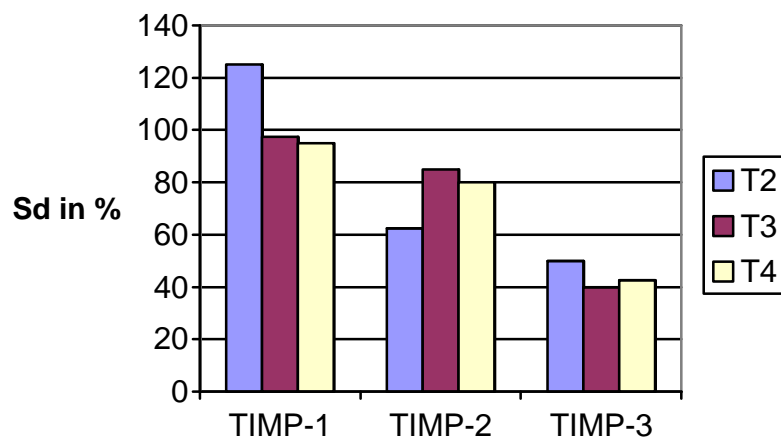


Abbildung 4: Durchschnittliche Signalintensitäten  $S_d$  der TIMPs bei verschiedenen Primärtumorgößen in Prozent

#### 4.1.4 Expression von MMPs in verschiedenen Tumorlokalisationen

Die Lokalisation des Primärtumors spielt in den vorliegenden Proben für das Expressionsverhalten von MMPs und TIMPs keine Rolle. Larynx-, Oro- und Hypopharynx-tumore unterscheiden sich im Hinblick auf die von ihnen exprimierte RNA nur unwesentlich voneinander. Die Verteilung der RNA entspricht in etwa der schon beschriebenen Weise: MMP-13 ist bei Tumoren aller drei Lokalisationen die am stärksten exprimierte Matrix-Metalloproteinase mit Mittelwerten über 100 %. MMP-9, -7 und -2 folgen mit geringen Variationen in absteigender Reihenfolge. Auffällig sind nur die Larynx-Primärtumore mit der außergewöhnlich starken Expression von MMP-7 (Mittelwert 75,0 %) im Vergleich zu

den anderen Lokalisationen (Mittelwerte 43,8 % bzw. 46,4 %). TIMP-1 (Mittelwerte um 100 %) bleibt der am ausgeprägtesten vorhandene Inhibitor, gefolgt von TIMP-2 und -3.

## 4.2 Expression von MMPs in Zelllinien

In den verschiedenen betrachteten Tumorzelllinien lassen sich ebenfalls alle untersuchten MMPs und TIMPs nachweisen. Am häufigsten wird MMP-13 (86% der Fälle) exprimiert; der Mittelwert liegt bei 64,29 % bzw. der Median bei 50,00 % (Standardabweichung 37,8), womit MMP-13 zugleich auch die MMP mit der stärksten Signalintensität ist. Am zweithäufigsten findet sich MMP-7 in 71 % der Zelllinien. Hier beträgt der Mittelwert 53,57 % bei einer Standardabweichung von 44,32, der Median 25,0 %. MMP-9 und MMP-2 sind in je 43 % der Proben nachzuweisen: MMP-9 mit einem Mittelwert von 17,86 % (Standardabweichung 18,9), MMP-2 mit einem Mittelwert von 10,71 % bei einer Standardabweichung von 13,36. MMP-2 ist somit die am geringsten exprimierte Matrix-Metalloproteinase in den untersuchten Zelllinien. TIMP-1 und -2 können in allen Zelllinien (= 100 %), TIMP-3 in 86 % nachgewiesen werden. Dabei beträgt der Mittelwert und der Median der TIMP-1-Expression 100 % (Standardabweichung 0). TIMP-2 wird im Mittel in einer Stärke von 85,71 % (Standardabweichung 24,4) und einem Median von 100 %, TIMP-3 mit einem Mittelwert von 35,71 % (Standardabweichung 19,7) und einem Median von 50,0 % exprimiert.

In der Keratinozytenlinie stellt sich MMP-9 als einzige MMP mit einer Signalstärke von 25 % dar; die übrigen MMPs -2, -7 und -13 können nicht nachgewiesen werden. Dagegen sind alle drei TIMPs vorhanden; die Signalstärke von TIMP-1 beträgt 100 %, die von TIMP-2 und -3 je 50 %.

Die folgende Tabelle 6 erlaubt einen Überblick über die RNA-Expression von MMP und TIMP in den betrachteten Tumorzelllinien (n = 7):

	positive Proben	Prozent	Mittelwert in Prozent	Standardabweich.	Median
MMP-2	3	43	10,71	13,36	0
MMP-7	5	71	53,57	44,32	25
MMP-9	3	43	17,86	18,90	25
MMP-13	6	86	64,29	37,80	50
TIMP-1	7	100	100	0	100
TIMP-2	7	100	85,71	24,40	100
TIMP-3	6	86	35,71	19,67	50

Tabelle 6: Statistische Darstellung der Signale von MMPs und TIMPs in Tumorzelllinien.

Abbildung 5 veranschaulicht noch einmal die in Tabelle 6 aufgeführten Ergebnisse zum Mittelwert der Signalintensitäten S in Prozent von MMPs und TIMPs in Tumorzelllinien.

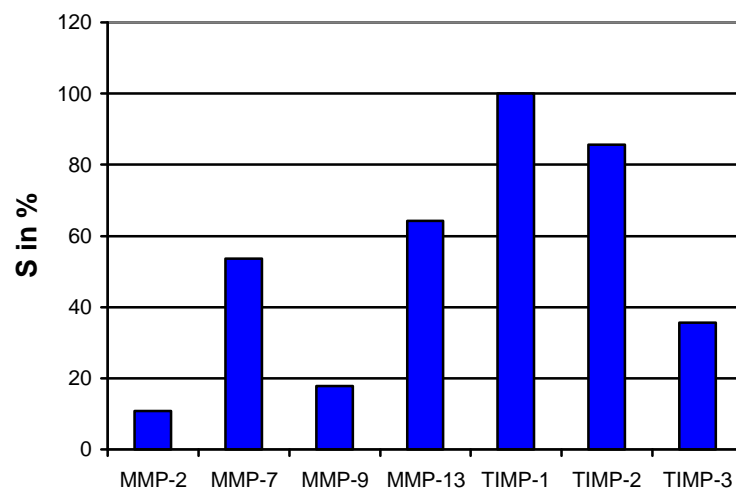


Abbildung 5: Mittelwerte der Signalintensitäten von MMPs und TIMPs in Tumorzelllinien

#### 4.2.1 Korrelationen zwischen MMPs und klinisch-pathologischen Parametern der betrachteten Zelllinien

Bestimmte Expressionsmuster im Sinne von Korrelationen zwischen einzelnen Parametern finden sich auch bei den betrachteten Zelllinien. So besteht zwischen dem Lymphknoten-



status des Ursprungsgewebes der Zelllinien und der Menge an exprimierter MMP-13-RNA eine negative Korrelation, d.h. mit ansteigendem Tumorbefall von Lymphknoten sinkt die Menge an MMP-13-RNA ab. Der Korrelationskoeffizient dieser statistisch signifikanten Korrelation beträgt nach Kendall-tau-b  $-0,653$  ( $p = 0,047$ ), nach Spearman-rho  $-0,683$  ( $p = 0,045$ ). Innerhalb der nachgewiesenen Mengen einzelner MMPs und TIMPs zeigt sich zwischen MMP-2 und TIMP-3 eine positive Korrelation: Der Korrelationskoeffizient liegt in diesem Fall nach Kendall-tau-b bei  $0,694$  mit einem Signifikanzniveau  $p$  bei  $0,038$ ; nach Spearman-rho liegt der Koeffizient bei  $0,725$  mit  $p$  bei  $0,033$ .

### **4.3 Gemeinsamkeiten der MMP-Expression zwischen Tumorgewebe und Zelllinien**

Anhand der zuvor dargestellten Ergebnisse lassen sich verschiedene Gemeinsamkeiten im MMP- und TIMP-Signalverhalten zwischen Tumorgewebe und Zelllinien feststellen:

- 1) Alle Proben, sowohl primäre Gewebe wie Linien, zeigen Signale für die untersuchten MMPs und TIMPs auf RNA-Ebene.
- 2) Die Signaltintensitäten der verschiedenen MMPs schwanken zwischen den einzelnen Proben.
- 3) MMP-13-RNA ist die am häufigsten darstellbare RNA einer Metalloproteinase. Zugleich wird sie auch mengenmäßig am stärksten dargestellt.
- 4) Die geringste Menge an nachweisbarer RNA zeigt sich bei MMP-2.
- 5) TIMPs sind in Zelllinien wie in Tumorgewebe weitverbreitet vorhanden. RNA von TIMP-1 und -2 kann in allen betrachteten Proben dargestellt werden, RNA von TIMP-3 in fast allen. Die Menge an TIMP-1-RNA ist jeweils größer als die von TIMP-2, die Menge an TIMP-3-RNA ist immer die geringste aller TIMPs.
- 6) Eine negative Korrelation zwischen der Signalstärke für MMP-13-RNA und dem Lymphknotenstatus N findet sich sowohl in primärem Tumorgewebe wie auch in Zelllinien.
- 7) Es können Zusammenhänge zwischen MMP- und TIMP-RNA und dem Tumorstadium T in der Gruppe der Primärtumoren festgestellt werden.

## **5. Diskussion**

### **5.1 Allgemeine Einführung**

#### **5.1.1 Pathophysiologische Grundlagen der Metastasierung**

Das Charakteristikum maligner Tumore liegt in ihrer Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung. Während sich benigne Tumore beim Wachstum auf das Gebiet ihres ursprünglichen Auftretens beschränken, können maligne Tumore sowohl in sie umgebende Gewebe eindringen als auch durch Streuung in entfernten Geweben die Bildung neuer Tochtergeschwülste verursachen. Dabei ist die Entwicklung von Metastasen für die Mehrzahl der durch eine maligne Erkrankung verursachten Todesfälle verantwortlich, entweder direkt durch Tumorbesiedelung lebenswichtiger Organe und Beeinträchtigung oder Zerstörung ihrer Funktionen, oder durch nicht beherrschbare Komplikationen in der Therapie von metastasierten Tumoren. Wie Kleiner et al. [50] aufzeigen, präsentieren sich allein in den USA ein Drittel aller Tumorpatienten mit bereits vorhandenen Metastasen. Von den übrigen entwickeln die Hälfte nach initial erfolgreicher Resektion des Primärtumors im weiteren Krankheitsverlauf Metastasen, die eine systemische Therapie erfordern, weil die chirurgische Entfernung nur von palliativem Nutzen ist. Diese Problematik unterstreicht die Bedeutung, die einzelnen Schritte der Metastasenentstehung zu verstehen, um so letztendlich wirkungsvoller gegen Entstehung, Ausbreitung und Wachstum maligner Erkrankungen therapieren zu können.

Liotta et al. [51] stellen dar, dass die erfolgreiche Bildung neuer Metastasen von vier gleichzeitig und kontinuierlich verlaufenden Schritten abhängig ist:

- 1) Invasion der epithelialen Tumorzellen in die umgebende Extrazellulärmatrix (EZM) nach erfolgter Lösung aus dem ursprünglichen Zellverband.
- 2) Einbruch durch eine Basalmembran in mikroskopisch kleine Blut- oder Lymphgefäße.
- 3) Überleben innerhalb des Blut- oder Lymphkreislaufs und Verlassen desselben an anderer Stelle, wiederum durch eine Basalmembran.
- 4) Tumorzellkolonisation und Angiogenese zur Entstehung einer neuen Metastase.

Tumorzellen müssen drei charakteristische, im Modell postulierte Fähigkeiten zur lokalen Invasion und systemischen Ausbreitung besitzen, wie Liotta et al. [52] darstellen: die Möglichkeit, Bestandteile der Extrazellulärmatrix zu degradieren, sich an Proteine der EZM anzuheften und wieder zu lösen, und sich durch kleine Defekte der Matrix hindurch zu bewegen. Das angiogenetische Potential von Tumorzellen ist ebenfalls wichtig für den Prozess der Metastasierung. Es ist allerdings keine Spezifität maligner Zellen, denn auch gutartige Neubildungen können das Wachstum neuer Gefäße induzieren, wie unter anderem das Auftreten von Angiomen zeigt.

Bei der Untersuchung von Tumorzellen im Hinblick auf die genannten Forderungen haben eine Vielzahl von Arbeitsgruppen die Bedeutung von MMPs und TIMPs hervorgehoben. Dabei spielen die proteolytischen Fähigkeiten der MMPs nicht nur bei der Modifikation der EZM eine entscheidende Rolle, sondern zeigen auch Effekte auf die Adhäsion und Beweglichkeit von Tumorzellen [53] sowie auf die Modulation Angiogenese-induzierender Substanzen wie VEGF [54].

### **5.1.2 Struktur und Funktion der Matrix-Metalloproteinasen**

Martisian et al. [22], Rooprai et al. [55] und andere haben gezeigt, dass allen Matrix-Metalloproteinasen fünf verschiedene Charakteristika gemeinsam sind:

- 1) Jede MMP hat zumindest einen Bestandteil der EZM zum spezifischen Substrat.
- 2) Sie sind aktiv bei physiologischem pH-Wert.
- 3) Das MMP-Molekül muss zur Funktionsfähigkeit zwei Zinkionen enthalten.
- 4) MMPs werden von Chelatbildnern sowie von TIMPs inhibiert.
- 5) Alle MMPs werden als inaktive Pro-Enzyme sezerniert und erfordern extrazellulär Aktivierung.

Auf Protein- und cDNA-Niveau betrachtet weisen MMPs ebenfalls einige strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten auf, die auf einer Reihe von konservierten DNA-Sequenzen beruhen. So enthalten alle zur Zeit bekannten MMPs als Pro-Enzyme mindestens drei konstante Domänen:

Erstens, als aktives Zentrum, eine hochkonservierte, katalytische Domäne mit der Fähigkeit zur Bindung von Zinkionen. Dabei handelt es sich um einen etwa 50 bis 55 Aminosäuren langen Proteinanteil, dessen drei Histidine mit drei Bindungsstellen einer aktivierten Zinkion-Komplexbindung interagieren [56].

Zweitens eine Cystein enthaltende Pro-Domäne am amino-terminalen Ende des Proteins, die zur Aktivierung des Enzyms abgespalten wird. Im latenten Stadium des Enzyms besetzt das Cystein dieser Prodomäne die vierte Bindungsstelle der Zinkion-Komplexbindung mit seiner Sulfhydrylgruppe [57]. Während der Aktivierung des Pro-Enzyms muss es an einem Punkt zu einer Destabilisierung und Lösung dieser Zink-Schwefel-Brücke kommen, worauf im Anschluss die Cystein-enthaltende Sequenz von dem nun aktivierten Enzym abgespalten wird.

Die dritte Gemeinsamkeit ist eine hydrophobe Pro-Domäne, die das Signal für die Sekretion des Pro-Enzyms darstellt. Auf dieser dreiteiligen Grundstruktur bauen alle MMPs auf. Die kleinste Matrix-Metalloproteinase, MMP-7 (Matrilysin), besteht nur aus diesen drei Grundbausteinen. Alle übrigen MMPs besitzen zudem noch eine C-terminale Domäne, die Ähnlichkeit mit dem Protein Hemopexin aufweist und über eine sogenannte „hinge region“ mit der katalytisch wirkenden Domäne verbunden ist. Sie enthält die Bindungsstelle für TIMP und ist darüber hinaus wahrscheinlich auch an der Bindung an Rezeptoren beteiligt. Als eigene Unterklasse weisen die MT-MMPs zusätzlich am C-terminalen Ende eine Transmembrandomäne zur Verankerung des Proteins an der Zelloberfläche auf. Die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 besitzen dagegen beide noch eine Gelatin-bindende Domäne innerhalb ihres aktiven Zentrums, MMP-9 außerdem eine Kollagen V-ähnliche Sequenz innerhalb der katalytischen Domäne.

### **5.1.3 Struktur und Funktion der Inhibitoren von Matrix-Metalloproteinasen**

Die vier Mitglieder der TIMP-Familie werden von vielen verschiedenen Zellen exprimiert und finden sich in den meisten Geweben und Körperflüssigkeiten in unterschiedlichem Maß [19]. Neben der gemeinsamen namensgebenden Fähigkeit zur MMP-Inhibition besitzen sie auch eine Reihe weiterer biologischer Funktionen. Während TIMP-1 und -2 in

gelöster Form auftreten, liegt TIMP-3 an die EZM gebunden vor [58]. Wie die MMPs, so teilen auch die TIMPs einige strukturelle Gemeinsamkeiten [59;60]. Zunächst besitzen sie alle 12 Cysteine in definierten, konservierten Regionen des Gesamtmoleküls, um so sechs Disulfidbrücken zu formen. Zweitens haben alle TIMPs am N-terminalen Ende des Proteins eine feststehende Sequenz, VIRAK, die zur MMP-Inhibition notwendig ist. Drittens wird bei allen TIMPs eine Leitsequenz aus 29 Aminosäuren abgespalten, um das fertige Enzym zu produzieren.

Von allen TIMPs ist TIMP-1 am längsten und daher am besten bekannt. Es ist innerhalb des Organismus weit verbreitet und wird von einer Vielzahl an Zellen synthetisiert. Wie Carmichael et al. [13] zeigen konnten, besteht das TIMP-Protein aus 148 Aminosäuren inklusiv der 12 Cysteine, die die bereits erwähnten Disulfidbrücken formen und das Protein in drei Knoten-ähnliche Strukturen unterteilen [61]. Die MMP-inhibitorische Region befindet sich nach Murphy et al. [62] am N-terminalen Ende, und strukturelle Analysen bestätigen, dass das C-terminale Ende des Moleküls für seine Funktion als Inhibitor nicht notwendig ist [63]. Allerdings hat sich gerade TIMP-1 in den letzten Jahren als multifunktionales Protein mit diversen biologischen Fähigkeiten herausgestellt. So nimmt es unter anderem Einfluss auf die Aktivität von Wachstumsfaktoren [64] und auf Veränderungen in der Morphologie von Zellen [65], stimuliert die Steroidsynthese in den Gonaden [66] und inhibiert die Angiogenese [67].

TIMP-2 ist etwas kleiner als TIMP-1, 21 kDa im Vergleich zu durchschnittlich 28,5 kDa, abhängig vom Glykosylierungsgrad von TIMP-1, und kann ebenfalls in verschiedenen Geweben gefunden werden. Die Aminosäuresequenz ist zu 40 % identisch mit der von TIMP-1 [68]. Es besitzt ebenfalls sechs Disulfidbrücken an denselben Stellen und hat ein N-terminales Ende, das für die Inhibition von MMPs verantwortlich ist. In den meisten Situationen hat TIMP-2 eine ähnliche Funktion wie TIMP-1. Wird jedoch die TIMP-2-Synthese moduliert, kann das Enzym einen zu TIMP-1 gegenteiligen Effekt aufweisen [69].

TIMP-3 ist ebenfalls 21 kDa groß und wie TIMP-2 unglycolysiert. Nach Pavloff et al. [70] teilt es 30 % seiner Aminosäuresequenz mit TIMP-1 und etwa 38 % mit TIMP-2. Im Gegensatz zu den ersten beiden ist es an Strukturen der EZM gebunden. Yang et al. [71] stel-

len dar, dass TIMP-3 die Ablösung von transformierten Zellen von der EZM fördert und morphologische Veränderungen, die mit Zell-Transformation einhergehen, beschleunigt. Außerdem wird es mit einer Blockade der G1-Phase des Zell-Zyklus` in der Differenzierung von HL-60 Leukämiezellen assoziiert [72].

#### **5.1.4 Regulation von MMPs**

Als potente Enzyme mit einem breiten physiologischen Spektrum an Substraten ist es notwendig, dass MMPs und TIMPs in ihrer Funktion streng reguliert werden, um einen überschießenden Abbau von EZM-Komponenten zu vermeiden. Eine Kontrolle von MMPs und TIMPs findet dabei auf mehreren Ebenen von Enzym-Synthese und -Aktivität statt.

##### **5.1.4.1 Regulation von Transkription und Translation**

Die Expression von MMPs und TIMPs auf RNA-Niveau wird von einer Reihe verschiedener Substanzen reguliert. Dabei ist die Aktivierung der Transkription so komplex, dass sie zur Zeit noch nicht vollständig aufgeklärt ist. So kann derselbe Faktor bei den einzelnen Mitgliedern der MMP-Familie unterschiedliche Gen-Expression bewirken; zudem ist die Art der Expression von der Art des jeweiligen Gewebes abhängig. Toth et al. [73] stellen dar, dass Phorbol-Ester eine Gruppe sehr wirkungsvoller Substanzen zur Transkriptions-Aktivierung sind. Zytokine wie Interleukin-1 $\alpha$ , -1 $\beta$  und -8, TGF-1 $\beta$  und TNF können ebenfalls die Expression von MMPs und TIMPs auf Genniveau induzieren [74]. Wasylyk et al. [75] weisen auf die Möglichkeit der Aktivierung von MMP-Expression durch Onkoproteine wie c-Ets hin. Als weitere Faktoren mit Expressions-stimulierendem Potential fungieren bFGF [76], EGF [77] und VEGF [78].

Zusätzlich zu den bereits genannten Faktoren spielen einzelne Bestandteile der EZM selber eine Rolle in der Regulation der MMP-Transkription. So legen Bafetti et al. [79] den Einfluss von Vitronectin, Haas et al. [80] den von Kollagen und Elastin auf die Expression einiger MMPs in Tumorzellen und Fibroblasten dar.

Zur Aufrechterhaltung des notwendigen Gleichgewichts zwischen MMPs und TIMPs wird die Expression letzterer ebenfalls eng kontrolliert. Dabei nehmen dieselben Faktoren, die MMPs regulieren, auch auf TIMPs Einfluss. Overall [81] zeigt, dass Phorbol-Ester und Interleukin-1 $\beta$  die Transkription von TIMP-1 in gleichem Maße wie die von MMPs stimulieren. Tumorstromungsfaktor TGF-1 $\beta$  und Retinoide stimulieren ebenfalls die TIMP-1-Produktion, während sie die Expression von MMPs reduzieren [82]. Als weitere TIMP-1-Stimulantien können Ganser et al. [83] EGF und Lotz et al. [84] Interleukin-6 identifizieren. Die Arbeitsgruppe um Ito et al. [85] weist nach, dass der Effekt von TNF auf die TIMP-1 Produktion von der Menge an TNF abhängig ist: bei niedriger TNF-Konzentration wird die Produktion von TIMP-1 gefördert, bei steigender Konzentration kommt es zu einer Dosis-abhängigen Hemmung. Zu den weiteren Faktoren, die die Expression von TIMPs beeinflussen können, zählen unter anderem Dexamethason [69] und verschiedene Hormone wie Progesteron, Estradiol [86] und LH [87].

#### **5.1.4.2 Aktivierung latenter MMPs**

Wie eingangs schon beschrieben, werden MMPs mit Ausnahme der membrangebundenen MT-MMPs als latente Pro-Enzyme sezerniert. Ihre Aktivierung stellt eine weitere wichtige Ebene in der Kontrolle der MMPs dar. Die Inaktivität der Pro-Enzyme wird dabei durch die Interaktion zwischen einem Cystein in der Pro-Region und dem Zinkion im aktiven Zentrum gewährleistet, weil diese Bindung das aktive Zentrum blockiert. Spaltung der Bindung durch Abtrennung der Pro-Region führt folglich zur Aktivierung des Enzyms. Ein wichtiger MMP-Aktivator ist Trypsin 2, das sowohl freie Pro-Enzyme als auch Pro-Enzym-TIMP-1-Komplexe spalten kann [88]. Des Weiteren können die Kathepsine G, B und L, PMN Elastase und Hypochlorsäure [89] sowie Komponenten des Plasmin/ Plasminogen-Systems [90] MMPs aktivieren. Zahlreiche Untersuchungen wie die von Sang et al. [91] und Crabbe et al. [92] haben gezeigt, dass die einzelnen MMPs zur gegenseitigen Aktivierung fähig sind. MMP-3 und -7 können MMP-2 und -9, die beiden letztgenannten sich auch gegenseitig aktivieren. Pro-MMP-2 wird außerdem von MT-MMPs aktiviert. Insgesamt scheint die Aktivierung von MMP-2 einer engeren Regulation zu unterliegen als die der übrigen MMPs.

### **5.1.4.3 Inhibition aktiver MMPs**

Die dritte Ebene in der Regulation der MMPs erfolgt durch die Blockade der enzymatischen Aktivität. Neben TIMPs können andere Moleküle wie  $\alpha$ 2-Makroglobulin MMPs hemmen. Allerdings kann  $\alpha$ 2-Makroglobulin aufgrund seiner Größe von 780 kDa das Gefäßlumen nicht verlassen und nicht in Gewebespalten eindringen. Die sehr viel kleineren TIMPs finden sich dagegen weit verbreitet in Geweben und Sekreten. Sie blockieren MMPs durch Ausbildung eines nicht-kovalenten Komplexes hoher Affinität im Verhältnis 1 : 1. Dabei besetzt TIMP mit seinem N-terminalen Ende die vierte und letzte freie Bindungsstelle der Zinkion-Komplexbindung im aktiven Zentrum des MMPs. Darüber hinaus können TIMP-1 und -2 auch die Pro-Formen von MMP-2 und -9 an einer zweiten Stelle des Proteins binden. Die Blockade durch TIMPs ist besonders wichtig zur Aufrechterhaltung eines Gleichgewichts zwischen EZM-Synthese und -Degradation durch MMPs.

### **5.1.5 Beitrag von MMPs zur Progression maligner Tumore**

#### **5.1.5.1 Degradation der Extrazellulärmatrix**

Alle Mitglieder der MMP-Familie können als Proteinasen Komponenten der Extrazellulärmatrix abbauen und so physikalische Barrieren für die Ausbreitung maligner Prozesse beseitigen. Allerdings ist die EZM keine starre Einheit, die mit Hilfe ihrer Proteine eine Art Raumteiler-Funktion inne hat, sondern eine dynamische Matrix, die in ständigem Umbau begriffen ist. Die Strukturproteine, Wachstumsfaktoren und latenten Enzyme der Matrix beeinflussen die Zellen, die sie umgibt, sowie die Interaktion der Zellen untereinander. Unter physiologischen Bedingungen tragen MMPs durch den Abbau unerwünschter Proteine zur Aufrechterhaltung und Funktionstüchtigkeit der EZM bei. Zerstörung der EZM durch Degradation ihrer Strukturproteine ist ein entscheidender Schritt zur Invasion und Metastasierung. Von besonderer Bedeutung ist die Fähigkeit einiger MMPs, Basalmembranen mit ihrem Kollagen IV abzubauen, wie Liotta et al. [42] darstellen. Damit ist die Voraussetzung zur erfolgreichen Metastasierung durch Intra- und Extravasation geschaffen.



### **5.1.5.2 MMPs und Angiogenese**

In normaler physiologischer Umgebung ist Angiogenese sehr eng kontrolliert und findet sich nur in wenigen Situationen wie Wundheilung oder Embryogenese. Für das Wachstum maligner Tumore und die Ausbildung von Metastasen ist die Neubildung von Gefäßen allerdings unabhkmmlich. Folkman [93] zeigt schon 1971 auf, dass Tumore ohne eigene Blutversorgung nicht größer als 1 – 2 mm<sup>3</sup> werden und die Ausbildung eigener Gefäße für das Wachstum von Metastasen notwendig ist. Angiogenese ist ein komplizierter, mehrstufiger Prozess, der Freisetzung angiogenetischer Faktoren, Abbau von Gefäß-Basalmembranen, Migration und Proliferation endothelialer Zellen, sowie die Formation und Differenzierung von Mikrogefäßen umfasst. Tumore mit einem höheren Anteil angiogenetischer Zellen haben daher ein größeres metastatisches Potential und sind insgesamt aggressiver [94]. Die Rolle von MMPs beschränkt sich dabei nicht auf die vielfältigen EZM-Umbauprozesse, die zur Gefäßneubildung notwendig sind. Sie nehmen auch Einfluss auf beteiligte angiogenetische Faktoren wie VEGF und Thrombospondin-1 [54].

## **5.2 Kritische Betrachtung der verwendeten Methoden**

Die verwendeten Gewebeproben stammen alle von Patienten, die wegen ihrer malignen Erkrankung in der Hals-, Nasen- und Ohrenklinik operativ behandelt wurden. Bei der Auswahl der Patienten wurde auf eine möglichst große Breite in den biologischen Parametern geachtet. So umfasst die Auswahl Proben von Patienten mit unterschiedlichen Tumorstadien und Tumorlokalisationen innerhalb des oberen Aerodigestivtraktes, sowie mit verschiedenen histologischen Malignitätsgraden. Die Bedingungen für die Gewinnung der Gewebeproben können innerhalb der betrachteten Auswahl als gleich angesehen werden: operative Resektion des Gewebes, dann zügiges Schockfrieren bei –80°C innerhalb von 30 min nach Entnahme und die weitere Lagerung ebenfalls bei –80°C waren die Grundvoraussetzung für die mögliche Verwendung der Probe.

Durch die photometrische Bestimmung der Konzentration an gewonnener RNA und Berechnung der unterschiedlichen Volumina an einzusetzendem RNA-Eluat wurden konstan-

te Ausgangsbedingungen für die nachfolgende RT-PCR garantiert: Die Verwendung von genau 1 µg RNA.

RT-PCR ist die Standardmethode zum Nachweis vorhandener RNA. Die Spezifität der eingesetzten Primer bedingt eine korrekte Transkription und nachfolgende Synthese nur der gesuchten DNA. Eine willkürliche Synthese aller im eingesetzten Eluat vorhandener RNA ist ausgeschlossen. Zudem ist die RT-PCR durch die exponentielle Vermehrung vorhandener RNA eine sehr sensitive Methode zum Aufspüren auch kleinster Mengen an RNA.

Mit der Untersuchung von Tumorgewebe auf vorhandene MMP-RNA wird die erste Stufe der MMP-Regulation, die Genregulation, betrachtet. RT-PCR kann keine Auskunft darüber geben, ob die Transkription der MMP-Gene in gleichem Maße zu einer Translation und damit zur Synthese der Enzyme selber führt. Auch kann nichts über die folgenden Ebenen der MMP-Regulation ausgesagt werden: die Frage, inwieweit latente Pro-MMPs aktiviert und aktivierte Enzyme durch TIMPs gehemmt werden, muss bei einer Betrachtung auf RNA-Niveau unbeantwortet bleiben. Im Gegensatz zu histologischen Untersuchungen kann die RT-PCR auch nichts über die Verteilung der RNA-Expression innerhalb des Tumorzellverbandes aussagen. Sie kann nur Informationen über die insgesamt transkribierte RNA in der Gesamtmenge aller betrachteten Tumorzellen liefern.

Eine semiquantitative, auf eine Konstante bezogene Auswertung gibt keine Auskunft über exakt vorhandene Mengen, sondern über das grundsätzliche Expressionsverhalten und eventuelle Muster. Die Frage nach absoluten Mengen ist in dieser Hinsicht zweitrangig, weil ihre Beantwortung keine entscheidend neuen Informationen zum Sachverhalt liefert.

Im ganzen betrachtet handelt es sich bei dieser Versuchsreihe um eine orientierende Untersuchung, die die Beantwortung grundlegender Fragestellungen zum Ziel hat. Eine Verallgemeinerung der Ergebnisse ist wegen der relativ kleinen Fallzahl nur mit Einschränkungen möglich. Weitere Untersuchungen mit größeren Fallzahlen und ergänzenden Methoden sind deshalb vonnöten.

## **5.3 Expression von MMPs und TIMPs in Tumorgeweben**

### **5.3.1 Expression von MMP-2 und MMP-9 unter Berücksichtigung ihrer biologischen Eigenschaften**

Die Expression von MMP-2 und -9 ist für Karzinome der oberen Luft- und Speisewege sowie für Tumore anderer Lokalisationen bisher am intensivsten untersucht. Auch Gelatinase A und B genannt, können sie neben Gelatin und Laminin V die Kollagen-Typen I, IV, V und X abbauen, eine Eigenschaft, derentwegen ihnen eine besondere Rolle in der Tumorphorprogression zukommt.

Aufgrund der engen Verwandtschaft von MMP-2 und -9 betrachten viele Arbeitsgruppen diese beide MMPs gleichzeitig in ihren Arbeiten. Ein Nachweis von MMP-2 und -9, entweder auf RNA- oder auf Enzym-Niveau, wird in der Mehrheit der Untersuchungen dann aber im Einzelnen unterschieden. Korrelationen mit verschiedenen klinischen Parametern oder Überlebensraten werden aufgezeigt. Die Ergebnisse und die gezogenen Schlussfolgerungen sind bei weitem nicht einheitlich, zudem sind Studien auf RNA-Ebene relativ selten. Die Mehrheit der Untersuchungen bedient sich immunhistochemischer Verfahren und anderer Proteinnachweise. Im Hinblick auf die verschiedenen Stufen der MMP-Aktivierung und -Regulation sind diese Ergebnisse im Vergleich mit den hier dargestellten mit Einschränkungen zu sehen.

In der vorliegenden Untersuchung kann RNA für MMP-2 in 75 % der Primärtumore und 50 % der Metastasen nachgewiesen werden. Die Expression hängt dabei nicht von der Expression eines anderen MMPs ab und lässt sich auch nicht statistisch signifikant mit klinischen Parametern wie Lymphknoten- oder Metastasenstatus oder dem histologischen Differenzierungsgrad korrelieren. Allerdings können Tendenzen für einen Zusammenhang zwischen der Menge an MMP-2-RNA und Tumorstadium T sowie der Menge an RNA für die MMPs -7 und -9 dargestellt werden. Dabei scheint die Menge an exprimiertem MMP-2 mit stärker invasiven Tumoren (höheres T-Stadium) zuzunehmen, während es keinen Hinweis für einen Zusammenhang mit der Metastasierungsbereitschaft eines Tumors gibt.

MMP-9-RNA wird in 75 % der Primärtumore und 83 % der Metastasen nachgewiesen. Neben dem tendenziellen Zusammenhang zwischen der Menge an MMP-2 und -9 lässt

sich für MMP-9 auch ein Zusammenhang für die Menge an MMP-9-RNA und dem Tumorstadium T feststellen: höhere Tumorstadien exprimieren größere Mengen an MMP-9-RNA. Eine statistische Korrelation besteht zudem zwischen dem Fernmetastasenstatus M und der Menge an MMP-9 – bei vorhandenen Fernmetastasen ist mehr MMP-9-RNA nachweisbar. Eine stärkere MMP-9-Expression ist also mit einem höheren Invasions- und Metastasierungspotential vergesellschaftet.

Ähnliche Ergebnisse zeigen auch andere Untersuchungen von MMP-2- und -9-RNA auf. Magary et al. [95] können in Primärtumoren erhöhte Expressionswerte für MMP-2- und MMP-9-RNA darstellen: MMP-9 in 57 %, MMP-2 aber nur in 37% der Proben. Die Gesamtzahl von acht Proben lässt allerdings kaum Schlussfolgerungen aus diesen prozentualen Werten zu. Ebenfalls auf RNA-Ebene untersuchten Miyajima et al. [96] 27 Tumorproben aus dem Hypopharynx auf MMP-2 und -9 und können RNA für beide MMPs in allen Fällen nachweisen. Zudem weisen sie auf einen Zusammenhang zwischen höheren MMP-2-Spiegeln und einem höheren Invasions- und Metastasierungspotential sowie einem schlechteren Überleben hin. Für MMP-9 scheint danach aber kein solcher Zusammenhang zu bestehen. Dennoch wird die Analyse von MMPs von der Arbeitsgruppe als insgesamt nützlich für die Therapieplanung und Prognose von Karzinomen des Hypopharynx betrachtet. Pacheco et al. [97] berichten über RNA von MMP-9, die in den betrachteten 38 Plattenepithelkarzinomen der Statistik nach in größeren Mengen vorkommt als in gutartigen Geweben der Umgebung der Tumore. Höhere Mengen an MMP-9-RNA sind dabei mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für ein Tumorrezidiv im Halsbereich assoziiert.

Die weitaus größere Anzahl an Untersuchungen betrachtet dagegen das Vorkommen von MMP-Enzymen, also ihre Expression in Proteinform. Heissenberg et al. [46] werten das Auftreten von MMP-9 in Proben aus 39 Hypopharynx-Tumoren als prognostischen Indikator für die Aggressivität eines jeweiligen Tumors sowie für ein erhöhtes Rezidivrisiko. Wichtig ist dabei das gleichzeitige Fehlen einer TIMP-1-Expression, worauf im Folgenden noch eingegangen werden soll. Ohashi et al. [30] zeigen gesteigerte Expression und Aktivität von MMP-9 in Ösophagustumoren und stellen einen positiven Zusammenhang mit der Invasionstiefe der betrachteten Tumore her. Auf der anderen Seite können Riedel et al. [98] keine Korrelation zwischen MMP-9-Mengen und klinisch-pathologischen Charakteristika wie Lokalisation, T- oder N-Stadium oder Grad der histologischen Differenzierung

ihrer 52 Gewebeproben aus Plattenepithelkarzinomen der oberen Luft- und Speisewege nachweisen. Allerdings stellen sie, wie Heissenberg et al. [46], eine Gemeinsamkeit zwischen MMP-9-Mengen und der Wahrscheinlichkeit für eine schlechtere Prognose fest: Höhere MMP-9-Spiegel korrelieren laut Riedel et al. [98] mit einer insgesamt schlechteren Überlebensrate der betroffenen Patienten, während Heissenberg et al. [46] sie mit einer höheren Rezidivrate korrelieren.

Arbeitsgruppen, die isoliert MMP-2 untersuchen, berichten teilweise übereinstimmende Ergebnisse. So schreiben Shima et al. [99] schon 1992 über MMP-2 in Ösophaguskarzinomen und können das Enzym in etwa der Hälfte aller Proben nachweisen. Vor allem korreliert das Auftreten von MMP-2 mit einer Bandbreite an Parametern, so mit dem histologischen Grad, dem Invasionsgrad des jeweiligen Tumors und dem Lymphknotenstatus. Die gezogene Schlussfolgerung besteht nicht nur darin, dass MMP-2 eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung inne hat, sondern auch in dem Hinweis auf das mögliche Potential von MMP-2-Spiegeln zur Evaluation von individuellen Malignitätsgraden. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen Kusakawa et al. [100] in ihrer Untersuchung von 46 Proben von Patienten mit Karzinomen der Mundhöhle: Primärtumore mit vorhandenen Lymphknotenmetastasen exprimieren MMP-2 deutlich stärker als Tumore ohne Metastasen in Lymphknoten. Die Analyse von MMP-2-Spiegeln wird deshalb als Möglichkeit zur Einschätzung des jeweiligen malignen Potentials einzelner Plattenepithelkarzinome angesehen. Kawata et al. [101] und Kawamata et al. [102] weisen ebenfalls eine signifikant erhöhte MMP-2-Produktion in Primärtumoren mit Metastasen in Lymphknoten, verglichen mit Tumoren ohne Lymphknotenmetastasen, nach. Unabhängig ist nach Kawata et al. [101] die Menge an MMP-2 dagegen von der Größe des Primarius selber. Beide Arbeitsgruppen sehen aufgrund dieser Ergebnisse in MMP-2-Spiegeln eine Möglichkeit zur näheren Charakterisierung einzelner Tumore bezüglich ihrer Bereitschaft zu Invasion und Metastasierung.

In vielen Arbeiten wird für das Auftreten von MMP-2 und -9 zu evaluieren versucht, welche Unterschiede im Expressionsverhalten der beiden Enzyme bestehen. Die Aussagen verschiedener Arbeiten sind nicht einheitlich und teilweise kontrovers. Charous et al. [103] stellen eine fast homogene Expression von MMP-2 in Tumorgewebe fest, während MMP-9 eine deutlich stärkere Variabilität aufweist. Ebenso wenig können sie Unterschiede in exprimierten MMP-2- und -9-Mengen zwischen Primarius und Metastasen zeigen. Eben-

falls ein stärkeres Gewicht auf MMP-2 legen Xu et al. [104], die MMP-2 eine insgesamt wichtigere Rolle für Tumorinvasion und Metastasierung zuschreiben als MMP-9. Sie zeigen, dass die MMP-2-Expression in fortgeschrittenen T-Stadien gesteigert ist, ebenso wie bei vorhandenen Metastasen. Eine solch deutliche Korrelation liegt laut Xu et al. [104] für MMP-9 nicht vor, deshalb schließen die Autoren, dass MMP-2 die größere Bedeutung habe. Ikebe et al. [105] weisen auch erhöhte MMP-2-Spiegel in stärker invasiven Tumoren nach, schreiben aber MMP-9 denselben Zusammenhang zu. Wie Riedel et al. [98] finden auch Ikebe et al. [105] keine Korrelation von MMP-2- oder -9-Spiegeln mit dem Metastasierungsstatus eines Tumors, stehen damit aber im Widerspruch zu Kawata et al. [101], Kawamata et al. [102] und Kusakawa et al. [100]. Wie Heissenberg und Kollegen [46] folgern allerdings auch Ikebe et al. [105], dass hohe MMP-Spiegel bei niedrigen TIMP-Spiegeln mit einer stärkeren Bereitschaft zur Metastasierung einhergehen und somit unter Umständen Markerfunktionen einnehmen können. Eine Korrelation zwischen erhöhten MMP-2- und -9-Expressionen und einer stärkeren Tumorinvasion stellen auch Kurahara et al. [106] in ihrer Untersuchung an 96 Proben aus Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle dar. Sie kommen im weiteren zu dem Ergebnis, dass höhere MMP-2- und -9-Spiegel statistisch signifikant mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen korrelieren. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den von Ikebe et al. [105] und Riedel et al. [98] publizierten Resultaten. Ergebnisse ähnlich denen von Kurahara et al. [106] präsentieren Dünne et al. [107] mit Korrelationen zwischen den Expressionen von MMP-2 und -9, dem T-Stadium und dem Lymphknotenstatus. Die Arbeitsgruppe um Hong et al. [108] wiederum kommt im Hinblick auf eine nicht nachweisbare Korrelation zwischen MMP-2-Menge und Metastasierungsstatus zu demselben Ergebnis wie die beiden zuvor genannten Autoren. Gleichzeitig zeigt die Untersuchung an 44 Proben aus Plattenepithelkarzinomen der oberen Luft- und Speisewege, dass die MMP-9-Expression signifikant mit vorhandener Metastasierung korreliert. Dies steht im Gegensatz zu dem Ergebnis von Ikebe et al. [105].

Vor dem genannten Hintergrund ist eine abschließende Beurteilung hinsichtlich prognostischer Relevanz und Expressionsverhalten momentan noch nicht möglich. Die in der vorliegenden Untersuchung beschriebene Tendenz einer stärkeren Expression von MMP-9 bei höheren T-Stadien wird in anderen publizierten Untersuchungen, zum Teil sogar statistisch signifikant, bestätigt. Ein nur schwach positiver Zusammenhang zwischen MMP-2-Spiegeln und T-Stadium wurde in der Literatur so explizit noch nicht beschrieben. Unter

Berücksichtigung der biologischen Funktion von MMP-2 und des bereits diskutierten Beitrags dieses MMPs im Ausbreitungsprozess eines malignen Tumors ist dieses Ergebnis sicherlich überraschend. Es bleibt daher die Frage, ob es eine weitere Facette in der Breite der möglichen Expressionsweisen von MMP-2 darstellt, oder ob es sich um ein singuläres, eventuell versuchsintern bedingtes Ergebnis handelt. Sicher handelt es sich aber nicht allein um ein durch die Fallzahl bedingtes Resultat, denn auch Gruppen mit ähnlich großen Fallzahlen, so Kurahara et al. [106] mit 38 und Shima et al. [99] mit 29 Proben, kommen zu anderen Ergebnissen. Sicherlich ist aber in einer kleineren Fallzahl der Ausreißeffekt durch einzelne abweichende Ergebnisse größer.

Die im Rahmen dieser Dissertationsarbeit gefundene positive Korrelation von MMP-9 und dem Metastasierungsstatus findet sich dagegen recht klar auch bei anderen Autoren, so bei Hong et al. [108] oder Xu et al. [104]. Die eindeutige Tendenz zu höheren MMP-9-Spiegeln in fortgeschrittenen Tumoren und die signifikante Korrelation mit dem Vorhandensein von Metastasen lassen, ähnlich wie Hong et al. [108] beschreiben, die Schlussfolgerung zu, dass MMP-9 in der Ausbreitung von Plattenepithelkarzinomen der oberen Luft- und Speisewege eine wichtigere Rolle spielt als MMP-2.

### **5.3.2 Expression von MMP-13**

MMP-13 ist eine Kollagenase, deren Substrate die Kollagentypen I, II, III, VII und X umfasst. Sie kann damit viele häufige Bestandteile der EZM im Stroma des Gewebes in der Umgebung eines malignen Prozesses abbauen und so zu seiner lokalen Ausdehnung beitragen. Die Fähigkeit zum Abbau von Kollagen IV, einem entscheidenden Bestandteil von Basalmembranen, fehlt MMP-13 allerdings. MMP-13 kann somit nicht zu einer Degradation von Basalmembranen im Metastasierungsprozess beitragen.

RNA für MMP-13 kann in den vorliegenden Untersuchungen sowohl in Primärtumoren als auch in Metastasen in fast allen Proben nachgewiesen werden. Tendenziell nimmt die Menge an MMP-13 mit höherem T-Stadium, also stärkerer Invasion, zu. Zudem besteht eine negative Korrelation mit dem Lymphknotenstatus N: Sind Lymphknoten von Tumorgewebe befallen, sinkt die Menge an MMP-13-RNA statistisch signifikant ab.

Johansson et al. [109] weisen ebenfalls eine weite Verbreitung von MMP-13-RNA in ihren Proben nach: 15 von 17 Tumorgeweben sind positiv für MMP-13-RNA, während sich in benignen Proben keine MMP-13-RNA nachweisen lässt. Zu demselben Ergebnis kommen Gottschlich et al. [110] in ihrer Untersuchung von 36 Tumorbiopsaten mit Hilfe von RT-PCR: MMP-13-RNA ist in 83,3 % nachweisbar. Benignes Gewebe des Oropharynx zeigt dagegen keine MMP-13-RNA. Eine Korrelation zwischen MMP-13-Spiegeln und dem Lymphknotenstatus kann nicht nachgewiesen werden. Deshalb sehen Gottschlich et al. [110] die Menge an exprimierter MMP-13 auch nicht als prognostischen Marker für die Bereitschaft individueller Tumoren zur Metastasierung. Die Arbeitsgruppe um Cazorla et al. [111] beschreibt ebenfalls MMP-13-RNA in Tumorgeweben des Larynx, allerdings mit 57 % positiver Fälle in einem etwas geringeren Ausmaß. Wie bei den Ergebnissen anderer Gruppen kann auch hier kein MMP-13 in gutartigen Proben dargestellt werden. Zudem berichten Cazorla et al. [111] über eine signifikante Korrelation der Expression mit der lokalen Invasion eines Tumors und der Expression von MMP-2. Sie kommen so zu dem Ergebnis, dass die Menge an MMP-13-RNA mit höherem T-Stadium zunimmt. Desweiteren korrelieren sie den Grad der histologischen Differenzierung eines Tumors mit der Menge an exprimiertem MMP-13 und stellen höhere MMP-13-Spiegel in besser differenzierten Tumoren, d.h. solchen mit kleinerem G-Stadium, dar. Die Arbeitsgruppe folgert aus ihren Ergebnissen, dass MMP-13 in signifikanter Weise zur Progression von Plattenepithelkarzinomen des Larynx beizutragen scheint.

Ähnliche Ergebnisse zeigen sich in der hier diskutierten Untersuchung: Wie bei Johansson et al. [109] oder Gottschlich et al. [110] kann auch hier MMP-13 in der großen Mehrheit der betrachteten Proben nachgewiesen werden. In höheren T-Stadien wird tendenziell mehr MMP-13 exprimiert, wie Cazorla et al. [111] ebenfalls aufzeigen. Widersprüchlich ist allerdings das Ergebnis einer Korrelation zwischen MMP-13-Mengen und dem Auftreten von Metastasen der Lymphknoten: während die vorliegende Untersuchung eine negative Korrelation nachweist, verneinen Gottschlich et al. [110] jegliche Korrelation zwischen MMP-13 und N. Andere Gruppen betrachten diesen fraglichen Zusammenhang gar nicht. Wie in der Arbeit von Cazorla et al. [111] findet sich auch in der vorliegenden Dissertation eine größere Menge an MMP-13-RNA in Tumorproben kleinerer G-Stadien, also besser differenzierten Tumoren. Sie nimmt mit zunehmender Entdifferenzierung (höhere G-Stadien) ab.



Mit Blick auf diese Ergebnisse ist festzustellen, dass MMP-13 in malignen Tumoren des oberen Aerodigestivtraktes eine wichtige Rolle spielt. Dafür spricht sowohl das weitverbreitete Vorkommen als auch die Tatsache, dass die RNA mit Ausbreitung des Tumorprozesses in stärkerem Maße exprimiert wird. Die Abnahme von MMP-13-RNA in stärker undifferenzierten Tumoren lässt den Schluss zu, dass die Information zur Synthese von MMP-13 eine Eigenschaft des benignen Ursprungsgewebes ist, die mit zunehmender Entdifferenzierung verloren zu gehen scheint. Ob es sich dabei allerdings um einen funktionellen oder substantiellen Verlust dieser Information handelt, ist nicht zu sagen. Die negative Korrelation mit N und der tendenzielle Zusammenhang zwischen höheren MMP-13-RNA-Mengen und fortgeschrittener lokaler Invasion lässt MMP-13 hiernach als einen möglichen zukünftigen Marker für die Ausbreitung einer Tumorerkrankung erscheinen, dem unter Umständen sogar prognostische Qualitäten zukommen könnten. Diese Schlussfolgerungen liegen insgesamt im Einklang mit vorherigen Arbeiten. Der auffälligste Widerspruch liegt in der Bewertung von MMP-13-Spiegeln und ihrer möglichen Korrelation zu N und damit letztendlich in ihren prognostischen Möglichkeiten. Da die bisher erbrachten Ergebnisse eben nicht einheitlich in diese Richtung zeigen und sich zum Teil sogar widersprechen, sind weitere Studien in dieser Hinsicht notwendig, um einen eventuellen prognostischen Wert von MMP-13-RNA-Mengen in Karzinomen der oberen Luft- und Speisewege zu evaluieren.

### **5.3.3 Expression von MMP-7 mit Blick auf charakteristische Fähigkeiten**

MMP-7, Matrilysin, wird der Gruppe der Stromelysin-ähnlichen MMPs zugerechnet. Zu seinen Substraten zählen Gelatine und Fibronectin sowie Pro-MMP-1. MMP-7 ist somit, wie zwei weitere Stromelysine (MMP-3 und -10), ein Teil des Kontroll- und Aktivierungsmechanismus für MMP-1, eine interstitielle Kollagenase. Es trägt sowohl direkt als auch indirekt zum Abbau von EZM-Bestandteilen bei, kann aber wie MMP-13 ebenfalls kein Kollagen IV zerstören und also nicht zur Überwindung von Basalmembranen, einem entscheidenden Schritt zur Metastasierung, beitragen.

In der hier diskutierten Untersuchung lässt sich MMP-7-RNA in der Mehrheit (67 %) der Primärtumoren nachweisen. Interessanterweise exprimiert keine der untersuchten Metastasen MMP-7-RNA. Korrelationen mit Tumorstadium, Lymphknoten- oder Metastasenstatus

oder dem Grad der histologischen Differenzierung liegen nicht vor. Es besteht aber die Tendenz zur Abnahme der MMP-7-Menge in höheren Tumorstadien, weiter fortgeschrittene Tumoren produzieren also insgesamt weniger MMP-7 als lokal begrenzte.

MMP-7 ist bisher relativ wenig erforscht. Huachuan et al. [112] beschreiben MMP-7 im Magenkarzinom und weisen eine größere Expression im Tumorgewebe nach, verglichen mit benignen Proben aus angrenzenden Regionen. Dabei korreliert die MMP-7-Expression positiv mit Tumorgröße, Invasionstiefe, Metastasenstatus und TNM-Stadium, während kein Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad oder dem Wachstumsmuster des jeweiligen Karzinoms besteht. Huachuan et al. [112] folgern, dass eine gesteigerte Expression von MMP-7 eine wichtige Rolle in der Entstehung des Magenkarzinoms spielt und eventuell als biologischer Marker für seine Verhaltensweise fungieren kann. Diese Ergebnisse sind allerdings wegen der Verschiedenheit der betrachteten Tumore nicht direkt mit der vorliegenden Untersuchung zu vergleichen. Zumal betrachten Huachuan et al. [112] MMP-7 auf Proteinniveau, so dass ihre Ergebnisse nicht direkt auf die RNA-Expression der vorliegenden Dissertationsergebnisse übertragbar sind. Yamamoto et al. [113] beschreiben MMP-7 in Ösophaguskarzinomen auf Proteinniveau und weisen MMP-7 in 49 % der Fälle nach. Das Auftreten von MMP-7 korreliert dabei mit Tumortiefe, fortgeschrittenen Tumorstadien und Rezidivrate im ersten Jahr nach der Operation, weshalb ihm ein prädiktiver Wert für das krankheitsfreie und allgemeine Überleben zugesprochen wird. Außerdem postuliert die Gruppe um Yamamoto et al. [113] eine fragliche Schlüsselrolle für MMP-7 in der Progression des Ösophaguskarzinoms. Ohashi et al. [30] betrachten, ebenfalls in Ösophaguskarzinomen, MMP-7 neben anderen MMPs wiederum auf Ebene der Enzyme. In 148 Proben stellen sie eine erhöhte Expression von MMP-7 in Karzinomgeweben dar, wobei die Menge an MMP-7 positiv mit der Invasionstiefe des Tumors und dem T-Stadium korreliert. Yamashita et al. [114] stellen die Expression von MMP-7 in Ösophaguskarzinomen auf RNA-Niveau dar. In 65 % der Proben finden sich erhöhte Werte für MMP-7-RNA in Tumoren, verglichen mit gutartigen Geweben. Zudem lassen sich höhere Werte für MMP-7-RNA ebenfalls mit einem häufigeren Auftreten von Lymphknotenmetastasen in Verbindung bringen, weshalb auch Yamashita et al. [114] die Möglichkeit einer prognostischen Rolle für MMP-7-Expressionswerte sehen. Ebenfalls die RNA-Expression von MMP-7 betreffen die Ergebnisse von Pacheco et al. [97] in ihrer Untersuchung von Plattenepithelkarzinomen der oberen Luft- und Speisewege. Auch diese Gruppe

weist auf eine stärkere Expression von MMP-7-RNA in malignem Gewebe hin, kann allerdings keinen Zusammenhang mit pathologisch-klinischen Eigenschaften der jeweiligen Tumore aufzeigen. MMP-7 ist demnach auch in der Entwicklung von Karzinomen der oberen Luft- und Speisewege ein in seiner Wertigkeit noch nicht abschließend geklärter Faktor: Eine prognostische Bedeutung scheint ihm aber, soweit bis jetzt beurteilbar, nicht zuzukommen.

Publizierte Ergebnisse zu MMP-7 in Karzinomen des oberen Aerodigestivtraktes sind selten. Der mehrheitliche Nachweis von MMP-7 in den verschiedenen Studien spricht für einen Beitrag von MMP-7 in der Entwicklung von Karzinomen der Luft- und Speisewege. Ein einheitlicher Zusammenhang zwischen exprimierten Mengen und verschiedenen Tumor-Parametern ist nicht durchgängig nachweisbar. Daher kann, im Gegensatz zu Karzinomen von Magen und Ösophagus, zur Zeit noch nicht von einer möglichen prognostischen Rolle für MMP-7 bei Karzinomen der oberen Luft- und Speisewege ausgegangen werden.

#### **5.3.4 Expression von TIMPs**

Das Expressionsverhalten von TIMPs in Karzinomen der oberen Luft- und Speisewege wird, wenn untersucht, in den meisten Fällen zusammen mit dem von MMPs beschrieben. Arbeiten, die TIMPs allein betrachten, sind relativ selten.

Von allen TIMPs ist die Expression von TIMP-1 in Plattenepithelkarzinomen am besten untersucht. Gottschlich et al. [110] beschreiben in ihrer Arbeit eine TIMP-1-Expression in fast allen (94 %) Proben. Auch Charous et al. [103] können TIMP-1 in der großen Mehrheit der betrachteten Proben nachweisen, stellen jedoch zugleich keinen Unterschied in den exprimierten TIMP-1-Mengen zwischen Primärtumoren und Metastasen fest. Die Arbeitsgruppe um Ikebe et al. [105] dagegen zeigt auf, dass Primärtumore mit erfolgter Metastasierung geringere Spiegel für TIMP-1-RNA besitzen als solche ohne Metastasen. Es kann dabei auch ein Zusammenhang zwischen hohen MMP- und niedrigen TIMP-1-Spiegeln in Primärtumoren hergestellt werden. Dieses Expressionsverhalten korreliert laut Ikebe et al. [105] mit einem hohen Metastasierungspotential der jeweiligen Tumore.

Eine detailliertere Betrachtung von TIMP-1 und -2 erfolgt durch Heissenberg et al. [46]. Sie weisen TIMP-1 in fast allen von ihnen untersuchten Primärtumoren nach. Dabei findet sich im Schnitt weniger TIMP-1 als TIMP-2. In den Proben von Patienten, bei denen im weiteren Verlauf ein Rezidiv auftrat, ist dagegen kein TIMP-1, aber fast immer TIMP-2 nachweisbar. Die gesamte Gruppe der Primärtumore exprimiert nur in einigen wenigen Proben MMP-9. In Rezidivtumoren können Heissenberg et al. [46] in keinem Fall TIMP-1 nachweisen. Sie folgern, dass ein Fehlen von TIMP-1 (besonders im Zusammenhang mit nachweisbarem MMP-9) eine höhere Aggressivität des einzelnen Tumors indiziert.

Gegenteiliges stellen Kurahara et al. [106] dar. Primärtumore mit vorhandenen Metastasen weisen deutlich höhere Spiegel für TIMP-1 auf als nicht metastasierte Tumore. Zugleich bleiben die Spiegel für TIMP-2 unbeeinflusst von einer eventuell erfolgten Metastasierung. Die Gruppe schließt daraus, dass für eine erfolgreiche Streuung von Metastasen erhöhte MMP-Expression wichtiger ist als die Senkung inhibitorischer Faktoren.

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation weisen ein Auftreten von TIMP-1 in allen untersuchten Proben nach. Im Hinblick auf die komplexe biologische Funktion von TIMP-1, die sich bei weitem nicht auf die Inhibition von MMPs beschränkt, ist die weite Verbreitung des Enzyms auch in höheren Tumorstadien, wo Inhibition von MMPs offensichtlich nicht mehr erfolgreich gewährleistet wird, verständlich. Außerdem zeigt TIMP-1 von allen TIMPs Spiegel mit den höchsten Durchschnittswerten. Während die weite Verbreitung der TIMPs mit anderen Ergebnissen übereinstimmt, zeigen sich bezüglich der exprimierten Mengen Unterschiede auf. In der hier betrachteten Versuchsreihe ist TIMP-1 im Schnitt stärker als TIMP-2 exprimiert, während Heissenberg et al. [46] ein genau Gegenteiliges Ergebnis beschreiben. Wie bei Charous et al. [103] kann auch bei der vorliegenden Dissertation kein Unterschied in der TIMP-1-Expression von Primärtumoren und Metastasen nachgewiesen werden. Es findet sich allerdings eine Tendenz zu niedrigeren TIMP-1-Spiegeln in Tumoren fortgeschrittener T-Stadien, was Überlegung hinsichtlich eines prognostischen Wertes nachweisbar niedrigerer TIMP-1-Spiegel unterstützt.

Auch TIMP-2 ist in allen Proben nachweisbar, die Mengen sind aber geringer als die von TIMP-1 und nehmen mit Ausbreitung des Tumors, also höherem T-Stadium, tendenziell zu. Interessanterweise besteht eine negative Korrelation zwischen TIMP-2- und MMP-7-

Spiegeln, die bisher von keiner anderen Arbeitsgruppe beschrieben wird. Hohe TIMP-2-Mengen gehen mit niedriger bis nicht vorhandener Expression von MMP-7 einher. Es ist daher zu überlegen, ob MMP-7 spezifisch durch TIMP-2 inhibiert wird. Weiterhin korreliert die Menge an nachweisbarer TIMP-2-RNA positiv mit der von TIMP-3, was in dieser Form noch nicht beschrieben ist. Ob diese Tatsache allerdings in gemeinsam bevorzugten Substraten zur Inhibition begründet ist oder in biologischen Interaktionen dieser beiden TIMPs, durch gleiche Regulationsmechanismen oder noch unbekannte Faktoren zustande kommt, ist momentan nicht mit letzter Sicherheit zu sagen. TIMP-2 und vor allem TIMP-3 sind bisher nur spärlich untersucht, so dass umfassendere Aussagen zu diesen beiden TIMPs nur begrenzt zu treffen sind. Die im Rahmen der vorliegenden Untersuchung gewonnenen Ergebnisse weisen aber auf eine ebenfalls nicht unbedeutende Rolle dieser TIMPs hin.

### **5.3.5 Expression von MMPs und TIMPs in Abhängigkeit von der Tumorlokalisation**

Die Frage nach einer Abhängigkeit zwischen MMPs und dem Ort des Auftretens des Primärtumors im oberen Aerodigestivtrakt ist unter Berücksichtigung anatomischer Verhältnisse der Region zu verstehen. So hat, durch die unterschiedlichen Größenverhältnisse bedingt, ein maligner Prozess im Larynx weniger EZM zu durchwandern als ein solcher in manchen Bereichen des Oro- oder Hypopharynx, bevor er in benachbarte Strukturen einbricht und damit in ein höheres Tumorstadium eintritt. Dementsprechend stellt sich die Frage, ob zum Beispiel Larynxkarzinome im Vergleich mit anderen Plattenepithelkarzinomen der oberen Luft- und Speisewege geringere Mengen an MMPs in gleichen Primärtumor- oder Metastasierungsstadien aufweisen.

In der vorliegenden Dissertation ist eine Abhängigkeit der MMP- oder TIMP-Expression von der Lokalisation des Primärtumors nicht nachweisbar. Ebenso bestehen keine festen Expressionsmuster, die über das Maß von Korrelationen einzelner MMPs und TIMPs miteinander hinausgehen. Auffällig ist nur die starke Expression von MMP-7 in Larynx-Primärtumoren, verglichen mit anderen Lokalisationen.

### **5.3.6 Auftreten vorhandener Muster in der Expression**

Arbeiten, die sich mit diesem Aspekt der Expression in Plattenepithelkarzinomen befassen, sind selten. Riedel et al. [98] erwähnen, dass sich kein Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen MMP-9-Expression und der Lokalisation des Tumors nachweisen lässt. Xu et al. [104] können höhere TIMP-1-Werte in Larynx- als in Pharynxkarzinomen feststellen. Eine sehr umfassende Untersuchung multipler MMPs wurde von O-Charoenrat et al. [115] publiziert. Keinerlei Korrelation besteht dabei zwischen einem der MMPs und der Tumorlokalisation. Zusammenhänge bestehen dagegen zwischen den Mengen exprimierter MMP-1, -9 und TIMP-1 und einem fortgeschrittenen Tumorstadium, sowie weiterhin zwischen der Expression von MMP-2, -7, -9 und -11 und dem Lymphknotenstatus der einzelnen Tumore. Im einzelnen lassen sich diese Ergebnisse den bereits angestellten Überlegungen zur Expression der jeweiligen MMPs zuordnen, ebenso die Folgerung ob der besonderen Bedeutung von MMP-Überexpression in Plattenepithelkarzinomen der oberen Luft- und Speisewege. Sicherlich beinhalten diese wie alle anderen betrachteten Korrelationen ein Muster im Sinne einer bestimmten Expressionsweise unter bestimmten Bedingungen. Die Breite der von O-Charoenrat et al. [115] angestellten Untersuchung lässt dabei erste Ansätze im Sinne solcher Expressionsmuster erkennen: So zeigen sich zum Beispiel in Tumoren mit befallenen Lymphknoten wie erwähnt erhöhte Expressionswerte für mehrere MMPs. Echte Muster aber, bei denen immer gleiche Verhältnisse von exprimierten MMP-Mengen bei gleichen Tumorparametern darstellbar sind, können noch nicht nachgewiesen werden. Dabei ist dieser Aspekt im Hinblick auf die eingangs erwähnten Interaktionen und gegenseitigen Aktivierungen von MMPs untereinander nicht nur interessant, sondern auch durchaus annehmbar. Weiterführende, ähnlich breit angelegte Arbeiten sind wünschenswert, um mehr über die Interaktionen der einzelnen MMPs in malignen Prozessen zu erfahren.

### **5.4 Expression von MMPs und TIMPs in Zelllinien**

Die Expression der einzelnen MMPs und TIMPs in den hier betrachteten Zelllinien ist nicht wesentlich verschieden von der in den Tumorproben. Alle in Frage kommenden MMPs und TIMPs werden exprimiert, wobei MMP-13 am häufigsten, MMP-7 noch in der

Mehrheit der Fälle nachweisbar ist. Die Menge an exprimierter MMP-9-RNA ist deutlich geringer als in Tumorgeweben, während MMP-2 auch in den Gewebeproben die MMP mit der geringsten Expression ist. Die TIMP-Expression stellt sich ebenfalls ähnlich wie die in Tumorgeweben dar: TIMP-1 wird am stärksten exprimiert und ist in allen Zelllinien vorhanden, darauf folgen TIMP-2 und -3 entsprechend.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der untersuchten Tumorgewebe besteht in den untersuchten Zelllinien eine negative Korrelation zwischen MMP-13-RNA-Spiegeln und dem Lymphknotenstatus. Zusätzlich zeigt sich eine Korrelation zwischen MMP-2- und TIMP-3-RNA-Spiegeln, die zuvor nicht in den Tumorgeweben nachweisbar war.

Verschiedene Untersuchungen zeigen die Bedeutung einer Interaktion zwischen Tumorzellen und umgebenden Fibroblasten, so unter anderem Dalberg et al. [116] und Sun et al. [117]. Sutinen et al. [118] weisen in einer umfassenderen Untersuchung darauf hin, dass die Expression von MMPs und TIMPs in nicht geringem Maß durch Zellen des Tumorstromas geschieht und die gegenseitige Beeinflussung von Tumorzellen und ihrem Stroma eine wichtige Rolle spielt. Arbeiten mit Tumorzelllinien können in diesem Zusammenhang Klarheit bringen, inwieweit nicht-maligne Zellen oder der Kontakt mit ihnen für die Expression von MMPs und TIMPs innerhalb eines malignen Prozesses von Bedeutung ist. Auch Lengyel et al. [119] weisen nach, dass Zellen des Stromas, besonders Fibroblasten, eine Rolle in der Regulation der MMP-9-Expression zukommt: Tumorzelllinien exprimieren nach Zugabe von Proteinen aus Fibroblasten größere Mengen von MMP-9; außerdem finden sich in Randgebieten von Tumoren, nahe der Grenze zum Stroma, ebenfalls größere MMP-9-Mengen. Dagegen stellen Pyke et al. [120] dar, dass MMP-9 hauptsächlich von Tumorzellen selber exprimiert wird und in nur geringem Maße von der Stroma-Interaktion abhängig ist.

Die in dieser Untersuchung dargestellte, geringere MMP-9-Produktion von Zelllinien verglichen mit Spiegeln in Tumorgeweben weist damit auf die von Sutinen et al. [118] und Lengyel et al. [119] aufgezeigte, die MMP-9-Expression mitregulierende Interaktion zwischen Tumorzellen und Stroma hin. Ähnliche Hinweise für eine mögliche Beteiligung einzelner Stromafaktoren an der Regulation anderer MMPs und TIMPs sind dagegen nicht überzeugend darstellbar. Ob MMP-7, das in Zelllinien deutlich stärker exprimiert wird als

in Tumorgewebe, durch Bestandteile des gesamten Tumors in seiner Expression gehemmt wird und deswegen in Zelllinien in größeren Mengen vorhanden ist, lässt sich aufgrund dieser Ergebnisse nicht mit Sicherheit feststellen.

MMP-13 kann, wie in der vorliegenden Dissertationsschrift, auch von Johansson et al. [109] in der Mehrheit der untersuchten Plattenepithelkarzinom-Zelllinien dargestellt werden, was die Bedeutung von MMP-13 für die Progression von Plattenepithelkarzinomen der oberen Luft- und Speisewege unterstreicht. Dabei scheint MMP-13 von den Tumorzellen selber und unabhängig von Bestandteilen des Stromas exprimiert zu werden. Die Ähnlichkeit der TIMP-Expression in Zelllinien verglichen mit der in Tumorgewebe lässt die Annahme zu, dass die Expression von TIMPs wie die von MMP-13 von den Tumorzellen selber reguliert wird und keiner bedeutenden Einflussnahme durch Stroma-Faktoren unterliegt.

Die Expression von MMPs und TIMPs in der Keratinozyten-Zelllinie entspricht insgesamt den Erwartungen an das Verhalten benigner Zellen aufgrund der biologischen Funktion von MMPs. Außer geringer Mengen MMP-9 werden keine MMPs exprimiert. Da in gesunden Epithelzellen keine Notwendigkeit zum ständigen Abbau von EZM besteht, werden auch keine MMPs in größeren Menge synthetisiert. TIMPs sind vorhanden und weisen damit wieder auf die Bandbreite an biologischen Funktionen von TIMPs neben der Inhibition von MMPs hin.

## **5.5 Prognostische Eignung von MMPs und Therapieansätze**

Bei der Betrachtung der verschiedenen MMPs und TIMPs wurde bereits mehrfach die Frage nach der Möglichkeit der Verwendung von nachgewiesener MMP-Expression und ihren Spiegeln angesprochen. Es ist eines der Ziele der vielfältigen Untersuchungen, einen prognostischen Marker für Karzinome der oberen Luft- und Speisewege zu gewinnen und so Aussagen über das Invasions- und Metastasierungspotential des einzelnen Tumors treffen zu können. MMPs sind dabei auf Grund ihrer bis jetzt bekannten Funktion und ihres Beitrags zur malignen Ausbreitung ins Blickfeld gerückt. Bis heute ist es allerdings noch nicht gelungen, einen prognostisch relevanten MMP-Marker zu etablieren, auch wenn die Ergebnisse einzelner Arbeitsgruppen in diese Richtung zu weisen scheinen. Nachweisbare



Korrelationen zwischen MMP-Spiegeln und klinisch-pathologischen Tumorparametern wie Lymphknotenstatus N oder Fernmetastasenstatus M, die in dieser wie in anderen erwähnten Arbeiten dargestellt werden, lassen dabei den Schluss zu, dass MMPs als Marker an Bedeutung gewinnen könnten. Leider sind die Ergebnisse auch für die am besten untersuchten MMPs -2 und -9 noch derart uneinheitlich, dass prognostische Aussagen auf dieser Basis nicht zu treffen sind. Die Pathologie der Tumorprogression und Metastasierung sowie der spezielle Beitrag von MMPs, deren Interaktionen untereinander und mit Zellen und Faktoren der Umgebung sind noch nicht hinreichend bekannt, um die zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse umfassend erklären zu können.

Neben der Frage nach prognostischen Qualitäten von MMPs werden die Erkenntnisse auch für die Entwicklung von Chemotherapeutika verwendet. Dabei besteht die Überlegung darin, dass eine erfolgreiche Blockade Matrix- und Basalmembran-degradierender Enzyme, eben der MMPs, die Ausbreitung und Metastasierung eines malignen Tumors eindämmen könnte. Verschiedene Arbeitsgruppen haben sich mit der Synthese solcher Substanzen beschäftigt. So stellen Katori et al. [121] dar, dass die Administration von MMI-166, eines synthetischen selektiven Hemmstoffes für MMP-2 und -9, in vivo Tumorwachstum durch Senkung von MMP-Produktion und -Aktivität sowie der Inhibition von Angiogenese reduziert. Marimastat, BB 2516, ein MMP-Inhibitor mit breitem Spektrum, führt zu einer Wachstumsinhibition von Plattenepithelkarzinom-Zelllinien, wie O-Charoenrat et al. [122] darlegen. Diese Inhibition ist dabei auf eine Blockade autokriner Signale zurückzuführen. Zudem erhöht Marimastat die Zytotoxizität von Cisplatin in vitro wie in vivo.

## 6. Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome des oberen Aerodigestivtraktes stehen in Europa an sechster Stelle in der Häufigkeit ihres Auftretens und weisen in fortgeschrittenen Stadien trotz moderner Behandlungsmethoden eine relativ geringe 5-Jahres-Überlebensrate auf. Diese ist vor allem auf die hohe, in der Regel lymphogene Metastasierungsfrequenz zurückzuführen. Um bereits präoperativ das Risiko einer möglichen Metastasierung und die Aggressivität des Tumorwachstums einschätzen zu können, zielen die Bemühungen verschiedener Arbeitsgruppen auf die Etablierung molekularer Marker hin. Besonderes Interesse gilt hierbei seit einigen Jahren der Gruppe der Matrix-Metalloproteinasen.

Matrix-Metalloproteinasen bezeichnen eine Familie substratspezifischer Endopeptidasen, denen ein Zinkionen-Komplex im aktiven Zentrum gemeinsam ist. Alle Mitglieder der Familie können, neben anderen biologischen Funktionen, Bestandteile der Extrazellulärmatrix abbauen. Die Regulation dieser Enzyme verläuft auf verschiedenen Ebenen, unter anderem durch spezifische Inhibitoren der aktiven Enzyme, TIMPs. Aufgrund ihrer Fähigkeiten kommen Matrix-Metalloproteinasen und ihren Inhibitoren eine tragende Rolle in verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen zu, so auch in der Ausbreitung und Metastasierung maligner Tumore. Von besonderer Bedeutung ist dabei die Überwindung von Basalmembranen zur Metastasierung. Die MMPs -2 und -9 sind in der Lage, neben anderen Substraten das in Basalmembranen auftretende Kollagen IV abzubauen. Diese Fähigkeit besitzen die übrigen MMPs nicht.

Auf diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Dissertation die RNA-Expression von MMP-2, -7, -9 und -13, sowie von TIMP-1, -2 und -3 in Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes sowie in Plattenepithelkarzinom-Zelllinien untersucht. RNA aus 30 Gewebeproben und sieben Zelllinien wurde extrahiert, mit Hilfe von RT-PCR und Gel-Elektrophorese dargestellt, die Ergebnisse semiquantitativ erfasst und statistisch ausgewertet.

MMP- und TIMP-RNA war sowohl in den Gewebeproben als auch in den Zelllinien nachweisbar. Von den MMPs war MMP-13 am häufigsten und stärksten nachweisbar, MMP-2 am schwächsten. Die drei TIMPs konnten in allen Fällen nachgewiesen werden.

Statistisch signifikante Korrelationen fanden sich zwischen MMP-13 und dem Lymphknotenstatus, MMP-13 und TIMP-2, sowie MMP-9 und dem Fernmetastasenstatus. Des Weiteren ergaben sich Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen stärkeren Signalen für MMP-2 und -9 und einem fortgeschrittenen Tumorstadium. Der Nachweis der betrachteten RNA in den Zelllinien war dem der Gewebeproben ähnlich; allerdings waren die Signale für die jeweilige RNA insgesamt schwächer. Korrelationen von MMP-Signalen mit Primärtumor-Lokalisationen ließen sich nicht aufweisen, ebenso wenig kongruente Muster innerhalb der MMP-Signale.

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation zusammenfassend lässt sich eine Rolle der untersuchten MMPs und TIMPs für das Invasions- und Metastasierungsverhalten von Karzinomen der oberen Luft- und Speisewege annehmen. Der Nachweis von MMP-RNA-Signalen geht jedoch nicht zwingend mit einer entsprechenden Proteinbildung einher, so dass das prognostische Potential einer erhöhten RNA-Expression zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht abschließend geklärt ist.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Crowe DL, Hacia JG, Hsieh CL, Sihna UK, Rice H (2002): Molecular pathology of head and neck cancer. *Histol. Histopathol.* 17 (3): 909-14
2. Xu J, Gimenez-Conti IB, Cunningham JE, Collet AM, Luna MA, Lanfranchi HE, Spitz MR, Conti CJ (1998): Alterations of p53, cyclin D1, Rb, and H-ras in human oral carcinomas related to tobacco use. *Cancer* 83 (2): 204-12
3. Werner JA (1995): The lymph vessel system in the mouth cavity and pharynx. *Laryngorhinootologie* 74 (10): 622-8
4. Probst R, Grevers G, Iro H: *Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde*. Thieme-Verlag 2000
5. Parsons SL, Watson SA, Brown PD, Collins HM, Steel RJC (1997): Matrix Metalloproteinases. *Br. J. Surg.* 84: 160-66
6. Sopata I, Wize J (1979): A latent gelatin-specific proteinase of human leucocytes and its activation. *Biochim. Biophys. Acta* 571 (2): 305-12
7. Seltzer JL, Adams SA, Grant GA, Eisen AZ (1981): Purification and properties of a gelatin-specific neutral protease from human skin. *J. Biol. Chem.* 256 (9): 4662-8
8. Okada Y, Nagase H, Harris ED Jr. (1987): Matrix metalloproteinases 1, 2 and 3 from rheumatoid synovial cells are sufficient to destroy joints. *J. Rheumatol.* 14 (spec. No): 41-2
9. Murphy G, McAlpine CG, Poll CT, Reynolds LL (1985): Purification and characterization of a bone metalloproteinase that degrades gelatin and type IV and V collagen. *Biochim. Biophys. Acta* 831 (1): 49-58

10. Nakano T, Scott PG (1986): Purification and characterization of a gelatinase produced by fibroblasts from human gingiva. *Biochem. Cell Biol.* 64 (5): 387-93
11. Johansson S, Smedsrod B (1986): Identification of a plasma gelatinase in preparations of fibronectin. *J Biol Chem.* 261 (10): 4363-6
12. Mercer E, Cawston TE, de Silva M, Hazleman BL (1985): Purification of a metalloproteinase inhibitor from human rheumatoid synovial fluid. *Biochem. J.* 231 (3): 505-10
13. Carmichael DF, Sommer A, Thompson RC, Anderson DC, Smith CG, Welgus HG, Stricklin GP (1986): Primary structure and cDNA cloning of human fibroblast collagenase inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (8): 2407-11
14. Marchenko GN, Marchenko ND, Strongin AY (2003): The human and mouse matrix metalloproteinase MMP-21: the structure and the regulation of the gene and the protein. *Biochem. J.* Mar.5;
15. John A, Tuszynski G (2001): The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathol Oncol Res.* 7 (1): 14-23
16. Aimes RT, Quigley JP (1995): Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific  $\frac{3}{4}$  and  $\frac{1}{4}$ -length fragments. *J Biol Chem.* 270 (11): 5872-6
17. Cao J, Sato H, Takino T, Seiki M (1995): The C-terminal region of membrane type matrix-metalloproteinase is a functional transmembrane domain required for progelatinase A activation. *J Biol Chem.* 270(2): 801-5
18. Cowell S, Knäuper V, Stewart ML, D'Ortho MP, Stanton H, Hembry RM, López-Otín C, Reynolds JJ, Murphy G (1998): Induction of matrix metalloproteinase activation cascades based on membrane-type 1 matrix metalloproteinase: associated activation of gelatinase A, gelatinase B, and collagenase 3. *Biochem. J.* 15: 453-58

19. Gomez DE, Alonso FA, Yoshiji H, Thorgeirsson UP (1997): Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur. J. Cell Biol.* 74: 111-122
20. Johansson N, Saarialho-Kere U, Airola K, Herva R, Nissinen L, Westermarck J, Vuorio E, Heino J, Kahari VM (1997): Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by hypertrophic chondrocytes, periosteal cells, and osteoblasts during human fetal bone development. *Dev. Dyn.* 208 (3): 387-97
21. Jeffrey JJ (1991): Collagen and collagenase: pregnancy and parturition. *Semin. Perinatol.* 15: 118-26
22. Matrisian LM (1990): Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodelling: *Trends Genet.* 6 (4): 121-5
23. Kahari VM, Saarialho-Kere U (1997): Matrix metalloproteinases in skin. *Exp. Dermatol.* 6: 199-213
24. Lindy O, Konttinen YT, Sora T, Ding Y, Santavirta S, Ceponis A, López-Otín C (1997): Matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3) in human rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum.* 40: 1391-99
25. Keyszer G, Lambiri I, Keysser M, Keysser C, Nagel R, Burmester GR, Jung K (1998): Matrix metalloproteinases, but not cathepsins B, H and L or their inhibitors in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis are potentially useful markers of disease activity. *Z. Rheumatol.* 57: 392-98
26. Lichtinghagen R, Breitenstein K, Arndt B, Kuhbacher T, Boker KH (1998): Comparison of matrix metalloproteinase expression in normal and cirrhotic human liver. *Virchows Arch.* 432: 153-58
27. Luttun A, Dewerchin M, Collen D, Carmeliet P (2000): The role of proteinases in angiogenesis, heart development, restenosis, atherosclerosis, myocardial ischemia, and stroke: insights from genetic studies. *Curr. Atheroscler. Rep.* 2 (5): 407-16

28. Uitto VJ, Airola K, Vaalamo M, Johansson N, Putnins EE, Firth JD, Salonen J, Lopez-Otin C, Saarialho-Kere U, Kahari VM (1998): Collagenase-3 (matrix-metalloproteinase-13) expression is induced in oral mucosa epithelium during chronic inflammation. *Am. J. Pathol.* 152 (6): 1489
29. Page RC (1991): The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J. Periodontal Res.* 26 (3 Pt 2): 230-42
30. Ohashi K, Nemoto T, Nakamura K, Nemori R (2000): Increased expression of matrix-metalloproteinase 7 and 9 and membrane type 1-matrix metalloproteinase in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer* 88 (10): 2201-9
31. David L, Nesland J, Holm R, Sobrinho-Simoes M (1994): Expression of laminin, collagen IV, fibronectin, and type IV collagenase in gastric carcinoma. An immunohistochemical study of 87 patients. *Cancer* 73: 518-27
32. Gallegos NC, Smales C, Savage FJ, Hembry RM, Boulos PB (1995): The distribution of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 81: 287-93
33. Chan CC, Menges M, Orzechowski HD, Orendain N, Pistorius G, Feifel G, Zeitz M, Stallmach A (2001): Increased matrix metalloproteinase-2 concentration and transcript expression in advanced colorectal carcinomas. *In. J. Colorectal Dis.* 16: 133-40
34. Bramhall SR, Neoptolemos JP, Stamp GWH, Lemoine NR (1997): Imbalance of expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of the matrix metalloproteinases (TIMPs) in human pancreatic carcinoma. *J. Pathol.* 182: 347-55
35. Hayasaka A, Suzuki N, Fujimoto N, Iwama S, Fukuyama E, Kanda Y, Saisho H (1996): Elevated plasma levels of matrix metalloproteinase-9 (92-kd type IV collagenase / gelatinase B) in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 24 (5): 1058-62
36. Nakagawa H, Yagihashi S (1994): Expression of type IV collagen and its degrading enzymes in squamous cell carcinoma of the lung. *Jpn. J. Cancer Res.* 85: 934-38

37. González-Avila G, Iturría C, Vadillo F, Terán L, Selman M, Pérez-Tamayo R (1998): 72-kD (MMP-2) and 92 kD (MMP-9) type IV collagenase production and activity in different histologic types of lung cancer cells. *Pathobiology* 66: 5-16
38. Airola K, Johansson N, Kariniemi AL, Kahari VM, Saarialho-Kere UK (1997): Human collagenase-3 is expressed in malignant squamous epithelium of the skin. *J. Invest. Dermatol.* 109 (2): 225-31
39. Davidson B, Goldberg I, Kopolovic J, Lerner-Geva L, Gotlieb WH, Weis B, Ben-Baruch G, Reich R (1999b): MMP-2 and TIMP-2 expression correlates with poor prognosis in cervical carcinoma – a clinicopathologic study using immunohistochemistry and mRNA in-situ hybridization. *Gynecol. Oncol.* 73: 372-82
40. Kawata R, Shinomiya T, Yasuda N, Takenaka H, Murakami Y (1996): Matrix metalloproteinase-2 concentrations in squamous cell carcinoma of head and neck and its clinical significance. *Nippon Jibiinkoka Gakkai kaiho* 99: 299-305
41. Derrico A, Garbisa S, Liotta L, Astronovo V, Stetler-Stevenson WG, Grigioni W (1991): Augmentation of type IV collagenase, laminin receptor, and Ki67 proliferation antigen associated with human colon, gastric and breast carcinoma progression. *Mod. Pathol.* 4: 239-46
42. Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S (1980): Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 284: 67
43. Pendas AM, Uria JA, Jimenez MG, Balbin M, Freije JP, Lopez-Otin C (2000): An overview of collagenase-3 expression in malignant tumors and analysis of its potential value as a target in antitumor therapies. *Clin Chim Acta.* 291 (2): 137-55
44. Prontera C, Mariani B, Rossi C, Poggi A, Rotilio D (1999): Inhibition of gelatinase A (MMP-2) by batimastat and captopril reduces tumor growth and lung metastases in mice bearing Lewis lung carcinoma. *Int J Cancer* 81(5): 761-6



45. Ahonen M, Baker A, Kähäri VM (1998): Adenovirus-mediated gene delivery of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 inhibits invasion and induces apoptosis in melanoma cells. *Cancer Res.* 58: 2310-15
46. Heissenberg MC, Görögh T, Lippert BM, Werner JA (1998): Metalloproteinases and their inhibitors in squamous cell carcinoma of the hypopharynx: indicators of individual tumor aggressiveness. *Otolaryng. Polska* 5: 521-26
47. Bianco FJ Jr, Gervasi DC, Tiguert R, Grignon DJ, Pontes JE, Crissman JD, Fridman R, Wood DP Jr (1998): Matrix metalloproteinase-9 expression in bladder washes from bladder cancer patients predicts pathological stage and grade. *Clin. Cancer Res.* 4: 3011-16
48. Airola K, Karonen T, Vaalamo M, Lethi K, Lohi J, Kariniemi AL, Keski-Oja J, Saarialho-Kere UK (1999): Expression of collagenases-1 and -3 and their inhibitors TIMP-1 and -3 correlates with the level of invasion in malignant melanomas. *Br. J. Cancer* 80 (5-6): 733-43
49. Herbst RS, Yano S, Kuniyasu H, Khuri FR, Bucana CD, Guo F, Liu D, Kemp B, Lee JJ, Hong WK, Fidler IJ (2000): 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.* 6: 790-97
50. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG (1999): Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 43: 42-51
51. Liotta LA, Stetler-Stevenson WG (1993): Principles of molecular cell biology of cancer. in *Cancer, Principles and Practice of Oncology*, VT DeVita, S Hellman, and S.A. Rosenberg, Editors. Lippincott Co.: Philadelphia. p.134-149
52. Liotta LA, Steeg P, Stetler-Stevenson WG (1991): Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 64: 327-336

53. Ray JM, Stetler-Stevenson WG (1994): TIMP-2 expression modulates human melanoma cell adhesion and motility. *Ann. NY Acad. Sci.* 732: 233-47
54. Zucker S, Mirza H, Conner CE (1998): Vascular endothelial growth factor induces tissue factor and matrix metalloproteinase production in endothelial cells – conversion of prothrombin to thrombin results in progelatinase A activation and cell proliferation. *Internat. J. Cancer* 75: 780-786
55. Rooprai HK, McCormick JP (1997): Proteases and their inhibitors in human brain tumors: a review. *Anticancer Res.* 17: 4151-4162
56. Lovejoy B, Cleasby A, Hassell AM, Longley K, Luther MA, Weigl D, McGeehan G, McElroy AB, Drewry D, Lambert MH, Jordan JR (1994): Structure of the catalytic domain of fibroblast collagenase complexed with an inhibitor. *Science* 263: 375-377
57. Becker JW, Marcy AI, Rokosz LL, Axel MG, Burbaum JJ, Fitzgerald PM, Cameron PM, Esser CK, Hagmann WK, Hermes JD, Springr JP (1995): Stromelysin-1: three-dimensional structure of the inhibited catalytic domain and of the C-truncated proenzyme. *Protein Sci* 4: 1966-1976
58. Stricklin GP, Welgus HG (1983): Human skin fibroblast collagenase inhibitors: purification and biochemical characterization. *J. Biol. Chem.* 258: 12252-12258
59. Denhardt DT, Feng B, Edwards DR, Cocuzzi ET, Malyankar UM (1993): Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP, aka EPA): Structure, control of expression and biological functions. *Pharmacol. Ther.* 59: 329-341
60. Greene J, Wang M, Liu YE, Raymond LA, Rosen C, Shi YE (1996): Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J. Biol. Chem.* 271: 30375-30380
61. Williamson RA, Marston FAO, Angal S, Koklitis P, Panico M, Morris HR, Carne AF, Smith BJ, Harris TJR, Freedman RB (1990): Disulphide bond assignment in human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP). *Biochem. J.* 268: 267-274

62. Murphy G, Houbrechts A, Cockett MI, Williamson RAO, O`Shea M, Docherty A (1991): The N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases retains metalloproteinase inhibitory activity. *Biochemistry* 30: 8097-8102
63. Williamson RA, Smith BJ, Angal S, Murphy G, Freedman RB (1993): Structural analysis of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) by tryptic peptide mapping. *Biochim. Biophys. Acta* 1164: 8-16
64. Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, Uchijima E, Iwata K (1992): Growth promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. *FEBS Lett.* 298: 29-32
65. Ray JM, Stetler-Stevenson WG (1995): Gelatinase A activity directly modulates melanoma cell adhesion and spreading. *EMBO J.* 14: 908-917
66. Boujrad N, Ogwuegbu M, Garnier M, Lee CH, Martin BM, Papadopoulos V (1995): Identification of a stimulator of steroid hormone synthesis isolated from testis. *Science* 268: 1609-1612
67. Johnson MD, Kim HR, Chesler L, Tsao-Wu G, Bouck N, Polverini PJ (1994): Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase. *J. Cell. Physiol.* 160: 194-202
68. Stetler-Stevenson WG, Kruttsch HC, Liotta LA (1989): Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J. Biol. Chem.* 264: 17374-17378
69. Shapiro SD, Campbell EJ, Kobayashi DK, Welgus HG (1991): Dexamethasone selectively modulates basal and lipopolysaccharide-induced metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase production by human alveolar macrophages. *J. Immunol.* 146: 2724-2729
70. Pavloff N, Staskus PW, Kishnani NS, Hawkes SP (1992): A new inhibitor of metalloproteinase from chicken: ChIMP.3. *J. Biol. Chem.* 267: 17321-17071

71. Yang TT, Hawkes SP (1992): Role of the 21-kDa protein TIMP-3 in oncogenic transformation of cultured chicken embryo fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10676-10680
72. Wick M, Burger C, Brusselbach S, Lucibello FC, Muller R (1994): A novel member of human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) gene family is regulated during G1 progression, mitogenic stimulation, differentiation and senescence. *J. Biol. Chem.* 269: 18953-18960
73. Toth M, Gervasi DC, Fridman R (1997): Phorbol ester-induced cell surface association of matrix metalloproteinase-9 in human MCF10A breast epithelial cells. *Cancer Res.* 57: 3159-3167
74. Tyagi SC (1997): Proteinases and myocardial extracellular matrix turnover. *Molecular and Cellular Biochemistry* 168: 1-12
75. Wasylyk C, Gutman A, Nicholson R, Wasylyk B (1991): The c-Ets oncoprotein activates the stromelysin promoter through the same elements as several non-nuclear oncoproteins. *EMBO J* 10: 1127-1134
76. Miyake H, Yoshimura K, Hara I et al. (1997): Basic fibroblast growth factor regulates matrix metalloproteinases production and in vitro invasiveness in human bladder cancer cell lines. *J. Urology* 157: 2351-2355
77. Kanno N, Nonomura N, Miki T, et al. (1998): Effects of epidermal growth factor on the invasion activity of the bladder cancer cell line. *J. Urology* 159: 586-590
78. Lamoreaux WJ, Fitzgerald MEC, Reiner A, et al. (1998): Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro. *Microvascular Res.* 55: 29-42

79. Bafetti LM, Young TN, Itoh Y (1998): Intact vitronectin induces matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 expression and enhanced cellular invasion by melanoma cells. *J. Biol. Chem.* 273: 143-149
80. Haas TL, Davis SJ, Madri JA (1998): Three-dimensional type I collagen lattices induces coordinate expression of matrix metalloproteinases MT-MMP and MMP-2 in microvascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 273: 3604-3610
81. Overall CM (1994): Regulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase expression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 732: 51-64
82. Overall CM, Wrana JL, Sodek J (1991): Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase / type IV collagenase by transforming growth factor- $\beta$ 1 in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 266: 14064-14071
83. Ganser GL, Stricklin GP, Matrisian LM (1991): EGF and TGF alpha influence in vitro lung development by the induction of matrix-degrading metalloproteinases. *Int. J. Dev. Biol.* 35: 453-461
84. Lotz M, Guerne PA (1991): Interleukin-6 induces the synthesis of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 / erythroid potentiating activity (TIMP-1/EPA). *J. Biol. Chem.* 266: 2017-2020
85. Ito A, Sato T, Iga T, Mori Y (1990): Tumor necrosis factor bifunctionally regulates matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) production by human fibroblasts. *FEBS Lett.* 269: 93-95
86. Van den Brule FA, Engel J, Stetler-Stevenson WG, Liu FI, Sobel ME, Castronuovo V (1992): Genes involved in tumor invasion and metastasis are differentially modulated by estradiol and progesterin in human breast-cancer cells. *Int. J. Cancer* 52: 653-657
87. Sato T, Ito A, Mori Y, Yamashita K, Hayakawa T, Nagase H (1991): Hormonal regulation of collagenolysis in uterine cervical fibroblasts. *Biochem. J.* 275: 645-650

88. Sorsa T, Salo T, Koivunen E (1997): Activation of type IV pro-collagenases by human tumor-associated trypsin-2. *J. Biol. Chem.* 272: 21067-21074
89. Tyagi SC, Kumar S, Katwa L (1997): Differential regulation of extracellular matrix metalloproteinase and tissue inhibitor by heparin and cholesterol in fibroblast cells. *J. Mol. Cell Cardiology* 29: 391-404
90. Mazzieri R, Masiero L, Zanetta L (1997): Control of type IV collagenase activity by components of the urokinase-plasmin system: a regulatory mechanism with cell-bound reactants. *EMBO J.* 16: 2319-2332
91. Sang QX, Birkedal-Hansen H, Van Wart HE (1995): Proteolytic and non-proteolytic activation of human neutrophil progelatinase B. *Biochim. Biophys. Acta* 1251: 99-108
92. Crabbe T, Smith B, O'Connell JP, Docherty A (1994): Human progelatinase A can be activated by matrilysin. *FEBS Lett.* 345: 14-16
93. Folkman J (1971): Tumor angiogenesis: therapeutic implications (review). *New Engl. J. Med.* 285: 1182-1186
94. Pluda JM (1997): Tumor-associated angiogenesis: mechanisms, clinical implications and therapeutic strategies. *Seminars in Oncology* 24: 203-218
95. Magary SP, Ryan MW, Tarnuzzer RW, Kornberg L (2000): Expression of matrix metalloproteinases in laryngeal and pharyngeal squamous cell carcinoma: A quantitative analysis. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 122 (5): 712-716
96. Miyajima Y, Nakano R, Morimatsu M (1995): Analysis of expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 in hypopharyngeal squamous cell carcinoma by in situ hybridization. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 104 (9 Pt 1): 678-684

97. Pacheco MM, Kowalski LP, Nishimoto IN, Brntani MM (2002): Differential expression c-jun and c-fos mRNAs in squamous cell carcinomas of the head and neck: associations with uPA, gelatinase B, and matrilysin mRNAs. *Head Neck*. 24 (1): 24-32
98. Riedel F, Gotte K, Schwalb J, Bergler W, Hormann K (2000): Expression of 92-kDa type IV collagenase correlates with angiogenic markers and poor survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J. Oncol.* 17 (6): 1099-1105
99. Shima I, Sasaguri Y, Kusukawa J, Yamana H, Fujita H, Kakegawa T, Morimatsu M (1992): Production of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-3 related to malignant behavior of esophageal carcinoma. A clinicopathologic study. *Cancer* 70 (12): 2747-2753
100. Kusukawa J, Sasaguri Y, Shima I, Kameyama T, Morimatsu M (1993): Expression of matrix metalloproteinase-2 related to lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. A clinicopathologic study. *Am. J. Clin. Pathol.* 99 (1): 18-23
101. Kawata R, Shimada T, Maruyama S, Hisa Y, Takenaka H, Murakami Y (2002): Enhanced production of matrix metalloproteinase-2 in human head and neck carcinomas is correlated with lymph node metastasis. *Acta Otolaryngol.* 122 (1): 101-106
102. Kawamata H, Uchida D, Hamano H, Kimura-Yanagawa T, Nakashiro KI, Hino S, Omotehara F, Yoshida H, Sato M (1998): Active-MMP-2 in cancer cell nests of oral cancer patients: correlation with lymph node metastasis. *Int. J. Oncol.* 13 (4): 699-704
103. Charous SJ, Stricklin GP, Nanney LB, Nettekville JL, Burkey BB (1997): Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in head and neck squamous cell carcinoma. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 106 (4): 271-278
104. Xu YP, Zhao XQ, Sommer K, Moubayed P (2003): Correlation of matrix metalloproteinase-2, -9, tissue inhibitor-1 of matrix metalloproteinase and CD44 variant 6 in head and neck cancer metastasis. *J. Zhejiang Univ. Sci.* 4 (4): 491-501

105. Ikebe T, Shinohara M, Takeuchi H, Beppu M, Kurahara S, Nakamura S, Shirasuna K (1999): Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase in tumor tissues correlates with the invasiveness of oral cancer. *Clin. Exp. Metastasis* 17 (4): 315-323
106. Kurahara S, Shinohara M, Ikebe T, Nakamura S, Beppu M, Hiraki A, Takeuchi H, Shirasuna K (1999): Expression of MMPS, MT-MMP, and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumor invasion and metastasis. *Head Neck* 21 (7): 627-628
107. Dünne AA, Sesterhenn A, Gerisch A, Teymoortash A, Kuropkat C, Werner JA (2003): Expression of MMP-2, -9 and -13 in cell lines and fresh biopsies of squamous cell carcinomas of the upper aerodigestive tract. *Anticancer Res.* 23 (3B): 2233-2239
108. Hong SD, Hong SP, Lee JI, Lim CY (2000): Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oral squamous cell carcinomas with regard to the metastatic potential. *Oral Oncol.* 36 (2): 207-213
109. Johansson N, Airola K, Grenman R, Kariniemi AL, Saarialho-Kere U, Kahari VM (1997): Expression of collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Am. J. Pathol.* 151 (2): 499-508
110. Gottschlich S, Koch R, Gorogh T, Holtmeyer C, Hoffmann M, Rudert H, Maune S (2002): Collagenase 3 mRNA expression in squamous epithelial carcinomas of the oropharynx. *HNO* 50 (1): 43-47
111. Cazorla M, Hernandez L, Nadal A, Balbin M, Lopez JM, Vizoso F, Fernandez PL, Iwata K, Cardesa A, Lopez-Otin C, Campo E (1998): Collagenase-3 expression is associated with advanced local invasion in human squamous cell carcinomas of the larynx. *J. Pathol.* 186 (2): 144-150
112. Huachuan Z, Xiaohan L, Jimmin S, Qian C, Yan X, Yinchang Z (2003): Expression of matrix metalloproteinase-7 involving in growth, invasion, metastasis and angiogenesis of gastric cancer. *Chin. Med. Sci. J.* 18 (2): 80-86



113. Yamamoto H, Adachi Y, Itoh F, Iku S, Matsumo K, Kusano M, Arimura Y, Endo T, Hinoda Y, Hosokawa M, Imai K (1999): Association of matrilysin expression with recurrence and poor prognosis in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 59 (14): 3313-3316
114. Yamashita K, Mori M, Shiraishi T, Shibuta K, Sugimachi K (2000): Clinical significance of matrix metalloproteinase-7 expression in esophageal carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 6 (3): 1169-1174
115. O-Charoenrat P, Rhys-Evans PH, Eccles SA (2001): Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 127 (7): 813-20
116. Dalberg K, Eriksson E, Enberg U (2000): Gelatinase A, membrane type 1 matrix metalloproteinase, and extracellular matrix metalloproteinase inducer mRNA expression: correlation with invasive growth of breast cancer. *World J. Surg.* 24: 334-340
117. Sun J, Hemler ME (2001): Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD 147 / extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions. *Cancer Res.* 61: 2276-2281
118. Sutinen M, Kainulainen T, Hurskainen T, Vesterlund E, Alexander JP, Overall CM, Sorsa T, Salo T (1998): Expression of matrix metalloproteinases (MMP-1 and -2) and their inhibitors (TIMP-1, -2 and -3) in oral lichen planus, dysplasia, squamous cell carcinoma and lymph node metastasis. *Brit. J. Cancer* 77 (12): 2239-2245
119. Langyel E, Gum R, Juarez J, Clayman G, Seiki M, Sato H, Boyd D (1995): Induction of M(r) 92,000 type IV collagenase expression in a squamous cell carcinoma cell lines by fibroblasts. *Cancer Res.* 55 (4): 963-967
120. Pyke C, Ralfkiaer E, Huhtala P (1992): Localization of messenger RNA for Mr 72,000 and 92,000 type IV collagenases in human skin cancers by in situ hybridization. *Cancer Res.* 52: 1336-1341

121. Katori H, Baba Y, Imagawa Y, Nishimura G, Kagesato Y, Takagi E, Ishii A, Yanoma S, Maekawa R, Yoshioka T, Nagashima Y, Kato Y, Tsukuda M (2002): Reduction of in vivo tumor growth by MMI-166, a selective matrix metalloproteinase inhibitor, through inhibition of tumor angiogenesis in squamous cell carcinoma cell lines of head and neck. *Cancer Lett.* 178 (2): 151-159
  
122. O-Charoenrat P, Rhys-Evans P, Eccles S (2002): A synthetic matrix metalloproteinase inhibitor prevents squamous carcinoma cell proliferation by interfering with epidermal growth factor receptor autocrine loops. *Int. J. Cancer* 100 (5): 527-533

## 8. Anhang

### Ergebnistabellen

Die hier im Anschluss dargestellten Tabellen zeigen die Werte der semiquantitativ ausgewerteten originalen Ergebnisaufnahmen der Versuchsreihen, sowie die in den Untersuchungen verwendeten klinisch-pathologischen Parameter der Patienten, von denen die jeweiligen Tumorproben stammen.

Tabelle 7: semiquantitativ berechnete Signalstärken der exprimierten MMP- und TIMP-RNA in allen untersuchten Tumorgewebeproben

	<b>MMP-2</b>	<b>MMP-7</b>	<b>MMP-9</b>	<b>MMP-13</b>	<b>TIMP-1</b>	<b>TIMP-2</b>	<b>TIMP-3</b>
<b>1</b>	20	20	0	100	150	100	50
<b>2</b>	5	100	100	25	150	50	25
<b>3</b>	25	150	50	150	100	50	50
<b>4</b>	0	50	0	100	100	50	25
<b>5</b>	0	0	150	100	100	150	100
<b>6</b>	25	0	100	50	100	50	50
<b>7</b>	0	0	100	50	100	50	25
<b>8</b>	50	0	50	200	150	100	50
<b>9</b>	25	0	50	150	100	100	50
<b>10</b>	50	0	200	150	100	100	50
<b>11</b>	0	0	50	50	100	100	50
<b>12</b>	0	0	0	50	100	50	50
<b>13</b>	50	100	50	100	100	100	50
<b>14</b>	50	0	50	100	100	50	25
<b>15</b>	25	25	25	50	100	100	25
<b>16</b>	25	25	100	200	100	50	50
<b>17</b>	50	200	50	25	50	100	50
<b>18</b>	0	0	0	150	150	100	25
<b>19</b>	25	50	25	200	25	50	25

20	25	200	0	100	100	50	50
21	25	25	50	150	100	50	50
22	50	0	200	0	50	100	50
23	25	50	50	50	100	50	25
24	0	25	50	100	50	50	25
25	0	0	200	150	150	100	50
26	25	50	0	100	100	100	50
27	25	50	100	200	100	100	50
28	25	50	50	100	100	100	25
29	0	0	0	150	100	100	50
30	50	0	50	100	100	100	50

Tabelle 8: Klinisch-pathologische Parameter der Patienten, von denen die jeweiligen Tumorgewebeproben stammen

	<b>Gesch.</b>	<b>Alter</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>	<b>G</b>	<b>Lok.</b>
<b>1</b>	m	58	2	2	0	2	Hypopharynx
<b>2</b>	m	64	2	2	1	3	Larynx
<b>3</b>	m	57	2	0	0	2	Oropharynx
<b>4</b>	m	64	2	0	0	3	Hypopharynx
<b>5</b>	m	43	2	0	1	3	Metastase
<b>6</b>	m	61	3	3	0	2	Metastase
<b>7</b>	m	68	3	0	1	3	Metastase
<b>8</b>	m	53	3	0	0	2	Oropharynx
<b>9</b>	m	44	3	2	0	2	Hypopharynx
<b>10</b>	m	44	3	2	0	3	Metastase
<b>11</b>	m	55	3	2	0	3	Hypopharynx
<b>12</b>	m	55	3	2	0	4	Metastase
<b>13</b>	m	56	3	2	0	3	Larynx
<b>14</b>	m	61	3	2	0	2	Oropharynx

<b>15</b>	m	48	3	2	0	2	Hypopharynx
<b>16</b>	m	64	3	0	0	2	Hypopharynx
<b>17</b>	m	45	3	2	0	3	Hypopharynx
<b>18</b>	m	43	3	0	0	2	Oropharynx
<b>19</b>	m	67	3	0	0	2	Larynx
<b>20</b>	w	47	4	0	0	2	Oropharynx
<b>21</b>	m	59	4	2	0	2	Hypopharynx
<b>22</b>	m	68	4	2	0	2	Oropharynx
<b>23</b>	w	55	4	2	x	3	Oropharynx
<b>24</b>	m	57	4	2	0	1	Oropharynx
<b>25</b>	m	51	4	2	0	2	Hypopharynx
<b>26</b>	w	61	4	2	0	2	Hypopharynx
<b>27</b>	m	50	4	2	0	2	Hypopharynx
<b>28</b>	m	49	4	0	0	3	Larynx
<b>29</b>	m	43	4	2	0	3	Hypopharynx
<b>30</b>	m	53	x	2	0	x	CUP

Tabelle 9: Signalstärken der exprimierten MMP- und TIMP-RNA in den untersuchten Zelllinien

	<b>MMP-2</b>	<b>MMP-7</b>	<b>MMP-9</b>	<b>MMP-13</b>	<b>TIMP-1</b>	<b>TIMP-2</b>	<b>TIMP-3</b>
<b>Kera.</b>	0	0	25	0	150	100	50
<b>1</b>	25	100	0	100	100	50	50
<b>2</b>	25	100	0	50	100	100	50
<b>3</b>	25	100	25	100	100	100	50
<b>4</b>	0	25	25	100	100	100	25
<b>5</b>	0	25	25	0	100	50	25
<b>6</b>	0	0	0	50	100	100	50
<b>7</b>	0	25	50	50	100	100	0

Tabelle 10: klinisch-pathologische Parameter der Ursprungsgewebe der betrachteten Tumorzelllinien

	<b>Klass.</b>	<b>Gesch.</b>	<b>Alter</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>	<b>G</b>	<b>Lok.</b>
<b>1</b>	UT SCC 24 B	m	41	2	0	0	2	Metastase
<b>2</b>	UT SCC 16 B	w	77	3	1	0	3	Metastase
<b>3</b>	UT SCC 24 A	m	41	2	0	0	2	Oropharynx
<b>4</b>	UT SCC 19 B	m	44	4	0	0	2	Larynx
<b>5</b>	UT SCC 16 A	w	77	3	1	0	3	Oropharynx
<b>6</b>	UM SCC 3	w	73	1	0	0	2	Nasopharynx
<b>7</b>	UM SCC 27	m	62	1	0	0	2	Oropharynx

## Abkürzungsverzeichnis

bp	= Basenpaar
BPE	= bovine pituitary extract Rinderhypophysenextrakt
cDNA	= complementary desoxyribonucleic acid komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DMEM	= Dulbecco's minimal essential medium Dulbecco's minimal-essentielles Medium
EDTA	= ethylene diamine tetraacetic acid Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	= epidermal growth factor epidermaler Wachstumsfaktor
EZM	= Extrazellulärmatrix
FGF	= fibroblast growth factor Fibroblastenwachstumsfaktor
FCS	= fetal calf serum fetales Kälberserum
h	= hora
IU	= international unit Internationale Einheit
kDa	= kilo Dalton
M	= Mol pro Liter
MEM	= minimal essential medium
MMP	= Matrix-Metalloproteinase
MRA	= mycoplasma removal agent Mycoplasmen-entfernende Substanz
n	= Anzahl
p	= Korrelationskoeffizient
PBS	= phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung
RNA	= ribonucleic acid, Ribonukleinsäure

RT-PCR	= reverse transcriptase polymerase chain-reaction Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
S	= Signalstärke
S <sub>d</sub>	= durchschnittliche Signalstärke
TEA	= Tris-EDTA-Eisessig-Puffer
TIMP	= tissue inhibitor of matrix-metalloproteinase, Gewebeinhibitor der Matrix-Metalloproteinase
TGF	= tumor growth factor, Tumorstufungsfaktor
TNF	= Tumornekrosefaktor
U/min	= Umdrehungen pro Minute
UM	= University of Michigan
UT	= University of Turku
UV-Licht	= Ultraviolettes Licht
V	= Volt
VEGF	= vascular endothelial growth factor Gefäßendothelwachstumsfaktor



## 9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. J. A. Werner, Direktor des Zentrums für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Philipps-Universität Marburg, für die Anregung zur intensiven Auseinandersetzung mit dem Thema, die Freiheit bei der genauen Formulierung und schließlich die Überlassung des gewählten Themas. Er stellte den Arbeitsplatz sowie alle notwendigen Materialien zur Verfügung, beriet mich wissenschaftlich und förderte mich stetig. Ich danke ihm für die Ermutigung zur und Hilfe bei der Erstellung einer Präsentation dieser Ergebnisse im Rahmen eines wissenschaftlichen Kongresses. Mein ganz besonders herzlicher Dank gilt der außergewöhnlich wohlwollenden Betreuung und Geduld, dem großen persönlichen Engagement in der Korrektur und der stetigen Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht hätte fertiggestellt werden können.

Frau Priv.-Doz. Dr. med. A. A. Dünne und Herrn Dr. med. I. O. Rathcke ganz herzlichen Dank für die unermüdliche Hilfe in allen praktischen und theoretischen Fragen, die stets konstruktive Kritik und die wissenschaftliche Betreuung. Sie führten mich mit großem persönlichen Engagement in das wissenschaftliche Arbeiten ein und ermöglichten mir so die Verwirklichung dieser Arbeit.

Herrn Dr. T. Carey (UM-SCC) und Herrn Dr. R. Grénman (UT-SCC) für die freundliche Bereitstellung der in dieser Arbeit verwendeten Plattenepithelkarzinomzelllinien.

Frau R. Peldszus und Frau G. Sadowski für die technische Assistenz und vielfältige Hilfe. Ihnen und dem ganzen Team des Labors für Experimentelle Onkologie des Zentrums für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten der Philipps-Universität Marburg vielen Dank für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre – es war schön, dort zu arbeiten.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Zentrums für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Philipps-Universität Marburg sowie des Instituts für Molekularbiologie und Tumorforschung.

Frau Dr. med. N. Pletsch und Frau Pia Koch für ihre vielfältige Unterstützung.

Frau K. Schultheis für ihre spätabendlichen Fortbildungen in Präsentationserstellung und Bildbearbeitung.

Nicht zuletzt und ganz besonderen Dank meinen Eltern und meinem Bruder Christoph für ihre stetige und liebevolle Hilfe und Ermutigung bei dieser Arbeit wie im Verlauf des ganzen Medizinstudiums.

## 10. Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren und Universitätsdozenten

Adamkiewicz	Heeg	Moll
Arnold	Hofmann	Müller
Aumüller	Joseph	Mutters
Basler	Kern	Oertel
Baum	Klenk	Remschmidt
Berndt	Klose	Renz
Bertalanffy	Krieg	Riße
Cetin	Kretschmer	Rothmund
Christiansen	Kroh	Schmidt
Czubayko	Kroll	Schüffel
Daut	Kuhn	Seitz
Feuser	Lill	Seyberth
Geuss	Löffler	Weihe
Griss	Löw	Werner
Happle	Mandrik	Wulf
Hasilik	Mennel	



