

Aus dem Medizinischen Zentrum für  
Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. J. A. Werner  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH  
Standort Marburg



**Die invasive Front von Plattenepithelkarzinomen  
des oberen Aerodigestivtraktes exprimiert MMP-9  
und ist eine bevorzugte Lokalisation  
von Tumorstammzellkandidaten**

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

Carolina Sterz  
aus Darmstadt

Marburg, 2011

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 3.2.2011

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Herr Prof. Dr. R. Mandic

Korreferent: Herr Prof. Dr. H.-H. Heidtmann

Meinen Eltern

In Liebe und Dankbarkeit

# Inhalt

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Plattenepithelkarzinome des oberen Aerodigestivtraktes	1
1.2	Allgemeine Tumorbiologie	2
1.3	Stammzellen	3
1.3.1	Die Tumorstammzell Hypothese	4
1.3.2	Eigenschaften von Tumorstammzellen	5
1.3.3	Tumorstammzell Marker	6
1.4	Metastasierung	7
1.5	Matrix Metalloproteinasen (MMPs)	8
1.5.1	Physiologische Bedeutung der MMPs	10
1.5.2	Struktureller Aufbau der MMPs	11
1.5.3	Regulation der MMP Aktivität	13
1.5.4	Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL)	14
1.5.5	Pathophysiologische Bedeutung von MMPs	15
1.5.6	MMP-2 und -9 in Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes	16
1.6	Zielsetzung	16
<b>2</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>17</b>
2.1	Zelllinien	17
2.2	Gewebeproben	18
2.3	Antikörper und Standards	19
2.3.1	Primäre Antikörper für immunologische Nachweisverfahren	19
2.3.2	Sekundäre Antikörper	19
2.3.3	Standards	20
2.4	Medien	20
2.4.1	Medien für die Zellkultur	20
2.5	Allgemeine Puffer und Lösungen	20
2.6	Verwendete Chemikalien	25
2.7	Geräte und Materialien	27
<b>3</b>	<b>METHODEN</b>	<b>28</b>
3.1	Zellkultur	28
3.1.1	Allgemeine Zellkulturbedingungen	28
3.1.2	Passagieren von Zellen (Splitting)	28
3.1.3	Einfrieren von Zellen	28
3.1.4	Auftauen von Zellen	29

3.1.5	Ermittlung der Zellzahl .....	29
3.2	Herstellung von Zelllysaten .....	29
3.3	Proteinbestimmung nach Bradford .....	30
3.4	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	31
3.5	Western Blot Analyse .....	32
3.6	Zymographie .....	33
3.6.1	Auswertung der Zymographie .....	34
3.7	Immunhistochemie .....	35
3.7.1	Fixierung und Einbettung von Gewebe .....	35
3.7.2	Immunhistochemische Färbungen .....	35
3.8	Immunzytochemische Färbungen nach Co-Kultur von Tumorzellen und Fibroblasten .....	36
3.9	Statistische Auswertung .....	37
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>38</b>
4.1	Untersuchung stammzelltypischer Marker in normaler Mukosa und HNSCC Tumorgewebe .....	38
4.1.1	Stammzellmarker in normaler Mukosa.....	38
4.1.2	Stammzellmarker in Tumorgewebe .....	39
4.1.3	Expression des Basalmembran-typischen Kollagen-IV .....	40
4.2	Kolokalisation von CD44 und MMP-9 bei Tumorzellen der invasiven Front.....	41
4.2.1	Vergleich Immunhistochemischer Färbungen für CD44 und MMP-9.....	41
4.2.2	Immunfluoreszenz Färbung .....	42
4.3	Koexpression von CD44 und MMP-9 in HNSCC Gewebeproben .....	44
4.4	Gelatinolytische Aktivität in HNSCC Gewebeproben .....	45
4.4.1	Gelatin Zymographie .....	45
4.4.2	MMP-9 aber nicht MMP-2 korreliert mit der gelatinolytischen Aktivität .....	46
4.5	Expression und Lokalisation von MMP-9 und NGAL .....	47
4.5.1	Korrelation der MMP-9 und NGAL Proteinexpression .....	48
4.5.2	Kolokalisation von NGAL und MMP-9 im Bereich der Tumorfront.....	48
4.5.3	Immunfluoreszenz Doppelfärbung auf MMP-9 und NGAL nach Kokultur von Fibroblasten und Tumorzellen.....	50
4.6	Vergleich des Invasivitätsverhaltens <i>in vivo</i> versus <i>in vitro</i> .....	52
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>53</b>
5.1	Die Tumorstammzell Hypothese .....	53
5.2	Tumorstammzellen in HNSCC Tumoren .....	54
5.3	CD44 positive Tumorstammzellen im Bereich der invasiven Tumorfront.....	57
5.4	Kolokalisation von CD44 und MMP-9 im Bereich der Tumor-Stroma-Grenze.....	57
5.5	Zusammenhang zwischen gelatinolytischer Aktivität und MMP Expression .....	59

5.6	Analyse von MMP-9 Banden.....	60
5.7	NGAL als regulierender Faktor von MMP-9 in HNSCC Tumoren .....	61
5.8	Unterschiede zwischen HNSCC Geweben und Zelllinien.....	61
5.9	Therapeutische Aussichten .....	62
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURANGABEN .....</b>	<b>66</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>81</b>
8.1	Stadien und TNM Einteilung von HNSCC Tumoren .....	81
8.2	Abkürzungsverzeichnis .....	83
8.3	Abbildungsverzeichnis .....	85
8.4	Tabellenverzeichnis .....	86
8.5	Vorträge und Publikationen .....	87
8.6	Verzeichnis der akademischen Lehrer .....	88
8.7	Danksagung.....	89

# **1 EINLEITUNG**

## **1.1 Plattenepithelkarzinome des oberen Aerodigestivtraktes**

Karzinome des Kopf- und Halsbereiches gehören mit über 500.000 Neuerkrankungen im Jahr weltweit zu den fünf häufigsten Malignomerkrankungen (Parkin et al. 1999). Die Inzidenz der Erkrankung ist in Deutschland steigend (Gellrich et al. 2004).

Unter Karzinomen des Kopf- und Halsbereiches wird eine Gruppe von Tumoren mit bestimmten Lokalisationen zusammengefasst. Zu diesen Lokalisationen zählen Mund- und Nasenhöhle, die Speicheldrüsen, der Pharynx, bestehend aus Hypo-, Oro- und Nasopharynx sowie der Larynx, der sich wiederum in supra-, sub- und glottischen Raum untergliedert. Neunzig Prozent der malignen Tumore dieser Region sind Plattenepithelkarzinome, seltener finden sich Adenokarzinome, Sarkome oder Speicheldrüsentumore.

Nikotin und Tabak sind die führenden Risikofaktoren der Erkrankung (Sankaranarayanan et al. 1998, Spitz et al. 1994), jedoch spielen auch Alter und Geschlecht des Patienten, sowie Sonnenexposition bei z.B. Lippenkarzinomen eine wichtige Rolle. Menschen mit Verwandten ersten Grades, die bereits an einem Tumor des Kopf-, Hals Bereiches erkrankt sind, haben ein höheres Risiko ein solches Karzinom zu entwickeln als Menschen ohne familiäre Prädisposition (Foulkes et al. 1995, Copper et al. 1995). Weiterhin werden diätetische Faktoren, wie ein verminderter Konsum an Obst und Gemüse, sowie virale Infektionen, insbesondere eine Assoziation mit Humanen Papilloma Viren (HPV), genauer mit dem Subtyp 16, als mit ursächlich angesehen (Farrow et al. 1998, Gillison et al. 2000).

Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen dem 50. und 65. Lebensjahr, wobei Männer wesentlich häufiger betroffen sind als Frauen (Gellrich et al. 2004). Neben regionalen Unterschieden in der Prävalenz von Plattenepithelkarzinomen, sind je nach Land auch unterschiedliche Inzidenzen zu verzeichnen. Im Allgemeinen steigt die Zahl der Neuerkrankungen in Ländern wie Zentral- und Osteuropa, Skandinavien, Kanada, Japan und Australien an, während in Indien, Hong Kong, Brasilien und bei weißen US Amerikanern fallende Zahlen beobachtet werden (Sankaranarayanan et al. 1998).

Symptomatisch fallen die im angloamerikanischen Sprachgebrauch auch als Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) bezeichneten Tumore durch Fremdkörpergefühl, Schwellungen im Hals- und Rachenbereich sowie Blutungen auf. Weiterhin kann es zu Schluck- und Atembeschwerden, Heiserkeit, Stimm- sowie Hautveränderungen und Schmerzen kommen. Die Einteilung der Tumore erfolgt nach dem TNM System und der Stadieneinteilung des American Joint Committee on Cancer (AJCC) (siehe Tabelle 6 und Tabelle 7 im Anhang). Die Karzinome zeichnen sich durch invasives und aggressiv infiltrierendes Wachstum sowie eine frühe Metastasierung aus (Moisa et al. 1991). Mehr als 50% der Patienten weisen bereits bei Diagnosestellung ein regional fortgeschrittenes Tumorstadium auf.

Es konnte gezeigt werden, dass die allgemeine Überlebensrate im Wesentlichen von der Beteiligung der regionalen Lymphknoten abhängt. Deshalb sind Früherkennung sowie rechtzeitige Therapie der Erkrankung äußerst wichtig. Das primäre Ziel der Therapie liegt in einer möglichst vollständigen operativen Entfernung der Karzinome, wobei, je nach Ausbreitung des Tumors, eine Entfernung der axillären Lymphknoten erfolgt, sowie wenn nötig eine adjuvante Bestrahlung. Bei inoperablem oder sehr weit fortgeschrittenem Tumorwachstum wird alternativ eine Radiatio mit kombinierter Chemotherapie durchgeführt. Die Prognose hängt unter anderem von der Infiltration der Tumorzellen in angrenzende Strukturen, der Lymphknotenbeteiligung und der Absiedelung in entfernte Organe (Fernmetastasierung) ab.

## **1.2 Allgemeine Tumorbilogie**

Maligne Zellen zeichnen sich sowohl durch eine erhöhte Teilungsfähigkeit, als auch durch das Vorliegen fehlerhafter genetischer Information aus. Ähnlich wie embryonale Zellen, bzw. Zellen des normalen regenerationsfähigen Gewebes, besitzen Tumorzellen eine stark ausgeprägte Fähigkeit zur Proliferation und zeigen autonomes Wachstum. Physiologischer Weise kommt eine erhöhte Zellproliferationsrate im Rahmen von Wundheilung, in Wachstumsprozessen und im Zuge der normalen Gewebeerneuerung vor.

Pathologisch birgt unkontrollierte Zellvermehrung eine große Gefahr für den Organismus. Wenn einzelne Zellen ihre eigentliche Funktion verlieren, oder sich die genetische Sequenz einer Zelle verändert, können diese mutierten Genotypen zu neuen, abnormen Phänotypen führen. Dies kann eine Veränderung oder einen Verlust der eigentlichen Zellfunktion mit sich bringen, der oft mit der gewöhnlichen Gewebefunktion nicht mehr vereinbar ist. Liegen zusätzlich Veränderungen im Zellzyklus und im Wachstumsablauf vor, kann es zu unkontrollierter und ungehemmter Zellproliferation kommen. Tumorzellen haben zudem die besondere Eigenschaft, sich vor Zellen des Immunsystems zu verstecken bzw. Schutzmechanismen gegen diese zu entwickeln, sodass sie in ihrer Proliferation ungestört sind. Es handelt sich also bei Tumorzellen um Zellen, die aggressiver und invasiver wachsen als normale Zellen, die jedoch in der Regel nicht fähig sind, die physiologische Zellfunktion des Ursprungsgewebes auszuführen.

Je nach Wachstumsverhalten und Aggressivität können Tumore histopathologisch in gutartige und bösartige Tumore eingeteilt werden. Während benigne Tumore nur lokal wachsen und nicht in umliegende Gewebe infiltrieren, können maligne Tumore sowohl in angrenzende Gewebe eindringen als auch in entfernte Gewebe streuen (Metastasierung) (Weinberg 2007).

### **1.3 Stammzellen**

In Bezug auf zellbiologische Eigenschaften von tumorösem Gewebe hat sich im Laufe der letzten Jahre eine neue Hypothese durchgesetzt, welche die Existenz so genannter Tumorstammzellen (Cancer Stem Cells - CSCs) postuliert.

Analog zu hämatologischen Stammzellen des Knochenmarks kannte man von normalem, gesundem Gewebe, dass auch hier Zellen mit Stammzell Eigenschaften zu finden sind. Diese besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, wobei sich jede der Stammzellen zu unterschiedlichen Zellarten ausdifferenzieren kann. Interessanterweise hat sich diese Stammzellhypothese nicht nur bei gesunden Geweben durchgesetzt, sondern wurde auch auf maligne entartete Gewebe ausgedehnt. Es ist bekannt, dass in

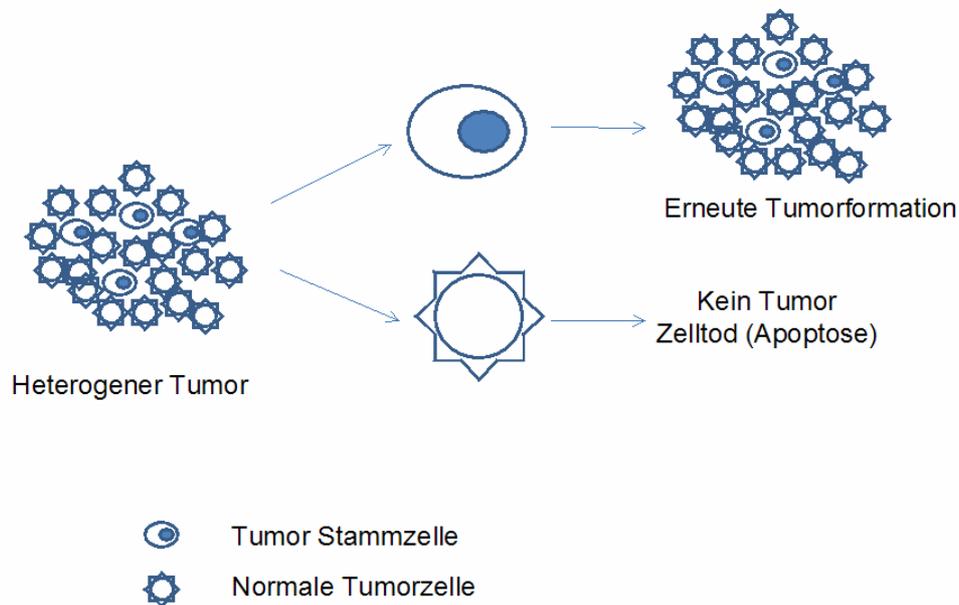
verschiedenen Gewebetumoren ebenfalls Zellen mit Stammzeleigenschaften zu finden sind, welche fähig sind den Phänotyp des ursprünglichen Tumors reproduzieren zu können.

Die Gesamtheit der sogenannten Tumorstammzellen stellt mit weniger als zehn Prozent der Gesamttumorzellzahl nur eine kleine Population dar, sie scheint jedoch für zahlreiche Invasions- und Wachstumsprozesse sowie für Chemotherapieresistenzen von entscheidender Bedeutung zu sein.

### **1.3.1 Die Tumorstammzell Hypothese**

Virchow und Paget stellten bereits im 19. Jahrhundert die Vermutung der Existenz stammzellähnlicher Zellen in malignem Gewebe auf (Virchow 1855, Paget 1889). Aufgrund des Fehlens spezifischer Marker dieser Zellen und eingeschränkter technischer Möglichkeiten, dauerte es ein ganzes Jahrhundert bis die vermuteten Tumorstammzellen erstmals bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie sicher nachgewiesen und isoliert werden konnten (Bonnet und Dick 1997). Daraufhin war es möglich nicht nur für andere Leukämie Formen (Eaves et al. 1993, Jamieson et al. 2004), sondern auch für Gewebetumoren, wie zum Beispiel Mamma- (Al-Hajj et al.), Pankreas- (Li et al. 2007), Prostata- (Gu et al. 2007), ZNS- (Singh et al. 2004) und Kolonkarzinome (Ricci-Vitiani et al. 2007) und auch für Karzinome des Kopf-, Halsbereiches (Prince et al. 2007), die Existenz von Tumorstammzellen nachzuweisen.

Die Tumorstammzell Hypothese wird von der Ansicht gestützt, dass die meisten Tumore aus einzelnen Zellen hervorgehen, aus diesen wenigen Zellen jedoch ein heterogenes Gewebe entsteht, in dem verschiedenste Differenzierungsstufen und Zelltypen vorhanden sind. Ausserdem konnte für solide Tumore gezeigt werden, dass nur wenige der Tumorzellen in der Lage sind, neue Tumorzellkolonien zu bilden. Der grösste Teil der Tumorzellen besitzt diese Fähigkeit nicht (Fidler und Kripke 1997). So konnten bei vom Primärtumor entfernten Stellen disseminierte Tumorzellen nachgewiesen werden, ohne dass diese jemals manifeste Metastasen bildeten (Salsbury 1975).



**Abbildung 1. Die Tumor Stammzell Hypothese schematisch**

In diesem vereinfachten Schema wird die Fähigkeit von Tumorstammzellen zur Selbstreproduktion und Tumorformation aus einzelnen Zellen veranschaulicht. Tumorzellen ohne Stammzeleigenschaften sind hierzu nicht in der Lage.

### 1.3.2 Eigenschaften von Tumorstammzellen

Tumorstammzellen werden, ähnlich den hämatologischen Stammzellen des Knochenmarks, besondere Eigenschaften zugesprochen. Zum einen ist dies die Fähigkeit zur Selbst-Reproduktion, zum anderen die Möglichkeit zur weiteren Differenzierung. Es hat sich gezeigt, dass sie eine hohe Proliferationsrate haben und auch in einer völlig neuen Umgebung zu expansivem Wachstum führen können (Reya et al. 2001). Auch konnten verschiedene Signaltransduktionswege aufgezeigt werden, die typischerweise die Stammzellentwicklung des hämatopoetischen Systems steuern, wobei insbesondere der sogenannte 'Notch-', 'Sonic hedgehog'- (Shh) sowie 'Wnt-Signaltransduktionsweg' eine wesentliche Rolle bei der Selbsterneuerung der Stammzellen und der Entwicklung von Vorläuferzellen zu spielen scheinen (Reya et al. 2001). Dysregulationen bzw. Mutationen in diesen besagten Signaltransduktionswegen können die Onkogenese fördern und konnten mit einer Vielzahl von Tumoren assoziiert werden (Chan EF et al. 1999, Gailani und Bale 1999, Ellisen et al. 1999).

Molekularbiologisch zeichnen sich Tumorstammzellen durch eine vermehrte Expression anti-apoptotischer Proteine (Monzani et al. 2007) bzw. Expression Resistenz fördernder Gene aus (Frank et al. 2005, Lou et al. 2007). Dieses spezifische Protein-Expressionsmuster führt zu verstärkter Therapieresistenz. Eine Hemmung der Tumorstammzellen würde daher bedeuten, dass der ursprüngliche Tumor seine Reproduktionsfähigkeit verliert und somit das invasive Potential des Tumors minimiert wird (Clarke et al. 2006).

### **1.3.3 Tumorstammzell Marker**

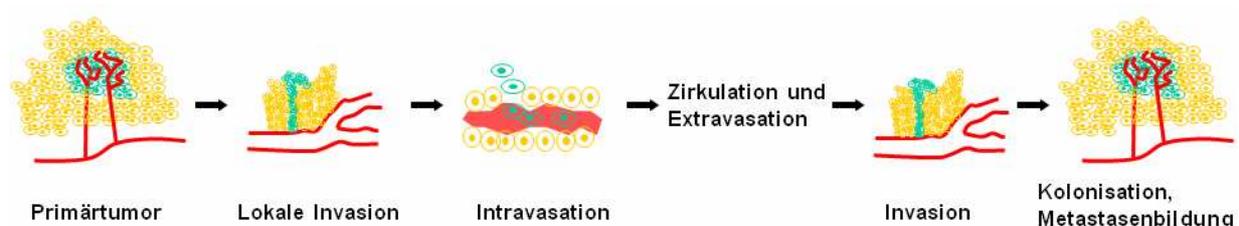
Von wesentlicher Bedeutung für eine mögliche Ausschaltung der Tumorstammzellen ist ihre Identifizierung mittels zellspezifischer Oberflächenmarker. Die anfängliche Isolierung der Tumorstammzellen wurde mittels eben dieser Marker möglich. Als für HNSCC und andere Tumore bedeutsam, zeigte sich insbesondere der Hyaluronsäure Rezeptor CD44 (Prince et al. 2007). Dieser wird von einem einzigen Gen kodiert, besteht aber aus einer polymorphen Gruppe transmembranöser Glykoproteine (Aruffo 1996). Durch alternatives Splicing und posttranslationale Modifikationen können ca. 20 verschiedene Unterformen von CD44 entstehen. Ursprünglich wurde CD44 als Rezeptor der Extrazellulären Matrix (ECM) entdeckt und ist an diversen Signaltransduktionswegen beteiligt (Trowbridge et al. 1982). Über seine Fähigkeit, Verbindung zur Extrazellulären Matrix herzustellen, ist CD44 für die Organintegrität von großer Bedeutung. Ausserdem dient CD44 als Korezeptor für verschiedene transmembranöse Proteine, wie zum Beispiel Matrixmetalloproteinasen oder auch Rezeptor Tyrosin Kinasen der ERB Familie (Mack und Gires 2008).

Gesteigertes Interesse an CD44 kam auf, als eine verstärkte CD44 Expression mit Tumorwachstum und Metastasierung in Verbindung gebracht wurde und man einen Zusammenhang zwischen CD44 und Tumorstammzellen aufdeckte. Die CD44 gesteuerte Tumorprogression kommt über Aktivierung bestimmter Signaltransduktionswege zustande, die für das Überleben der Zelle wichtig sind (Bourguignon et al. 2003).

Für das Mammakarzinom (Al-Hajj et al. 2003), das Kolonkarzinom (Dalerba et al. 2007), und für HNSCC konnte eine verstärkte CD44 Expression in Tumorstammzellkandidaten im Gegensatz zu nicht onkogenen Karzinomzellen nachgewiesen werden. In Bezug auf die Tumorstammzell Hypothese scheinen in HNSCC neben CD44 ausserdem Cytokeratin 14 (CK14), die Aldehydehydrogenase 1 (ALDH-1) (Chen et al. 2009) und Bmi1 (Valk-Lingbeek et al. 2004, Graziano et al. 2008) eine große Rolle zu spielen. Bei Bmi1 handelt es sich um ein Onkogen, das durch Hemmung der Transkription Einfluss auf die Regulation des Zellzyklus nimmt (Liu J et al. 2009). Es konnte gezeigt werden, dass Tumorstammzellkandidaten in HNSCC, wie auch in vielen anderen Tumoren, Bmi1 überexprimieren (Ailles und Prince 2009).

## 1.4 Metastasierung

Die einzelnen Schritte einer Tumorzelle auf dem Weg vom Primärtumor bis zur Gründung einer neuen Zellkolonie in entfernt liegenden Geweben, können nach Fidler in der sogenannten Invasions-Metastasierungs-Kaskade zusammengefasst werden (Fidler 2003).



### Abbildung 2. Invasions-Metastasierungs-Kaskade

Die Invasions-Metastasierungs-Kaskade umfasst sechs Schritte. Ausgehend von der Absiedelung einer Tumorzelle von ihrem Zellverband, bis zur Kolonisation und Formation einer Metastase. (Modifiziert nach Weinberg 2007, Biology of cancer S. 591)

Am Anfang steht hierbei der Durchbruch durch die Basalmembran und damit die Verwandlung eines *In situ* Karzinoms in einen invasiv wachsenden, malignen Tumor. Anschliessend treten die Tumorzellen durch Intravasation in Blutgefäße ein und können

so mit dem normalen Blutfluss alle Organe und Gewebe des Körpers erreichen. Durch Extravasation treten die Zellen wieder aus der Zirkulation aus und können im umliegenden Gewebe Mikrometastasen bilden. Der letzte Schritt der Kaskade ist die Ausbildung einer klinisch nachweisbaren Makrometastase (Fidler 2003).

In den einzelnen Schritten der Invasions-Metastasierungs-Kaskade sind die Tumorzellen auf externe Unterstützung angewiesen, weil sie den schützenden Zellverband des Primärtumors verlassen haben. Vor allem während der Zirkulation im Blut sind sie der Gefahr ausgesetzt von den sie umgebenden Zellen des Immunsystems angegriffen zu werden. Zur Degradation von Bestandteilen der Extrazellulären Matrix (ECM), durch welche die abgesiedelten Zellen sich bewegen, benötigen sie besondere Fähigkeiten. Sie müssen Membranen durchdringen und durch Gefäße hindurchtreten, um in den Blut- und Lymphstrom ein- bzw. auszutreten. Darüber hinaus benötigen sie eine besonders effiziente Art der Mobilität und Motilität. Von zentraler Bedeutung bei genannten Prozessen, sind Mitglieder einer großen Proteinase Familie - die sogenannten Matrix Metalloproteinasen (MMPs) (John und Tuszynski 2001).

## **1.5 Matrix Metalloproteinasen (MMPs)**

Der Familie der Matrix Metalloproteinasen (MMP) spielt bei Wachstum, Invasivität und Metastasierung von malignen Tumoren eine wichtige Rolle. Die Familie dieser Endopeptidasen hat 25 Mitglieder. Nach ihrer Synthese werden die meisten der MMP Subklassen aus der Zelle vollständig sezerniert, wobei sechs von ihnen in der Zellmembran verankert bleiben und ausschließlich Membran gebunden vorkommen (MMP-14, -15, -16, -17, -24 und -25). Zur Klassifikation hat jede der Proteinase sowohl einen deskriptiven Namen, der dem Hauptsubstrat entspricht, als auch eine Nummer. Die Nummern wurden in aufsteigender Reihenfolge entsprechend der Entdeckung der einzelnen MMPs vergeben. Allerdings sind in der Nummerierung einige Lücken entstanden, da z.B. die MMPs 4, -5 und -6 doppelt einbezogen wurden, wie sich später herausstellte (Sternlicht und Werb 2001).

**Tabelle 1. Übersicht über die MMP Familie**

Die Tabelle zeigt alle 28 bis heute bekannten verteberten MMP, sowie ihre entsprechenden Substrate (modifiziert nach Sommerville et al. 2003).

Name	Synonym	Mw latent	Mw aktiv	Substrate
MMP-1	Kollagenase-1	55	43	Typ I-, II-, III-, VII-, VIII-, X-, XI-Kollagen, Gelatine, Aggrecan, Casein, Nidogen, Serpin, Versican, Perlecan, Tenascin-C, Proteoglykane
<b>MMP-2</b>	<b>Gelatinase-A</b>	<b>72</b>	<b>66</b>	<b>Typ I -, IV -, V -, VII -, X -, XI -, XIV-Kollagen, Gelatine, Aggrecan, Elastin, Fibronectin, Laminin, Nidogen, Proteoglykane, Versican</b>
MMP-3	Stromelysin-1	57	43; 45	Typ II -, IV -, IX -, X- Kollagen, Gelatine, Aggrecan, Casein, Decorin, Elastin, Fibronectin, Laminin, Nidogen, Perlecan, Proteoglykane, Versican
MMP-7	Matrilysin-1	28	19	Typ I -, II -, III -, V -, IV -, X- Kollagen, Aggrecan, Casein, Elastin, Enactin, Laminin, Proteoglykane
MMP-8	Kollagenase-2	75	58	Typ I-, II-, III-, V-, VII-, VIII-, X-Kollagen, Gelatine, Aggrecan, Laminin, Nidogen
<b>MMP-9</b>	<b>Gelatinase-B</b>	<b>92</b>	<b>86</b>	<b>Typ IV -, V -, VII -, X -, XIV- Kollagen, Gelatine, Fibronectin, Laminin, Nidogen, Proteoglykane, Versican</b>
MMP-10	Stromelysin-2	57	44	Typ III -, IV -, V- Kollagen, Gelatine, Fibronectin, Laminin, Nidogen
MMP-11	Stromelysin-3	51	44	Laminin
MMP-12	Makrophagen Metalloelastase	54	45, 22	Elastin
MMP-13	Kollagenase-3	60	48	Typ I-, II -, III -, IV -, V -, IX -, X -, XI -Kollagen, Gelatine, Aggrecan, Fibronectin, Laminin, Perlecan, Tenascin
MMP-14	MT1-MMP	66	56	Typ I -, II -, III- Kollagen, Gelatine, Aggrecan, Proteoglykane, Fibrin, Fibronectin, Laminin, Nidogen, Perlecan, Tenascin, Vitronectin
MMP-15	MT2-MMP	72	60	Typ I -, III- Kollagen, Gelatine, Aggrecan, Casein, Fibronectin, Laminin, Perlecan, Vitronectin
MMP-16	MT3-MMP	64	52	Typ I -, III- Kollagen, Gelatine, Aggrecan, Casein, Fibronectin, Laminin, Perlecan, Vitronectin
MMP-17	MT4-MMP	57	53	Gelatine, Fibrin, Fibronectin
MMP-18	Kollagenase-4			Typ I – Kollagen
MMP-19	RASI-I	54	45	Typ I -, IV -Kollagen, Gelatine, Aggrecan, Casein, Fibronectin, Laminin, Nidogen, Tenascin
MMP-20	Enamelysin	54	22	Aggrecan, Amelogenin
MMP-21	Xenopus MMP			Nicht bekannt
MMP-23	CA-MMP			Nicht bekannt
MMP-24	MT5-MMP	63	29	Gelatine, Fibronectin
MMP-25	MT6-MMP	34	28	Typ IV- Kollagen, Gelatine
MMP-26	Matrilysin-2			Typ IV - Kollagen, Gelatine, Casein, Fibrinogen, Fibronectin
MMP-28	Epilysin			Casein

### 1.5.1 Physiologische Bedeutung der MMPs

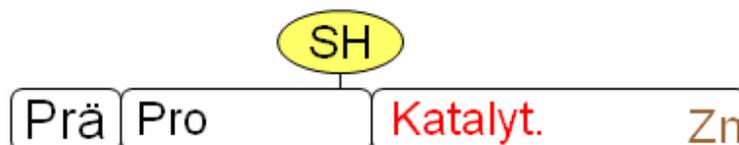
MMPs werden bezüglich ihrer Substratspezifität charakterisiert. Diese wird in erster Linie durch ihren strukturellen Aufbau begründet und ist für Funktion und Vorkommen maßgebend. Aus der Spezifität ergibt sich die weitere Untergliederung der MMPs in Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Matrilysin und Membran-Typ MMPs (MT-MMP), entsprechend ihrem Hauptsubstrat. Die beiden näher betrachteten MMPs (MMP-2 und -9) gehören zur Gruppe der Gelatinasen. Die Zersetzung der Substrate erfolgt durch Spaltung von Peptidbindungen (Birkedal-Hansen 1995). Durch Verdauung extrazellulärer Bestandteile leisten MMPs ihren Beitrag zur Degradation der Extrazellulären Matrix (ECM). Diese besteht im Wesentlichen aus Laminin, Kollagen, Fibronectin und zuckerhaltigen Verbindungen, den Glykosaminoglykanen. Vergleicht man die Substrate der verschiedenen MMP-Subgruppen mit den Bestandteilen der ECM, so fällt auf, dass gerade diese häufig Substrate verschiedener MMPs darstellen. MMPs sind vielseitig in Wachstums- und Umgestaltungsprozesse des Körpers involviert. Sowohl auf physiologischer, als auch auf pathologischer Basis, sind sie am Abbau und an der Modulation verschiedener Gewebsbestandteile beteiligt. Physiologisch spielen sie in der Embryogenese (Parry et al. 1998, Marchenko et al. 2003), im weiblichen Zyklus, der Schwangerschaft, sowie in der Angiogenese eine wichtige Rolle (Werner et al. 2002, Yen et al. 2006). Auch bei altersbedingten Umgestaltungsprozessen (Matrisian 1990) sowie Wundheilungsabläufen (Kahari et al. 1997) sind sie involviert. In Bezug auf pathologische Vorgänge wird den Matrix Metalloproteinasen daher, nicht nur bei Krebserkrankungen, eine bedeutende Rolle zugesprochen.

Eine pathologische Rolle der MMPs ist ebenfalls bei anderen Erkrankungen wie zum Beispiel der rheumatoiden Arthritis (Constantin et al. 2002), Morbus Alzheimer (John und Tuszynski 2001), Multiple Sklerose, Periodontitis (Page 1991) und kardiovaskulären Erkrankungen (Crisby et al. 2001, Aikawa et al. 2001, Bellosta et al. 1998) belegt. So konnten zum Beispiel in Aortenaneurysmen die MMPs -2, -9 und -12 nachgewiesen werden, wohingegen ein wichtiger Mediator des Knorpelverlustes bei rheumatoider und Osteoarthritis MMP-3 zu sein scheint (Sternlicht und Werb 2001).

Die meisten MMPs können nicht nur ein bestimmtes, sondern verschiedene Substrate umsetzen, weshalb zwischen den einzelnen Substratgebieten der MMPs vielseitige Überschneidungen existieren. Diese oft nicht ganz eindeutige Zuordnung erklärt Unklarheiten, die in Anbetracht vieler pathologischer Prozesse MMPs betreffend heute noch vorliegen. So kursieren bezüglich vieler Prozesse, sowohl onkologischer als auch nicht onkologischer Natur, widersprüchliche Aussagen über die Bedeutung der jeweiligen MMPs.

### 1.5.2 Struktureller Aufbau der MMPs

Allen MMPs gemeinsam ist ein aktives, katalytisches Zentrum in welchem sich ein ionisiertes Zink Atom befindet (Nelson et al. 2000). Des Weiteren fallen zwei wichtige Domänen auf, eine Prä- sowie eine Pro-Region, die für Sekretion und Aktivität wichtig sind. Die Prä-Region ist eine hydrophobe Domäne am N-terminalen Ende des Proteins, welche normalerweise direkt nach ihrer Synthese abgespalten wird und für die Sekretion von Bedeutung ist. Bis auf einige Ausnahmen werden die meisten MMPs als latente Pro-Enzyme sezerniert und durch Abspaltung der Pro-Region extrazellulär aktiviert.



**Abbildung 3. Grundstruktur aller MMPs**

Minimale Struktur der MMPs, mit Prä-, Pro-Region, katalytischem Zentrum, einer SH-Gruppe sowie einem Zink Atom. Diese Grundstruktur ist bei allen MMPs zu finden und ist bei allen Isoformen, außer bei MMP-7 und -26, durch zusätzliche Domänen erweitert.

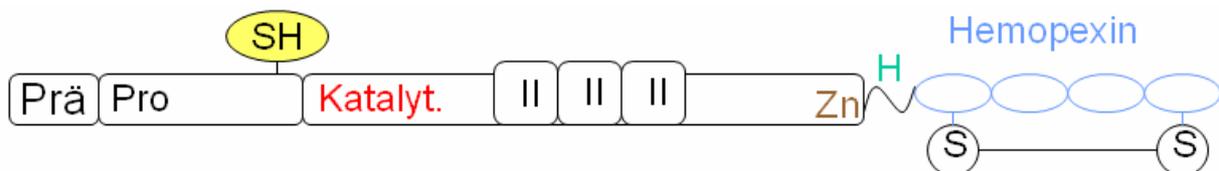
Neben Prä- und Pro-Region hat die Mehrheit der MMP Unterklassen zusätzliche Domänen, wie zum Beispiel eine Hämpexin- oder Fibronectin-Region, die für die Substrat Erkennung und damit für die Spezifität entscheidend sind.

Einige MMPs - die membrangebundenen Matrix Metalloproteasen (MT-MMP) - werden nach ihrer Synthese, noch bevor sie die Zelloberfläche zur Sekretion erreichen, durch Serin-Proteasen bereits intrazellulär aktiviert (Sternlicht und Werb 2001) und bleiben

anschliessend über ihre transmembranöse Domäne auf der Zelloberfläche verankert. Bei dieser transmembranösen Domäne handelt es sich entweder um ein kurzes cytoplasmatisches, c-terminales Ende, wie im Falle von MMP-14, -15, -16 und -24 oder wie bei MMP-17 und -25 um einen c-terminalen GPI - (Glykosylphosphatidylinositol-) Anker (Sternlicht und Werb 2001).

### Die Gelatinasen MMP-2 und -9

Zwei der sogenannten Proteasen MMP-2 und -9, welche auch als Gelatinase A bzw. B bezeichnet werden, sind durch drei, in die katalytische Domäne eingebaute, Cysteinreiche Verbindungen charakterisiert, die den Kollagen Bindungsstellen des Fibronectin ähneln. In diesem Bereich kann sowohl Kollagen, als auch Elastin gebunden und gespalten werden. MMP-9 hat eine zusätzliche, Kollagen V- ähnliche Bindungsstelle, deren Funktion allerdings noch nicht im Detail geklärt ist (Sternlicht und Werb 2001). Gemäss ihrem katalytischen Zentrum greifen die einzelnen MMPs spezifische Substrate der Extrazellulären Matrix (ECM) an und bauen diese ab. Neben Laminin V sind Kollagen I, IV, V und X Hauptsubstrate von MMP-2 und -9.



#### Abbildung 4. Proteinstruktur von Gelatinasen

Struktur der Gelatinasen MMP-2 und -9 mit cysteinreichen Verbindungen in der katalytischen Domäne.

In der Extrazellulären Matrix spielen sich die wesentlichen Schritte zur Regulation der Zellaktivität und des Zellzyklus ab. Moleküle der ECM können an bestimmte in der Membran der Zellen verankerte Rezeptoren, die so genannten Integrine, binden und über die entstandene Brücke zwischen Extrazellulärer Matrix und Zytoskelett auch im Inneren der Zelle interagieren. Über Integrin-vermittelte Signalwege haben extrazelluläre Moleküle Einfluss auf Zellwachstum und Zelldifferenzierung, Apoptose, Zellmigration

und Invasivität sowie weitere zytoskelettale Veränderungen (Hynes 1992). Sie nehmen Einfluss auf physiologische und onkologische Prozesse, wie hyperplastisches Wachstum und Tumorausbreitung. Eine Veränderung der ECM oder eine Veränderung der Rezeptoren der ECM kann zur Konversion einer prämaligen in eine maligne Läsion des Plattenepithels führen (Ziober et al. 2006).

Auch MMPs binden an Integrine. So haftet MMP-2 gleichzeitig an  $\beta 1$  oder  $\beta 3$  Integrin, während es an extrazelluläre Kollagenfibrillen bindet (Friedl et al. 2003). Die Aktivierung der Integrine führt ausserdem über einen Rückkopplungsmechanismus zur Rekrutierung weiterer Proteasen bzw. MMPs. Diese beginnen zellnahe Komponenten der ECM zu zersetzen. Durch Zerstörung der Extrazellulären Matrix wird für die Zelle ein tunnelartiger Weg geschaffen, der ihre Expansion und Migration ermöglicht. Nach Friedl et al. konnte gezeigt werden, dass MMPs in Tumorzellen nicht nur verstärkt exprimiert werden, sondern dass diese die Zellmigration *in vitro* sowie Metastasierung und Tumordisseminierung *in vivo* erleichtern (Friedl et al. 2003).

### **1.5.3 Regulation der MMP Aktivität**

Die Expression und Aktivität der MMPs hängen unter anderem von Interaktionen mit spezifischen und unspezifischen Inhibitoren der Metalloproteinasen ab. Neben weniger spezifischen Inhibitoren, wie  $\alpha 2$ -Makroglobulin oder  $\alpha 1$ -Antiprotease, haben spezifische Inhibitoren, wie die Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases (TIMPs), einen hohen Stellenwert (Kahari et al. 1999). Bis heute sind vier TIMPs (TIMP-1 bis -4) bekannt, die gemeinsame strukturelle Eigenschaften mit MMPs teilen (siehe Tabelle 2).

Die Kontrolle der MMP Expression bzw. Aktivität findet auf verschiedenen Ebenen statt. Zum einen kann in den Aktivierungsprozess selbst modifizierend eingegriffen werden, sei es durch Genregulation oder durch Aktivierung latenter MMP Pro-Formen. Zum anderen kann die aktive MMP Form direkt, zum Beispiel durch TIMPs, gehemmt werden (Hidalgo et al. 2001). Die MMP-Genexpression wird von einer Vielzahl von Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Steroidhormonen sowie Phorbolestern reguliert (John und Tuszynski 2001). Neben Interleukinen spielen hier TGF  $\beta$ -1, TNF, der basic fibroblast growth factor (bFGF) (Tyagi 1997, Parsons et al. 1997), EGF $\beta$  und VEGF

(Miyake et al. 1997, Kanno et al. 1998) wichtige Rollen. Außerdem beeinflussen Umgebungsfaktoren die MMP Expression, zum Beispiel verschiedene ECM Moleküle (John & Tuszynski 2001).

MMP-Proformen können allein oder als Komplex gebunden auftreten und durch Abspaltung der Pro-Region durch Trypsin 2 (Sorsa et al. 1997), Cathepsine, Elastase oder Plasmin aktiviert werden (Tyagi et al. 1997). Die Hemmung der aktiven und inaktiven MMP Form kann durch die oben genannten Inhibitoren (TIMPs) erfolgen.

**Tabelle 2. Übersicht über die Familie der Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases (TIMPs) (modifiziert nach Birkedal-Hansen et al. 1993)**

<b>Name</b>	<b>Molekulargewicht (kDa)</b>	<b>Assoziierte Proteine</b>	<b>Typisches Vorkommen</b>
TIMP-1	28	proMMP-9	Ovar, Knochen
TIMP-2	21	proMMP-2	Plazenta
TIMP-3	24	ECM	Nieren, Gehirn
TIMP-4	22	nicht bekannt	Herz

#### **1.5.4 Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL)**

Ein weiteres MMP assoziiertes Protein ist Lipocalin-2, auch Neutrophilen Gelatinase-assoziiertes Lipocalin (NGAL) genannt. Mit einem Molekulargewicht von 21 kDa in der nicht glykosylierten und 25 kDa in der glykosylierten Form stellt NGAL ein kleines Protein dar (Fernández et al. 2005). Es wurde 1993 durch Bindung an die Neutrophile Gelatinase entdeckt und so aus Neutrophilen Granulozyten isoliert (Kjeldsen et al. 1993). Immunhistochemisch konnte es mittlerweile auch in verschiedenen epithelialen Geweben, sowohl normalen, als auch neoplastischen Ursprungs, nachgewiesen werden (Friedl et al. 1999). Die Funktion von NGAL konnte bis heute nicht vollständig geklärt werden. Es ist jedoch bekannt, dass NGAL sowohl die aktive, als auch die Pro-Form von MMP-9 bindet und MMP-9 so durch Komplexbildung stabilisiert (Yan et al. 2001). NGAL schützt MMP-9 vor Degradation, es scheint die gelatinolytische Aktivität von MMP-9 sogar zu verstärken (Fernández et al. 2005, Yan et al. 2001). NGAL konnte sowohl in

monomerer als auch in dimerer Form nachgewiesen werden und wurde in seltenen Fällen sogar als Trimer beobachtet (Axelsson et al. 1995). Die genaue Bedeutung der Interaktion von MMP-9 und NGAL ist bis heute weitgehend unklar.

Für verschiedene Erkrankungen ist ein Zusammenhang zwischen NGAL und MMP-9, sowie eine Korrelation zum Ausmaß der Erkrankung belegt. So wurde NGAL und insbesondere die NGAL/MMP-9 Komplexbildung im Zusammenhang mit renalen Erkrankungen untersucht. Beispielsweise konnte eine Hochregulation der NGAL Expression nach akuter renaler Ischämie nachgewiesen werden (Herget-Rosenthal 2005). Auch für vaskuläre Geschehen wie beim abdominalen Aorten Aneurysma sowie bei ischämischen Vorfällen ist ein Zusammenhang belegt. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass NGAL/MMP-9 Komplexe in großem Maße in den Bereichen ischämischen Gewebes auftreten, in denen eine verstärkte Degradation der Extrazellulären Matrix stattfindet (Folkesson et al. 2007).

### **1.5.5 Pathophysiologische Bedeutung von MMPs**

Matrix Metalloproteinasen nehmen auf verschiedene Schritte und Prozesse des Tumorwachstums und der Metastasierung Einfluss. Für Tumorzellen stellt die Basalmembran eines der grössten Hindernisse dar. Da Typ IV Kollagen eines der Hauptbestandteile dieser Membran darstellt und ausserdem als Substrat von MMP-2 und -9 gilt, wurde der Fokus in Zusammenhang mit Invasivität und Metastasierung schon sehr früh auf diese beiden Gelatinasen gelegt (Liotta et al. 1980). TIMPs sind, genau wie die Metalloproteinasen selbst, wesentlich am malignen Geschehen beteiligt. Eine Beteiligung von MMPs und TIMPs ist für verschiedene Tumore, wie zum Beispiel für das Kolorektale Karzinom (Chan CC et al. 2001, Gallegos et al. 1995), Magen- (David et al. 1994) und Ösophagus- (Ohashi et al. 2000) Karzinom oder Hauttumore (Kahari et al. 1997) belegt. Auch wiesen Galateau-Salle et al. sowohl für MMPs, als auch für TIMPs eine erhöhte Expression in präneoplastischen Läsionen von bronchialem Plattenepithel nach (Galateau-Salle et al. 2000). Therapeutische Ansätze zur Hemmung von MMPs werden zum Beispiel in Bezug auf Knochenmetastasen (Saikali und Singh 2003) diskutiert und für das Prostata Karzinom (Ahmann et al. 2001, Eisenberger et al. 2000) und für „Nicht Kleinzellige Lungenkarzinome“ (Leighl et al. 2005) bereits in Phase

III Studien getestet. Es scheint demnach einen deutlichen Zusammenhang von MMPs und TIMPs mit Malignität, Invasivität und Metastasierung zu geben. Der genaue Mechanismus zwischen einer Beteiligung ganz bestimmter MMPs an der Entstehung der entsprechenden Tumore bleibt jedoch auf Grund der Fülle der Literatur und oft widersprüchlicher Aussagen unklar und wird kontrovers diskutiert.

#### **1.5.6 MMP-2 und -9 in Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes**

In Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes wird nach Werner et al. besonders den Matrix Metalloproteasen 2, -9 und -13, sowie in einem geringeren Ausmaß auch MMP 7 eine Schlüsselrolle zuteil (Werner et al. 2002). Rosenthal et al. konnten zeigen, dass MMPs in HNSCC Tumoren häufig überexprimiert werden und dass eine Hemmung der MMPs die Invasivität und Metastasierungsfähigkeit der Tumore vermindert (Rosenthal und Matrisian 2006). Auch Kawata et al. konnten eine besondere Beteiligung von MMP-2 nachweisen (Kawata et al. 1996). Therapeutisch nimmt die Bedeutung der MMPs immer weiter zu. So wird versucht, MMPs mittels synthetischer MMP Inhibitoren (MMPIs) zu hemmen, um so die Tumorprogression einzudämmen. Ein weiterer wichtiger Forschungsansatz liegt in der Klärung der prognostischen Bedeutung von MMPs bei neoplastischen Erkrankungen, die Assoziation mit bestimmten klinischen Verlaufsformen und schließlich auch der Überlebensrate. Da es diesbezüglich aber sehr viele verschiedene und zum Teil widersprüchliche Ergebnisse einzelner Arbeitsgruppen gibt, sind weitere Untersuchungen von Nöten, um ein abschliessendes und klares Bild der Bedeutung von MMPs bei malignen Erkrankungen zu gewinnen.

### **1.6 Zielsetzung**

Aufgrund der vermuteten zentralen Bedeutung der Gelatinasen MMP-2 und -9 bei der Invasivität von HNSCC Tumoren, war es ein wesentliches Ziel die Expression und Aktivität dieser Proteasen zu beurteilen. Diese Untersuchungen sollten vor dem Hintergrund der Tumorstammzell Hypothese erfolgen, da Tumorstammzellen zuvor mit der Invasivität von Tumoren in Verbindung gebracht wurden (Friedl 2003, Björklund und Koivunen 2005, Dingli und Michor 2006, Prince et al. 2007, Kuhn und Tuan 2010).

## 2 MATERIAL

### 2.1 Zelllinien

Die UM-SCC und die UT-SCC Zelllinien wurden freundlicherweise von Dr. Thomas E. Carey (University of Michigan, MI, USA) und Dr. Reidar Grénman (University of Turku, Finnland) zur Verfügung gestellt (Lansford et al. 1999). Die verwendeten Zelllinien sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

**Tabelle 3. Zelllinien**

Name	TNM	Grading	Lokalisation	Herkunft	Geschlecht	Alter
UM-SCC-1	T2N0M0	G2	Mundboden	R	m	73
UM-SCC-2	T2N0M0	G1	Alveolarkamm	R	w	63
UM-SCC-3	T1N0M0	G1-G2	Nasencolumna	LKM	w	73
UM-SCC-4	T3N2aM0	G4	Tonsille	PT	w	47
UM-SCC-9	T2N0M0	G1	vordere Zunge	PT	w	71
UM-SCC-11B	T2N2aM0	unbekannt	Larynx	PT	m	65
UM-SCC-14A	T1N0M0	G2-G3	Mundboden	R	w	58
UM-SCC-14C	T1N0M0	G3	Mundboden	R	w	58
UM-SCC-22B	T2N1M0	G2	Hypopharynx	M	w	58
UM-SCC-27	T1N0M0	unbekannt	vordere Zunge	LKM	m	62
UMB-SCC-745	T4 N2 M0	G2	Oropharynx	PT	m	48
UMB-SCC-864	T2 N2 M0	G2	Zunge	PT	m	59
UMB-SCC-969	T4 N2 M1	G2	Tonsille	PT	m	67
UT-SCC-9	T2N1M0	G1	Larynx	M	m	81
UT-SCC-10	T1N1M0	G2	Zunge	PT	m	62
UT-SCC-12A	T2N0M0	G1	Cutis nasi	PT	w	81
UT-SCC-12B	rT0N1M0	G2	Cutis nasi	M	w	81
UT-SCC-16A	T3N0M0	G3	Zunge	PT	w	77
UT-SCC-16B	T3N0M0	G3	Zunge	M	w	77
UT-SCC-19A	T4N0M0	G2	Larynx	PT	m	44
UT-SCC-54B	T2N0M0	G2	Wangenschleimhaut	R	w	58
UT-SCC-60A	T4N1M0	G1	Tonsille	PT	m	59
UT-SCC-60B	T4N1M0	G1	Tonsille	M	M	59
UT-SCC-74A	T3N1M0	G1-G2	Zunge	PT	M	31
UT-SCC-74B	rN2	G2	Halsmetastase	M	M	31

*m = männlich, w = weiblich, PT = Primärtumor, M = Metastase, LKM = Lymphknotenmetastase, R = Rezidiv*

## 2.2 Gewebeproben

Es wurden Gewebeproben von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches, welche routinemäßig nach Tumor Operationen angefallen sind, verwendet. Die Patienten wurden zuvor informiert und gaben ihr Einverständnis. Ein positives Votum der Ethikkommission zu den durchgeführten Untersuchungen an menschlichem Gewebe liegt vor.

Eine Auflistung der verwendeten Gewebeproben ist in der nachfolgenden Tabelle zu sehen (Tabelle 4). Als negative Kontrolle sowohl für die Zymographien, als auch bei der Western Blot Analyse wurde normale Schleimhaut verwendet.

**Tabelle 4. Gewebeproben**

Gewebe	Gewebeart	TNM	Grading	Lokalisation	Geschlecht	Alter
1152	Sinusitis				M	44
1164	Plattenepithel CA	T4N2M0	G2	Larynx, supraglottisch	M	72
1166	Tonsillitis				W	18
1170	unauffällige Schleimhaut				M	54
1179	Plattenepithel CA	T3N1M0	G2	Larynx	M	42
1194	Plattenepithel CA		G3	Hypopharynx	M	79
1202	Plattenepithel CA	T3N1M0	G2	Larynx	M	66
1208	Plattenepithel CA	T3N0M0	G2	Larynx	M	57
1224	Plattenepithel CA	T2N0Mx	G3	Hypopharynx	M	67
1228	Plattenepithel CA	T1N0M0	G2	Sinus piriformis	M	61
1237	Plattenepithel CA	T2N2M0	G3	Sinus piriformis	M	50
1248	Plattenepithel CA, Rezidiv	T4N2M0	G2	Larynx	M	72
1261	Plattenepithel CA	T2N1M0	G3	Sinus piriformis	W	69
1266	Basaloides CA	T3N2M0	G2	Oropharynx	M	51
1267	Plattenepithel CA	T4N2M0	G2	Oropharynx	W	68
1303	Plattenepithel CA	T2N2M0	G2	Zungengrund	W	52
1347	Plattenepithel CA	T3- .....	G2	Larynx, supraglottisch	W	68
1364	cutane Metastase	T3N1M0	G2	Haut prästernal	M	42
1372	Plattenepithel CA	T4N2M0	G2	Oropharynx	M	51
1379	Plattenepithel CA	T2N0M0	G2	Hypopharynx	M	64
1389	Plattenepithel CA	T4N2M0	G2	Hypopharynx	M	51
1397	Plattenepithel CA	T4N3M0	G3	Hypopharynx	W	43
1409	Plattenepithel CA	T2N2M0	G2	Hypopharynx	M	55
1410	Plattenepithel CA	T2N1M0	G2	Nasopharynx	W	56
1414	Plattenepithel CA	T2N2M0	G2	Larynx, supraglottisch	W	65
1433	Plattenepithel CA	T2N1M0	G3	Hypopharynx	M	68

*m = männlich, w = weiblich*

## 2.3 Antikörper und Standards

### 2.3.1 Primäre Antikörper für immunologische Nachweisverfahren

Antikörper	Beschreibung	Herkunft
Anti-MMP-2	Monoklonaler Maus AK	Abcam, Cambridge, UK
Anti-MMP-9	Polyklonaler Kaninchen AK	Abcam, Cambridge, UK
Anti-MMP-9	Polyklonaler Ziegen AK	Biozol, Deutschland
Anti- $\beta$ -Actin	Monoklonaler Maus AK	Sigma, Sant Louis, USA
Anti-NGAL	Monoklonaler Ratten AK	SCBT, Santa Cruz, California, USA
Anti-NGAL	Monoklonaler Maus AK	Dianova, Hamburg, Deutschland
Anti-CD44	Monoklonaler Ratten AK	HCAM, Santa Cruz, USA
Anti CK14	Monoklonaler Maus AK	Biodesign International, Portland, USA
Anti Kollagen IV	Polyklonaler Kanninchen AK	Abcam, Cambridge, UK
Anti ALDH-1	Monoklonaler Maus AK	SCBT, Santa Cruz, California, USA

### 2.3.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Herkunft
goat anti mouse	HRP gekoppelt oder biotinyliert	SCBT, Santa Cruz, California, USA
mouse anti goat	HRP gekoppelt oder biotinyliert	SCBT, Santa Cruz, California, USA
goat anti rabbit	HRP gekoppelt oder biotinyliert	SCBT, Santa Cruz, California, USA
donkey anti rat	HRP gekoppelt, human adsorbed	SCBT, Santa Cruz, California, USA
chicken anti rabbit	IgG-TR	SCBT, Santa Cruz, California, USA
cow anti goat	IgG-FITC	SCBT, Santa Cruz, California, USA

### 2.3.3 Standards

Precision Plus Protein Standard                      Bio Rad, München

## 2.4 Medien

### 2.4.1 Medien für die Zellkultur

500ml	DMEM Medium
50ml	10% fötales Kälberserum (FCS)
5ml	L-Glutamin 200mM (100x)
2,5ml	Penicillin/Streptomycin (100x)
0,5ml	Amphotericin (5mg/20ml)

## 2.5 Allgemeine Puffer und Lösungen

**Trenngel der Gelelektrophorese (10%):** Für 4 Gele, Dicke 1,5mm

7,9ml	H <sub>2</sub> O
6,7ml	Acrylamid mix (30%)
5ml	1,5M Tris (pH 8,8)
0,2ml	SDS (10%)
0,2ml	APS (10%)
0,02ml	TEMED

**Trenngel der Zymographie (10%):** Für 2 Gele, Dicke 1,5mm

5,9ml	H <sub>2</sub> O
6,7ml	Acrylamid mix (30%)
5ml	1,5M Tris (pH 8,8)
0,2ml	SDS (10%)
0,2ml	APS (10%)
0,002ml	TEMED
2ml	Gelatine stock solution (0,1%)

**Sammelgel der Gelelektrophorese:** Für 4 Gele, Dicke 1,5mm

5,4ml	H <sub>2</sub> O
2,0ml	Acrylamid mix (30%)
2,3ml	1,0M Tris (pH 6,8)
0,1ml	SDS (10%)
0,1ml	APS (10%)
0,001ml	TEMED

**SDS – Probenpuffer, reduzierend (2x):**

2ml	SDS 20%
4ml	Glycerin
2ml	B-Mercaptoethanol
1,25ml	Tris 2,0M pH 6,8
0,4ml	Bromphenolblau 0,1%

**SDS – Probenpuffer, nicht reduzierend (2x):**

4,0ml        SDS 10% (w/v)  
2,0ml        Glycerin  
2,5ml        0,5M Tris-HCl, pH 6,8  
0,5ml        Bromphenolblau 0,1%  
mit aqua dest. auf 10,0ml auffüllen

**Laufpuffer der SDS-PAGE (10x Elektrophorese-Puffer):**

60,4g        Tris Base  
376g        Glycin  
20g         SDS  
mit aqua dest. auf 2l auffüllen

**Transferpuffer Naß-Blot (pH 8,5):**

25mM        Tris Base  
0,2M        Glycin  
20%        Methanol

**TBS (10 x) für 1l :**

80g         NaCl  
24,2g        Tris Base  
mit HCl auf pH 7,6 einstellen

**1. Antikörper-Verdünnungs-Lösung (für 60ml):**

6ml	TBS (10x)
54ml	H <sub>2</sub> O
60µl	Tween-20
3g	BSA

**Block-Puffer:**

1l	TBS 1x
1000µl	Tween-20
50g	Magermilchpulver

mit aqua dest. auf 1l auffüllen

**Lysispuffer-NP 40:**

20mM	Tris-Cl pH 7,5
137mM	NaCl
10%	Glycerin
2mM	EDTA
1%	Nonidet P 40

**Renaturing-Puffer (10x):**

25ml	Triton X-100, 25% (v/v)
75ml	H <sub>2</sub> O

**Developing Puffer (1x):**

1,21g Tris Base

6,3g Tris-HCl

11,7g NaCl

0,98g CaCl<sub>2</sub>

0,2g Brij 35

mit aqua dest. auf 1l auffüllen

**Coomassie R-250 Färbe Lösung, 0,5%:**

500ml Methanol

100ml Essigsäure

400ml H<sub>2</sub>O

5g Coomassie R-250

**Coomassie R-250 Entfärbe Lösung:**

500ml Methanol

100ml Essigsäure

400ml H<sub>2</sub>O

## 2.6 Verwendete Chemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt
Acrylamid 30% ratiophorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agarose (Electrophoresis grade)	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
Ammoniumperoxiddisulfat (APS)	BioRad Laboratories GmbH, München
Amphotericin B	Bristol-Myers Squibb, München
Biotinylierte Peroxidase B (K0377)	Dako, Denmark
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St.Louis, Mo, USA
Bromophenol	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
3,3'-Diaminobenzidine Tabletten	Sigma, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	BioTech, St. Leon-Rot
Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM)	Bio Whittaker, Verviers, Belgium
ECL (Western blotting detection reagens)	Amersham Bioscience, Buckinghamshire, England
Eisessig	Merck, Darmstadt
Epinephrinhydrochlorid	Aventis, Frankfurt
Ethanol	Schmidt Chemikalien, Dillenburg
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, München
Fluorescent Mounting Medium	DakoCytomation, Carpinteria, USA
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Sigma, Seelze
Hematoxylin Lösung	Fluka, Steinheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat	Riedel-de Haen, Seelze
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Gibco BRL, Eggenstein
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Sigma, München
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Mayer's Hemalum Lösung	Merck, Darmstadt
$\beta$ -Mercaptoethanol	Schmidt Chemikalien, Dillenburg
Methanol	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine	Roth, Karlsruhe

---

Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Sigma, München
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	Gibco BRL, Eggenstein
Nonidet P-40	Fulka, Steinheim
Penicillin / Streptomycin-Gemisch	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
Phenol	Sigma, München
Phosphatase Inhibitor Cocktail II	Sigma, USA
Phosphate buffered saline (PBS)	Biochrom KG, Berlin
Polyacrylamid	Serva, Heidelberg
2-Propanol	Merck, Darmstadt
Propidiumiodid	Sigma, München
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma, USA
Puffer Lösung (PH 4,00)	Merck, Darmstadt
Puffer Lösung (PH 7,00)	Merck, Darmstadt
Rabbit serum (normal)	Dako, Denmark
Refobacin	Merck, Darmstadt
Roti-Histol	Roth, Karlsruhe
Saccharose (Sucrose)	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Sodium-dodecyl-sulphate (SDS)	Serva, Heidelberg
TEMED	Sigma, München
Tri-Natriumcitrat Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Tris-Base	Sigma, Steinheim
Tris-Cl	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma, München
Trypsin	BioChrom, Berlin
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat)	Carl Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (30%)	Merck, Darmstadt

## 2.7 Geräte und Materialien

Gerätetyp	Herkunft
Bench Herasafe	Kendro, Rodenbach
Bio-Photometer	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank, Heraeus Instruments	Kendro, Langenselbold
Confocal laser scanning microscope (Leica TCS SP2)	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Elektrophoresekammer (Bio-Rad Power Pac 300)	Bio Rad, USA
Entwicklungsmaschine Optimax Typ TR	MS Laborgeräte, Wiesloch
GelDoc 2000	Bio Rad, USA
Freezing Container „Mr. Frosty“	Nalgene, Dänemark
Immunoblotkammer	Bio Rad, USA
Mikroskop (binokulares Lichtmikroskop)	Zeiss, Jena
Mikroskop (Talaval 31)	Zeiss, Jena
Mikrotom S35	Feather, Japan
Schwenkbrett (Heidolph Instruments Duomax 1030)	Kobe, Japan
Wärmekammer für Tubes, HLC HBT 130	Kobe, Japan
Zellkulturschrank	Kendro, Heraeus
Zentrifuge (Labofuge 400R)	Medifuge Heraeus, Hanau
Zentrifuge Universal (30 RF)	Hettich, Tuttlingen

## **3      METHODEN**

### **3.1    Zellkultur**

#### **3.1.1  Allgemeine Zellkulturbedingungen**

Alle Arbeiten mit Zellkulturen werden nach Standard Methoden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen werden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) unter Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (FCS) und 25 mM HEPES kultiviert. Zusätzlich wird dem Medium Penicillin, Streptomycin, Gentamycin, Amphotericin und L-Glutamin beigemischt. Die Inkubation erfolgt in einem Brutschrank bei 37°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95%, sowie einer CO<sub>2</sub> Begasung von 5%.

#### **3.1.2  Passagieren von Zellen (Splitting)**

Um den Zellen ideale Wachstumsbedingungen zu schaffen, werden die Zellen ca. alle 3 Tage - je nach Wachstumsdichte - verdünnt und in neue Zellkulturschalen übertragen (gesplittet). Die Übertragung von Zellen und Medien erfolgt mit einer Pipettierhilfe (Hirschmann) und sterilen serologischen Einmalpipetten (Greiner, Bio-one) an einer sterilen Sicherheitswerkbank. Um alle Serumreste zu entfernen, werden die adhärennten Zellen - nach Absaugen des Mediums - zunächst mit sterilem PBS gewaschen, um die in den Serumresten enthaltenen Proteaseinhibitoren zu entfernen. Anschliessend erfolgt eine Inkubation für 3-10 Minuten mit 1ml einer Trypsin/EDTA Lösung, um Zellen durch Lockerung der Zell-Adhäsion und Spaltung von Proteinbrücken aus dem Zellrasen zu lösen. Nach Resuspensierung der gelösten Zellen in frischem Medium werden diese in frische Kulturschalen überführt, welche bereits frisches Medium enthalten.

#### **3.1.3  Einfrieren von Zellen**

Um Zellen langfristig zu lagern, werden diese in flüssigen Stickstoff (LN<sub>2</sub>) (-196°C) überführt. Um ein zu schnelles Einfrieren und die Ausblidung von Eiskristallen, welche zellschädigende Eigenschaften aufweisen, zu vermeiden, wird DMSO-haltiges Einfriermedium (10% DMSO/DMEM) verwendet, in welchem die Zellen langsam auf die Zieltemperatur abgekühlt werden können („Mr. Frosty“). Nach Trypsinisierung

(Trypsin/EDTA) werden die Zellen dazu suspendiert und bei 1500g für 5 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wird in eisgekühltes Gefriermedium aufgenommen und in vorbereitete Kryoröhrchen überführt. Die Abfüllung erfolgt mittels eines Freezing Containers.

#### **3.1.4 Auftauen von Zellen**

Die Zellen werden in einem Wasserbad (37°C) aufgetaut und in Röhrchen mit frischem, vorgewärmtem Medium überführt. Anschliessend erfolgt eine Zentrifugation bei 1500g für 5 Minuten und Entfernung des Überstandes. Nach Resuspensierung des Zellpellets in frischem Medium wird die Zellsuspension in neue Kulturschalen ausgesät.

#### **3.1.5 Ermittlung der Zellzahl**

Zur Bestimmung der genauen Zellzahl wird eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Frisch trypsinisierte Zellen werden in einem definierten Volumen Medium resuspendiert und mittels einer Pasteurpipette zwischen Zählkammer und Deckglas gebracht. Die Zellzahl wird anschliessend in einer definierten Anzahl von Quadraten (2 große Quadrate) ausgezählt und durch Multiplikation mit dem Faktor 10.000 die Zellzahl pro 1ml Medium errechnet:

Zellzahl pro 1 ml Medium = (gezählte Zellen / Anzahl ausgezählter Quadrate) x 10.000

### **3.2 Herstellung von Zelllysaten**

#### **Lysat aus Zelllinien**

Zur Herstellung von Zelllysate aus adhärennten Zelllinien werden die Zellen zunächst mit Hilfe von Trypsin/EDTA mobilisiert (siehe auch 3.1.2.) und in normalem Medium aufgenommen. Durch Zentrifugieren für fünf Minuten bei 1500g formt sich ein Zellpellet, welches nach Verwerfen des Überstandes mit PBS gewaschen wird. Nach erneuter Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes wird das Zellpellet mit 2 Volumenteilen Lysispuffer versetzt und in 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Nach ca. 20

Minuten Lyse (4°C) werden die Eppendorftubes bei 4°C für 10 Minuten bei 13.000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Während sich nach Zentrifugation die meisten Zellen und Proteine im klaren Überstand befinden, enthält das Zellpellet Zellkerne, Membranen und Zellabfälle, welche verworfen werden. Der Überstand wird in neue Eppendorftubes überführt und die Proteinkonzentration bestimmt (Bradford) (siehe 3.3).

### Lysat aus Gewebeproben

Um Zelllysate aus Gewebeproben herzustellen, müssen Zellmembranen aufgelöst, Proteine herausgelöst und vom restlichen Zellmaterial getrennt werden. Dazu werden die Gewebeproben zunächst unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff mit einem Mörser zerkleinert bis feines Pulver entsteht. Nach Überführung in ein Eppendorf Reaktionsgefäß wird das Pulver mit Lysispuffer (Volumenverhältnis 2:1) in Suspension gegeben und anschließend nach kräftigem Schütteln 15 Minuten auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 13000 Umdrehungen/min sammeln sich die Zellreste im Pellet und die im Überstand befindlichen Proteine können vorsichtig abgenommen und in ein frisches Tube überführt werden. Auch hier erfolgt die Proteinbestimmung (siehe 3.3) und anschließende Aufbewahrung bei -80°C.

## 3.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Zelllysate wird die Methode nach Bradford eingesetzt. Diese Methode nutzt aus, dass sich das Absorptionsmaximum einer sauren, mit Farbstoffen versetzten Lösung verändert, sobald diese an Proteine bindet (Bradford 1976). Die photometrische Messung erfolgt bei einer Wellenlänge von 595nm und die Bestimmung nach folgendem Ansatz:

**Tabelle 5. Proteinbestimmung nach Bradford**

	Leerwert	St 1	St 2	St 3	St 4	St 5	Probe
Bio-Rad (1:5) (ml)	1	1	1	1	1	1	1
BSA (µl)	-	1	2	3	4	5	-
Lysis-Puffer (µl)	3	3	3	3	3	3	-
Probenextrakt (µl)	-	-	-	-	-	-	3

### 3.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In der Elektrophorese macht man sich unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten verschieden geladener und verschieden großer Teilchen im elektrischen Feld zunutze. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit - neben der Molekülgröße - sowohl von der Ladung der Teilchen, als auch vom Reibungswiderstand abhängig. Bei der diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird SDS unter nicht denaturierenden oder unter denaturierenden Bedingungen nach der Methode von Laemmli verwendet (Laemmli et al. 1970). SDS liegt unter Pufferbedingungen vollständig dissoziiert vor, es besitzt also eine negative Ladung und geht mit den zu analysierenden Proteinen einen Komplex ein. Dadurch erhalten auch die Proteine im Komplex eine negative Nettoladung und die Wanderungsgeschwindigkeit ist somit nur noch vom Molekulargewicht des Proteins sowie dem Reibungswiderstand abhängig. Der Reibungswiderstand ergibt sich aus der Durchlässigkeit der Matrix, in der die Proteine wandern. Die für die Auftrennung verwendeten diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid Gele bestehen aus einem oberen, der Fokussierung dienendem Sammelgel (6% Acrylamid) und einem unteren Trenngel (10% Acrylamid) zur Auftrennung der Proteine. Die hergestellte Acrylamidlösung (siehe 2.5) wird in die in der Gelappertemperatur vorbereiteten Kammern gefüllt, APS und TEMED abschliessend zugegeben, um die Polymerisation des Gels einzuleiten. Die Gele werden während der Polymerisation mit 100% Isopropanol beschichtet, um eine glatte und saubere Oberfläche zu erhalten. Nach erfolgter Polymerisation (20-30 Minuten) wird das Isopropanol entfernt, das vorbereitete Sammelgel (siehe 2.5) vorsichtig auf die Trenngele gegossen und in dieses ein Kamm zur Ausbildung der Geltaschen eingesetzt. Die vollständig polymerisierten Gele können dann in eine vertikale Elektrophoresekammer eingesetzt werden. Nachdem die Kammer mit 1 x SDS-Laufpuffer aufgefüllt wurde, werden die Gelkämme entfernt. In die fertigen Geltaschen werden die vorbereiteten Proben eingefüllt, welche mit einem SDS Lade Puffer versetzt sind. Je nachdem ob eine Auftrennung von Proteinkomplexen gewünscht ist, wird ein nicht reduzierender oder ein reduzierender Puffer gewählt und die Proben entweder für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (keine Denaturierung) oder für 10 Minuten bei

95°C auf dem Heizblock denaturiert. Es werden je 35µg Protein geladen und auf jedem Gel zusätzlich ein Standard (BioRad, 5µl) zur späteren Bestimmung des Molekulargewichts aufgetragen. Zunächst erfolgt die Fokussierung der Proben bei einer angelegten Spannung von 75 V im Sammelgel, anschliessend werden die Proben bei einer konstanten Spannung von 100V für circa zwei Stunden im SDS-Gel aufgetrennt.

### 3.5 Western Blot Analyse

Mit Hilfe der Western Blot Methode können Proteine durch Bindung an spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Hierzu wird zunächst im Nass-Blot-Verfahren ein Elektrotransfer der Proteine auf eine Trägerfolie, eine Nitrozellulose Membran eingeleitet. Auf der Oberfläche dieser Membran können die zu detektierenden Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen gebunden werden (Towbin et al. 1979). Zur Vorbereitung werden dazu das Elektrophorese-Gel und die auf die richtige Größe zugeschnittene Membran zusammen mit Filterpapier und Schaumstoffkissen sandwichartig entsprechend der in Abbildung 5 dargestellten Reihenfolge aufeinander gelegt. Es wird dabei darauf geachtet, dass die Schaumstoffkissen und Filterpapiere ausreichend in Transferpuffer getränkt sind, wobei insbesondere Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten zu vermeiden sind.

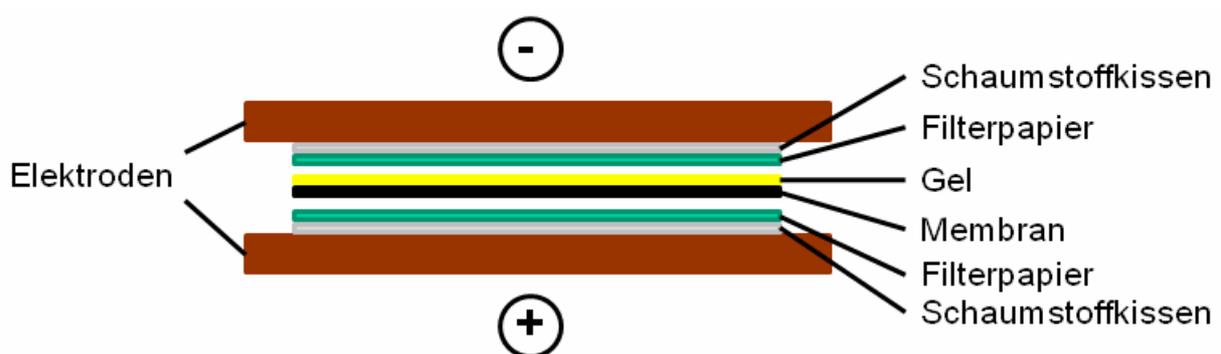


Abbildung 5. Schematischer Versuchsaufbau Western Blot

Nach Einsetzen des Blot-Konstruktes wird das Blotgefäß mit gekühltem Transferpuffer, einem Kühlelement, und einem Magnetfisch zur gleichmäßigen Kühlung befüllt. Es wird für eine Stunde eine konstante Spannung von 100V angelegt. Nach dem Blotvorgang werden die Membranen vorsichtig aus dem Blot-Konstrukt entfernt, zurechtgeschnitten und in Glasküvetten überführt. Für die weiteren Wasch- und Inkubationsvorgänge werden die Küvetten auf ein Schwenkbrett gestellt, sodass die Membranen gleichmäßig mit den Lösungen benetzt werden. Nach kurzem Spülen in TBS (1x) werden die Membranen für eine Stunde (RT) in Block-Puffer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 5 Minuten in TBS/T (0,1% Tween-20) wird zur Proteindetektion 6ml der Erstantikörper-Verdünnungs-Lösung auf die Membranen gegeben. In dieser werden die Membranen nach Zugabe des Erstantikörpers über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in TBS/T wird der Zweitantikörper in 6ml Block-Puffer gegeben und die Membranen darin für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Auf ein erneutes Waschen in TBS/T folgt nun die Sichtbarmachung der Proteine mittels des Enhanced Chemiluminescence-Verfahrens (ECL-Verfahren). Die Membranen werden dazu für eine Minute nach Zugabe der Detektionslösungen (Verhältnis 1:1) belichtet und anschliessend zusammen mit einem Kodak Biomax MR Film in eine Röntgenkassette gelegt. Nach entsprechender Expositionszeit können die Filme entwickelt werden.

### **3.6 Zymographie**

Mit Hilfe der Zymographie ist ein qualitativer und semiquantitativer Nachweis der Enzym- bzw. der Gelatinase Aktivität möglich. Zunächst erfolgt eine SDS-Gelelektrophorese zur Auftrennung der Proteine, wie unter 3.4. beschrieben, jedoch mit dem Unterschied, dass 1 ml Gelatine stock solution (0,1%) zugegeben wird. Bei der Probenvorbereitung ist darauf zu achten, dass der nicht reduzierende Tri-Glycin Probenpuffer (2x) verwendet und die Proben für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden. Anschliessend können die Proteine, wie beschrieben, im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Zur Identifizierung der Proteine wird wie bei der regulären SDS-PAGE ein Standard mitgeführt. Nach erfolgter Elektrophorese werden die Gele

vorsichtig von den Glasplatten abgelöst und in Glasküvetten überführt. Diese sind zuvor mit 50 ml einer im Verhältnis 1:9 mit aqua dest. verdünnten Renaturing-Puffer-Lösung (25%) vorbereitet worden. Nach 30 minütiger Inkubation wird die Renaturing-Puffer-Lösung durch 50 ml einer „Developing“-Puffer-Lösung ersetzt und weitere 30 Minuten inkubiert. Nach Erneuerung der „Developing“-Puffer-Lösung erfolgt eine Inkubation bei 37°C für 24 Stunden. Um den proteolytischen Abbau der Gelatine sichtbar zu machen, werden die Gele dann mit einer Coomassie Blue R-250 Färbelösung (0,5%) für 1 Stunde versetzt und im Anschluss mit einer entsprechenden Coomassie R-250 Entfärbelösung inkubiert. Eine Proteaseaktivität manifestiert sich durch Aufhellungen im sonst dunkelblau angefärbten Gel. An den Stellen mit hellen Banden sind Gelatinasen proteolytisch aktiv und führen zum Abbau von Gelatine, wodurch keine Anfärbung mehr möglich ist. Nach Quantifizierung der Banden (siehe 3.6.1) werden die Gele zur Lagerung in Plastikfolie im Vakuum eingeschlossen und bei 4°C gelagert.

### **3.6.1 Auswertung der Zymographie**

Die Gele werden mit Hilfe der Quantity One Software von BioRad quantifiziert. Dazu werden diese zuvor mit dem GelDoc 2000 System (BioRad) unter Trans-UV Belichtung, nach individueller Einstellung von Schärfe und Helligkeit, dokumentiert. Die Bearbeitung erfolgt dann mit der entsprechenden Software. Dabei kann zwischen verschiedenen Einstellungen und Ansichten („image mode“: „UV“; „Transform“) gewählt werden, um eine optimale Kontrastschärfe zu erhalten und die Banden möglichst deutlich darzustellen. Mit Hilfe des Befehls „frame lanes“ werden die Laufspuren der einzelnen Proben festgelegt. Nach Definition des Hintergrundes („lane background“) können die Banden detektiert („detect bands“) und die Genauigkeit durch Modifikation der Sensitivität verändert werden. Durch Festlegung des Standards wird die Größe der entsprechenden Banden errechnet, um schliesslich mit der Funktion „all lanes report“ ihre relative Quantität zu erhalten.

## **3.7 Immunhistochemie**

### **3.7.1 Fixierung und Einbettung von Gewebe**

Um frische Gewebeproben zu fixieren, werden diese direkt nach Entnahme für 24 Stunden in Formalin (4%) fixiert. Anschliessend erfolgt die Inkubation der Gewebe für je 30 Minuten in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) und in Roti-Histol. Die Gewebeproben werden dann für weitere 24 Stunden in flüssiges Paraffin gegeben und anschliessend in vorgefertigten Formen zu Blöcken gegossen. Das Aushärten der Blöcke erfolgt bei 4°C im Kühlschrank.

### **3.7.2 Immunhistochemische Färbungen**

Es wird die Avidin-Biotin-Complex (ABC-) Methode nach Hsu et al. als immunhistochemische Färbemethode angewendet (Hsu et al. 1981). Hierbei erfolgt nach Bindung eines Primärantikörpers an das entsprechende Gewebe Antigen, die Bindung eines biotinylierten Sekundärantikörpers an den zuvor gebundenen Primärantikörper. Die vorgefertigten Paraffinblöcke werden dazu nach Kühlung auf einer Kühlplatte und Behandlung mit einem Eisspray mit Hilfe eines Mikrotoms in 4µm dicke Scheiben geschnitten und auf Objektträgern für mindestens 3 Stunden getrocknet. Zur Entparaffinierung werden die Proben nach 30 minütiger Behandlung mit Roti-Histol in eine absteigende Alkoholreihe überführt (100%, 90%, 70%), und die Schnitte für 30 Minuten in Methanol-Wasserstoffperoxid-Lösung inkubiert, um die Aktivität endogener Peroxidasen zu hemmen. Zur Demaskierung der Antigene werden die Präparate unter Wärmezufuhr mit Citratpuffer behandelt. Nachdem die Schnitte mit PBS gewaschen sind, erfolgt für 30 Minuten eine Inhibition mit Normalserum des entsprechenden Sekundärantikörpers, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Anschliessend wird eine feuchte Kammer angelegt und die Schnitte darin über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper inkubiert, der zuvor mit Blockpuffer verdünnt wird. Nach dem Waschen der Präparate mit PBS werden sie für 30 Minuten ebenfalls in der feuchten Kammer mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wird AB-Komplex (Avidin-Biotin) auf die Schnitte gegeben. Nach Inkubation (30 Minuten) wird die Farbreaktion durch Zugabe von 3,3-Diaminobenzidin-

Tetrahydrochlorid (DAB) (15 Minuten) ausgelöst. Die anschließende Gegenfärbung erfolgt mit Hämalan und die Fixierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Die Gewebeschnitte werden mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Zeiss) betrachtet und dokumentiert.

### **3.8 Immunzytochemische Färbungen nach Co-Kultur von Tumorzellen und Fibroblasten**

Immunzytochemische Färbungen werden von den gleichen Gewebeschnitten angefertigt, die auch für die Immunhistochemische Färbung verwendet werden. Zusätzlich wird eine Co-Kultur von Fibroblasten und Tumorzellen angefertigt. Dazu werden Fibroblasten gemeinsam mit Tumorzellen auf einen Objektträger gegeben, so dass die beiden Kulturen zusammen wachsen können. Die ausgewählte Zelllinie wird dazu in PBS resuspendiert und eine kleine Menge auf eine Seite des Objektträgers gegeben, auf die andere Seite werden die Fibroblasten aufgetragen. Nachdem die Zellen angewachsen sind, erfolgt die Kultivierung der Zellen. Nach einigen Tagen kommt es zu einem Zusammenwachsen beider Zelltypen, wonach eine Fixierung der Zellen mit Methanol bei  $-20^{\circ}\text{C}$  erfolgt. Für die immunzytochemische Färbung werden die Gewebeschnitte, wie auch die fixierten Zellen nach Co Kultur zunächst drei Mal für fünf Minuten in PBS gewaschen. Nach 15 minütiger Inkubation in einer 3%BSA/0,3%NP40/PBS Puffer-Lösung erfolgt die Inkubation mit dem Erstantikörper. Dieser wird nach Austauschen der Pufferlösung zugefügt und für eine Stunde inkubiert. Anschliessend wird der überschüssige Erstantikörper mit der Pufferlösung ausgewaschen und die Zweitantikörper in Lösung gegeben. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der fluoreszierenden Antikörper, werden die Zellkulturschalen für alle weiteren Vorgänge mit Folie abgedeckt. Im Anschluss an die einstündige Inkubation mit den Zweitantikörpern werden die Zellen zunächst erneut mit 3%BSA/0,3%NP40/PBS Lösung gewaschen. Nach weiterem Waschen in PBS und aqua dest. zur Fixierung wird ein Tropfen „Fluorescent Mounting Medium“ auf die Objektträger gegeben und diese mit einem Deckgläschen bedeckt. Nach Trocknung wird das Deckgläschen mit klarem

Nagellack fixiert. Die Gewebeschnitte bzw. die Co-Kulturen werden dann mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Olympus, Hamburg) untersucht. Die Aufbewahrung der Objektträger erfolgt abgedunkelt bei 4°C.

### **3.9 Statistische Auswertung**

Eine vermeintliche Korrelation zwischen der Expression von CD44 und MMP-9 sowie der gelatinolytischen Aktivität wird mit Hilfe der Pearson Korrelationsanalyse untersucht. Hierbei können Werte zwischen -1 und +1 auftreten, welche den Grad des linearen Zusammenhangs zwischen zwei Merkmalen ausdrücken. Weist das Korrelationsmaß den Wert 0 auf, besteht kein Zusammenhang zwischen den beiden Merkmalen. Bei +1 liegt ein vollständig positiver und bei -1 ein vollständig negativer linearer Zusammenhang vor. Mittels t-Test wird darüber hinaus geprüft, ob der errechnete Korrelationskoeffizient signifikant ist.

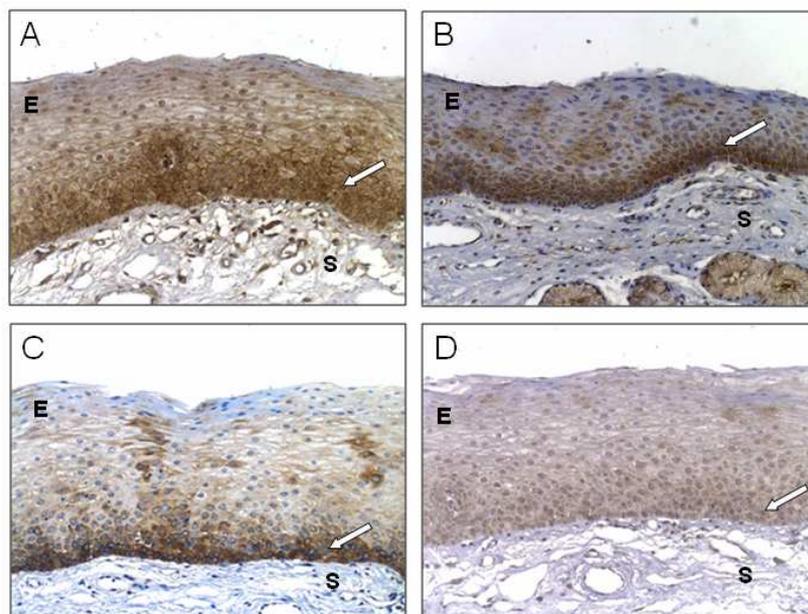
## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Untersuchung stammzelltypischer Marker in normaler Mukosa und HNSCC Tumorgeweben

Um die Expression der Stammzellmarker CD44, ALDH-1 und CK14 in gesundem sowie malignem Gewebe zu untersuchen, erfolgt die immunhistochemische Anfärbung von normaler Mukosa und Tumorgewebebeproben.

#### 4.1.1 Stammzellmarker in normaler Mukosa

Abbildung 6 stellt die Expression potentieller Stammzellmarker sowie MMP-9 in normaler Mukosa dar. Es zeigt sich eine Expression von CD44 (A), ALDH-1 (B) und CK14 (C) in Basalzellen, wobei sich die oberen Epithelschichten negativ darstellen. Diese Beobachtung ist in Einklang mit der etablierten Ansicht, dass die epitheliale Basalzellschicht Stammzellen beherbergt. Weder Basalzellen noch höher differenzierte Zellschichten normaler Mukosa sind hingegen positiv für MMP-9 (D).

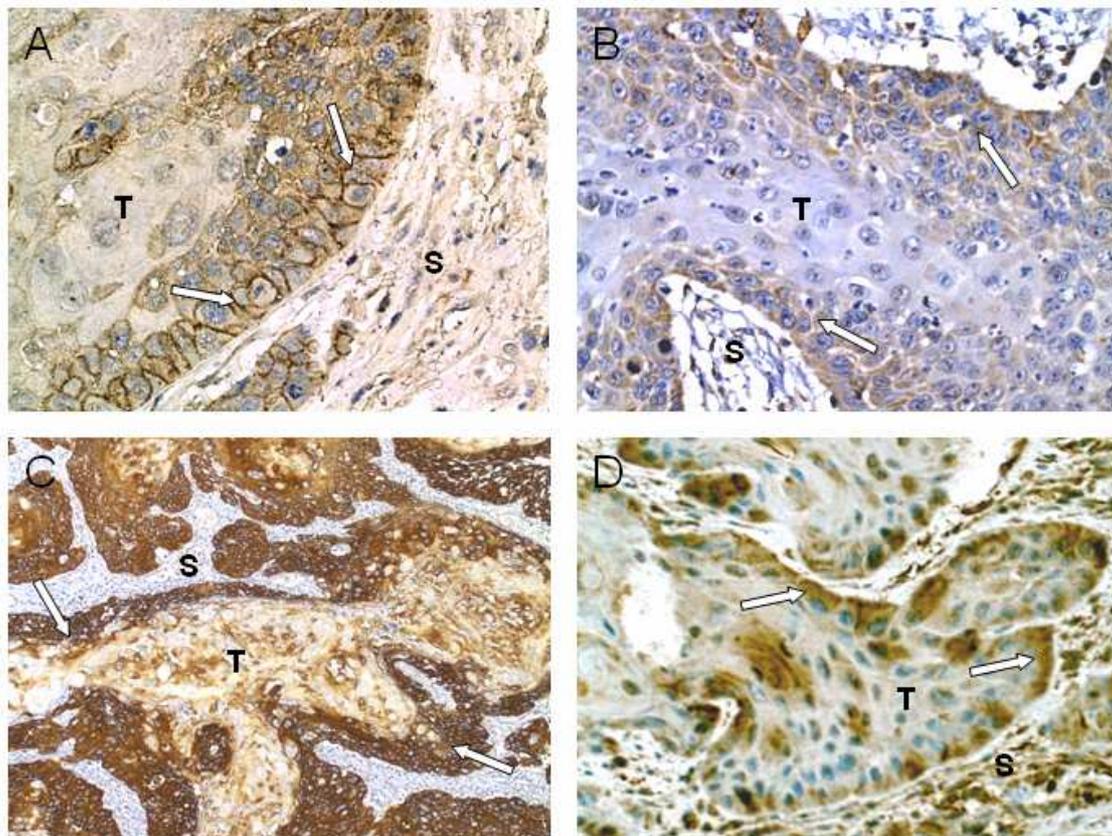


#### Abbildung 6. Expression Stammzelltypischer Marker im Epithel normaler Mukosa

Expression der Stammzellmarker CD44 (A), ALDH-1 (B), CK14 (C) in Basalzellen normaler Mukosa. Es zeigt sich keine wesentliche MMP-9 Expression (D).

#### 4.1.2 Stammzellmarker in Tumorgewebe

In den Tumorgewebeproben kann, wie auch in normaler Mukosa, eine CD44, CK14 sowie ALDH-1 Expression nachgewiesen werden. Diese Expression zeigt sich in Zellen, welche an Basalzellen normaler Mukosa erinnern und sich bevorzugt im Bereich der invasiven Front des Tumors befinden, die wiederum in direktem Kontakt zum umliegenden Stroma steht. Mehr zentral gelegene Anteile des Tumors erscheinen dagegen negativ für alle drei Zellmarker. Im Gegensatz zu normaler Mukosa zeigt sich in HNSCC Tumorgeweben auch eine positive Färbung für MMP-9. Besonders deutlich ist dies an der invasiven Front.

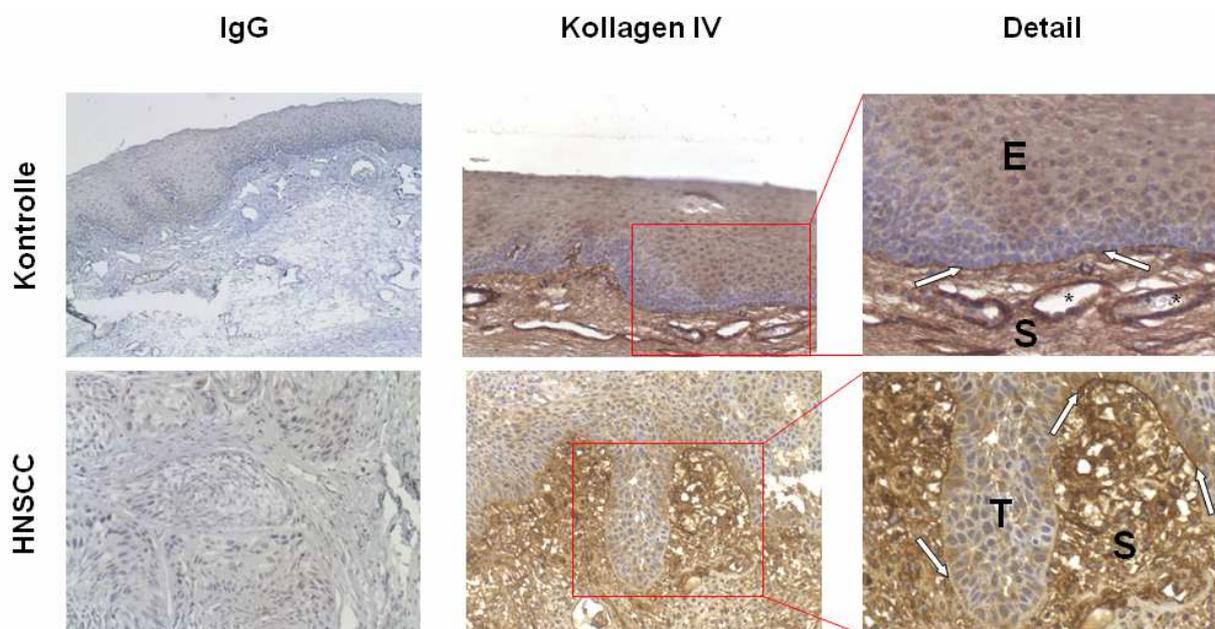


**Abbildung 7. Immunhistochemische Färbung von Tumorgewebe zum Nachweis möglicher Tumorstammzellkandidaten**

Im Gegensatz zu normaler Mukosa zeigt sich im Tumorgewebe nicht nur eine Expression der Stammzellmarker CD44 (A), ALDH-1 (B) und CK14 (C), sondern auch eine MMP-9 (D) Expression bei Zellen der invasiven Tumorfront.

#### 4.1.3 Expression des Basalmembran-typischen Kollagen-IV

Beim Anfärben von normaler Mukosa und HNSCC mit einem Kollagen-IV spezifischen Antikörper (Abbildung 8) zeigt sich bei normaler Mukosa ein schmaler Kollagen-IV Saum, der die Lage der Basalmembran anzeigt. Auch bei HNSCC Tumoren kann ein solches Kollagen-IV Signal nachgewiesen werden, wobei dieses, insbesondere in Bereichen protrudierender Tumorzellen, teilweise unterbrochen erscheint. Bei kleineren Blutgefäßen findet sich ebenfalls ein Kollagen IV Signal, welches mit der Lage der dortigen Basalmembran vereinbar ist.



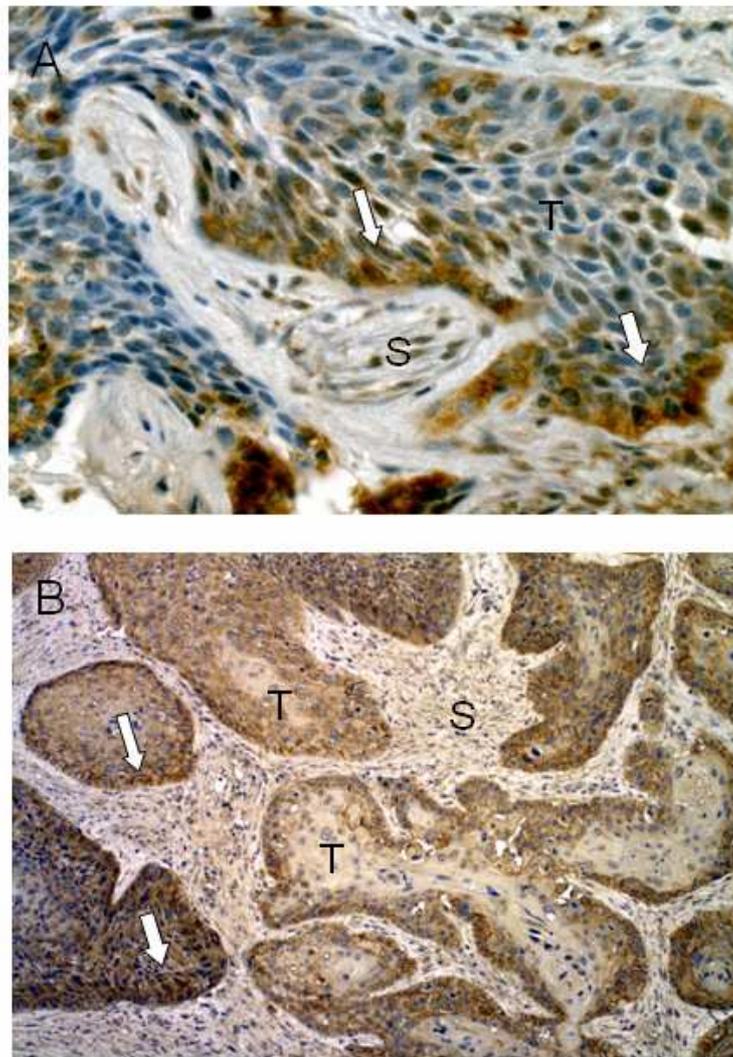
**Abbildung 8. Immunhistochemische Färbung zum Kollagen IV Nachweis**

Es zeigt sich sowohl bei normaler Mukosa (obere Reihe), als auch in HNSCC Tumoren (untere Reihe) ein schmaler, zur Basalmembran passender Kollagen IV Saum. Die Vergrößerung zeigt, dass diese genau an den Stellen durchbrochen ist, an denen die Tumorzapfen in das gesunde Gewebe vordringen.

## **4.2 Kolokalisation von CD44 und MMP-9 bei Tumorzellen der invasiven Front**

### **4.2.1 Vergleich Immunhistochemischer Färbungen für CD44 und MMP-9**

Da CD44 bei HNSCC Tumoren als einer der wichtigsten Tumorstammzellmarker angesehen wird (Prince et al. 2007), erfolgt zunächst die Darstellung dieses Markers. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Tumorstammzellen und der Invasivität von HNSCC Tumoren nachzuweisen, werden die immunhistochemischen Färbungen für CD44 mit denen für MMP-9 verglichen. Hierbei zeigt sich, dass der Bereich in dem CD44 verstärkt exprimiert wird ebenfalls eine starke MMP-9 Expression aufweist (Abbildung 9). Insbesondere kann eine Kolokalisation von CD44 und MMP-9 in Zellen der Tumor-Stroma Grenze gezeigt werden. Betrachtet man die inneren Bereiche der Tumorinseln, so fällt auf, dass hier sowohl die CD44, als auch die MMP-9 Expression wesentlich schwächer ausfallen.

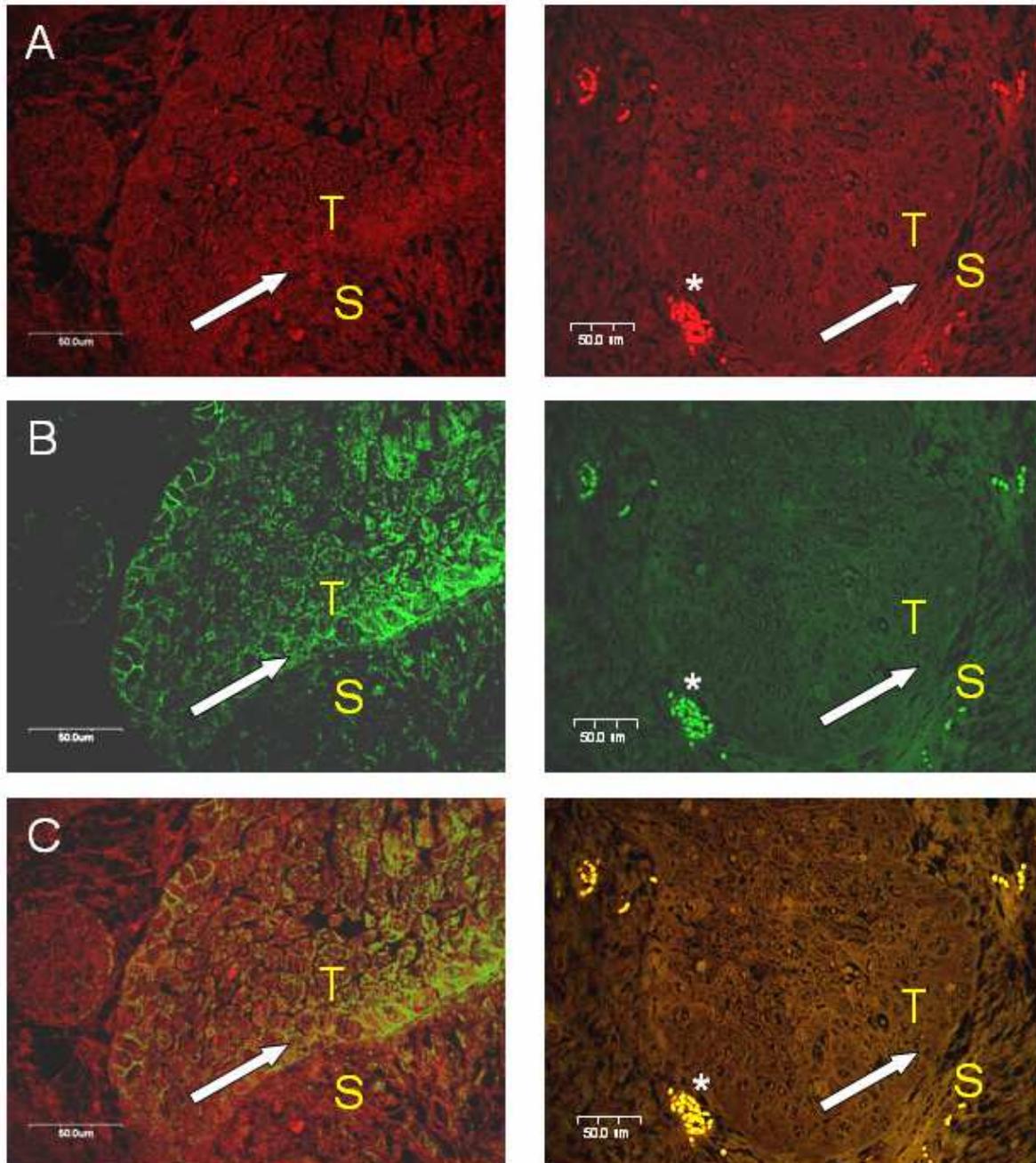


**Abbildung 9. Vergleich der Immunhistochemischen Färbungen von HNSCC Gewebeproben auf CD44 und MMP-9**

(A) Verstärkte MMP-9 Expression an der Übergangszone zwischen Tumor und Stromabereichen. (B) CD44 Expression in Bereichen, in denen auch eine verstärkte MMP-9 Expression vorliegt

#### 4.2.2 Immunfluoreszenz Färbung

Bei der Immunfluoreszenzfärbung wird eine Kolo-kalisation von CD44 und MMP-9 im Bereich der invasiven Tumorfront deutlich. Hierbei zeigt sich auch, dass CD44 eher an der Plasmamembran exprimiert wird, wohingegen MMP-9 vorwiegend zytoplasmatisch nachweisbar ist.

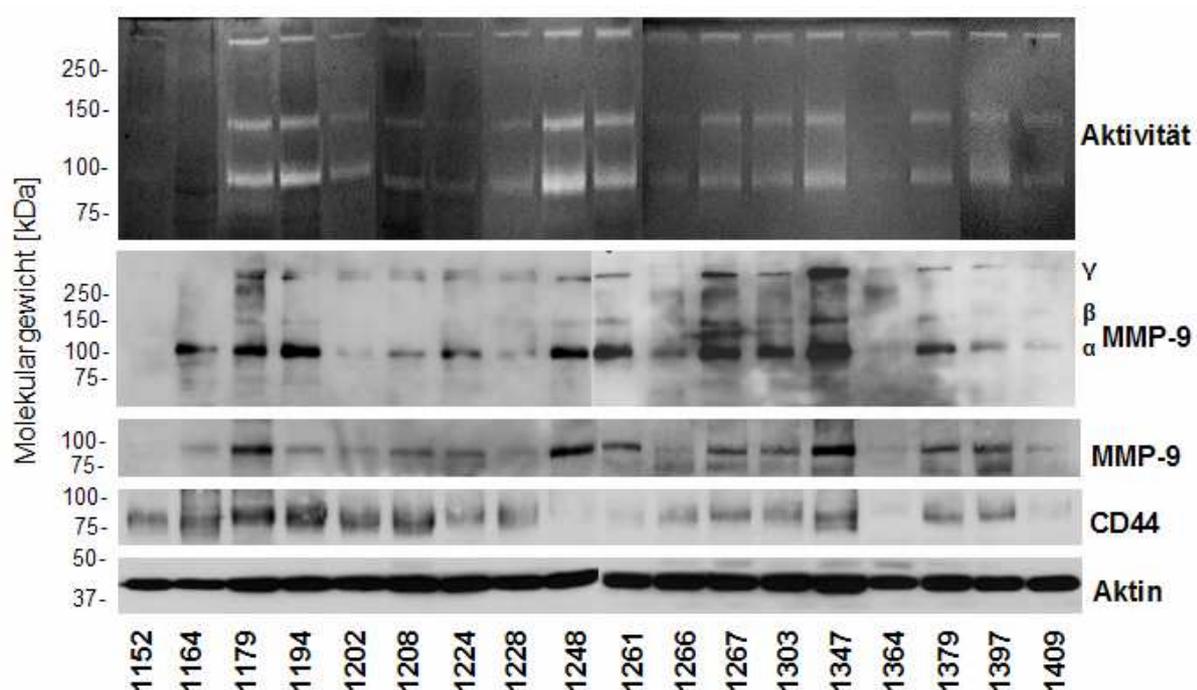


**Abbildung 10. Kolokalisation von CD44 und MMP-9 in HNSCC Gewebeproben**

Die Immunfluoreszenz Doppelfärbung Formalin-fixierter Paraffinschnitte zeigt eine Kolokalisation von MMP-9 (rot, TR) (A) und CD44 (grün, FITC) (B). Insbesondere bei der Überlagerung beider Signale (C) wird diese Kolokalisation an der Tumor (T) Stroma (S) Grenze (Pfeile) deutlich. In der rechten Spalte sind die entsprechenden Negativkontrollen abgebildet (IgG) Asteriske markieren auto-fluoreszierende Erythrozyten.

### 4.3 Koexpression von CD44 und MMP-9 in HNSCC Gewebeproben

Die Proteinexpression von CD44 und MMP-9 in HNSCC Gewebeproben wird mittels Western Blot Analyse untersucht. Es zeigt sich in der überwiegenden Zahl der untersuchten Proben eine sichtbare Korrelation zwischen CD44 und MMP-9. Als interne Kontrolle wird  $\beta$ -Aktin mitgeführt. Interessanterweise stellt sich normale Mukosa (Abbildung 11 #1152) positiv für CD44 jedoch negativ für MMP-9 dar, was mit den Ergebnissen der Immunhistochemie vereinbar ist.



**Abbildung 11. Gelatinolytische Aktivität und MMP-9 und CD44 Expression in HNSCC Gewebeproben**

Mittels Zymographie wird die gelatinolytische Aktivität von HNSCC Geweben bestimmt und mit den Ergebnissen der Western Blot Analyse für MMP-9 und CD44 verglichen. Zusätzlich wird die Western Blot Analyse für MMP-9 unter nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt, um das Vorliegen möglicher Komplexen einzuschätzen (2. Tafel von oben).

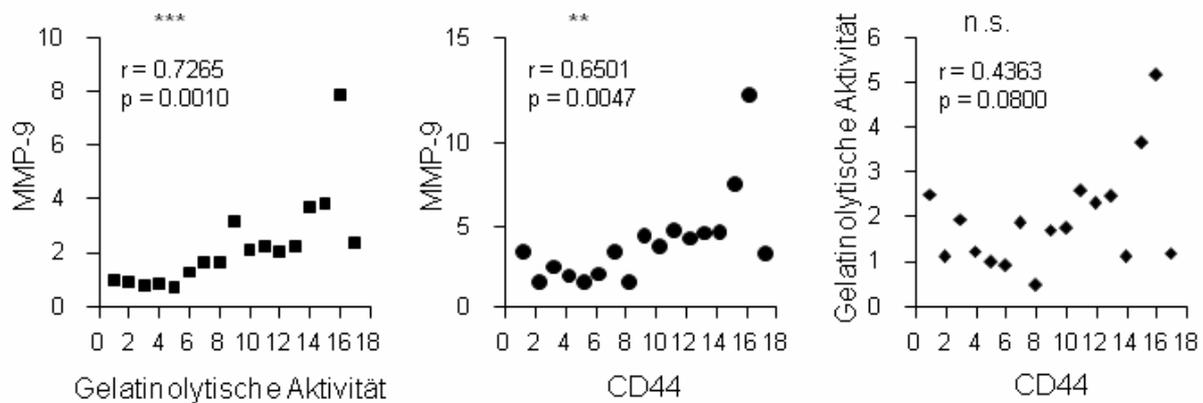
## 4.4 Gelatinolytische Aktivität in HNSCC Gewebeproben

### 4.4.1 Gelatin Zymographie

Um vergleichend zur MMP-9 Protein Expression die Quantität der MMP-9 Aktivität einzuschätzen, werden HNSCC Gewebeproben mittels Gelatin Zymographie beurteilt und die Ergebnisse mit den Western Blot Ergebnissen von MMP-9 der gleichen Tumorproben verglichen.

Abbildung 11 zeigt, dass die Expression von CD44 und MMP-9 miteinander korreliert und dass MMP-9 hauptverantwortlich ist für die gelatinolytische Aktivität. Es zeigt sich, dass Gewebe, die eine starke Gelatinase Aktivität aufweisen, auch eine starke MMP-9 Expression zeigen (Abbildung 11, #1179, 1194, 1248, 1261), wohingegen Gewebe mit schwacher Gelatinase Aktivität auch nur schwache MMP-9 Expression aufweisen (Abbildung 11, #1152, 1364). Normale Mukosa diente als eine normale Kontrolle und zeigte im Gegensatz zu den Tumorgeweben keine wesentliche MMP-9 Expression oder Aktivität (Abbildung 11, #1152). Um die Ergebnisse der Zymographie mit den Ergebnissen der Western Blot Analyse vergleichen zu können, werden die Proben unter exakt den gleichen Bedingungen behandelt. So wird auch für die Western Blot Analyse analog zur Zymographie, ein nicht reduzierender Puffer verwendet, wobei die Proben nicht denaturiert, sondern 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden. Dadurch kann die MMP Aktivität aufrechterhalten und ein Zerfall möglicher Komplexe verhindert werden.

Um die Signifikanz der Korrelation zwischen MMP-9, CD44 und der gelatinolytischen Aktivität zu zeigen, werden die Ergebnisse quantifiziert und mittels der Pearson Korrelations Analyse beurteilt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 dargestellt. Eine hoch signifikante Korrelation ( $p=0,001$ ) zeigt sich zwischen MMP-9 und der gelatinolytischen Aktivität, sowie zwischen der Expression von CD44 und MMP-9 ( $p=0,0047$ ). Weiter zeigt sich eine Assoziation zwischen CD44 und der gelatinolytischen Aktivität an, die jedoch keine Signifikanz erreicht.



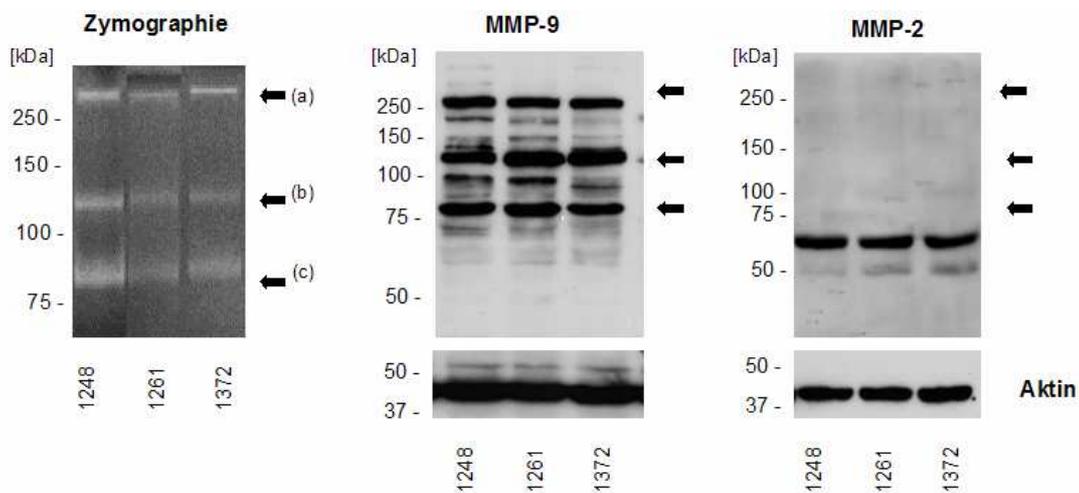
**Abbildung 12. Korrelation von gelatinolytischer Aktivität, CD44 und MMP-9.**

Eine deutliche Signifikanz zeigt sich zwischen MMP-9 und gelatinolytischer Aktivität sowie zwischen CD44 und MMP-9. Ein Vergleich der Expression von CD44 mit der gelatinolytischen Aktivität zeigte eine tendenzielle Korrelation, erreichte jedoch keine Signifikanz (Pearson Korrelations Analyse).

In der Western Blot Analyse sowie der Zymographie können drei Banden nachgewiesen werden. Die unterste auf einer Höhe von ca 90 kDa ( $\alpha$ ), die mittlere bei ca. 140 kDa ( $\beta$ ) und die höchste bei >250 kDa ( $\gamma$ ). Die Positionen der MMP-9 spezifischen Banden sind vergleichbar mit der Lokalisation der gelatinolytischen Aktivität, wohingegen die Lage von MMP-2 nicht mit den gelatinolytischen Banden im Zymogramm übereinstimmt.

#### 4.4.2 MMP-9 aber nicht MMP-2 korreliert mit der gelatinolytischen Aktivität

Da gelatinolytische Aktivität nicht ausschließlich von MMP-9, sondern ebenfalls von MMP-2 ausgehen kann, werden die gleichen Proben im Western Blot auf die beiden Gelatinasen getestet und diese Ergebnisse mit denen der Zymographie verglichen.



**Abbildung 13. Gelatinase Aktivität und MMP-2 bzw. -9 Expression**

Die Pfeile zeigen die im Molekulargewicht übereinstimmenden Banden von MMP-9 und der gelatinolytischen Aktivität. Es zeigt sich keine Übereinstimmung zwischen der Aktivität und MMP-2.

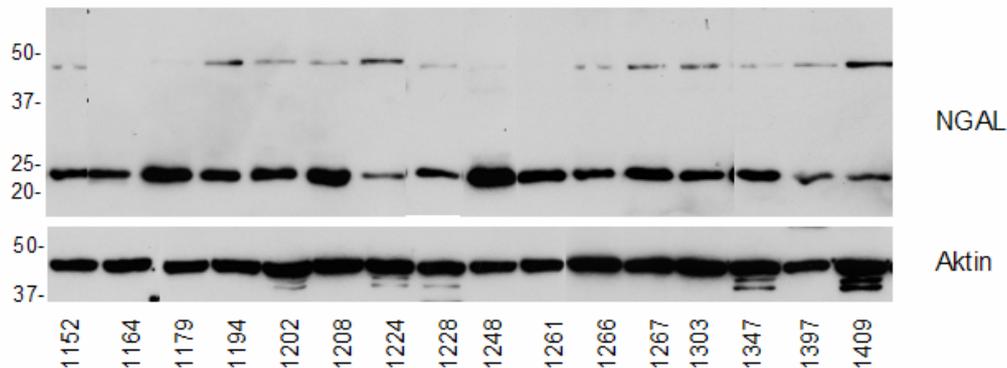
Die MMP-2 spezifischen Banden sind mit einem Molekulargewicht von 66 kDa passend zur aktiven Form und mit 72 kDa zur Pro-Form von MMP-2.

#### 4.5 Expression und Lokalisation von MMP-9 und NGAL

Die Höhe der mittleren (b) MMP-9 Banden ist vereinbar mit einer Komplexbildung zwischen MMP-9 und NGAL (Zhang et al. 2007). Um diese Annahme weiter bestätigen bzw. verwerfen zu können, erfolgen die weiterführenden Untersuchungen.

#### 4.5.1 Korrelation der MMP-9 und NGAL Proteinexpression

Die Expression von NGAL und MMP-9 wird in HNSCC Gewebeproben mittels Western Blot beurteilt und miteinander verglichen.



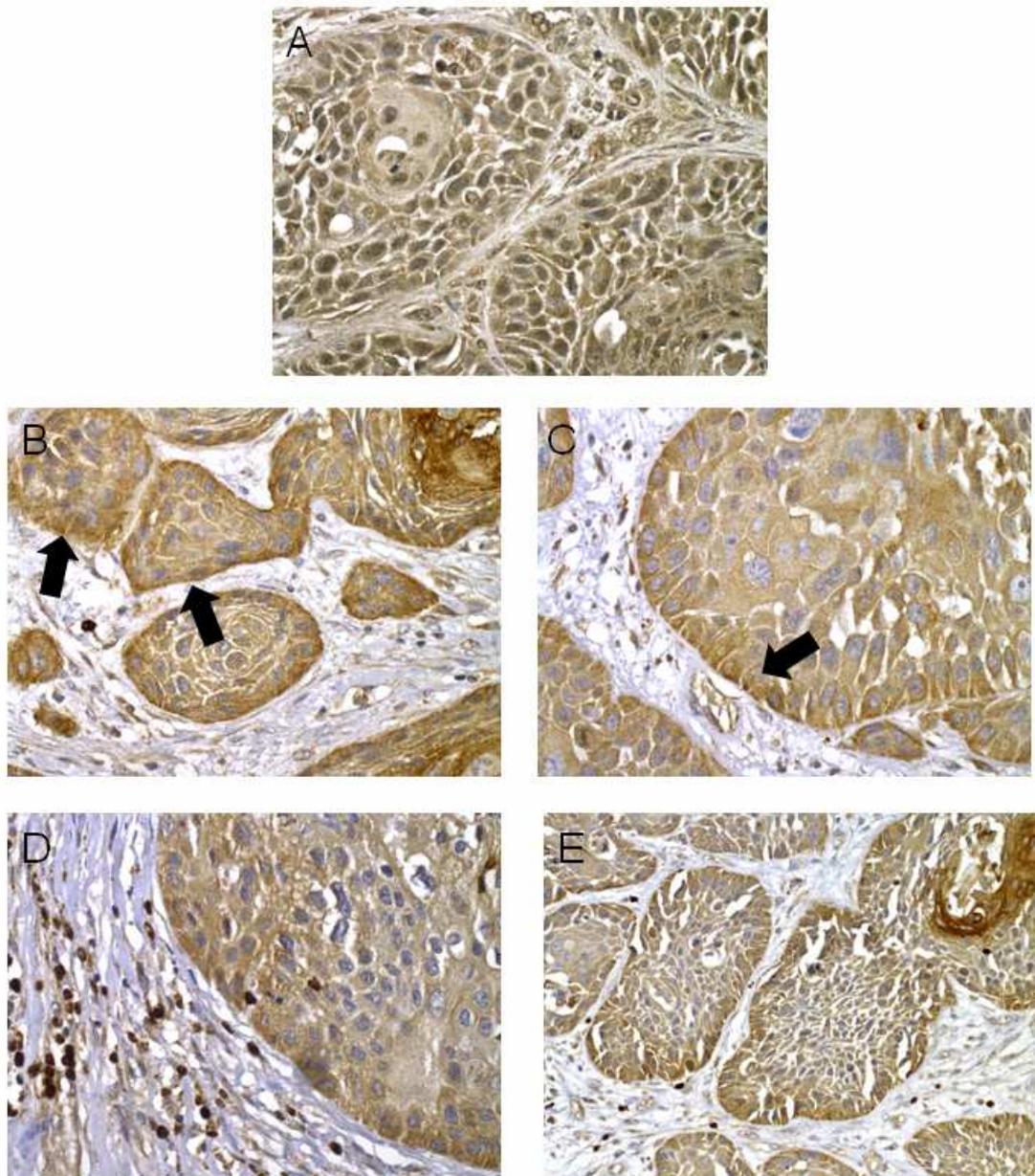
**Abbildung 14. NGAL Expression in HNSCC Gewebeproben**

In HNSCC Gewebeproben wurde die NGAL Expression untersucht und mit der von MMP-9 verglichen. Aktin diente als interne Kontrolle.

Die Western Blotuntersuchungen werden unter nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt, um einer Dissoziation möglicher Komplexe entgegen zu wirken. Die nachgewiesenen NGAL Banden liegen bei 23 bzw. 46 kDa und sind mit der monomeren bzw. dimeren Form von NGAL vereinbar. Mit den in Abbildung 11 und 13 beobachteten MMP-9 Banden sind sie nicht vereinbar.

#### 4.5.2 Kolokalisation von NGAL und MMP-9 im Bereich der Tumorfront

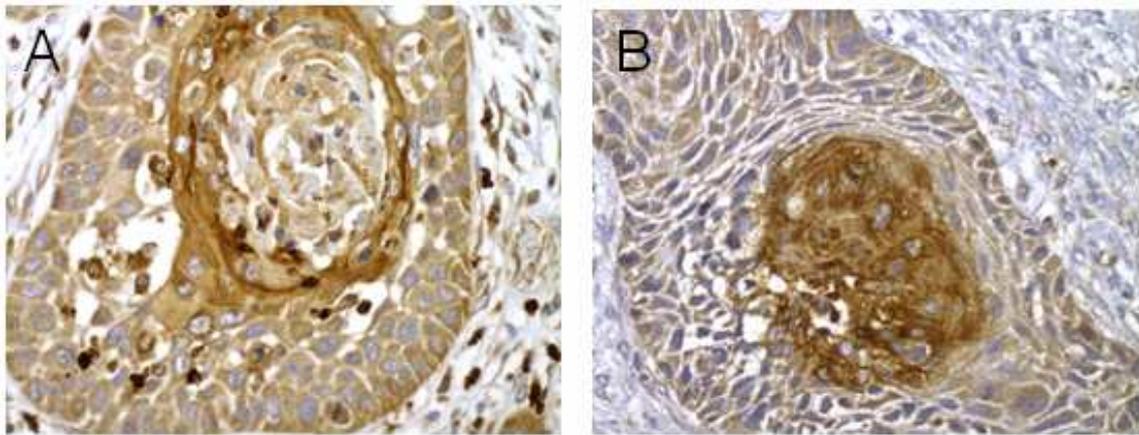
Zur weiteren Beurteilung einer möglichen Ko-Expression von MMP-9 und NGAL, wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Analog zu den durchgeführten Färbungen auf CD44 und MMP-9 wurde nun auch die NGAL Expression in HNSCC Gewebeschnitten beurteilt. Es zeigte sich in gleicher Weise wie für CD44 und MMP-9 beschrieben eine NGAL Expression im Bereich der invasiven Front (Abbildung 15).



**Abbildung 15. Verstärkte NGAL Expression in den Randbereichen des Tumorgewebes**

B-E zeigen eine verstärkte NGAL Expression am Übergang zwischen Tumor und Stroma.  
(A: Negativkontrolle).

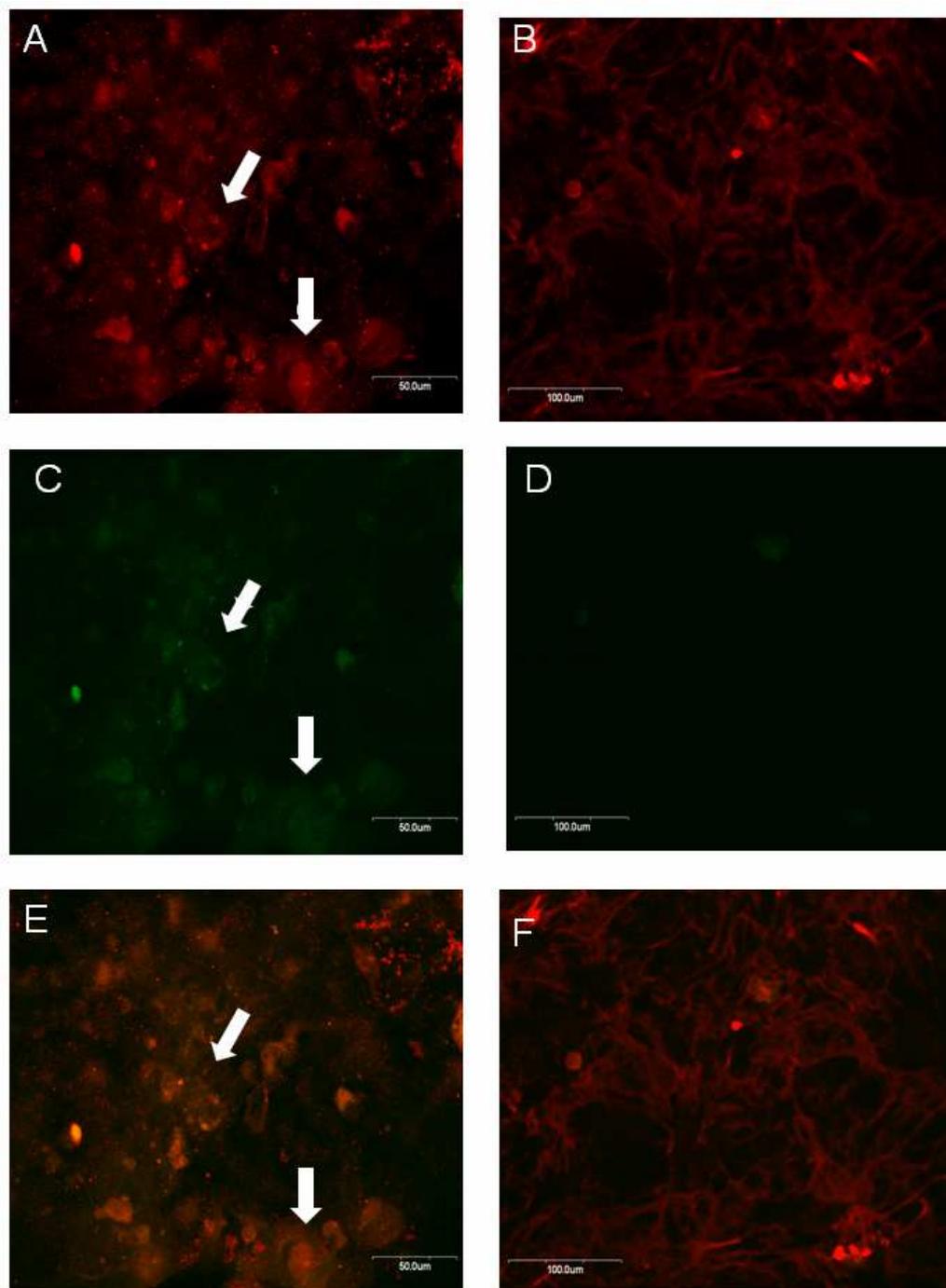
Weiterhin zeigten sich die inneren Anteile der Tumorzellnester häufig ebenfalls positiv für NGAL (Abbildung 16).



**Abbildung 16. NGAL positive Zellen im Inneren der Tumorinseln**

#### **4.5.3 Immunfluoreszenz Doppelfärbung auf MMP-9 und NGAL nach Kokultur von Fibroblasten und Tumorzellen**

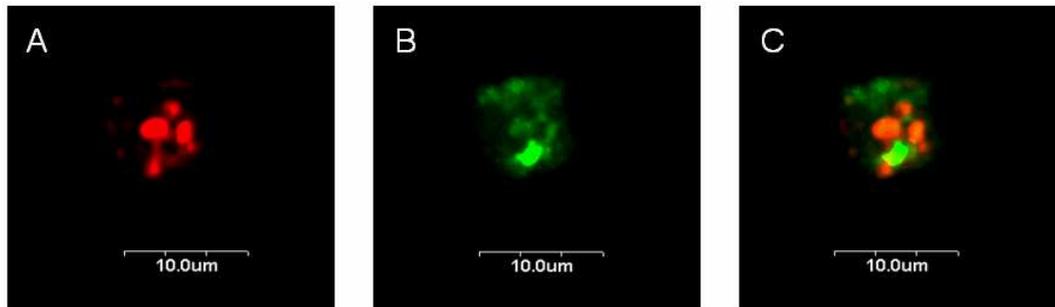
In der Immunfluoreszenz Färbung zeigt sich nach Co-Kultur von Fibroblasten und der HNSCC Zelllinie UM-SCC-2 eine mäßige NGAL Expression in Tumorzellen (B), wohingegen Fibroblasten kaum sichtbar NGAL exprimieren (F). Die MMP-9 Expression ist sowohl in Tumorzellen (A), als auch in Fibroblasten (D) deutlich zu erkennen.



**Abbildung 17. MMP-9 und NGAL Expression im Bereich der Tumor Stroma Grenze**

Vergleich der MMP-9 Expression in Tumorzellen (A) und Fibroblasten (B) mit der NGAL Expression in Tumorzellen (C) bzw. Fibroblasten (D). (E) und (F) zeigen jeweils die Überlagerung.

Einzelne Zellen zeigen eine Koexpression von MMP-9 und NGAL.

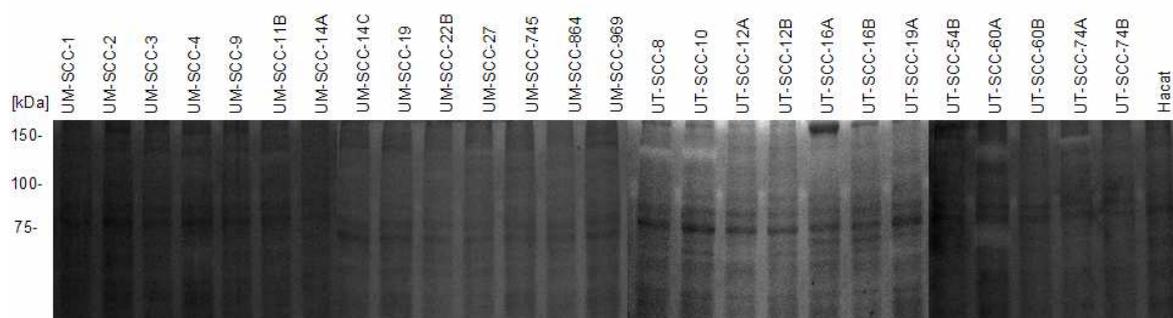


**Abbildung 18. Immunfluoreszenz Färbung einer Tumorzelle nach Co-Kultur mit Fibroblasten.**

(A) MMP-9 Expression, (B) NGAL Expression, (C) Überlagerung

#### 4.6 Vergleich des Invasivitätsverhaltens *in vivo* versus *in vitro*

Um die Unterschiede im Invasivitätsverhalten *in vivo* und *in vitro* zu untersuchen, wurde mittels Gelatin Zymographie die gelatinolytische Aktivität in Zelllinien mit der in HNSCC Gewebeproben verglichen. Es stellte sich dabei heraus, dass mit der beobachteten starken Invasivität von Tumorgewebe *in vivo* auch eine starke Gelatinase Aktivität einhergeht. Im Gegensatz hierzu war in den gering invasiven Zelllinien kaum Aktivität nachweisbar.



**Abbildung 19. Untersuchung der Gelatinase Aktivität in Zellysat.**

Die gelatinolytische Aktivität wurde in Zellysaten getestet und mit der in Gewebeproben verglichen. Dabei zeigen HNSCC Zelllinien eine deutlich geringere Gelatinase Aktivität als HNSCC Gewebe.

## **5 DISKUSSION**

### **5.1 Die Tumorstammzell Hypothese**

Die in den letzten Jahren zunehmend diskutierte Tumorstammzell Hypothese bringt viele neuartige Überlegungen und Forschungsansatzpunkte mit sich (Kuhn und Tuan 2010). Es konnte in letzter Zeit nicht nur für maligne hämatologische Erkrankungen sondern zunehmend auch für solide Tumore die Existenz von Tumorstammzellkandidaten nachgewiesen werden. Geht man davon aus, dass der größte Teil des malignen Potentials eines Tumors von eben diesen Zellen ausgeht, so hat dies weitreichende Konsequenzen. Es scheint daher weniger die zahlenmässig dominierende Menge an stärker differenzierten Tumorzellen, sondern vielmehr die in viel geringerer Anzahl vorhandenen Zellen mit Stammzell Eigenschaften zu sein, welche die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzt und damit in der Lage ist, den Tumorphänotyp zu reproduzieren.

Die Frage mit welchen Oberflächenmarkern Tumorstammzellen am Besten zu identifizieren sind, wird kontrovers diskutiert. So scheinen bestimmte Marker in manchen Tumorarten von größerer, in anderen hingegen von geringerer Bedeutung zu sein. Für Tumore des Zentralen Nervensystems zum Beispiel wurde eine besondere Rolle von CD133 nachgewiesen (Suva et al. 2009, Singh et al. 2004), ebenso bei Nierentumoren (Bruno et al. 2006). In Lebertumoren scheint hingegen CD90 die zentrale Rolle zu spielen (Yang et al. 2008). Im Fall der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) zeigten sich CD34 positive Zellen in immundefizienten Mäusen in der Lage einen Tumor zu bilden, der dem ursprünglichen Tumor in Morphologie und Phänotyp entsprach (Lapidot et al. 1994). Für die AML kann also CD34 als ein Marker für Zellen mit Stammzell Eigenschaften postuliert werden (Cobaleda et al. 2000). Nicht immer herrscht Einigkeit über die Spezifität und Sensitivität verschiedener Stammzellmarker. So befanden Cox et al. in ihren Untersuchungen Tumorstammzellen in Bezug auf B-Zell Leukämien als CD19 negativ (Cox et al. 2004), wohingegen Castor et al. Tumorstammzellen in Bezug auf dieselbe Erkrankung als CD19 positiv bezeichnen (Castor et al. 2005).

## 5.2 Tumorstammzellen in HNSCC Tumoren

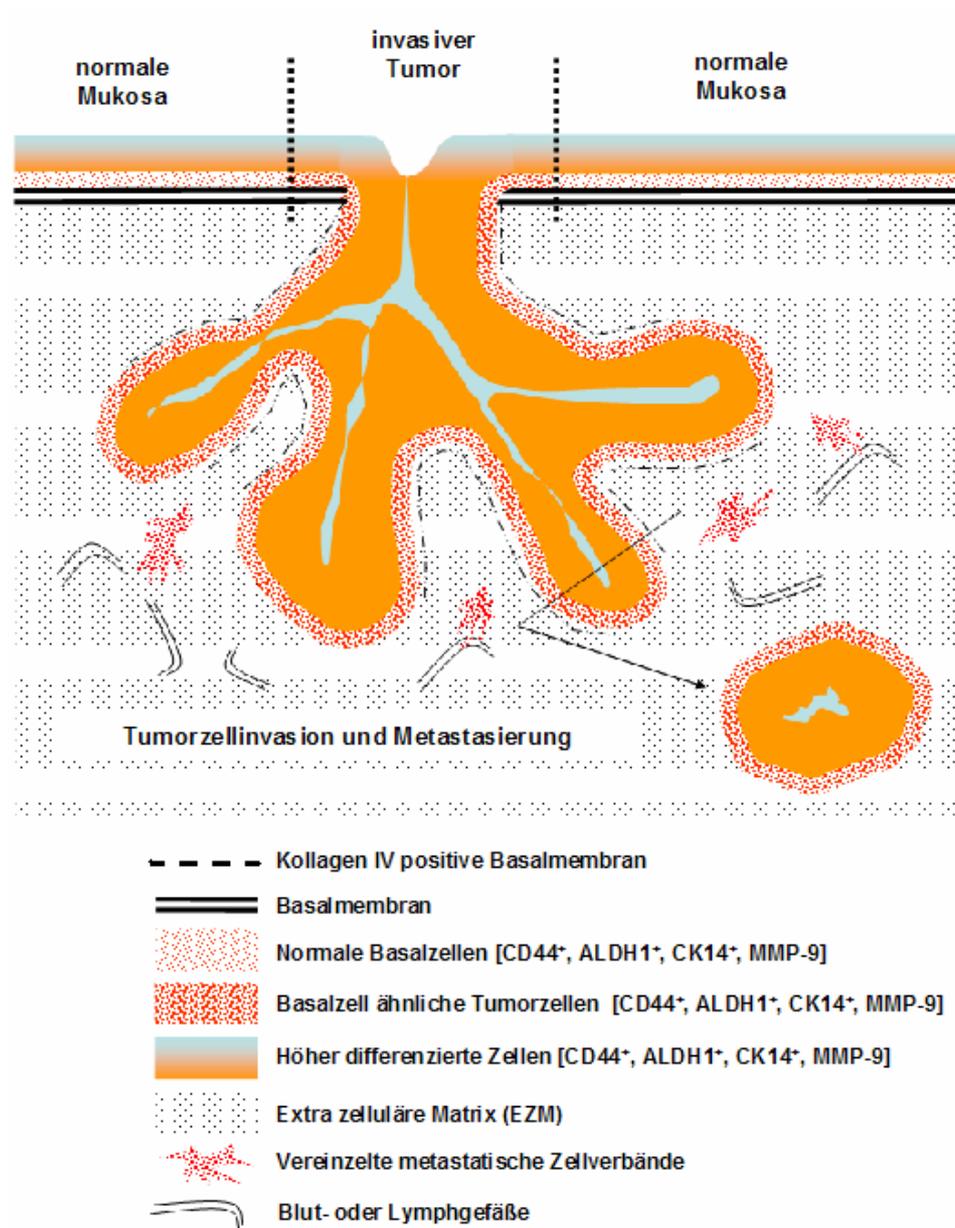
Plattenepithelkarzinome des Kopf-, Halsbereiches stellen eine hochinvasive Tumorentität dar. Sie sind durch ein schnelles aggressives Wachstum charakterisiert und zeichnen sich ausserdem durch eine frühe Metastasierung aus (Moisa et al. 1991). Auch bei HNSCC Tumoren wird die Existenz von Tumorstammzellen, welche den größten Teil des malignen Potentials des Tumors ausmachen sollen, angenommen. So konnten Prince et al. für Plattenepithelkarzinome des Kopf-, Halsbereiches zeigen, dass CD44 positive Zellen im Gegensatz zu CD44 negativen Zellen in der Lage sind, einen neuen, mit dem Primärtumor identischen Tumorphänotyp zu bilden (Prince et al. 2007). Auch andere Forschungsgruppen beschäftigen sich mit der Bedeutung von CD44 als Tumorstammzellmarker für HNSCC Tumore (Prince et al. 2007, Pries et al. 2008, Wang et al. 2007). Prince et al. konnten sogar zeigen, dass eine Selektion nach CD44 ausreicht, um diese Zellen mit Stammzell Eigenschaften zu isolieren. Barth et al. konnten eine Expression der Rezeptor Tyrosin Kinase c-kit (CD117) in Tumor assoziierten Fibroblasten zeigen, wohingegen nicht Tumor assoziierte Fibroblasten CD117 negativ waren. Neben CD44 gibt es weitere Zellmarker, für die gezeigt werden konnte, dass sie in Zellen mit Stammzell Eigenschaften überexprimiert werden.

In Mammakarzinomen konnte eine Korrelation zwischen einer hohen Expression des Enzyms Aldehyddehydrogenase 1 (ALDH1), einer frühen Metastasierung sowie einem schlechten klinischen Verlauf gezeigt werden (Charafe-Jauffret et al. 2010). Auch für Karzinome der Lunge konnte ALDH1 als Marker für Zellen mit Tumorstammzell ähnlichen Eigenschaften identifiziert werden (Jiang et al. 2009). Da für ALDH1 auch bei HNSCC Tumoren eine Bedeutung als Tumorstammzellmarker angenommen wird (Chen et al. 2009), ist ALDH1 auch in der vorliegenden Arbeit untersucht worden. In neuesten Studien wird ALDH1 eine noch größere Spezifität als Stammzellmarker für HNSCC Tumore zugesprochen als CD44 (Clay et al. 2010). Bei der Betrachtung unserer immunhistochemischen Untersuchungen scheinen jedoch wesentlich weniger Zellen ALDH1 positiv als CD44 positiv, weshalb eine höhere Spezifität von ALDH1 gegenüber CD44 erst noch genau nachgewiesen werden muss. Die Expression des Basalzelltypischen Zytokeratins 14 (CK14) wurde ebenfalls untersucht. CK14 wird

bekannterweise in normalen Stammzellen der Basalzellschicht exprimiert und als zusätzlicher Marker für Tumorstammzellen diskutiert (Prince et al. 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurden die genannten potentiellen Tumorstammzellmarker sowohl in normaler Mukosa, als auch in Tumorgewebe untersucht. Hierbei zeigte sich in normaler Mukosa eine deutliche Expression aller drei Stammzellmarker (CD44, ALDH1, CK14) in der Basalzellschicht des Epithels. Höher gelegene, besser differenzierte Zellschichten waren hingegen negativ für diese Marker, was vereinbar mit der angenommenen Basalmembran-nahen Lokalisation von Stammzellen in normalem Epithel ist. Die immunhistochemische Färbung des Tumorgewebes zeigt interessanterweise eine Expression der drei Stammzellmarker in Tumorzellen an der Tumor-Stroma-Grenze, also im Bereich der invasiven Front des Tumors. Überraschenderweise zeigen eben diese Areale an der invasiven Tumorfront auch eine vermehrte Expression von MMP-9, welche in der CD44+/ALDH1+/CK14+-Basalzellschicht normaler Mukosa nicht nachweisbar ist.

Abbildung 20 zeigt eine hypothetische Darstellung der Tumorzellinvasion von HNSCC Tumoren. Epithelzellen normaler Mukosa, die der Basalmembran anliegen, sind positiv für die Stammzellmarker CD44, ALDH1 und CK14, aber negativ für MMP-9. Im Gegensatz hierzu sind Zellen, welche die Basalmembran durchdringen und invasiv in die Extrazelluläre Matrix einwachsen sowohl positiv für diese drei Stammzellmarker, als auch für MMP-9.



### Abbildung 20. Schematische Darstellung der Tumorzell Invasion

Sowohl Zellen der Basalzellschicht normaler Mukosa, als auch Zellen der Tumorinvasionsfront (Basalzell ähnliche Tumorzellen) exprimieren CD44, ALDH1 und CK14. Signifikante Mengen an MMP-9 finden sich jedoch vorwiegend in Tumorstammzellkandidaten der Invasionsfront und nicht den normalen Basalzellen. Im Inneren des Tumors finden sich höherdifferenzierte (CD44<sup>-</sup>, ALDH1<sup>-</sup>, CK14<sup>-</sup>, MMP-9<sup>-</sup>) Tumorzellen. Einzelne Tumorzellen oder -zellhaufen lösen sich von der Invasionsfront und können Blut- oder Lymphgefäße infiltrieren.

### **5.3 CD44 positive Tumorstammzellen im Bereich der invasiven Tumorfront**

Die invasive Front des Tumors, der Grenzbereich zwischen Tumor und Stroma stellt den Bereich des Tumors dar, in dem Proliferation und Invasivität besonders stark ausgeprägt sind. Während seines Wachstumsprozesses muss der Tumor also in eben diesem Bereich über Mechanismen verfügen, mit denen er die Extrazelluläre Matrix zerstören und in umliegendes Gewebe eindringen kann.

Da CD44 bei HNSCC Tumoren als Marker für Zellen mit Stammzeleigenschaften gilt, wurde bei den weiterführenden Untersuchungen CD44 stellvertretend für die übrigen Stammzellmarker betrachtet, insbesondere da Prince et al. in ihrer Arbeit zeigen konnten, dass eine Selektion von CD44 positiven HNSCC Zellen zu einer starken Anreicherung von Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften führt (Prince et al. 2007). Nach immunhistochemischer Färbung zeigt sich eine Akkumulation CD44 positiver Zellen in den Tumorrandbereichen, welche dem Stroma direkt anliegen. Dies scheint aufgrund der Überlegungen durchaus plausibel, da in diesem Bereich das Haupttumorwachstum stattfindet.

### **5.4 Kolokalisation von CD44 und MMP-9 im Bereich der Tumor-Stroma-Grenze**

Die Invasivität von Tumoren sowie deren Metastasierung wird unter anderem durch einen Umbau der Extrazellulären Matrix bewirkt (Fidler, 2003). Die malignen Zellen bahnen sich durch Degradation verschiedener Matrixkomponenten ihren Weg durch gesundes Gewebe, dringen in Blutgefäße ein und streuen so in entfernt liegende Bereiche des Körpers. Wie bereits in der Einleitung dargestellt, spielen die Matrixmetalloproteinase beim Prozess der Invasivität und Metastasierung eine zentrale Rolle. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass eine Vielzahl von Tumoren mit erhöhter Tumoraggressivität und erhöhtem Metastasierungspotential eine Überexpression der MMPs gemein ist (Björklund und Koivunen 2005). Dies gilt in besonderem Maße auch für Plattenepithelkarzinome des Kopf-, Halsbereichs (Werner et

al. 2002). Durch Zerstörung der Basalmembran sowie Kollagenabbau sind hier speziell die beiden Gelatinasen MMP-2 und -9 wesentlich involviert. Kollagen IV spielt dabei als Hauptbestandteil der Basalmembran und wichtiges Substrat von MMP-9 eine große Rolle.

Für das Kolonkarzinom wurde gezeigt, dass die Expression von MMP-2 und -9 in Korrelation zur Adenom-Karzinom-Sequenz ansteigt (Tomita und Iwata 1996). Hong et al. fanden heraus, dass MMP-9 in Bezug auf die Metastasierung oraler Plattenepithelkarzinome eine bedeutendere Rolle zu spielen scheint als MMP-2 (Hong et al. 2000). Auch Vilen et al. konzentrierten sich auf MMP-9 und beschreiben eine intrazelluläre Kolo-kalisation von MMP-9 und Trypsin-2 als möglichen Marker der Tumoraggressivität. MMP-9 scheint also in Bezug auf Invasivität von HNSCC Tumoren eine Schlüsselrolle zu spielen (Vilen et al. 2007).

Interessanterweise wird in den durchgeführten Untersuchungen eine verstärkte MMP-9 Expression im Bereich der Tumor-Stroma-Grenze beobachtet. Es zeigt sich, dass die invasive Tumorfront einem CD44 positiven Zellkompartiment entspricht und dass im Bereich dieser Zellen eine verstärkte Degradation der Extrazellulären Matrix mit Hilfe von MMP-9 stattfindet. Eine Bindung von proMMP-9 sowie aktivem MMP-9 ist in der Literatur vorbeschrieben (Bourguignon et al. 1998). In den vorliegenden Untersuchungen zeigen sich normale basale Stammzellkandidaten dabei CD44 positiv und MMP-9 negativ, wohingegen die Tumorstammzellkandidaten CD44 und MMP-9 koexprimieren. Die Zellen scheinen sich demnach im Bereich der invasiven Front mit Hilfe von MMP-9 durch das umliegende Stroma vorzuarbeiten und können so in umliegende Strukturen wie Blut- oder Lymphgefäße eindringen. Die im Inneren der Tumorinseln gelegenen Bereiche sind im Gegensatz zu den Tumor Randbereichen CD44 und MMP-9 negativ. Es handelt sich hierbei um stärker differenzierte Tumorzellen, die weniger an den invasiven Wachstumsvorgängen beteiligt sind und die Hauptzellmasse des Tumors ausmachen.

In den durchgeführten Western Blot Analysen zeigte sich passend zu den Ergebnissen der Immunhistochemie ebenfalls eine signifikante Korrelation zwischen CD44 und MMP-9. Interessanterweise ist auch hier normale Mukosa CD44 positiv,

jedoch MMP-9 negativ. Dies unterstützt die Annahme, dass auch in normaler Mukosa Stammzellen vorhanden sind, welche jedoch nicht invasiv sind, da sie kein MMP-9 exprimieren.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz Doppelfärbung bestätigen die oben beschriebenen Beobachtungen. Es zeigte sich hierbei eine deutliche Kolo-kalisation von CD44 und MMP-9 im Bereich der invasiven Tumorfront. Es fällt dabei auf, dass CD44 deutlich an der Plasmamembran, MMP-9 dagegen eher im cytoplasmatischen Zellkompartiment nachzuweisen ist.

## **5.5 Zusammenhang zwischen gelatinolytischer Aktivität und MMP Expression**

Untersuchungen zur MMP-9 Expression auf mRNA oder auf Proteinebene wurde bereits in verschiedenen Studien durchgeführt (Jordan et al. 2004). Da MMP-9 aber ebenfalls als Pro-Form vorliegen, bzw. die aktive Form durch zum Beispiel TIMPs gehemmt sein kann, erscheint der Grad der Expression für eine Beurteilung des invasiven Charakters eines Tumors nur unzureichend aussagekräftig. Vielmehr sollte als repräsentatives Maß der Aggressivität und Invasivität von Tumoren im Bezug auf MMP-9 die gelatinolytische Aktivität beurteilt werden. Mittels Gelatin Zymographie kann die Aktivität der Gelatinasen quantifiziert werden. Da nicht nur MMP-9, sondern auch MMP-2 Gelatin als Substrat nutzt, wurde die Expression beider Gelatinasen mit den Ergebnissen der Zymographie verglichen. Hierbei zeigt sich eine Korrelation zwischen gelatinolytischer Aktivität und MMP-9 Expression, nicht jedoch mit der Expression von MMP-2. Dies weist darauf hin, dass MMP-9 und nicht MMP-2 im Wesentlichen ausschlaggebend für die gelatinolytische Aktivität von HNSCC Tumoren ist.

Es wird ausserdem deutlich, dass nicht nur die Höhen der MMP-9 Banden mit denen der gelatinolytischen Aktivität korrelieren, sondern auch die Stärke der Aktivität mit dem Grad der Expression übereinstimmt. Es ist bekannt, dass MMP-9 sowohl als Monomer gelatinolytisch als auch in dimerer und sogar trimerer Form aktiv sein kann (Björklund, Koivunen 2005). Zu berücksichtigen ist ausserdem, dass verschiedene

Proteine und Moleküle die Aktivität von MMP-9 durch Komplexbildung und Interaktion beeinflussen.

## 5.6 Analyse von MMP-9 Banden

Ausgehend von den drei im Western Blot und in der Zymographie beobachteten Banden (250, 130, 85 kDa) wurde untersucht, wodurch diese drei Banden gebildet werden. Es ging darum zu klären, in welcher Form MMP-9 in den einzelnen Fällen gelatinolytisch aktiv ist und ob eine mögliche Komplexbildung mit anderen Proteinen vorliegt.

Die Lokalisation der oberen MMP-9 Bande wäre mit einer multimeren Form von aktivem MMP-9 (258 kDa) vereinbar (Kamiguti et al. 2004). Die mittlere Bande lässt bei einem Molekulargewicht von ca. 130 kDa eine Komplexbildung zwischen MMP-9 und einem weiteren Bindungspartner vermuten. Laut aktueller Literatur kann vermutet werden, dass es sich bei dem Molekulargewicht dieser Bande um eine Komplexbildung mit NGAL, auch Lipocalin-2 genannt, handelt (Yan et al. 2001). NGAL soll MMP-9 im Komplex stabilisieren und dadurch dessen Aktivität modulieren (Redondo-Munoz et al. 2008, Yan et al. 2001). Trotz nicht reduzierender Bedingungen bei der Western Blot Analyse, war es nicht möglich, diese Komplexbildung nachzuweisen. NGAL wird zwar in Geweben exprimiert, jedoch können bei der Western Blot Analyse nur die monomeren und dimeren Formen nachgewiesen werden. Auf Grund dieser Ergebnisse konnte eine Komplexbildung zwischen MMP-9 und NGAL nicht eindeutig gezeigt werden. Durch Bindung verschiedener Proteine aneinander kann es vorkommen, dass sich die räumliche Konfiguration der Proteine ändert. Dies kann einerseits zu Veränderungen des Aktivitätsniveaus führen, andererseits aber auch zu so gravierenden Änderungen der Proteinstruktur, dass das nachzuweisende Protein mit Hilfe der konventionellen Antikörper nicht mehr oder nur schwer zu detektieren ist.

Über Einzelheiten der Komplexbildung zwischen MMP-9 und NGAL ist bisher nur wenig bekannt (Yan et al. 2001). Allerdings scheint ein Zusammenhang zwischen verschiedenen malignen Erkrankungen und NGAL offensichtlich. Eine erhöhte Expression von NGAL mRNA konnte bei Adenokarzinomen der Lunge, des Kolon sowie

des Pankreas nachgewiesen werden (Furutani et al. 1998, Friedl et al. 1999). Ein Zusammenhang zwischen dem MMP-9/NGAL Komplex und neoplastischem Wachstum ist für Brustkrebs nachgewiesen (Fernández et al. 2005). Auch bei Osteoarthritis, konnte ursächlich für die gelatinolytische Aktivität MMP-9 im Komplex mit NGAL identifiziert werden. Die unterste Bande mit einem Molekulargewicht von 86 kDa ist vereinbar mit ungebundenem MMP-9, in diesem Fall dem Monomer der aktiven Form.

### **5.7 NGAL als regulierender Faktor von MMP-9 in HNSCC Tumoren**

Da eine vermutete Komplexbildung von MMP-9 und NGAL in der Western Blot Analyse weder eindeutig ausgeschlossen noch bestätigt werden konnte, wurden HNSCC Gewebeproben mittels immunhistochemischer Färbung untersucht. Analog zur MMP-9 Expression in den CD44 positiven Stammzellkompartimenten zeigt sich ebenfalls eine verstärkte Expression von NGAL in diesen Bereichen. Diese Beobachtung bestärkt die Vermutung, dass NGAL als Kofaktor von MMP-9 bei den invasiven Vorgängen im Bereich der Tumor Stroma Grenze beteiligt ist. Es kann vermutet werden, dass die Koexpression von NGAL im Bereich der Tumorfront zur Stabilisierung von MMP-9 führt und die Aktivität der Gelatinase so gezielt in diesen Bereichen erhöht bzw. reguliert wird.

### **5.8 Unterschiede zwischen HNSCC Geweben und Zelllinien**

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurden überwiegend an Gewebeproben von HNSCC Tumor Patienten durchgeführt. Aus vorherigen Versuchen ist bekannt, dass HNSCC Zelllinien ein nur sehr gering invasives Verhalten zeigen (Mandic et al. 2004). HNSCC Zelllinien wurden auf gelatinolytische Aktivität und MMP-9 Expression hin untersucht und mit Gewebeproben verglichen. Während in den Tumorgewebeproben eine starke gelatinolytische Aktivität festgestellt werden konnte, welche dem hochinvasiven klinischen Bild dieser Tumore entspricht, lässt sich in Zelllysaten kaum gelatinolytische Aktivität nachweisen. Dies ist vereinbar mit dem wenig invasiven Verhalten dieser Zellen *in vitro* (Mandic et al. 2004.)

Es kann also angenommen werden, dass tatsächlich die gelatinolytische Aktivität ausschlaggebend ist für den invasiven Charakter dieser Tumore. Eine eindeutige statistisch gesicherte Korrelation zwischen Tumorstadien der einzelnen Gewebeproben und der gelatinolytischen Aktivität bzw. CD44 oder MMP-9 Expression konnte nicht gefunden werden. Jedoch zeigen sich deutliche Tendenzen, dass die Fälle mit starker gelatinolytischer Aktivität und starker Expression der beiden Proteine CD44 und MMP-9 auch einen aggressiven klinischen Verlauf zeigen. So handelt es sich bei den meisten dieser Gewebeproben um G3 Tumore oder Tumore, die bereits Lymphknoten- oder sogar periphere Fernmetastasen gebildet haben und damit einem N+ bzw M1 Stadium entsprechen.

Obwohl HNSCC Tumorzelllinien *in vitro* kaum invasiver sind und eine nur unwesentliche gelatinolytische Aktivität aufweisen, konnte im Western Blot trotzdem MMP-9 nachgewiesen werden. Das Molekulargewicht dieser MMP-9 Bande in Zelllinien liegt höher als in Gewebeproben und ist vereinbar mit der nicht aktiven „pro-Form“ von MMP-9. Dies erklärt auch, warum Zelllinien kaum gelatinolytische Aktivität aufweisen.

## **5.9 Therapeutische Aussichten**

Wenn man die Bedeutung der Tumorstammzellen für die Onkogenese eines malignen Tumors sieht, wird schnell ersichtlich, dass ein wichtiger Ansatzpunkt einer kurativen Krebstherapie die Tumorstammzellen sein sollten. Wenn Tumorstammzellen gezielt ausgeschaltet werden, geht damit das ungehinderte Proliferationspotential des Tumors verloren und nur die weniger aggressiven Karzinomzellen verbleiben.

Dazu ist es von herausragender Bedeutung, die exakten Mechanismen auf dem Weg der Entartung der Stammzellen zu verstehen. Erst wenn genaue Unterschiede definiert werden können, die eine Tumorstammzelle von Stammzellen normalen Gewebes unterscheiden und die Resistenzmechanismen genau nachvollzogen sind, die in Tumorstammzellen vorzuliegen scheinen, können effektive Therapiestrategien entwickelt werden.

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zeigen die herausragende Bedeutung von Tumorstammzellen auch für Plattenepithelkarzinome des Kopf-, Halsbereiches. Die Identifikation von MMP-9 als Kofaktor der CD44 positiven Stammzellen wirft neue Überlegungen bezüglich wirksamer Therapiestrategien auf. Bereits heute wird die gezielte Hemmung der MMPs diskutiert und therapeutisch eingesetzt (Maity et al. 2010, Becker et al. 2010, Ling et al. 2010).

Im Laufe der letzten Jahre konnten im Bezug auf die Tumorstammzell Hypothese viele neue Erkenntnisse gewonnen werden. So hat sich weitestgehend die Ansicht durchgesetzt, dass es für eine erfolgreiche Therapie vor allem nötig ist die Tumorstammzellen zu eliminieren (Dingli und Michor 2006). Tumorstammzellen gelten nicht nur als Ziel der primären Therapie, sondern werden ausserdem für Resistenzen gegenüber Chemotherapien und Therapieversagen verantwortlich gemacht (Milas und Hittleman 2009, Baumann et al. 2008).

Um diese Ansätze zu spezifizieren und weiterführende Strategien zu entwickeln, sind weiterführende Untersuchungen auf diesem Gebiet erforderlich.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Plattenepithelkarzinome stellen mit ca. 90% die häufigsten Malignome im Kopf-Hals-Bereich dar. Seit mehr als 30 Jahren konnte keine wesentliche Verbesserung in der Überlebenszeit von Patienten mit diesen auch als HNSCC (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma) bezeichneten Tumoren erreicht werden. Eine wesentliche Ursache hierbei sind Resistenzmechanismen gegen klassische Therapiemaßnahmen wie Radio- und Chemotherapie. Cisplatin stellt das zentrale Chemotherapeutikum in der Behandlung von HNSCC Tumoren dar und gerade Resistenzen gegen Cisplatin bzw. Platin-Analoga sind häufige Ursachen einer infausten Prognose bei Kopf-Halskarzinomen.

Die in den letzten Jahren aufgestellte Tumorstammzell Hypothese besagt, dass Tumorstammzellen den eigentlich gefährlichen Anteil eines Tumors ausmachen, da sie in der Lage sind sich zu reproduzieren und mit Invasivität, Metastasierung und Chemotherapieresistenz in Verbindung gebracht werden. Vorgegangene Untersuchungen anderer Gruppen konnten zeigen, dass HNSCC Tumorzellen, welche den Hyaluronsäure-Rezeptor (CD44) exprimieren verstärkt Stammzeleigenschaften aufweisen. Aufgrund der Bedeutung dieser Zellpopulation war es ein Ziel der vorliegenden Arbeit, diesen Zelltyp in HNSCC Tumoren darzustellen und näher zu untersuchen. Bei den immunhistochemischen Untersuchungen an Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten HNSCC Geweben, zeigten sich die Tumorzellen im Bereich der Tumor-Stroma Grenze, welche der Invasionsfront des Tumors entspricht, verstärkt CD44 positiv. Diese Tumorstammzellkandidaten waren auch positiv für Aldehyd-Dehydrogenase 1 (ALDH1) ebenfalls ein Stammzellmarker. Interessanterweise zeigten sich klare Übereinstimmungen in der Expression von CD44 und ALDH1 zwischen den Tumorstammzellkandidaten und Basalzellen normaler Mukosa, welche die Nische normaler Stammzellen repräsentiert. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen zeigten sich die stroma-nahen HNSCC Zellen auch positiv für das basalzelltypische Zytokeratin 14 (CK14).

Zymographische Untersuchungen in Verbindung mit Western blot Analysen von HNSCC Gewebe und normaler Mukosa zeigten, dass Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-

9) für die in HNSCC Tumoren beobachtete hohe Gelatinaseaktivität verantwortlich ist ( $p=0,0010$ ). In der immunhistochemischen Untersuchung zeigte sich eine deutliche Kolo-kalisation von MMP-9 und CD44. Die mittels Western Blot quantifizierte Expression beider Marker ergab eine signifikante Korrelation ( $p=0,0047$ ). Normale Kontroll-Mukosa hingegen war negativ für aktives MMP-9.

Abschliessend kann gesagt werden, dass Zellen der invasiven Front von HNSCC Tumoren positiv sind für die basaltypischen Stammzellmarker CD44, ALDH1 und CK14 aber im Gegensatz zur nichtinvasiven Basalzellschicht normaler Mukosa zusätzlich auch positiv sind für aktives MMP9, welches die gelatinolytische Aktivität von HNSCC Tumoren vermittelt. Diese Beobachtungen weisen auf ein Modell hin, wobei sich Zellen der invasiven Front in HNSCC Tumoren von der Basalzellschicht normaler Mukosa ableiten (basal cell like cell layer, BCLC) und die Tumorstammzell Nische beherbergen. Weiterführende Untersuchungen sollten daher auf Tumorzellen der BCLC Schicht fokussieren, da anzunehmen ist, dass Tumorrezidive sowie Resistenzentwicklungen von diesen Zellen ihren Ausgang nehmen.

## 7 LITERATURANGABEN

- [1] Ahmann FR, Saad F, Mercier R, Huddart RA, Roberts JT, Collier M, Bettencourt L (2001): Interim results of a phase III study of the matrix metalloprotease inhibitor primomastat in patients having metastatic, hormone refractory prostate cancer (HRPC). *Proc Amer Soc Clin Oncol*, 20. Jg., Heft 174a.
- [2] Aikawa M, Rabkin E, Sugiyama S, Voglic SJ, Fukumoto Y, Furukawa Y, Shiomi M, Schoen FJ, Libby P (2001): An HMG-CoA reductase inhibitor, cerivastatin, suppresses growth of macrophages expressing matrix metalloproteinases and tissue factor in vivo and in vitro. In: *Circulation*, 103. Jg., Heft 2, S. 276-283.
- [3] Ailles L, Prince M (2009): Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. In: *Methods in Molecular Biology* 568. Jg., S. 175-193.
- [4] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito Hernandez A (2003): Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. In: *Proc Natl Acad Sci USA*, 100. Jg., Heft 7, S. 3983-3988.
- [5] Aruffo A (1996): CD44: one ligand, two functions. In: *J Clin Invest*, 98. Jg., Heft 10, S. 2191-2192.
- [6] Axelsson L, Bergenfeldt M, Ohlsson K (1995): Studies of the release and turnover of a human neutrophil lipocalin. In: *Scand J Clin Lab Invest.*, 55. Jg., Heft 7, S. 577-588.
- [7] Barth PJ, Schenck zu Schweinsberg T, Ramaswamy A, Moll R (2004): CD34+ fibrocytes, alpha-smooth muscle antigen-positive yo fibroblasts, and D117 expression in the stroma of invasive squamous cell carcinomas of the oralcavity, pharynx, and larynx. In: *Virchows Arch*, 444. Jg, Heft 3, S. 231–234.

- 
- [8] Baumann M, Krause M, Hill R (2008): Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. In: *Nat Rev Cancer*, 8. Jg., Heft 7, S. 545-554.
- [9] Becker DP, Barta TE, Bedell LJ, Boehm TL, Bond BR, Carroll J, Carron CP, Decrescenzo GA, Easton AM, Freskos JN, Funckes-Shippy CL, Heron M, Hockerman S, Howard CP, Kiefer JR, Li MH, Mathis KJ, McDonald JJ, Mehta PP, Munie GE, Sunyer T, Swearingen CA, Villamil CI, Welsch D, Williams JM, Yu Y, Yao J (2010): Orally Active MMP-1 Sparing alpha-Tetrahydropyranyl and alpha-Piperidinyl Sulfone Matrix Metalloproteinase (MMP) Inhibitors with Efficacy in Cancer, Arthritis, and Cardiovascular Disease. In: *J Med Chem*, (Epub ahead of print).
- [10] Bellosta S, Via D, Canavesi M, Pfister P, Fumagalli R, Paoletti R, Bernini F (1998): HMG-CoA reductase inhibitors reduce MMP-9 secretion by macrophages. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18. Jg., Heft 11, S. 1671-1678.
- [11] Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA (1993): Matrix metalloproteinases: a review. In: *Crit Rev Oral Biol Med*, 4. Jg., Heft 2, S. 197-250.
- [12] Birkedal-Hansen H (1995): Proteolytic remodeling of extracellular matrix. In: *Curr Opin Cell Biol*, 7. Jg., Heft 5, S. 728-735.
- [13] Björklund M, Koivunen E (2005): Gelatinase mediated migration and invasion of cancer cells. In: *Biochimica et Biophysica Acta*, 1755. Jg., Heft 1, S. 37-69.
- [14] Bonnet D, Dick JE (1997): Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. In: *Nat Med*, 3. Jg., Heft 7, S. 730-737.
- [15] Bourguignon LY, Singelton PA, Zhu H, Diedrich F (2003): Hyaluronan-mediated CD44 interaction with RhoGEF and Rho kinase promotes Grb2-associated binder-1 phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase

- signaling leading to cytokine (macrophage-colony stimulating factor) production and breast tumor progression. In: J Biol Chem, 278. Jg., Heft 32, S. 29420-29434.
- [16] Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: Anal Biochem., 72. Jg., Heft 1-2, S. 248-254.
- [17] Bruno S, Brussolati B, Grange C, Collino F, Graziano ME, Ferrando U, Camussi G (2006): Cd133+ renal progenitor cells contribute to tumor angiogenesis. In: Am J Pathol, 169. Jg., Heft 6, S. 2223-2235.
- [18] 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. Jg., Heft 3, S. 133-140.
- [19] Chan E F, Gat U, McNiff J M, Fuchs E (1999): A common human skin tumour is caused by activating mutations in  $\beta$ -catenin. In: Nature Genet, 21. Jg., Heft 4, S. 410-413.
- [20] Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Tarpin C, Diebel M, Esterni B, Houvenaeghel G, Extra JM, Bertucci F, Jacquemier J, Xerri L, Dontu G, Stassi G, Xiao Y, Barsky SH, Birnbaum D, Viens P, Wicha MS (2010): Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer. In: Clin Cancer Res., 16. Jg., Heft 1, S. 45-55.
- [21] Chen YC, Chen YW, Hsu HS, Tseng LW, Huang PI, Lu KH, Chen DT, Tai LK, Yung MC, Chang SC, Ku HH, Chiou SH, Lo WL (2009): Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer. In: Biochemical and Biophysical Research Communications, 385. Jg., S. 307-313.

- 
- [22] Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM (2006): Cancer stem cells-perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells. In: *Cancer Res*, 66. Jg., Heft 19, S. 9339-9344.
- [23] Clay MR, Tabor M, Owen JH, Carey TE, Bradford CR, Wolf GT, Wicha MS, Prince ME (2010): Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase. In: *Head Neck*, (Epub ahead of print).
- [24] Cobaleda C, Gutierrez-Cianca N, Perez-Losada J, Flores T, García-Sanz R, González M, Sánchez-García I (2000): A primitive hematopoietic is the target for the leukemic transformation in human philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. In: *Blood*, 95. Jg., Heft 3, S. 1007-1013.
- [25] Constantin A, Lauwers-Cances V, Navaux F, Abbal M, van Meerwijk J, Mazieres B, Cambon-Thomsen A, Cantagrel A (2002): Stromelysin 1 (matrix metalloproteinase 3) and HLA-DRB1 gene polymorphisms: Association with severity and progression of rheumatoid arthritis in a prospective study. In: *Arthritis Rheum*, 46. Jg., Heft 7, S. 1754-1762.
- [26] Copper MP, Jovanovic A, Nauta JJ, Braakhuis BJ, de Vries N, van der Waal I, Snow GB (1995): Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. In: *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 121 Jg., Heft 2, S. 157-160.
- [27] Crisby M, Nordin-Fredriksson G, Shah PK, Yano J, Zhu J, Nilsson J (2001): Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization. In: *Circulation*, 103. Jg., Heft 7, S. 926-933.

- 
- [28] Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Lui R, Wang X Cho RW, Hoey T, Gurney A, Huang EH, Simeone DM, Shelton AA, Parmiani G, Castelli C, Clarke MF (2007): Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cell. In: Proc Natl Acad Sci USA, 104. Jg., Heft 24, S. 10158-10163.
- [29] 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. In: Cancer, 73. Jg., Heft 3, S. 518-527.
- [30] Dingli D, Michor F (2006): Successful therapy must eradicate cancer stem cells. In: Stem Cells, 24. Jg., Heft 12, S. 2603-2610.
- [31] Eaves C, Udomaski C, Cashman J, Barnett M, Eaves A (1993): The biology of normal and neoplastic stem cells in CML. In: Leuk Lymphoma, 11. Jg., Heft 1, S. 245-253.
- [32] Eisenberger MA, Sinibaldi V, Laufer M, et al. Phase I pharmacokinetic evaluation of marimastat in patients (Pts) with advanced prostate cancer (PC) (2000): Identification of the biologically active dose. In: Proc Amer Soc Clin Oncol, 19. Jg., Heft 336a.
- [33] Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, Sklar J (1991): TAN-1, the human homolog of Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. In: Cell, 66. Jg., Heft 4, S. 649-661.
- [34] Farrow, DC, Vaughan, TL, Berwick, M, Lynch CF, Swanson GM, Lyon JL (1998): Diet and nasopharyngeal cancer in a low-risk population. In: Int J Cancer, 78. Jg., Heft 6, S. 675-679.
- [35] Fernández C A, Yan L, Louis G, Yang J, Kutok J, Moses M (2005): The Matrix Metalloproteinase-9/Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Complex

- plays a role in breast tumor growth and is present in the urine of breast cancer patients. In: Clin Cancer Res, 11. Jg., Heft 15, S. 5390-5395.
- [36] Fidler IJ, Kripke ML (1977): Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. In: Science, 197. Jg., Heft 4306, S. 893-895.
- [37] Fidler IJ (2003): The pathogenesis of cancer metastasis: the „seed and soil“ hypothesis revisited. In: Nat Rev Cancer, 3. Jg., Heft 6, S. 453-458.
- [38] Folkesson M, Kazi M, Zhu C, Hemdahl A-L, Hamsten A, Hedin U, Swedenborg J, Eriksson P (2007): Presence of NGAL/MMP-9 complexes in human abdominal aortic aneurisms. In: Thromb Haemost, 98. Jg., Heft 2, S. 427-433.
- [39] Foulkes WD, Brunet JS, Kowalski LP, Narod SA, Franco EL (1995): Family history of cancer is a risk factor for squamous cell carcinoma of the head and neck in Brazil: a case-control study. In: Int J Cancer, 63. Jg., Heft 6, S. 769-773.
- [40] Frank NY, Margaryan A, Huang y Schatton T, Waaga-Gasser AM, Gasser M, Sayegh MH, Sadee W, Frank MH (2005): ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. In: Cancer Res, 65. Jg., Heft 10, S. 4320-4333.
- [41] Friedl A, Stoesz SP, Buckley P, Gould, MN (1999): Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in normal and neoplastic human tissues. Cell type-specific pattern of expression. In: Histochem J, 31. Jg., Heft 7, S. 433-441.
- [42] Friedl P, Wolf K (2003): Tumor-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. In: Nat Rev Cancer, 3. Jg., Heft 5, S. 362-374.
- [43] Furutani M, Arai S, Mizumoto M, Kato M, Imamura M (1998): Identification of a neutrophil gelatinase-associated lipocalin mRNA in human pancreatic cancers,

- using a modified signal sequence trap method. In: *Cancer Lett*, 122. Jg., Heft 1-2, S. 209-214.
- [44] Gailani MR, Bale AE (1999): Acquired an inherited basal cell carcinomas and the patched gene. In: *Adv Dermatol*, 14. Jg., S. 261-283.
- [45] Galateau-Salle FB, Luna RE, Horiba K, Sheppard MN, Hayashi T, Fleming MV, Colby TV, Bennett W, Harris CC, Stetler-Stevenson WG, Liotta L, Ferrans VJ, Travis WD (2000): Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in bronchial squamous preinvasive lesions. In: *Hum Pathol*, 31. Jg., Heft 3, S. 296-305.
- [46] Gallegos NC, Smales C, Savage FJ, Hembry RM, Boulos PB (1995): The distribution of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in colorectal cancer. In: *Br J Cancer*, 81. Jg., Heft 5, S. 287-293.
- [47] Gellerich NC, Gutwald R, Winterer J, Henne K, Digel W, Maier W, Schipper J, Henß H (2004): Kopf-Hals-Tumoren – Empfehlung zur standardisierten Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Tumorzentrum Freiburg, URL: [http://www.uniklinik-freiburg.de/tumorzentrum/live/Medizin-Info/Leitlinien/schilddruesen\\_karzinom.pdf](http://www.uniklinik-freiburg.de/tumorzentrum/live/Medizin-Info/Leitlinien/schilddruesen_karzinom.pdf) (13.09.2010).
- [48] Gillison M, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D (2000): Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. In: *J Natl Cancer Inst*, 92. Jg., Heft 9, S. 709-720.
- [49] Graziano A. R, d'Aquino V, Tirino V, Desiderio A, Rossi I and Pirozzi G (2001): The Stem Cell Hypothesis in Head and Neck Cancer. In: *J Cell Biochem*, 103. Jg., Heft 2, S. 408–412.

- 
- [50] Gu G, Yuan J, Wills M Kasper S (2007): Prostate cancer cells with stem cell characteristics reconstitute the original human tumor in vivo. In: *Cancer Res*, 67. Jg., Heft 10, S. 4807-4815.
- [51] Herget-Rosenthal S (2005): One step forward in the early detection of acute renal failure. In: *Lancet*, 365. Jg., Heft 9466, S. 1205-1206.
- [52] Hidalgo M, Eckhardt SG (2001): Development of Matrix Metalloproteinase Inhibitors in cancer therapy. In: *J Natl Cancer Inst*, 93. Jg., Heft 3, S. 178-193.
- [53] 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. In: *Oral Oncol*, 36. Jg., Heft 2, S. 207-213.
- [54] Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981): Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques; a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. In: *J Histochem Cytochem*, 29. Jg., Heft 4, S. 577-580.
- [55] Hynes RO (1992): Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. In: *Cell*, 69. Jg., Heft 11, S. 11-25.
- [56] Iredale JP (2003): Cirrhosis: New Research provides a Basis for rational and targeted Treatments. In: *BMJ*, 327. Jg., Heft 7407, S. 143–147.
- [57] Jamieson CH, Ailles LE, Dylla SJ, Muijtjens M, Jones C, Zehnder JL, Gotlib J, Li K, Manz MG, Keating A, Sawyers CL, Weissman IL (2004): Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. In: *N Engl J Med*, 351. Jg., Heft 7, S. 657-667.
- [58] John A, Tuszynski G (2001): The role of Matrix Metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. In: *Pathology Oncology Research*, 7. Jg., Heft 1, S. 14-23.

- 
- [59] Jordan RC, Macabeo-Ong M, Shiboski CH, Dekker N, Ginzinger DG, Wong ATW, Schmidt BL (2004): Overexpression of Matrix Metalloproteinase-1 and -9 mRNA Is Associated with Progression of Oral Dysplasia to Cancer. In: Clin Cancer Res, 10. Jg., Heft 19, S. 6460-6465.
- [60] Kahari VM, Saarialho-Kere U (1997): Matrix metalloproteinases in skin. In: Exp Dermatol, 6. Jg., Heft 5, S. 199-213.
- [61] Kahari VM, Saarialho-Kere U (1999): Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumor growth and invasion. In: Ann. Med, 89. Jg., Heft 1, S. 1260-1270.
- [62] Kamiguti AS, Lee ES, Till KJ, Harris RJ, Glenn MA, Lin K, Chen HJ, Zuzel M, Cawley JC (2004): The role of matrix metalloproteinase 9 in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. In: Br J Haematol, 125. Jg., Heft 2, S. 128-140.
- [63] Kanno N, Nonomura N, Miki T, Kojima Y, Takahara S, Nozaki M, Okuyama A (1998): Effects of epidermal growth factor on the invasion activity of bladder cancer cell line. In: J Urology, 159. Jg., Heft 2, S. 586-590.
- [64] 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. In: Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho, 99. Jg., Heft 2, S. 299-305.
- [65] Kuhn NZ, Tuan RS (2010): Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: implications in tumorigenesis and metastasis. In: J Cell Physiol, 222. Jg., Heft 2, S. 268-277.
- [66] Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: Nature, 227. Jg., Heft 5259, S. 680-685.

- 
- [67] Lansford C, Grénman R, Bier H, Somers K, Yoon Kim S, Whiteside T, Clayman G, Welkoborsky HJ, Carey T (1999): Head and Neck cancers. In: Human Cell Culture, 2. Jg., S. 185-255.
- [68] Leighl NB, Paz-Ares L, Douillard JY, Peschel C, Arnold A, Depierre A, Santoro A, Betticher DC, Gatzemeier U, Jassem J, Crawford J, Tu D, Bezjak A, Humphrey JS, Voi M, Galbraith S, Hann K, Seymour L, Shepherd FA (2005): Randomized phase III study of matrix metalloproteinase inhibitor BMS-275291 in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: National Cancer Institute of Canada-Clinical Trials Group Study BR.18. In: J Clin Oncol, 23. Jg., Heft 12, S. 2831-2839.
- [69] Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM (2007): Identification of pancreatic cancer stem cells. In: Cancer Res, 67. Jg., Heft 3, S. 1030-1037.
- [70] Ling H, Yang H, Tan SH, Chui WK, Chew EH (2010): Shogaol, an active constituent of ginger, inhibits breast cancer cell invasion by reducing matrix metalloproteinase-9 expression via blockade of nuclear factor-kappaB activation. In: Br J Pharmacol, (Epub ahead of print).
- [71] Liotta LA, Stetler-Stevenson WG (1991): Tumor Invasion and Metastasis: An Imbalance of Positive and Negative Regulation. In: Cancer Research, 51. Jg., Heft 18, S. 5054–5059.
- [72] Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S (1980): Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. In: Nature, 284. Jg., Heft 5751, S. 67-68.
- [73] Liu J, Cao L, Chen J, Song S, Lee IH, Quijano C, Liu H, Keyvanfar K, Chen H, Cao LY, Ahn BH, Kumar NG, Rovira II, Xu XL, van Lohuizen M, Motoyama N, Deng CX, Finkel T. (2009): Bmi1 regulates mitochondrial function and the DNA damage response pathway. In: Nature, 459. Jg., Heft 7245, S. 387-392.

- 
- [74] Lou H, Dean M (2007): Targeted therapy for cancer stem cells: the patched pathway and ABC transporters. In: *Oncogene*, 26. Jg., Heft 9, S. 1357-1360.
- [75] Maity G, Choudhury PR, Sen T, Ganguly KK, Sil H, Chatterjee A (2010): Culture of human breast cancer cell line (MDA-MB-231) on fibronectin-coated surface induces pro-matrix metalloproteinase-9 expression and activity. In: *Tumour Biol*, (Epub ahead of print).
- [76] Mandic R, Ludwig T, Oberleithner H, Werner JA (2004): Evaluation of head and neck squamous cell carcinoma invasiveness by the electrical resistance breakdown assay. In: *Clin Exp Metastasis*, 21. Jg., Heft 8, S. 699-704.
- [77] Marchenko GN, Marchenko ND, Strongin AY (2003): The structure and regulation of the human and mouse matrix metalloproteinase-21 gene and protein. In: *Biochem J*, 372. Jg., Heft 2, S. 503-515.
- [78] Matrisian LM (1990): Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. In: *Trends Genet*, 6. Jg., Heft 4, S. 121-125.
- [79] Milas L, Hittleman WN (2009): Cancer stem cells and tumor response to therapy: current problems and future prospects. In: *Semin Radiat Oncol*, 19. Jg., Heft 2, S. 96-105.
- [80] Miyake H, Yoshimura K, Hara I, Eto H, Arakawa S, Kamidono S (1997): Basic fibroblast growth factor regulates matrix metalloproteinases and in vitro invasiveness in human bladder cancer cell lines. In: *J Urology*, 157. Jg., Heft 6, S. 2351-2355.
- [81] Moisa I, Mahadevia P, Silver CE (1991): *Unusual tumors of the larynx*. New York: Thieme, S. 33-43.
- [82] Monzani E, Facchetti, Galmozzi E, Corsini E, Benetti A, Cavazzin C, Gritti A, Piccinini A, Porro D, Santinami M, Invernici G, Parati E, Alessandri G, La Porta CA (2007): Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with

- enhanced tumourigenic potential. In: Eur J Cancer, 43. Jg., Heft 5, S. 935-946.
- [83] Nelson A R, Fingleton B, Rothenberg M L, Matrisian L M (2000): Matrix Metalloproteinases: Biologic Activity and Clinical Implications. In: J Clin Oncol, 18. Jg., Heft 5, S.1135-1149.
- [84] 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. In: Cancer, 88. Jg., Heft 10, S. 2201-2209.
- [85] Page RC (1991): The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. In: J Periodontal Res., 26. Jg., Heft 3, S. 230-242.
- [86] Paget S (1889): The distribution of secondary growths in cancer of the breast. In: The Lancet, 133. Jg., Heft 3421, S. 571-573.
- [87] Parkin DM, Pisani P, Ferlay J (1999): Global cancer statistics. In: CA Cancer J Clin, 49. Jg., Heft 1, S. 33-64.
- [88] Parry S; Strauss JF 3<sup>rd</sup> (1998): Premature rupture of the fetal membranes. In: N Engl J Med, 338. Jg., Heft 10, S. 663-670.
- [89] Parsons SL, Watson SA, Brown PD, Collins HM, Steele RJ (1997) : Matrix metalloproteinases. In : Brit J Surgery, 84. Jg., Heft 8, S. 160-166.
- [90] Pries R, Witkopf N, Trenkle T, Nitsch SM, Wollenberg B (2008): Potential stem cell marker CD44 is constitutively expressed in permanent cell lines of head and neck cancer. In: Vivo, 22. Jg., Heft 1, S. 89-92.
- [91] Prince ME, Sivanavdan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, Weissman IL, Clarke MF, Ailles LE (2007): Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. In: Proc Natl Acad Sci USA, 104. Jg., Heft 3, S. 973-978.

- [92] Redondo-Munoz J, Ugarte-Berzal E, Garcia-Marco JA, del Cerro MH, Van den Steen PE, Opdenakker G, Terol MJ, García-Pardo A. (2008):  $\alpha 4\beta 1$  integrin and 190-kDa CD44v constitute a cell surface docking complex for gelatinase B/MMP-9 in chronic leukemic but not in normal B cells. In: Blood, 112. Jg., Heft 1, S. 169-178.
- [93] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001): Stem cells, cancer, and cancer stem cells. In: Nature, 414. Jg., Heft 6859, S. 105-111.
- [94] Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi F, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R (2007): Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. In: Nature 445. Jg., Heft 7123, S. 106-110.
- [95] Rosenthal E L, Matrisian L M (2006): Matrix metalloproteinases in head and neck cancer. In: Head Neck, 28. Jg., Heft 7, S. 639-648.
- [96] Saikali Z, Singh G (2003): Doxycycline and other tetracyclines in treatment of bone metastasis. In: Anticancer Drugs, 14. Jg., Heft 10, S. 773-778.
- [97] Salsbury A J (1975): The significance of the circulating cancer cell. In: Cancer Treatment Rev, 2. Jg., Heft 1, S. 55-72.
- [98] Sankaranarayanan R, Masuyer E, Swaminathan R, Ferlay J, Whelan S (1998): Head and neck cancer: a global perspective on epidemiology and prognosis. In: Anticancer Res, 18. Jg, Heft 6B, S. 4779-4786.
- [99] Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB (2004): Identification of human brain tumor initiating cells. In: Nature, 432. Jg., Heft 7015, S. 396-401.
- [100] Sommerville RP, Oblander SA, Apte SS (2003): Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. In: Genome Biology, 4. Jg., Heft 6, Artikel 216.
- [101] Sorsa T, Salo T, Koivunen E, Tynnelä J, Konttinen YT, Bergmann U, Tuuttila A, Niemi E, Teronen O, Heikkilä P, Tschesche H, Leinonen J, Osman S,

- Stenman UH (1997): Activation of type IV procollagenases by human tumor associated trypsin-2. In: J Biol Chem, 272. Jg., Heft 34, S. 21067-21074.
- [102] Spitz MR (1994): Epidemiology and risk factors for head and neck cancer. In: Semin Oncol, 21. Jg., Heft 3, S. 281-288.
- [103] Sternlicht M D, Werb Z (2001): How do Matrix Metalloproteinases regulate cell behavior. In: Annu Rev Cell Dev Biol., 17. Jg., S. 463-517.
- [104] Tomita T, Iwata K. (1996): Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in Colonic Adenomas- Adenocarcinomas. In: Diseases Colon Rectum, 39. Jg., Heft 11, S. 1255–1264.
- [105] Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. In: Proc Natl Acad Sci USA, 76. Jg., Heft 9, S. 4350-4354.
- [106] Trowbridge IS, Lesly J, Schulte R, Hyman R, Trotter J (1982): Biochemical characterization and cellular distribution of a polymorphic, murine cell-surface glycoprotein expressed on lymphoid tissues. In: Immunogenetics, 15. Jg., Heft 3, S. 229-312.
- [107] Tyagi SC, Kumar S, Katwa L (1997): Differential regulation of extracellular matrix metalloproteinase and tissue inhibitor by heparin and cholesterol in fibroblast cells. In: J Mol Cell Cardiology, 29. Jg., Heft 1, S. 391-404.
- [108] Tyagi SC (1997): Proteinases and myocardial extra cellular matrix turnover. In: Mol Cell Biochem, 168. Jg., Heft 1-2, S. 1-12.
- [109] Vilen ST, Nyberg P, Hukkanen M, Sutinen M, Ylipalosaari M, Bjartell A, Paju A, Haaparanta V, Stenman UH, Sorsa T, Salo T (2007): Intracellular co-localisation of trypsin-2 and matrix metalloproteinase-9: Possible proteolytic cascade of trypsin-2, MMP-9 and enterokinase in carcinoma. In: Exp Cell Res, 314. Jg., Heft 4, S. 914-926.

- [110] Wang SJ, Wreesmann VB, Bourguignon LY (2007): Association of CD44 V3-containing isoforms with tumor cell growth, migration, matrix metalloproteinases expression and lymph node metastasis in head and neck cancer. In: *Head and Neck*, 29. Jg., Heft 6, S. 550-558.
- [111] Weinberg R (2007): *The biology of cancer*. Garland Science, S. 587-653.
- [112] Werner J A, Rathcke I O, Mandic R (2002): The role of matrix metalloproteinases in squamous cell carcinomas of the head and neck. In: *Clin Exp Metastasis*, 19. Jg., Heft 4, S. 275-282.
- [113] Yan L, Borregaard N, Kjeldsen L, Moses MA (2001): The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Modulation of MMP-9 activity by NGAL. In: *J Biol Chem*, 276. Jg., Heft 40, S. 37258-37265.
- [114] Yen WC, Prudente RY, Corpuz MR, Negro-Vilar A, Lamph WW (2006): A selective retinoid X receptor agonist bexarotene (LGD1069, targretin) inhibits angiogenesis and metastasis in solid tumours. In: *Br J Cancer*, 94. Jg., Heft 5, S. 654-660.
- [115] Zhang H, Xu L, Xiao D, Xie J, Zeng H, Wang Z, Zhang X, Niu Y, Shen Z, Shen J, Wu X, Li E (2007): Upregulation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in oesophageal squamous cell carcinoma: significant correlation with cell differentiation and tumour invasion. In: *J Clin Pathol*, 60. Jg., Heft 5, S. 555-561.
- [116] Ziober AF, JD, Falls EM, Ziober BL, Ph D (2006): The extracellular matrix in oral squamous cell carcinoma: friend or foe? In: *Head & Neck*, 28. Jg., Heft 8, S. 740-749.

## 8 ANHANG

### 8.1 Stadien und TNM Einteilung von HNSCC Tumoren

**Tabelle 6. TNM-Klassifikation von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches**

<b>T</b>	<b>Primärtumor</b>
T0	keine Evidenz für einen Primärtumor
T1, T2, T3, T4	Evidenz zunehmender Größe des Primärtumors
Tx	Die Minimalerfordernisse zur Beurteilung des Sitzes oder Ausbreitungsgrades des Primärtumors liegen nicht vor
<b>N</b>	<b>regionäre Lymphknoten</b>
N0	keine Evidenz für einen Befall regionärer Lymphknoten
N1, N2, N3	Evidenz zunehmenden Befalls regionärer Lymphknoten
N4	Evidenz des Befalls juxtaregionärer Lymphknoten
Nx	Die Minimalerfordernisse zur Beurteilung der regionären Lymphknoten liegen nicht vor
<b>M</b>	<b>Fernmetastasen</b>
M0	keine Evidenz für Fernmetastasen
M1	Evidenz für Fernmetastasen
Mx	Die Minimalerfordernisse zur Beurteilung des Vorhandenseins von Fernmetastasen liegen nicht vor

**Tabelle 7. Stadieneinteilung von Plattenepithelkarzinomen (UICC 2002) AJCC**

Stadium	Zugehöriges TNM Stadium
0	T0 N0 M0
I	T1 N0 M0
II	T2 N0 M0
III	T1 N1 M0
	T2 N1 M0
	T3 N0 M0
	T3 N1 M0
IV	T4 jedes N M0 oder jedes T jedes N M1

## 8.2 Abkürzungsverzeichnis

AB-Komplex	Avidin-Biotin-Komplex
aq, aqua dest.	aqua destillata
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BSA	Bovine Serum Albumine
CA	Carcinom
CLSM	Confocal Laser Scanning Mikroskopie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	Enhanced Chemiluminescence
ECM	Extracellular Matrix
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoreszeinthiocyanat
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
HRP	Horseradish Peroxidase
IU	International Unit
kDa	Kilo Dalton
LK	Lymphknotenmetastase
LW	Leerwert
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	Mitochondrial Ribonucleic acid
MT-MMP	Membrangebundene MMP
MW	Molecular Weight
NGAL	Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin
PBS	Phosphate Buffered Saline
SCC	Squamous Cell Carcinoma
SDS	Sodiumdodecylsulfate
ST	Standard
TGF	Transforming Growth Factor
TIMP	Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase
TNF	Tumor Nekrose Faktor

TNM	Tumor-Node-Metastasis
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
UM	University of Michigan
UMB	University of Marburg
UT	University of Turku
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WB	Western Blot

### 8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Die Tumor Stammzell Hypothese schematisch .....	5
Abbildung 2. Invasions-Metastasierungs-Kaskade .....	7
Abbildung 3. Grundstruktur aller MMPs .....	11
Abbildung 4. Proteinstruktur von Gelatinasen.....	12
Abbildung 5. Schematischer Versuchsaufbau Western Blot.....	32
Abbildung 6. Expression Stammzelltypischer Marker im Epithel normaler Mukosa.....	38
Abbildung 7. Immunhistochemische Färbung von Tumorgewebe zum Nachweis möglicher Tumorstammzellkandidaten.....	39
Abbildung 8. Immunhistochemische Färbung zum Kollagen IV Nachweis .....	40
Abbildung 9. Vergleich der Immunhistochemischen Färbungen von HNSCC Gewebeproben auf CD44 und MMP-9 .....	42
Abbildung 10. Kolo-kalisation von CD44 und MMP-9 in HNSCC Gewebeproben .....	43
Abbildung 11. Gelatinolytische Aktivität und MMP-9 und CD44 Expression in HNSCC Gewebeproben.....	44
Abbildung 12. Korrelation von gelatinolytischer Aktivität, CD44 und MMP-9.....	46
Abbildung 13. Gelatinase Aktivität und MMP-2 bzw. -9 Expression .....	47
Abbildung 14. NGAL Expression in HNSCC Gewebeproben .....	48
Abbildung 15. Verstärkte NGAL Expression in den Randbereichen des Tumorgewebes .....	49
Abbildung 16. NGAL positive Zellen im Inneren der Tumorinseln .....	50
Abbildung 17. MMP-9 und NGAL Expression im Bereich der Tumor Stroma Grenze ...	51
Abbildung 18. Immunfluoreszenz Färbung einer Tumorzelle nach Co-Kultur mit Fibroblasten. ....	52
Abbildung 19. Untersuchung der Gelatinase Aktivität in Zelllysat.....	52
Abbildung 20. Schematische Darstellung der Tumorzell Invasion .....	56

---

## 8.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Übersicht über die MMP Familie .....	9
Tabelle 2. Übersicht über die Familie der Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases (TIMPs) (modifiziert nach Birkedal-Hansen et al. 1993) .....	14
Tabelle 3. Zelllinien.....	17
Tabelle 4. Gewebeproben .....	18
Tabelle 5. Proteinbestimmung nach Bradford.....	30
Tabelle 6. TNM-Klassifikation von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals- Bereiches .....	81
Tabelle 7. Stadieneinteilung von Plattenepithelkarzinomen (UICC 2002) AJCC .....	82

## 8.5 Vorträge und Publikationen

### Vorträge und Poster:

- Wiegand S, **Sterz C**, Kulle C, Werner JA, Mandic R: **The level of MMP-2 and -9 expression in HNSCC tissues does not necessarily correlate with the activity of these proteases.** 5th International Symposium on Advances in Head and Neck Cancer - Basic and Clinical Research - 01.-03. Februar 2007, Marburg.
- **Carolina Sterz**, Carolin Kulle, Jochen A. Werner, Robert Mandic: **Expression and activity of Matrix Metalloproteinases in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas and possible implications of the tumor-stroma region.** Deutsche Gesellschaft für Zellbiologie – Annual meeting 12.-15.03.2008, Marburg.

### Publikationen:

- Wiegand S, Dakic B, Rath AF, Makarova G, **Sterz C**, Meissner W, Bette M, Adamkiewicz J, Müller-Brüsselbach S, Müller R, Werner JA, Mandic R (2009): **The Rotamase Pin1 is overexpressed, activated and required for survival of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas in vitro.** In: Oral Oncology, 45 Jg., Heft 10, S. 140-149.
- **Sterz CM**, Kulle C, Dakic B, Makarova G, Böttcher MC, Bette M, Werner JA, Mandic R (2010): **A basal-cell-like compartment in head and neck squamous cell carcinomas represents the invasive front of the tumor and is expressing MMP-9.** In: Oral Oncology, 46 Jg., Heft 2, S. 116-122.

## 8.6 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

- der Universität Marburg:

Adamkiewicz, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Baumann, Czubayko, Daut, Dettmeyer, Eilers, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Gerdes, Grundmann, Grzeschik, Herrmann-Lingen, Hertl, Hilt, Höffken, Jungclas, Klose, Koolmann, Krieg, Kroll, Lang, Lenz, Lill, Lohoff, Maier, Mandic, Mandrek, Martin, Moll, Mueller, Müller-Brüsselbach, Mutters, Neubauer, Oertel, Opitz, Plant, Renz, Richter, Röper, Schade, Schäfer, Schmidt, Schofer, Schrader, Steiniger, Tibesku, Vogelmeier, Wagner, Waldegger, Werner, Westermann, Wulf

- der Universidad de Barcelona:

Blanca Coll, Cuchi, Gomez, Navarro González, Martí, Soto, Tolosa

- der Universidad del Ecuador:

Gordillo, Moyano, Naranjo, Salgado

- der Universität Bern:

Amman, Hirt, Schöni

## 8.7 Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. R. Mandic danken. Er hat mich als Leiter des onkologischen Forschungslabors der HNO Klinik der Philipps Universität Marburg stets unterstützt, mir mit guten Ideen und Anregungen weitergeholfen und immer mit einem guten Rat zur Seite gestanden. Ich möchte ihm für sein großes Engagement ganz herzlich danken.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. A. J. Werner, der mir als Direktor der Klinik für Hals- Nasen- und Ohrenheilkunde der Philipps-Universität Marburg nicht nur die Mittel zur Durchführung der Arbeit zur Verfügung gestellt hat, sondern mich auch sonst in allen Belangen unterstützt hat.

Den beiden MTAs Frau R. Peldszus und Frau G. Sadowski danke ich nicht nur für die Einarbeitung in die Laborarbeit, sondern auch für die Unterstützung bei der Vorbereitung und Durchführung der Experimente.

Meinen Mitdoktorandinnen danke ich ganz herzlich für die gegenseitige Unterstützung und die Kollegialität.

Herrn PD Dr. M. Bette vom Institut für Anatomie und Zellbiologie Marburg danke ich für die Benutzung des Olympus Mikroskops zur Durchführung der Immunhistochemie.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern für die ausdauernde Unterstützung danken, nicht nur bei der Fertigstellung der Promotion, sondern auch während des gesamten Studiums. Nicht zuletzt danke ich meinen beiden Schwestern, Florian Roßwog und meinen Freunden für die Begleitung auf dem Weg zur Promotion und für all die aufmunternde Unterstützung in schwierigen Zeiten.