

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

Einfluss der Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9) auf das Metastasierungsverhalten von Oropharynxkarzinomen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von

Alexander Gröbe

aus Lübeck



Marburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 07.04.2005.
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Maisch

Referent: Priv.-Doz. Dr. Anja-A. Dünne

Korreferent: Prof. Dr. Dr. Karl-Heinz Austermann

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--|-----------|
| 1. EINLEITUNG | 5 |
| 2. FRAGESTELLUNG | 7 |
| 3. MATERIAL UND METHODEN | 8 |
| 3.1. Studienpopulation..... | 8 |
| 3.3. Die Avidin-Biotin-Methode: Prinzip | 11 |
| 3.3.1. ABC-Methode: Mikrowellenvorbehandlung | 13 |
| 3.3.2. ABC-Methode: Auftragen von Normalserum | 14 |
| 3.3.3. ABC-Methode: Auftragen des Primär- und des Sekundärantikörpers..... | 14 |
| 3.3.4. ABC-Methode: Aufbringen des A-B-Enzymkomplexes..... | 15 |
| 3.3.5. ABC-Methode: Substratzugabe, Gegenfärbung und Eindickung..... | 16 |
| 3.4. Statistische Auswertung | 17 |
| 4. ERGEBNISSE | 19 |
| 4.1. Wertungssystem | 19 |
| 4.2. Nachweis von MMP-9 Signalen im Gewebe | 21 |
| 4.3. Korrelation zwischen der MMP-9 Expression und klinischen Parametern..... | 22 |
| 4.3.1. Korrelation zwischen MMP-9 Expression und der T-Klassifikation der Oropharynxkarzinome | 23 |
| 4.3.2. Korrelation zwischen MMP-9 Expression und Halslymphknotenmetasta- sierung der Oropharynxkarzinome | 24 |
| 4.3.3. Korrelation zwischen der MMP-9 Expression und des internationalen UICC-Stadiums | 25 |
| 5. DISKUSSION | 27 |
| 5.1. Plattenepithelkarzinom im Kopf- und Halsbereich | 27 |
| 5.1.1. Prozess der Metastasierung | 29 |
| 5.2. Matrixmetalloproteinasen (MMPs)..... | 31 |
| 5.2.1. Matrixmetalloproteinasen unter der besonderen Berücksichtigung der MMP-9 | 34 |
| 5.3. Tumorklassifizierung von Plattenepithelkarzinomen im Kopf- Halsbereich und Therapieoptionen des subklinischen Lymphknotenbefalls | 35 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 5.4. | Korrelationen zwischen MMP-9 Produktion und klinischen Parametern in malignen Oropharynxtumoren | 38 |
| 5.5. | Ausblick auf die prognostische Eignung und therapeutische Ansätze von MMPs.... | 44 |
| 5.5.1. | <i>Prognostische Eignung von MMP-9</i> | 44 |
| 5.5.2. | <i>Moderne Therapieansätze von Malignomen mittels MMP-Hemmung</i> | 45 |
| 6. | ZUSAMMENFASSUNG | 48 |
| 7. | LITERATURVERZEICHNIS | 51 |
| 8. | ANHANG | 72 |
| | Abbildungsverzeichnis | 72 |
| | Tabellenverzeichnis | 73 |
| | Danksagung | 74 |
| | Akademischer Lebenslauf und Ehrenwörtliche Erklärung | 75 |
| | Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Universitätsprofessoren und Dozenten | 76 |

1. Einleitung

Die ständige Weiterentwicklung zielgerichteter Therapiekonzepte und die prognostische Einschätzung von Tumoren im Kopf- und Halsbereich hat sich nicht zuletzt auf dem Gebiet der Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde zu einer Thematik von außerordentlicher Relevanz entwickelt.

So erkranken in Deutschland jährlich ca. 10 – 15 Männer pro 100.000 Einwohner an einem Karzinom von Mundhöhle oder Pharynx, vornehmlich in der 5.-7. Lebensdekade und bei Frauen sind es immerhin noch 4 Fälle. Damit ist dies bei Männern die vierthäufigste Krebsart in Deutschland, weltweit beträgt der Anteil maligner Kopf-Halstumore 6% aller Krebserkrankungen mit zunehmender Tendenz. Als Risikofaktoren sind Nikotinabusus und der regelmäßige Verzehr hochprozentigen Alkohols sowie andere chronische Reizzustände, wie die Achalasie oder Ösophagusdivertikel, gemeinhin akzeptiert.

Der häufigste maligne epitheliale Tumor, der sich quasi ubiquitär im Kopf- Halsbereich finden lässt, ist in über 90% der Fälle das Plattenepithelkarzinom [Black et al. 1997]. Dies ist im allgemeinen chirurgisch oder strahlentherapeutisch zu beherrschen. Sehr viel schwieriger und für das Überleben der Patienten Prognose relevant ist das Ausmaß der lymphogenen Metastasierung. Fernmetastasen treten nahezu nie ohne vorausgehende Metastasierung in die regionären Lymphknoten auf. Je nach Lokalisation des Primärtumors weisen bis zu 60% der Patienten bei der Erstuntersuchung Halslymphknotenmetastasen auf. Teilweise werden diese regionären Metastasen vor dem Primärtumor symptomatisch und 15% der Patienten weisen ein Zweitkarzinom im Bereich des Schluckweges auf.

Für die Invasion und Metastasierung maligner Tumoren ist die Expression und Aktivierung proteolytischer Enzyme unerlässlich, um das Tumorwachstum sicherzustellen und die physiologischen Grenzen Basalmembran und die Extrazellulärmatrix zu zerstören [Stetler-Stevenson et al. 1993, MacDougall et al. 1995].

Vor diesem Hintergrund fokussiert ein besonderes Interesse auf das bessere Verständnis der Matrix-Metalloproteinasen, proteolytische Enzyme, die sich aus einer Superfamilie von über 20 verschiedenen Zinkbindenden Endopeptidasen [Nelson et al. 2000] zusammensetzen, die physiologischerweise in Umbau- und Erneuerungsprozessen des umliegenden Gewebes involviert sind.

Insbesondere den MMPs -2 und -9 aus der Subfamilie der Gelatinasen wird im Rahmen des Metastasierungsprozesses diverser Karzinome eine Rolle zugesprochen [Kossakowska et al. 1996, Himmelstein et al. 1994], die neben Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereiches [Pickett et al. 1999] auch Malignome der Lunge [Kawano et al. 1997, Tokuraku et al. 1995, Herbst et al. 2000] oder der Prostata [Wood et al. 1997], des Kolons [Liabakk et al. 1996, Garbett et al. 1999] und der Blase [Papathoma et al. 2000, Kanayama 2001] betreffen.

Nach wie vor besteht Uneinigkeit darüber, inwieweit einzelnen MMPs eine mehr oder weniger gewichtige Rolle beim Metastasierungsprozeß von Plattenepithelkarzinomen zukommt. Vor diesem Hintergrund soll mit der vorliegenden Dissertationsschrift erarbeitet werden, welcher Zusammenhang zwischen einer erhöhten MMP-9 Expression im Tumorgewebe und dem lymphogenen Metastasierungsverhalten oropharyngealer Karzinome besteht.

2. Fragestellung

Der Einfluss von MMP-9 auf das Metastasierungsverhalten von Oropharynxtumoren im Kopf- und Halsbereich soll in dieser Arbeit anhand von Paraffinschnitten immunhistochemisch untersucht werden. Dabei liegen folgende Fragestellungen zugrunde:

1. Finden sich Anhaltspunkte für eine Korrelation zwischen der MMP-9 Expression und des T-, N-, M- und UICC-Stadiums oder des „Gradings“ von Malignomen des Oropharynx?
2. Eignet sich die immunhistochemisch einklassifizierte MMP-Expression des Primarius als prognostischer Marker für das Metastasierungspotential von Tumoren des Oropharynx?
3. Welche prognostische Relevanz ergibt sich aus einer MMP-Expression des Primarius für den klinischen N0-Hals?
4. Welche modernen therapeutischen Aspekte ergeben sich für Oropharynxtumoren mit erhöhter MMP-Expression?

3. Material und Methoden

In diesem Kapitel sollen neben der angewandten Methode und den benutzten Materialien auch das untersuchte Patientengut vorgestellt und klassifiziert werden. Insgesamt sind dazu die histologischen Präparate von 105 Patienten mit Oropharynxkarzinomen nach der Avidin-Biotin-Komplex-Methode am Paraffinmaterial mit Mikrowellenvorbehandlung aufgearbeitet und anschließend mit einem monoklonalen Anti-human MMP-9-Antikörper angefärbt und ausgewertet worden.

3.1. Studienpopulation

Für diese Arbeit sind die histologischen Präparate von 105 Patienten aus dem laufenden Patientengut von 1998 bis 2002 der Marburger Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde untersucht worden. Sämtliche Diagnosen sind postoperativ durch das Institut für Pathologie (Direktor: Prof. Dr. med. R. Moll) der Philipps-Universität Marburg histologisch gesichert und die Tumoren durch entsprechende Staging- und Grading-Verfahren einklassifiziert. Es handelt sich dabei um Oropharynxkarzinome verschiedenster Lokalisation mit einem Geschlechterverhältnis von männlich 84 zu weiblich 21 mit also männlicher Prädominanz, was für Kopf- und Halskarzinome als bekannt vorauszusetzen ist.

Als Referenzproben wurden in der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Philipps-Universität Marburg entnommene Tonsillengewebe verwendet. Die Tonsillenschnittpräparate wurden während therapeutischer Routineeingriffe im Oropharynxbereich gewonnen, die in der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt wurden.

Das Patientenalter zum Zeitpunkt der initialen Diagnosestellung variierte zwischen 40 und 79 Jahren mit einem Durchschnittsalter von 57.84 Jahren.

Die Klassifizierung der Oropharynxkarzinome folgte dem international anerkannten TNM-System (UICC 1993), wonach sich 22 Patienten mit einem T1-klassifizierten Primärtumor vorgestellt haben und deren Tumorausdehnung somit maximal 2 cm aufweist, aber nicht überschreitet. 31 Patienten zeigten einen T2-Tumor, der sich mehr als 2 cm aber immer noch unterhalb von 4 cm ausdehnt. 24 Patienten kamen, die an einem T3-Tumor leiden/litten und deren Tumorgöße nach der UICC oberhalb 4 cm liegt, aber noch keine Nachbarstrukturen infiltriert. Schließlich haben sich 28 Patienten schon mit Tumorinfiltrationen in Nachbarstrukturen, wie z.B. den Unterkiefer, harten Gaumen oder Skelettmuskulatur von Zunge vorgestellt, die damit einen T4-Tumor aufgewiesen haben.

Insgesamt 41 Patienten haben sich ohne locoregionäre Lymphknotenmetastasen (N0) vorgestellt, 6 präsentierten eine solitäre ipsilaterale Lymphknotenmetastase von bis zu 3 cm (N1-Status des Halses), 54 einen N2-Status, also mit multiplen ipsilateralen oder kontralateralen Lymphknoten kleiner als 6 cm und immerhin 4 Patienten zeigten bei der Erstdiagnose des Primärtumors bereits eine N3-Situation im Kopf- und Halsbereich mit demnach Lymphknotenmetastasen von mehr als 6 cm Durchmesser.

7 Patienten haben bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose eine Fernmetastasierung gezeigt, vornehmlich der Lunge (M1).

Beim histologischen Grading sind 21 gut differenzierte Tumoren (G1) diagnostiziert worden, 61 zeigten einen mäßigen Differenzierungsgrad, 19 einen schlechten und immerhin 2 Tumoren zeigten gar keine Differenzierung (G4), wobei 2 Tumoren histologisch nicht einklassifiziert waren. Die entsprechenden histologischen Einteilungskriterien sind unter 5.1. ausführlich beschrieben und sollen hier nicht noch einmal angeführt werden.

Nach Therapieeinleitung präsentierten 5 Patienten im Zeitraum zwischen wenigen Monaten bis zu 4 Jahren nach der Erstdiagnose ihres Tumorleidens Lokalrezidive und 12 Patienten sind während des Therapieverlaufes gestorben.

3.2. Immunhistologische Nachweismethoden

Zum Nachweis der MMP-9 Proteine soll als immunhistologisches Nachweisverfahren die Avidin-Biotin-Methode oder auch ABC-Methode zur Anwendung kommen.

Die Immunhistologie insgesamt ist eine der zentralen Methoden der modernen histopathologischen Diagnostik, durch die es möglich wird, Proteine, Polysaccharide u.a. Strukturen, gegen die Antikörper gebildet werden können, hochspezifisch nachzuweisen. Z.B. in vitro hergestellt, lassen sich diese Antikörper in verschiedenen Untersuchungsverfahren zum Nachweis der von ihnen spezifisch erkannten Antigene einsetzen, wodurch die konventionell-histologische Analyse von Differenzierungsmustern um die Ermittlung von Expressionsmustern ergänzt wird.

Praktische Anwendung finden diese immunhistochemischen Techniken, um antigene Komponenten in Zellen und Gewebsschnitten im mikroskopischen Bild nachzuweisen. Dies geschieht mit spezifischen AK, die mit Fluoreszenzfarbstoffen, Enzymen, partikulärem Material (z.B. Goldpartikel) oder mit radioaktiven Isotopen markiert sind. Eine dieser Techniken ist die Avidin-Biotin-Methode, die im Anschluss vorgestellt werden soll und enzymatisch zur Detektion der MMP-9 Proteine beiträgt.

Wesentliche Voraussetzungen für die Aussagekraft der Methode sind die Spezifität der verwendeten AK und die Stabilität der nachzuweisenden antigenen Determinanten. Ein negativer Ausfall der Reaktion beweist daher nicht unbedingt das Fehlen des Antigens. Prinzipiell kommen dabei zwei auf unterschiedliche Weise hergestellte Antikörper zum Einsatz, die polyklonalen oder monoklonalen Antikörper:

Polyklonale Antikörper sind natürliche Gemische der Antikörper, die im Zuge der Immunreaktion gegen die verschiedenen Determinanten eines Antigens von den jeweiligen B-Lymphozyten bzw. Plasmazellen gebildet werden. Zur Immunisierung sollte ein Antigen daher in möglichst reiner Form verabreicht werden. Am Anfang einer Immunreaktion dominieren Antikörper der Klasse IgM, später meist solche der Klasse IgG. Im Verlauf der Immunreaktion entstehen oft auch Antikörper höherer Affinität. Die ver-

schiedenen Antikörpermoleküle differieren daher auch in ihren physikochemischen Eigenschaften, so dass die Qualität der Immunsera selbst eines Empfängers von Tag zu Tag erheblich variieren kann. Das am häufigsten zur Erzeugung polyklonaler Antikörper genutzte Tier ist das Kaninchen. Geeignete Sera lassen sich jedoch auch von anderen Spezies wie Ziege, Schwein, Schaf, Pferd, Meerschweinchen u.a. gewinnen. Jedes Tier besitzt allerdings eine Reihe spontan entstandener AK, die Störfaktoren bei der immunchemischen Reaktion darstellen können.

Der Nachteil polyklonaler AK besteht in der Hauptsache in ihrem breiten Reaktionsspektrum, welches zu Kreuzreaktionen führen kann (Kreuzreaktion bezeichnet die Bindung eines AK an verschiedene Antigene, die das gleiche oder ähnlich strukturierte Epitope haben).

Für die Produktion *monoklonaler Antikörper* werden Plasmazellen mit Zellen eines unbegrenzt teilungsfähigen Plasmazelltumors, eines Plasmozytoms fusioniert. Die resultierenden "Hybridome" haben Eigenschaften der Tumorzelle und des anderen Fusionspartners und produzieren dauerhaft den bestimmten Ak, da sie sowohl Erbmaterial der Plasmazelle als auch der Myelomzelle enthalten. Die Produktion der AK erfolgt entweder in der Zellkultur (AK im Medium) oder in Tieren (AK im Aszites). Vorteile der monoklonalen AK sind die Möglichkeit eines praktisch unbegrenzten Nachschubs, die hohe Standardisierung, die hohe und enge Spezifität. Nachteile sind z.T. eine zu enge Spezifität und eine teilweise geringe Stabilität.

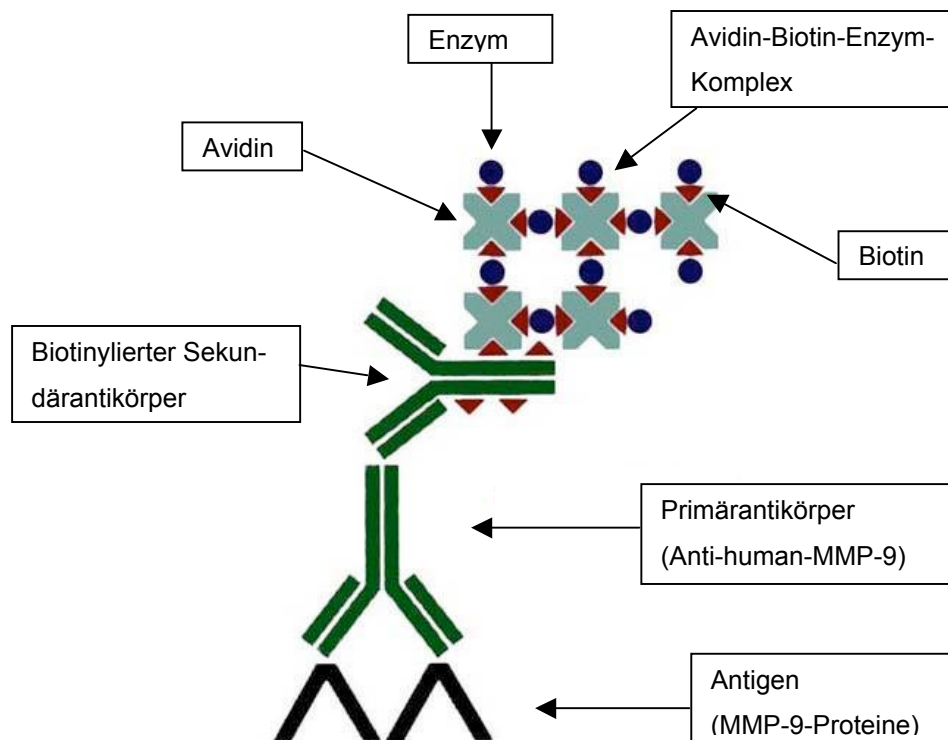
Insgesamt kommen in dieser Arbeit monoklonal hergestellte Antikörper zum Einsatz, da diese den hohen Spezifitätsgrad, der gefordert ist, erfüllen können.

3.3. Die Avidin-Biotin-Methode: Prinzip

Die Avidin-Biotin-Methode ist eine mögliche immunhistologische Nachweismethode und soll zur späteren Detektion der MMP-9-Proteine die starke Affinität von Avidin für

Biotin (Dissoziationskonstante 10^{-19} M) nutzen und somit die Sensitivität gegenüber anderen direkten oder indirekten immunhistologischen Färbemethoden erhöhen. Avidin besitzt 4 Bindungsstellen für Biotin, allerdings binden aufgrund der molekularen Konfiguration meistens weniger als 4 Biotinmoleküle an das Avidin. Zusätzlich wird noch ein biotinylierter Zweitantikörper benutzt, bei dem das Biotin kovalent an den Antikörper gebunden ist, und der quasi als Brückenantikörper zwischen den freien Bindungsplätzen des Avidins am Avidin-Biotin-Komplex und dem Detektions- oder Primärantikörper fungiert. Als Primärantikörper zur eigentlichen MMP-9-Proteindetektion dient ein lyophilisierter monoklonaler Anti-human MMP-9-IgG Antikörper, der von einer zuvor mit rekombinatem MMP-9 (rhMMP-9) sensibilisierten Maus stammt (Oncogene Products, USA).

Somit ergibt sich folgende Reihenfolge der vorzunehmenden Reagenzienapplikation, die in der folgenden Darstellung auch beibehalten werden soll: Nach der Mikrowellenvorbehandlung wird zunächst der Primärantikörper auf das histologische Schnittpräparat aufgetragen, dann der biotinylierte und gegen Maus-IgG sensibilisierte Zweitantikörper dazugegeben und schließlich der vorbereitete ABC-Komplex, welcher mittels einer abschließenden Substratlösung sichtbar gemacht wird, aufgetragen.



<– **Abb.1:** Avidin-Biotin-Methode: vorgeformte Avidin-Biotin-Komplexe reagieren mit biotinylierten Sekundärantikörpern.

3.3.1. ABC-Methode: Mikrowellenvorbehandlung

Vorbereitend für die Erstellung histologischer Schnittpräparate werden die 105 Paraffinblöcke der Primärtumoren geschnitten und für 30 min. zur Entparaffinierung in Roti-Histol® und anschließend wiederum 30 min. in einer absteigenden Alkoholreihe 100% – 70% getränkt. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase und damit falsch positiver Störreaktionen werden die Schnitte dann für erneut 30 min. einer Küvette mit 200 ml Methanol und 6 ml 30% H₂O₂ zugeführt und anschließend mit Aqua dest. gespült.

Es folgt die Mikrowellenvorbehandlung, indem die Schnitte in einer randvoll mit 10 mM tri-Na-citrat-Dihydrat-Puffer (4°C, pH 6 mit HCl eingestellt) gefüllten Küvette für 10 min. bei 600 Watt gekocht werden. Der Deckel der Küvette sollte dabei möglichst lose aufgelegt sein. Der Kochvorgang wird dann dreimal wiederholt und die bei jedem Durchgang verdunstete Menge tri-Na-citrat-Puffer dabei nachgefüllt. Abschließend kühlen die Küvetten bei Raumtemperatur für mind. 15 min. ab und werden dann im Spülpuffer TBS (53 g NaCl und 12 g Tris-Base ad 1000 ml Aqua dest., pH 7,4 einstellen und 1:10 verdünnen) für ca. eine halbe Stunde gespült.

Material:

- Roti-Histol®, Carl Roth GmbH & Co, D-78185 Karlsruhe
- Methanol, Riedel-De-Haën Laborchemikalien GmbH & Co KG, D-30926 Seelze
- tri-Na-citrat-Dihydrat-Puffer, Carl Roth GmbH & Co, D-78185 Karlsruhe
- Aqua-Dest. (Ampuwa®), Fresenius Kabi-Friedberg, D-61346 Bad Homburg
- TBS-Spülpuffer, Carl Roth GmbH & Co, D-78185 Karlsruhe

3.3.2. ABC-Methode: Auftragen von Normalserum

Zur Verhinderung unspezifischer Collagen-Reaktionen und Reaktionen mit endogenen IgGs wird nachfolgend Normalserum von der Ziege auf das Schnittpräparat aufgetragen. Dieser Arbeitsschritt soll durch die folgenden beiden Beispiele verdeutlicht werden:

| | <i>Beispiel 1</i> | <i>Beispiel 2</i> |
|-----------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| <i>1. Primär-Ak</i> | monoklonal aus der Maus | polyklonal aus Rb. |
| <i>2. Sekundär-Ak</i> | biot. Anti-Maus aus der Ziege | biot. Anti-Rb. aus dem Kaninchen |
| <i>3. Normalserum</i> | aus der Ziege | aus dem Kaninchen |

Für diesen Fall gilt nun Beispiel 1, so soll also 1:10 verdünntes Ziegen-Normalserum mit dem Schnittpräparat reagieren und dort für 30 min. in einer feuchten Kammer belassen werden. Anschließend wird das Präparat ausdrücklich nicht gespült, sondern lediglich abgekippt!

Material:

- Normalserum, Fa. Sigma-Aldrich GmbH, D-89502 Steinheim

3.3.3. ABC-Methode: Auftragen des Primär- und des Sekundärantikörpers

Nach dem Abkippen des Normalserums vom Schnittpräparat wird nun der Primärantikörper aufgetragen. Es handelt sich dabei um einen monoklonalen Anti-human MMP-9 Antikörper von der Maus in einer Verdünnung 1:100. Die Inkubationsdauer beträgt hier

12 Stunden bei 4°C wiederum in einer feuchten Kammer. Anschließend wird das Schnittpräparat mit PBS-Lösung für ca. fünf min. gespült und ein nach dem oben erwähnten Prinzip entsprechender Zweitantikörper aufgetragen.

Dieser ist enzymgekoppelt und gegen das Fc-Fragment des Primär-AK (jetzt als Antigen wirkend) gerichtet. In diesem Fall wird ein Maus-Immunglobulin G aus der Ziege in einer Verdünnung von 1:100 benutzt. Anschließend wird das Präparat wiederum für 30 min. in einer feuchten Kammer zur Inkubation belassen und für ca. 5 min. mit PBS-Lösung gespült.

Das angewandte Verfahren ist flexibler als die direkte Methode mit einem a priori gekennzeichneten Primärantikörper, da eine Vielzahl von Primär-AK aus einer Spezies mit den gleichen markierten Zweit-AK kombiniert werden können. Zudem ist diese Methode um ein Vielfaches empfindlicher als die direkte Methode, da mehrere Zweit-AK (und somit mehrere Enzymmoleküle) an einen Primär-AK binden können (Signalverstärkung). Als unerwünschte Reaktion kann, wie bereits oben erwähnt, eine Kreuzreaktion der Zweit-AK mit endogenen Igs oder Collagen auftreten, was durch Vorinkubation mit Kaninchen-Normalserum ausgeschaltet wird.

Material:

- Primärantikörper (monoklonaler Anti-human MMP-9 Antikörper, Clone 56-2A4), Oncogene Research Products, USA
- Sekundärantikörper (polyklonaler Anti-maus IgG), Dakro A/S, Denmark

3.3.4. ABC-Methode: Aufbringen des A-B-Enzymkomplexes

Bei dieser Reaktion bindet das Avidin des A-B-Komplexes an den Sekundär-AK. Der A-B-Enzymkomplex wird zunächst ca. 30 min. vor Gebrauch angesetzt, indem zu 1000 μ l PBS jeweils 20 μ l Avidin (Komponente A) und 20 μ l Biotin (Komponente B) zugefügt werden. Nun werden aus einer Tropfflasche ein bis zwei Tropfen dieses Enzymkomplexes auf das Präparat aufgetragen, welches dann wiederum in einer feuchten Kammer für 30 min. inkubiert und anschließend in einer mit PBS gefüllten Küvette für etwa 5 min. gespült wird.

Material:

- Strept.-ABC-Komplex/HRP, Fa. Dako, Denmark
- PBS-Lösung, Biochrom KG, D-12247 Berlin

3.3.5. ABC-Methode: Substratzugabe, Gegenfärbung und Eindickung

Der Sichtbarmachung der Enzymkomplexe dient die Zugabe des Substrates für den A-B-Komplex. Dazu wird in 18 ml TBS-Pufferlösung (pH 7.4) 1 Tablette DAB aufgelöst und diese Lösung dann filtriert. Direkt vor Gebrauch werden noch 18 μ l H₂O₂ dazugegeben und die hergestellte Substratlösung auf das gespülte Schnittpräparat aufgetragen. Die Inkubationszeit beträgt 5-10 min. bevor fließend gewässert und Spülung in Aqua dest. vorgenommen wird.

Die Gegenfärbung des Schnittpräparates erfolgt anschließend in einer Hämalaun-Küvette mit 50 ml Hämalaun und 250 ml Aqua dest., in die das Präparat 3 bis 6 mal eingetaucht und dann wiederum fließend gewässert wird.

Die Spülung erfolgt wiederum in Aqua dest., bevor die Schnittpräparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe 50% bis 100% getränkt werden und dann die Eindickung des Schnittpräparates mit Corbit-Balsam zur auswertenden Betrachtung erfolgt.

Material:

- PBS-Lösung, Biochrom KG, D-12247 Berlin
- DAB-Tablette, Fa. Sigma-Aldrich GmbH, D-89502 Steinheim
- Hämalaun, Fa. Merck KG aA, D-64271 Darmstadt
- Corbit-Balsam, I.Hecht, Kiel-Hassee, Stadtrade 27

3.4. *Statistische Auswertung*

Die Statistische Auswertung der erhobenen Daten ist mit dem Programm SPSS 11.0 für Windows und den dort integrierten Funktionen erfolgt. Neben Mittelwertberechnungen und Standardabweichungen sind auch Korrelationen mit dem integrierten Korrelations-test nach Pearson berechnet worden, und zwar nach folgender Formel:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) * (y_i - \bar{y})}{(n - 1) * s_x * s_y}$$

Dabei sind x_i und y_i die Werte der beiden Variablen, \bar{x} und \bar{y} deren Mittelwerte und s_x und s_y deren Standardabweichungen; n ist die Anzahl der Wertepaare. Der Korrelationskoeffizient (r) wird von SPSS berechnet und gibt die Anzahl der jeweiligen Wertepaare aus und die sich bei der Absicherung von r gegen Null ergebende Irrtumswahrscheinlichkeit p . In einer Fußnote wird die Signifikanz mit drei Sternchen bei höchster Signifikanz ($p < 0.001$) und mit weniger Sternchen bei sinkender Signifikanz angegeben.

Die Expressionslevel von MMP-9 sind auf Zusammenhänge mit klinischen Parametern wie dem Alter und dem Geschlecht der Patienten, der histologischen Differenzierung des Tumors, der TNM-Klassifikation sowie dem UICC-Stadium untersucht worden.

4. Ergebnisse

Zunächst sei vorweggestellt, dass erste Versuchsreihen mit einem kommerziellen Antikörper (monoklonaler Anti-human MMP-9 Antikörper, Clone 36020.111), der Firma R&D Systems GmbH aus Wiesbaden zu keinen auswertbaren Ergebnissen führte. In mehreren Verdünnungsreihen des Primärantikörpers und diversen Protokollvarianten kam es lediglich zu Zellkernanfärbungen und aller im Schnittpräparat befindlicher Gewebetypen, so dass keine auswertbare Aussage möglich gewesen ist.

Insgesamt ist versucht worden, durch Hinzufügen einer Schnittpräparat-Trypsinisierung verborgene Antigendomänen für die Antigen-Antikörperreaktion besser verfügbar zu machen. Zusätzlich ist die Mikrowellenvorbehandlung zeitlich variiert worden und die Inkubationsdauer aller im Protokoll angesprochener sowohl Primär-, als auch Sekundärantikörper und des Normalserums verändert worden. Weiterhin sind alle Protokollveränderungen in Kombination experimentiert und mit den angesprochenen unterschiedlichen Antikörperverdünnungen von 1:10, 1:80, 1:100, 1:200 und 1:800 getestet worden.

4.1. Wertungssystem

Nach etlichen frustranen Versuchsverläufen ist schließlich mit einem qualitativen Wechsel des Primärantikörpers von R&D Systems, Wiesbaden zu einem Oncogene-Research Produkt aus den USA die erhoffte Auswertbarkeit der Schnittpräparate erzielt worden.

Die nun erzielten Resultate sind nach folgendem in der Literatur gängigem Klassifizierungssystem [Kurahara et al. 1999] vorgenommen worden:

- 0 = fast keine Färbung von Tumorzellen/Stroma
- 1+ = Färbung von weniger als 50% der Tumorzellen und/oder schwache Färbung der Stromazellen

- 2+ = Färbung von mehr als 50% der Tumorzellen und/oder mäßige Färbung der Stromazellen
- 3+ = ausgedehnte Tumorzellfärbung und/oder starke Färbung der Stromazellen

Dabei richtet sich die Klassifizierung nach dem Tumorareal und hier insbesondere auf die Tumor/Stromagrenze, da alle Schnittpräparate ein insgesamt heterogenes Färbemuster mit leicht variierender Intensität – jedoch nicht unterschiedlicher Klassifizierungsstufen – in verschiedenen Arealen aufzeigten.

Exemplarisch sollen im folgenden für zwei MMP-9 Expressionslevel entsprechende histologische Schnittpräparate dokumentiert werden:

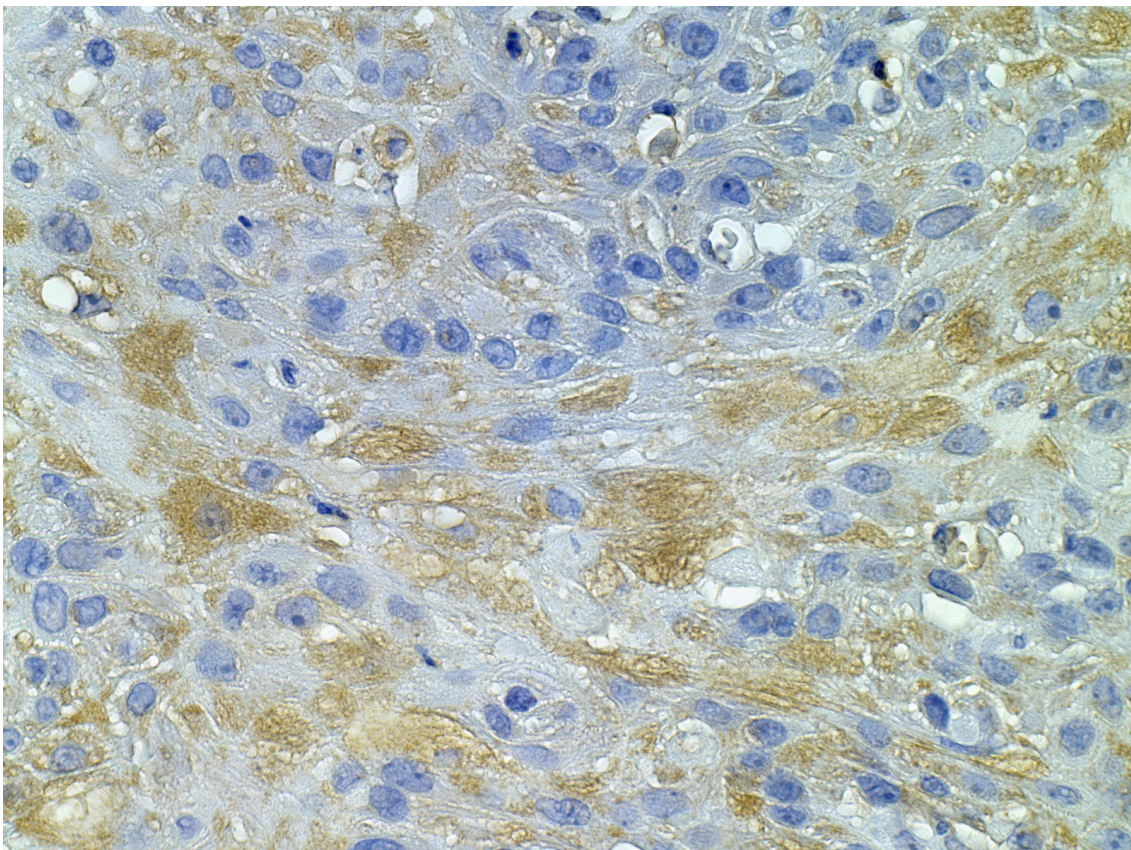


Abb. 2: Immunhistochemische Färbung von MMP-9 nach der ABC-Methode eines Oropharynxtumors, der die Anfärbung von weniger als 50% der Tumorzellen bzw. des Stromagewebes zeigt (40-fache Vergrößerung) und somit in die Kategorie 1+ einzuklassifizieren ist.

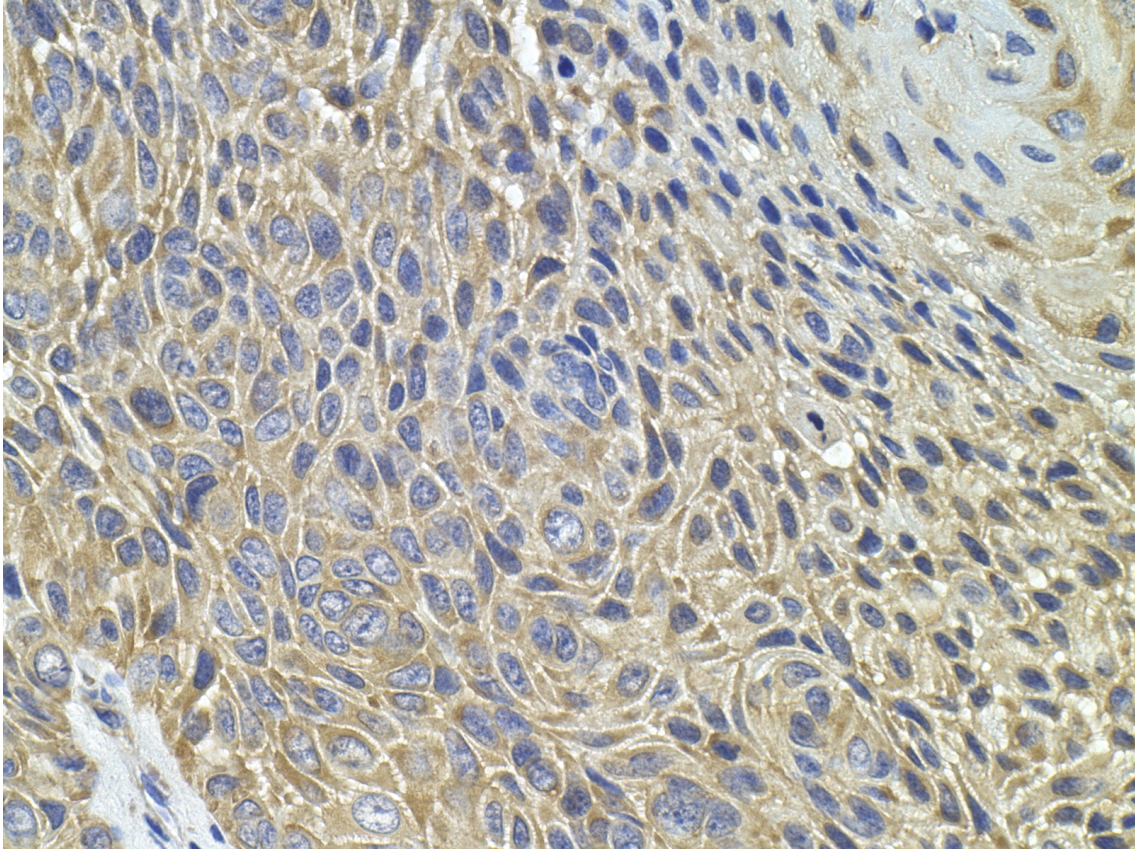


Abb. 3: Immunhistochemische Färbung von MMP-9 nach der ABC-Methode eines Oropharynxtumors, der eine ausgedehnte Anfärbung der Tumorzellen bzw. des Stromagewebes zeigt (40-fache Vergrößerung) und somit in die Kategorie 3+ einzuklassifizieren ist.

4.2. Nachweis von MMP-9 Signalen im Gewebe

Die immunhistochemische Untersuchung der 105 Oropharynxkarzinome auf die Expression von MMP-9 zeigte insgesamt den Expressionsnachweis in 95,2% (100/105) der Fälle. Dabei war die Intensitätsausprägung der MMP-9 Expression in 24 Präparaten <50% der Tumorzellen bzw. des Stromagewebes, in 37 Fällen >50% der Tumorzellen bzw. des Stromagewebes und in 39 Schnittpräparaten konnte eine ausgedehnte Tumorzell- bzw. Stromafärbung nachgewiesen werden. Alle mitgefärbten Tonsillenepithelien zeigten eine insgesamt negative, also keine Anfärbbarkeit an.

4.3. Korrelation zwischen der MMP-9 Expression und klinischen Parametern

In diesem Kapitel sollen die ermittelten Expressionsmuster von MMP-9 und etwaige Zusammenhänge mit der TNM-Klassifikation, der internationalen UICC-Klassifikation, dem Tumorgrading und anderen klinischen Parametern wie Alter und Geschlecht der Patienten dargestellt werden.

Die resultierenden Expressionsmuster von MMP-9 zeigten bzgl. des Patientenalters oder ihres Geschlechtes keine Zusammenhänge mit der Expressionsintensität von MMP-9 (Daten nicht gezeigt). Gleiches gilt auch für den histologischen Differenzierungsgrad des Primärtumors, so dass insgesamt nicht von einem Zusammenhang zwischen der Differenzierung bzw. der Entdifferenzierung eines Oropharynxtumors und der entsprechenden MMP-9 Expression ausgegangen werden kann:

| <i>Färbungsgrad</i> | <i>G1</i> | <i>G2</i> | <i>G3</i> | <i>G4</i> | <i>Gesamt</i> |
|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------------|
| 0 | 2 | 2 | 1 | 0 | 5 |
| 1+ | 3 | 22 | 1 | 0 | 26 |
| 2+ | 6 | 20 | 7 | 2 | 35 |
| 3+ | 10 | 17 | 10 | 0 | 37 |
| Gesamt | 21 | 61 | 19 | 2 | 103* |

*2 Tumoren sind pathologisch nicht einklassifiziert

Tabelle 1: Verhältnis zwischen MMP-9 Expressionslevel und dem Grading der Oropharynxkarzinome. 0: keine Expression, 1+: Färbung von weniger als 50% der Tumorzellen und/oder schwache Färbung der Stromazelle, 2+: Färbung von mehr als 50% der Tumorzellen und/oder mäßige Färbung der Stromazellen, 3+: ausgedehnte Tumorzellfärbung und/oder starke Färbung der Stromazellen.

Die Zusammenhänge zwischen der MMP-9 Expressionsintensität und der TNM- bzw. UICC-Klassifikation sollen in den folgenden Kapiteln ausführlich dargestellt werden:

4.3.1. Korrelation zwischen MMP-9 Expression und der T-Klassifikation der Oropharynxkarzinome

Die Expressionslevel für MMP-9 und die lokale Tumorerinvasion, die T-Klassifikation, zeigten eine statistisch signifikante Korrelation für $p < 0.05$. (siehe Tab. 2)

| <i>Expressionslevel</i> | <i>T1</i> | <i>T2</i> | <i>T3</i> | <i>T4</i> | <i>Gesamt</i> |
|-------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------------|
| 0 | 2 | 3 | 0 | 0 | 5 |
| 1+ | 8 | 5 | 6 | 5 | 24 |
| 2+ | 7 | 14 | 6 | 10 | 37 |
| 3+ | 5 | 9 | 12 | 13 | 39 |
| Gesamt | 22 | 31 | 24 | 28 | 105 |

Tabelle 2: Verhältnis zwischen MMP-9 Expressionslevel und der T-Klassifikation der Oropharynxkarzinome. 0: keine Expression, 1+: Färbung von weniger als 50% der Tumorzellen und/oder schwache Färbung der Stromazelle, 2+: Färbung von mehr als 50% der Tumorzellen und/oder mäßige Färbung der Stromazellen, 3+: ausgedehnte Tumorzellfärbung und/oder starke Färbung der Stromazellen.

Insgesamt haben die kleineren bzw. wenig lokal invasiven T1- und T2-Oropharynxkarzinome in 90,6% (48/53) der Fälle MMP-9 exprimiert, wohingegen die größeren T3- und T4-Karzinome alle MMP-9 Expression und hier vermehrt die stärkeren Expressionslevel für MMP-9 gezeigt haben.

4.3.2. Korrelation zwischen MMP-9 Expression und Halslymphknotenmetastasierung der Oropharynxkarzinome

Zwischen dem Vorhandensein von Halslymphknotenmetastasen und der MMP-9 Expression konnte durch den bivarianten Korrelationstest nach Pearson eine statistisch signifikante Korrelation für $p < 0.01$ gezeigt werden. (siehe Tab. 3)

| <i>Expressionslevel</i> | Lymphknotenbeteiligung | | <i>Gesamt</i> |
|-------------------------|-------------------------------|----------------|---------------|
| | <i>Nein (N0)</i> | <i>Ja (N+)</i> | |
| 0 | 4 | 1 | 5 |
| 1+ | 20 | 4 | 24 |
| 2+ | 12 | 24 | 36 |
| 3+ | 5 | 35 | 40 |
| Gesamt | 41(39%) | 64(61%) | 105 |

Tabelle 3: Verhältnis zwischen MMP-9 Expressionslevel und dem Befall der Halslymphknoten der Oropharynxkarzinome. 0: keine Expression, 1+: Färbung von weniger als 50% der Tumorzellen und/oder schwache Färbung der Stromazelle, 2+: Färbung von mehr als 50% der Tumorzellen und/oder mäßige Färbung der Stromazellen, 3+: ausgedehnte Tumorzellfärbung und/oder starke Färbung der Stromazellen.

Hier zeigten die wenig aggressiven Oropharynxphänotypen ohne stattgehabte nodale Metastasierung in 90,2% (37/41) der Fälle MMP-9 Expression und hier überwiegend in den niedrigen Expressionsleveln. Die aggressiven Phänotypen mit Halslymphknotenmetastasierung hingegen haben in 98,4% (63/64) der Fälle MMP-9 Expression gezeigt und hier wiederum in den hohen Expressionsleveln 2+ und 3+. Insgesamt korreliert der Halslymphknotenbefall der Patienten mit dem Expressionslevel für MMP-9 der Oropharynxtumore ($p < 0.01$).

Für die einzelnen Lymphknotenstadien gilt folgendes:

| <i>Expressionslevel</i> | <i>N1</i> | <i>N2</i> | <i>N3</i> | <i>Gesamt</i> |
|-------------------------|-----------|-----------|-----------|---------------|
| 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 1+ | 1 | 3 | 0 | 4 |
| 2+ | 3 | 21 | 1 | 25 |
| 3+ | 1 | 30 | 3 | 34 |
| Gesamt | 6 | 54 | 4 | 64 |

Tabelle 4: Verhältnis zwischen MMP-9 Expressionslevel und dem N-Stadium der Oropharynxkarzinome. 0: keine Expression, 1+: Färbung von weniger als 50% der Tumorzellen und/oder schwache Färbung der Stromazelle, 2+: Färbung von mehr als 50% der Tumorzellen und/oder mäßige Färbung der Stromazellen, 3+: ausgedehnte Tumorzellfärbung und/oder starke Färbung der Stromazellen.

Bezüglich des N-Status der Karzinompatienten und des MMP-9 Expressionslevels zeigte sich eine signifikante Korrelation ($p < 0.01$), wobei kritischerweise angemerkt werden muss, dass die Fallzahl für den N1- und den N3-Status gering war und somit eine statistisch nur begrenzte Aussagekraft bestand. Auch hier zeigten die aggressiveren Karzinomphänotypen eine deutliche Expressionsintensität für MMP-9, alle N2- und N3-Karzinome haben MMP-9 exprimiert und immerhin noch 83,3% (5/6) der N1-Patienten.

4.3.3. Korrelation zwischen der MMP-9 Expression und des internationalen UICC-Stadiums

Weiterhin konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der MMP-9 Expression und den internationalen UICC-Tumorstadien ($p < 0.01$) gezeigt werden:

| <i>Expressionslevel</i> | <i>UICC I</i> | <i>UICC II</i> | <i>UICC I+II</i> | <i>UICC III</i> | <i>UICC IV</i> | <i>UICC III+IV</i> | <i>Gesamt UICC I-IV</i> |
|-------------------------|---------------|----------------|------------------|-----------------|----------------|--------------------|-------------------------|
| 0 | 2 | 2 | 4 | 1 | 0 | 1 | 5 |
| 1+ | 7 | 5 | 12 | 7 | 5 | 12 | 24 |
| 2+ | 3 | 5 | 8 | 5 | 24 | 29 | 37 |
| 3+ | 1 | 1 | 2 | 2 | 35 | 37 | 39 |
| Gesamt | 13 | 13 | 26 | 15 | 64 | 79 | 105 |

Tabelle 5: Verhältnis zwischen MMP-9 Expressionslevel und dem UICC-Stadium der Oropharynxkarzino-
me. 0: keine Expression, 1+: Färbung von weniger als 50% der Tumorzellen und/oder schwache Fä-
bung der Stromazelle, 2+: Färbung von mehr als 50% der Tumorzellen und/oder mäßige Färbung der
Stromazellen, 3+: ausgedehnte Tumorzellfärbung und/oder starke Färbung der Stromazellen.

Auffällig hier ist wiederum die starke MMP-9 Expression bei den hohen UICC-Stadien, so haben 84,6% (22/26) der niedrigen Stadien I und II und 98,7% der hohen UICC-Stadien III und IV (78/79) MMP-9 Expression gezeigt und die hohen Stadien wiederum v.a. in den höheren MMP-9 Expressionsleveln 2+ und 3+. Somit scheint auch hier ein Zusammenhang zwischen UICC-Stadium und MMP-9 Expression ($p < 0.01$) vorhanden.

Abschließend betrachtet scheint es im untersuchten Patientengut der Marburger Universitäts-HNO-Klinik von 1998-2002 einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der MMP-9 Expression der Oropharynxtumoren und der nodalen Metastasierung bzw. dem internationalen UICC-Stadium und auch dem T-Stadium zu geben. Diese Beobachtungen sollen in den folgenden Kapiteln erläutert und mit Beobachtungen bereits publizierter Ergebnisse verglichen und abschließend diskutiert werden.

5. Diskussion

Die Eigenheiten und das Metastasierungsverhalten von Plattenepithelkarzinomen insbesondere des Kopf- und Halsbereiches soll im folgenden kurz vorgestellt werden, bevor auf die sich daraus ergebenden Konsequenzen hinsichtlich Diagnostik und Therapie eingegangen und mit den Ergebnissen dieser Arbeit diskutiert wird.

5.1. *Plattenepithelkarzinom im Kopf- und Halsbereich*

Bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Halsbereich handelt es sich primär um Karzinome, also Malignome epithelialer Strukturen, von Schleimhäuten der Lippe, Mundhöhle, Pharynx und Larynx, gemäß UICC (International Union against Cancer) gehören auch zervikale Ösophaguskarzinome dazu [Sobin et al. 1997]. Sie alle können prinzipiell über den hämatogenen oder den lymphogenen Weg metastasieren. Eher selten neigen Plattenepithelkarzinome der Kopfhaut, der Nasennebenhöhlen oder der Speicheldrüsen zur regionären Metastasierung in die Halslymphknoten [Seifert et al. 2000, Shanmugaratnam 1991, Pindborg et al. 1997].

Plattenepithelkarzinome gehen von Organen aus, die entweder Plattenepithel enthalten oder aber prinzipiell zur Plattenepithelmetaplasie in der Lage sind. Sie weisen ein typisches Zytoskelett auf und ahmen das verhornende Plattenepithel je nach Differenzierungsgrad unterschiedlich nach. Der Schritt von normalen Plattenepithelzellen zu pathologischen Tumorzellen geschieht auf molekulargenetischer Ebene durch eine Akkumulation von mehreren Mutationen in wachstumskontrollierenden Schlüsselgenen innerhalb einer Plattenepithelzelle [Hunter 1991]. Diese Schlüsselgene werden aufgeteilt in Protoonkogene und Tumorsuppressorgene [Grander 1998], wobei Protoonkogene für Proteine kodieren, die die normale Zellentwicklung regulieren und durch Mutationen zu Onkogenen transformiert werden können. Tumorsuppressorgene codieren für Proteine, die physiologischerweise die Zelle vor strukturellen Veränderungen schützen können oder aber Apoptose und Reparaturmechanismen regulieren [Hübner et al. 1969]. Trifft

nun eine Mutation eines dieser 7-10 Tumorsuppressor- bzw. Protoonkogene, so gerät ein empfindlicher Regulationsprozess ins Ungleichgewicht und die Zelle erhält einen ungewollten Wachstumsvorteil gegenüber benignen Zellen. Im diesem Fall bedeutet das eine Transformation der Plattenepithelzelle in eine Plattenepithelkarzinomzelle.

Die morphologische Einteilung der Plattenepithelkarzinome erfolgt in der Regel vom Pathologen und richtet sich dabei vornehmlich nach der Bestimmung des Differenzierungs- oder Malignitätsgrades (Grading) und wird von G1 gut differenziert bis nach G3 bzw. G4 schlecht bzw. gar nicht mehr differenziert klassifiziert. Die hierfür maßgeblichen Parameter sind zum einen die Differenzierungsparameter, also eine dem normalen Plattenepithel analoge Diversifizierung von peripheren Basalzellen und nach zentral ausreifenden Plattenepithelzellen, die Ausbildung von Interzellularbrücken und die Verhornung. Diese Parameter nehmen von guter zu schlechter Differenzierung hin ab, wohingegen die Parameter der zytologischen und histologischen Malignitätskriterien zunehmen. Für die zytologische Einteilung spielen neben der Pleomorphie und Hyperchromasie der Zellkerne auch die Kern/Plasmarelation und atypische Mitosen eine entscheidende Rolle. Wichtigster histologischer Parameter ist das Infiltrationsmuster, wobei ein stark aufgesplittertes Wachstum einer höheren Malignität entspricht.

Alle Parameter führen gemäß der WHO [Pindborg et al. 1997] zur entsprechenden Einteilung in die entsprechenden bereits genannten Differenzierungsgrade, was in der Literatur jedoch Untersucher entsprechend subjektiv zu sein scheint [Pindborg et al. 1997] und somit durchaus noch der Überarbeitung z.T. mittels differenzierungsassoziierter Marker, wie das E-cadherin, bedarf [Bosch et al. 2001, Schipper et al. 1991, Shinohara et al. 1998].

Dem histopathologischen Erscheinungsbild des Primärtumors entspricht in der Regel auch das der entsprechenden Lymphknotenmetastase die sich in einem komplizierten Prozess aus dem Primärtumor absiedeln kann, der im folgenden dargestellt werden soll.

5.1.1. Prozess der Metastasierung

Der Vorgang der zunächst regionären und damit später auch disseminierten Aussaat von Tochtergeschwülsten eines Primärtumors differiert je nach Typus des Primärtumors enorm. Auch innerhalb eines Tumors können sich Subpopulationen mit unterschiedlichem Metastasierungspotential bzw. Aggressivität entwickeln [Fidler et al. 1977].

Primärtumoren mit höherem Metastasierungspotential können nun mehrere Millionen Zellen täglich in die Zirkulation entlassen [Liotta et al. 1974], wobei davon nur wenige Hundert überhaupt in der Lage sind, Metastasen zu bilden. Erleichtert wird diesen vom Primärtumor entlassenen Zellpopulationen der Zugang zum venösen Gefäßsystem durch neugebildete Tumorgefäße, die z.T. erhebliche Defekte aufweisen und als vorübergehende Barriere nicht mehr funktionieren können [Liotta et al. 1974, Easty et al. 1982]. In diesem Zusammenhang sei auf die Tumorangiogenese verwiesen, die in den Mittelpunkt des Interesses gerückt ist, seitdem in histopathologischen Arbeiten gezeigt wurde, dass eine höhere Tumovaskularisation generell eine höhere Aggressivität mit einem früheren Auftreten von Fernmetastasen anzeigt [Folkman 1995]. Andere Untersuchungen konnten zeigen, dass nicht nur VEGF (Vascular endothelial growth factor) als angiogener Hauptfaktor, sondern auch MMPs (Matrixmetalloproteinasen) und hier v.a. MMP-9 an der Tumorneoangiogenese beteiligt sind [Risau 1997, Unemori et al. 1992, Riedel et al. 2001]. Zusätzlich ist MMP-9 in Zusammenhang mit Plattenepithelzellkarzinomen im Kopf- Halsbereich und in Nicht-Kleinzelligen Lungenkarzinomen dargestellt und ihre prognoseverschlechternde Wirkung bei erhöhten Angiogeneesefaktoren wie VEGF publiziert worden [Iizasa et al. 1998, Falkenberg et al. 1999, Heissenberg et al. 2000, Riedel et al. 2000].

Der prinzipiell andere Metastasierungsweg ist der über die Lymphbahnen. Lymphgefäße können allerdings vom Tumor nicht neu gebildet werden, so dass angenommen wird, dass die lymphogene Metastasierung im Randbereich des Tumors, der „Invasionsfront“, stattfindet. Von hier aus können dann die tumorösen Zellen im Sinne einer Lymphangiomas carcinomatosa den Zugang zu den regionären Lymphknoten finden und hier zu einer Mikrometastase heranreifen. Diese ist definiert als ein metastatisch entstandener von

einem Lymphknotensinus ausgehender Karzinomherd <3mm und minimaler Alteration der Lymphknotenstruktur [Steinhart et al. 1993, van den Brekel et al. 1996, Woolgar 1999]. Prinzipiell ist dieser Vorgang im Kopf- und Halsbereich in über 300 verschiedene Lymphknoten möglich, welcher Lymphknoten letztendlich befallen wird hängt mit der Dichte und Richtung der initialen Lymphgefäße im Primärtumorbereich zusammen und hat für jede Tumorlokalisation einen bevorzugten Drainageweg in eine oder mehrere bestimmte Lymphknotengruppe, es können aber auch Lymphknotenstationen übersprungen werden. Hat der metastatische Zellverband sich nun nicht im Lymphknoten festgesetzt oder ist der metastatische Zellverband als Mikrometastase selbst zum Fokus für weitere Metastasen geworden, besteht auch eine Invasionsmöglichkeit in den systemisch venösen Abfluss über lymphohämatogene Verbindungen.

Für beide Metastasierungswege ist die Basalmembranauflösung der erste Schritt in einem komplizierten Metastasierungsprozess und bezeichnet den Beginn der Invasion eines Primärtumors, welcher sich in der Entstehung einer Metastase fortsetzt. Basalmembranen begrenzen die meisten epithelialen Strukturen und stellen eine physiologische Grenze zwischen histologisch differentem Gewebe dar. Die Lyse dieser Basalmembranen und von Komponenten der Extrazellulärmatrix ist ein Charakteristikum von maligne entarteten Zellen, benigne Zellen besitzen diese Fähigkeit im Gegensatz dazu nicht [Liotta et al. 1986]. Insgesamt vollzieht sich der Invasionsprozess als biochemisch aktiver Prozess nach vorherrschender Lehrmeinung in folgenden drei Schritten:

1. Tumorzellanheftung an die Zelloberflächenrezeptoren der Matrix wie Integrine oder Cadherine mittels Glykoproteinen wie Laminin oder Fibronectin, dann die
2. lokale Degradation dieser Matrix durch zellassoziierte Proteasen und schließlich
3. die Tumorzellbewegung durch die degradadierte Matrix entlang chemotaktischer Faktoren.

In diesem Metastasierungsprozess, der auch für das Plattenepithelkarzinom im Kopf- und Halsbereich gilt, nimmt die Gruppe der Proteinasen als Ausdruck erhöhter lytischer Aktivität eine zentrale Stellung ein. Neben den Serinproteinasen Gewebs- und Urokinase- Plasminogenaktivator sind dies die Zysteinproteinasen Cathepsin B und L, der

Aspartatproteinase Cathepsin D und, in diesem Zusammenhang am bedeutendsten, die sogenannten Matrixmetalloproteinasen [Mignatti et al. 1986, Yagel et al. 1989]. Es ist bei letzteren nicht die Expression an sich entscheidend, sondern vielmehr das Verhältnis von beiden zueinander oder auch die Imbalance dieser Proteinase und deren natürlichen Inhibitoren (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases, TIMPs), die dem Primärtumor dann eine erhöhte lytische Aktivität verleihen.

Da MMPs eine Schlüsselrolle bei der Degradation von sämtlichen extrazellulären Matrixkomponenten einschließlich der Basalmembran und des Kollagens [Sternlicht et al. 2001, Birkedal-Hansen et al. 1993] spielen, bestimmen sie letztendlich also die Tumorinvasivität entscheidend mit. Der Zusammenhang zwischen lytischer Aktivität von Kollagen und Invasivität von Malignomen ist in früheren Arbeiten bereits nachgewiesen worden [Taylor et al. 1970]. Zudem ermöglicht eine gesteigerte proteolytische Aktivität dem Primärtumor die spätere Absiedlung im Kapillarbett des Zielorgans, wiederum die Penetration durch Blutgefäße und durch die dortige Extrazellulärmatrix.

Die erhöhte Expression der MMPs ist z.T. mit einem hohen Metastasierungspotential in Verbindung gebracht worden und Arbeitsgruppen versuchen, diesen Sachverhalt dazu zu nutzen, bestimmte Markereigenschaften zu erforschen [Kuropkat et al. 2002], die diagnostische oder prognostische Hinweise auf die jeweilige Tumoraggressivität nicht zuletzt im Kopf- und Halsbereich geben können.

Für das Verständnis dieses eminent wichtigen Vorganges soll nachfolgend kurz die Familie der MMPs, deren Inhibitoren und das sensible Gleichgewicht dieser Proteinase vorgestellt werden.

5.2. *Matrixmetalloproteinasen (MMPs)*

Wie bereits erwähnt bilden die Matrixmetalloproteinase eine Superfamilie aus über 20 verschiedenen Zinkbindenden Endopeptidasen [Nelson et al. 2000], die physiologischerweise in Umbau- und Erneuerungsprozessen des umliegenden Gewebes involviert

sind, beispielsweise in die Wundheilung und das Gewebewachstum [Brown 1997] oder die Embryogenese. Aber auch bei der Leberzirrhose oder bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises [Shlopov et al. 1997, Thorgeirsson et al. 1982] und schließlich bei vielen Malignomen nehmen sie eine zentrale Rolle ein.

MMPs sind Proteinasen, die mindestens eine Komponente der Extrazellulärmatrix abbauen können. Sie enthalten ein funktionell unabhömmliches Zinkion und werden von Chelatbildnern inhibiert. Sie werden als pro-MMP sezerniert und zur Aktivierung wird ein Peptid proteolytisch abgespalten. Dies geschieht im Extrazellulärraum, mit Ausnahme von MMP-11 und MT1-MMP, die beide von furinähnlichen Proteasen aktiviert werden [Nagase 1997]. Alle MMPs lassen sich nach strukturellen und substratspezifischen Gesichtspunkten in sieben Untergruppen unterteilen, wozu die Collagenasen (MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18), die Gelatinasen (MMP-2, MMP-9), die Stromelysine (MMP-3, MMP-10, MMP-11) und Stromelysin-ähnlichen MMPs (MMP-7, MMP-12, MMP-26), die Membrangebundenen MMPs (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25), die Neuen MMPs (MMP-19, MMP-20, MMP-28) und schließlich die Inhibitoren der MMPs, die TIMPs (TIMP 1-4) gehören.

Bekannt ist, dass die meisten MMP-Proteine als noch inaktive Zymogene oder Pro-MMPs produziert und sowohl intra- als auch extrazellulär durch Serin-Proteasen oder bereits aktivierte MMPs aktiviert werden können, wie z.B. die MMP-2 durch sogenannte MT-MMPs (Membrane-type Matrixmetalloproteinasen) aktiviert wird. Auch der äußerst komplexe Aktivierungsprozess unterliegt genauester Kontrollmechanismen [O-huchi et al. 1997]. Daneben bestehen Regulationsmechanismen im Bereich der Stimulation und Inhibition der MMP-Expression durch verschiedene parakrin wirkende Faktoren und Co-Faktoren aus den Bereichen der Wachstumsfaktoren, den Zytokinen und den Hormonen [Ikebe et al. 1998, Long et al. 1998, Mann et al. 1995, O-Charoenrat et al. 2000a, Rooprai et al. 2000, Shima et al. 1993], z.T. auch durch das Substratangebot bzw. die erhöhte oder erniedrigte Substratkonzentration.

In diesem Kontext ist der Zusammenhang zwischen der Tumordinvasion von Plattenepithelkarzinomen des Kopf- Halsbereiches mit einem spezifischen EGF-Rezeptor und

der Überexpression von Pro-MMP-9 bzw. MMP-9 gezeigt worden [O-Charoenrat et al. 2000]. Auch die dominante Expression von MMP-9 und MT1-MMP in epithelialen Malignomen [Pyke et al. 1992, Nomura et al. 1996, Hayakawa et al. 1992] scheint an dieser Stelle bemerkenswert.

Schließlich besteht ein weiterer Regulationsmechanismus in der Inhibition bereits aktivierter MMPs durch Mitglieder der TIMP-Familie. Dabei handelt es sich um einen Proteinfamilienkomplex bestehend aus 4 Mitgliedern (TIMP 1-4), der in den Remodelling-Prozess des Bindegewebes involviert zu sein scheint [Uria et al. 1994, Gomez et al. 1997]. TIMP 1-4 binden an aktivierte MMPs und inhibieren diese durch Bildung non-kovalenter Komplexe [Imai et al. 1995].

Insgesamt gesehen sind aber alle beschriebenen Regulationsmechanismen noch nicht endgültig verstanden und weiterhin Gegenstand aktiver Forschung [Koong et al. 2000, O-Charoenrat et al. 1999, Tomita et al. 2000, Werb et al. 1974].

Obwohl für die Plattenepithelkarzinome im Kopf-Halsbereich bisher keine charakteristischen Expressionsmuster für bestimmte MMPs bestätigt werden konnten, ist die Expression bestimmter MMPs in sowohl benignen als auch malignen oralen Epithelzellen, Epithelkarzinomen, Lymphknotenmetastasen und Dysplasien gezeigt worden, was angesichts des Gesamtkontextes und des pathophysiologischen Verständnisses der MMPs im Bereich der Tumorinvasion von malignen Plattenepithelkarzinomen nur zu verständlich erscheint.

So sollen die bisher gut untersuchten MMP-2 und MMP-9 aus der Gruppe der Gelatinasen, die MMP-13 aus dem Bereich der Collagenasen und die MMP-7 aus dem Bereich der Stromelysinähnlichen MMPs ihre essentielle Rolle in der Tumorentwicklung von Plattenepithelkarzinomen des Kopf- Halsbereiches und der oft folgenden Gewebeinvasion im Rahmen der lokoregionären Lymphknotenmetastasierung und Fernmetastasierung spielen.

Da für MMP-9 auch in einer aktuellen Metaanalyse nicht abschließend geklärt ist, welche Bedeutung dieser Gelatinase beim Metastasierungsprozess zukommt, soll im folgenden kurz auf deren Charakteristik eingegangen werden.

5.2.1. Matrixmetalloproteinasen unter der besonderen Berücksichtigung der MMP-9

Es wird vermutet, dass MMP-9 als eine wichtige Vertreterin der Gelatinasen eine Rolle bei dem endgültigen Abbau fibrillären Kollagens spielt. MMP-9 wird zunächst von Kollagenasen gespalten und denaturiert. Es konnte gezeigt werden, dass MMP-9 die Kollagene des Typs I, II, und V in das N-terminale nonhelikale Telopeptid spalten kann [Okada et al. 1995]. Andere Untersuchungen über die Substratspezifität der Gelatinasen bewiesen ihre Fähigkeit, Kollagene des Typs IV, V, VII und X sowie Fibronectin und Elastin abzubauen [Murphy et al. 1991, Senior et al. 1991, Matrisian et al. 1992].

Die Gelatinase-B (MMP-9) wird von epithelialen Zellen, vor allem von Keratinozyten, exprimiert und zusätzlich auch in den sekretorischen Granula von Neutrophilen und Eosinophilen gespeichert [Stähle-Bäckdahl et al. 1993]. Die meisten Untersuchungen kamen zu der Aussage, dass die Gelatinasen im maligne veränderten Gewebe exprimiert werden, einige belegten eine Produktion in den Malignomzellen selbst [Matrisian et al. 1992, Stähle-Bäckdahl et al. 1993, Dérrico et al. 1991, Juarez et al. 1993, Shima et al. 1993, David et al. 1994, Höyhtä et al. 1994], der Hauptanteil der Veröffentlichungen konzentrierte sich jedoch auf eine Expression im Stroma [Miyajima et al. 1995, Kawata et al. 2002, Hewitt et al. 1991, Pyke et al. 1992, Newell et al. 1994, Satoh et al. 1994]. So kamen Pyke et al. [Gallegos et al. 1995] zu dem Schluss, in humanen Hautmalignomen werde MMP-9 von Tumorzellen synthetisiert. Viele Untersuchungen belegten für MMP-9, dass eine Expression durch Makrophagen, Neutrophile oder Fibroblasten erfolgte, welche sich in der Umgebung von Tumorzellen befanden [Zeng et al. 1995, Pyke et al. 1993, Nielsen et al. 1996, Segain et al. 1996], wengleich bei immunhistochemischen Untersuchungen auch eine Expression von MMP-9 in Tumorzellnestern selbst aufgezeigt werden konnte [Sugiura et al. 1998]. Jedoch konzentriert sich auch bei diesen

die Expression auf die invasive Front des Malignoms, wo nicht nur die Matrix lysiert wird, sondern dadurch auch Wachstums- und Angiogenesefaktoren frei werden, die zuvor in der Extrazellulärmatrix gebunden waren [Kerkelä et al. 2003]. Diese Interaktion zwischen Tumorgewebe und dem Mikromillieu hebt erneut die Bedeutung von MMP-9 für das maligne Verhalten eines Tumors hervor und zeigt sich auch durch die Zell-MMP-Interaktion zwischen MMP-9 und CD44 [Parks et al. 2001].

Es wäre also ein wissenschaftlicher Fortschritt, MMP-9 in ein Risikoprofil integrieren zu können, welches in der Therapie der Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereiches hilft, das Metastasierungspotential eines Primärtumors mit in die Therapiestrategie einzubeziehen. Interessant sind in dieser Hinsicht vor allem Primärtumoren mit klinisch nicht nachweisbaren Halslymphknotenmetastasen, also einem N0-Stadium. Zum besseren Verständnis soll diese Problematik im folgenden kurz dargestellt werden.

5.3. *Tumorklassifizierung von Plattenepithelkarzinomen im Kopf- Halsbereich und Therapieoptionen des subklinischen Lymphknotenbefalls*

Die Klassifikation von Malignomen und letztendlich auch den Plattenepithelkarzinomen im Kopf- Halsbereich erfolgt nach der TNM-Klassifikation der UICC (International Union against Cancer) [Hermanek et al. 1997] und entscheidet letztendlich mit über ein vorzunehmendes Therapieschema. Diese Klassifikation darf dabei allerdings nicht als alleiniges Entscheidungskriterium angewendet werden, vielmehr sei darauf hingewiesen, dass sich bei der Eingruppierung der Tumoren Überschneidungen ergeben können und individuelle Faktoren stets mitberücksichtigt werden sollten, um eine für den Patienten optimale Therapie zu erreichen.

Allgemein beschreibt die T-Klassifikation die Größe und Ausdehnung des Primärtumors und reicht für Plattenepithelkarzinome im Oropharynxbereich von T1 (≤ 2 cm in größter Ausdehnung) bis T4 (Infiltration von Nachbarstrukturen). Die N-Klassifikation ordnet die Lymphknoten ein und reicht hier von NX (nicht beurteilbar) bzw. N0 (keine

Lymphknotenmetastasen) über N1 (Metastase in ipsilateralem Lymphknoten ≤ 3 cm) bis hin zu N3 (Metastase(n) in Lymphknoten > 6 cm). Der M-Klassifikation entnimmt man das Vorhandensein oder Fehlen von Fernmetastasen.

Diese Klassifizierung soll also als Therapieentscheidungshilfe dienen und evt. auch Vergleiche zwischen unterschiedlichen Therapieoptionen gleich einklassifizierter Tumorpatienten ermöglichen, ist aber in ständiger Überarbeitung und Anpassung.

Ist nun ein Primärtumor zunächst klinisch einklassifiziert, erfolgt das „Staging“ der Lymphknoten, wobei sich im Kopf- Halsbereich die B-Mode-Sonographie, ergänzt durch eine ultrasonographisch geführte Punktionszytologie, als derzeit aussagekräftigstes prätherapeutisches Diagnostikverfahren von Lymphknotenmetastasen erwiesen hat [van den Brekel et al. 1990, van den Brekel et al. 1991, van den Brekel et al. 1993, van den Brekel et al. 1994, van den Brekel et al. 2000]. Dennoch muss für die Ultraschall-diagnostik, deren Aussagekraft zudem deutlich von der Untersuchererfahrung abhängig ist [Werner 2002], erwähnt werden, dass in 20-30% der Fälle Lymphknotenmetastasen histologisch nachgewiesen werden können, die auch der intensiven Bildgebung verborgen geblieben sind [Hosal et al. 2000, van den Brekel et al. 1996, O'Brien et al. 2000]. Diese Situation wird als subklinischer Lymphknotenbefall bezeichnet und beschreibt einen Zustand, in dem ein durch Palpation und Bildgebung einklassifiziert sog. N0-Hals, also ein Hals ohne klinisch nachweisbare Lymphknotenmetastasen, dennoch Mikrometastasen aufweisen kann und wie bereits beschrieben, potentiell zur Fernmetastasierung befähigt.

Für die elektive Therapie dieses subklinischen Lymphknotenbefalls gelten gleichermaßen die chirurgische oder die strahlentherapeutische Therapieoption. Die Entscheidung für die eine oder die andere Therapiealternative richtet sich primär nach der Behandlung des Primärtumors, da die Effektivität der elektiven Strahlentherapie oder alternativ der elektiven Neck-dissection durchaus vergleichbar scheinen [Batani et al. 1993, Rabuzzi et al. 1980].

Die Indikation für eine elektive Neck-dissection wird bisher noch bei einer Wahrscheinlichkeit okkulten Lymphknotenmetastasen von 20% gestellt. Die Diskussion um die Indikationsstellung ist nicht abschließend geklärt, zum besseren Verständnis sollen an dieser Stelle zunächst die prinzipiellen Zielsetzungen einer Neck-dissection kurz dargestellt werden.

Zum einen kann sie das Ziel eines operativen Staging-Verfahrens sein und kommt dann als selektive Neck-dissection (SND) zur Anwendung. Hierbei werden in Abhängigkeit des Primärtumors im Gegensatz zur Radikalen Neck-dissection lediglich bestimmte Lymphknotenengebiete (Level) entfernt, die funktionellen Strukturen, wie der Nervus accessorius, die Vena jugularis interna und der Musculus sternocleidomastoideus bleiben erhalten. Für das Plattenepithelkarzinom im Oropharynxbereich kommt hier also die SND II-IV oder bei Karzinomen der vorderen Mundhöhle die SND I-III zur Anwendung. Die Angaben II-IV bzw. I-III beziehen sich auf die zu entnehmenden Lymphknotenlevel. Beim histologischen Nachweis von Lymphknotenmetastasen kommt in der Mehrzahl der Fälle eine postoperative Strahlentherapie zur Anwendung [Jones et al. 2003].

Zum anderen kann das Ziel der Neck-dissection eine definitive kurative Therapie des zervikalen Lymphabflusses sein. Hierbei kommt häufig eine modifizierte Radikale Neck-dissection angewendet, wobei dann alle Lymphknotenengebiete (Level I-V) aber unter Erhalt der oben angesprochenen funktionellen Strukturen von N. accessorius, M. sternocleidomastoideus und V. jugularis interna erfolgt [Shah et al. 1981, Shestak et al. 1992]. Die selektive Neck-dissection mit kurativer Zielsetzung ist bisher noch im Diskussionsprozeß [Mira et al. 2002, Buckley et al. 2001].

Insgesamt gesehen werden nach Indikationsstellung zur chirurgischen Therapieoption des klinischen N0-Halses immerhin bis zu 70-80% der Patienten unbegründet operiert [Gavilán et al. 1989], was neben den Risiken dieses Operationsverfahrens auch eine Barriere gegen die Krebserkrankung zerstört.

Könnte also ein Risikoprofil entwickelt werden, mit dem sich die Metastasierungswahrscheinlichkeit besser abschätzen lässt, könnte diesem Patientenkollektiv und den auch an Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Halsbereich erkrankten Patienten insgesamt sicherlich weitergeholfen werden. Die Inzidenz okkulten Lymphknotenmetastasen wird immerhin mit Werten zwischen 12 und 50% bei einem Median von 33% angenommen [Hosal et al. 2000, van den Brekel et al. 1996, Teichgraeber et al. 1984].

5.4. *Korrelationen zwischen MMP-9 Produktion und klinischen Parametern in malignen Oropharynx Tumoren*

Vor der anschließenden Diskussion der in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse sollen einige kritische Punkte zur angewendeten Methodik angemerkt werden.

Das Patientenkollektiv entsprach einer repräsentativen Auswahl von Patienten der Universitäts-HNO-Klinik der Philipps-Universität Marburg, die sich einer Operation oder einem invasiv-diagnostischen Verfahren unterzogen haben. Alle von diesen Patienten entnommenen Präparate sind gleichartig einer Paraffin-Einbettung im Institut für Pathologie der Philipps-Universität Marburg zur histologischen Diagnostik und anschließenden Lagerung unterzogen worden. Lediglich die interindividuell unterschiedlichen präoperativen Variablen sowie der relativ kurze Beobachtungszeitraum bzw. Nachbeobachtungszeitraum sprach gegen eine weitere Einteilung in Gruppen, z.B. bezüglich Überlebenszeit, Fernmetastasierung oder des Auftretens eines Zweitkarzinoms.

Bei dem bereits in Abschnitt 3 dieser Arbeit erläuterten und auch etablierten Einsatz von monoklonalen Antikörpern mit großer Spezifität und hoher Empfindlichkeit handelte es sich beim eingesetzten Primärantikörper um monoklonales Maus Immunglobulin G. Die Detektion des Maus IgGs gelang durch den Einsatz eines Sekundärantikörpers aus der Ziege. Dabei sei an dieser Stelle nochmals darauf hingewiesen, dass erste Versuchsreihen mit einem kommerziellen MMP-9 Antikörper der Firma R&D Systems wie bereits beschrieben frustriert verliefen. Auch bei diesem handelte es sich um einen monoklonalen Maus-IgG-Antikörper. Das dann durch einen qualitativen Austausch des

Primärantikörpers erzielte charakteristische Signalmuster ist anschließend visualisiert und in das bekannte Bewertungsschema einklassifiziert worden. Alle Präparate sind zum gleichen Zeitpunkt von derselben Person bewertet worden, klinische Daten, wie die Tumorformel nach dem TNM-System waren zum Bewertungszeitpunkt nicht bekannt. Die Auswertung erfolgte auf der Grundlage von Journal-Nummern, die vom Institut für Pathologie vergeben worden sind und eine eindeutige Identifizierung der einzelnen Präparate zuließen. Allerdings ist die visuelle Methode abhängig von der unterschiedlichen Betrachtungs- und Beurteilungsweise des entsprechenden Untersuchers und kann somit als ungenau kritisiert werden. Auch sind die entsprechenden Tumorpräparate nur Ausschnitte aus einem Malignom und möglicherweise nicht repräsentativ für das gesamte Gewebe und davon sind wiederum nur bestimmte Schnittpräparate angefärbt und ausgewertet worden. Zusätzlich konnte nicht in jedem Fall zwischen dem Tumorzentrum und der invasiven Front des Tumors eine Unterscheidung getroffen werden, dennoch traf die Bewertung insgesamt eine Aussage über die Intensität der mit den detektierten Proteinstrukturen versehen Zellen und des Stromas und erlaubte somit den Vergleich der unterschiedlichen Schnittpräparate miteinander. Zusammenfassend basiert das angewandte Auswertungsschema nur insofern auf objektiv prozentualen Werten, als dass unterschieden worden ist zwischen >50% angefärbter Tumorzell bzw. Stromazellmasse und <50% angefärbter Tumorzell bzw. Stromazellmasse oder gar keine Anfärbung, so dass diese Auswertung insgesamt als subjektiv angenommen werden muss. Weiterhin ist mit der Intensitätsbestimmung des MMP-9 Signals letztendlich nur eine quantitative Aussage über die Expression von MMP-9 Proteinen gemacht worden und nichts über die Aktivität der MMP-9 ausgesagt. Zudem unberücksichtigt blieb die Einbindung eines gleichzeitigen Nachweises von Tissue Inhibitor Matrixmetalloproteinasen (TIMPs). So ist nicht auszuschließen, dass im Falle einer hohen Expression von TIMP-1, TIMP-2 und/oder TIMP-3 eine erhöhte MMP-9 Expression irrelevant bleibt. Zur Beantwortung dieser Fragestellung sind weitere Untersuchungen geplant.

Diese Einschränkungen sollen einer kritischen Ergebnisinterpretation und weiteren bzw. ergänzenden Untersuchungen dienen.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels immunhistochemischer Färbemethode ein Nachweis für die quantitative MMP-9 Expression am Paraffinmaterial von 105 Patienten mit Oropharynxkarzinomen vorgenommen. Die Signalintensität der gefärbten Schnittpräparate ist dann in einen bereits beschriebenen Intensitätsscore eingeteilt worden. Insgesamt zeigten nahezu alle untersuchten Tumoren eine mehr oder weniger starke MMP-9 Expression im Tumor- und/oder Stromagewebe, wohingegen die MMP-9 Expression in mitgeführtem Tonsillenepithel vergleichsweise schwach bis nicht vorhanden ausfiel.

Die Ergebnisse der Dissertationsschrift decken sich mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen. So zeigten zunächst die Arbeitsgruppen um Juarez 1993 und Kumagai 1994 eine MMP-9 Produktion bei Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle [Juarez et al. 1993, Kumagai et al. 1994]. Desweiteren sind dann auch von anderen Autoren ähnliche Resultate bestätigt worden. So ist die besondere Rolle der Gelatinasen A (MMP-2) und B (MMP-9) bei Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle dokumentiert [Sutinen et al. 1998, Arenas-Huertero et al. 1999, Ikebe et al. 1999, Kurahara et al. 1999, Pickett et al. 1999, Hong et al. 2000] und wiederholt die erhöhte Expression der Gelatinasen als Subfamilie der MMPs im Kopf- und Halsbereich beobachtet worden. Verschiedenste Arbeitsgruppen haben Plattenepithelkarzinome der oberen Luft- und Speisewege [Charous et al. 1997, Heissenberg et al. 1998, Burian et al. 1999, Schmidt et al. 1999, Magary et al. 2000, O-Charoenrat et al. 2001, Yorioka et al. 2002] und des Ösophagus [Ohashi et al. 2000, Murray et al. 1998, Samantaray et al. 2004] untersucht und haben vergleichbaren Ergebnissen publiziert.

Auch außerhalb des Kopf- und Halsbereiches konnte eine erhöhte MMP-Expression und hier v.a. der Gelatinasen A und B bei Plattenepithelkarzinomen gefunden werden. Bei Karzinomen der Haut [Kobayashi et al. 1996] und der Lunge [Nakagawa et al. 1994, González-Avila et al. 1998] ebenso wie des Uterus [Davidson et al. 1996] ist erhöhte MMP-2 und MMP-9 Sezernierung in der aktuellen Literatur zu finden.

Doch nicht nur die Überexpression von MMP-9 bei Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx gegenüber normalem Epithel ist in vorliegender Arbeit als Resultat festzu-

halten, sondern auch, dass bereits lymphogen metastasierte Karzinome eine deutlich intensivere immunhistochemische Anfärbung und somit MMP-9 Expression bieten als weniger aggressive Phänotypen, die noch keine Metastasierung gezeigt haben. Diese Beobachtung scheint möglicherweise ein Indiz für die Involvierung der Gelatinase B (MMP-9) in den Metastasierungsprozeß bei Plattenepithelkarzinomen zumindest des Oropharynx zu sein. Neben der signifikanten Korrelation zwischen Höhe der Expression von MMP-9 und dem N-Stadium besteht eine signifikante Korrelation bezüglich des UICC-Stadiums. Dies ist nicht verwunderlich, da diese internationale Klassifikation im wesentlichen auf dem N-Status des Patienten beruht. Wohingegen keine signifikante Korrelation mit dem Differenzierungsgrad des Tumors und dem MMP-9 Expressionslevel besteht.

Insgesamt scheint die Gelatinase B (MMP-9) eine weiter zu spezifizierende Rolle im Metastasierungsprozeß von Oropharynxtumoren zuzukommen, denn statistische Korrelationen mit sowohl dem N-Stadium und dem UICC-Stadium, als auch dem T-Stadium des jeweiligen Patienten deuten einen Einfluss dieses Enzyms auf das Metastasierungsverhalten an. Dennoch sei an dieser Stelle nochmals darauf hingewiesen, dass trotzdem mit der angewandten Methode Schnittpräparate aus Paraffinmaterial verwendet wurden und damit weitestgehend in-vivo-Bedingungen geherrscht haben, keine Gelatinase B-Aktivität, sondern quantitative Expressionen nachgewiesen worden sind und zudem keine Untersuchungen zur TIMP-Aktivität vorgenommen wurden. Die Klärung eines möglichen Zusammenhanges zwischen TIMP und MMP-9 Expression wird Aufgabe einer weiteren Dissertationsschrift sein.

Die Literatur zeigt bezüglich der vorgenannten Beobachtungen nahezu übereinstimmende Ergebnisse hinsichtlich des Expressionsverhalten der Gelatinase B in Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx. So zeigten Ikebe et al. 1999 [Ikebe et al. 1999] mittels Zymographie signifikant höhere Enzymaktivitäten der Gelatinasen A und B und erweiterten diese Untersuchungen um immunhistochemische Methoden und Westernblot-Hybridisierungen mit der Schlussfolgerung, dass die Gelatinasen A (MMP-2) und B (MMP-9) an der Invasivität der untersuchten 57 oralen Plattenepithelkarzinome maßgeblich beteiligt seien.

Murray et al. dokumentierten ein Jahr zuvor [Murray et al. 1998] an 46 Ösophaguskarzinomen immunhistochemisch eine erhöhte MMP-9 Expression in 70% der Fälle, hatten aber auch zusätzlich zu den Plattenepithelkarzinomen Adenokarzinome in ihre Untersuchungen eingeschlossen. Prognostische Signifikanzen bezüglich der MMP-9 Expression ließen sich in dieser Arbeit nicht herstellen.

Juarez et al. [Juarez et al. 1993] haben 2 aus oralen Plattenepithelkarzinomen kultivierte Zelllinien zymographisch untersucht und fanden auch hier für MMP-9 eine herausragende Bedeutung hinsichtlich der Tumoraggressivität, wohingegen Kusakawa et al. [Kusakawa et al. 1992] ein Jahr zuvor der anderen Gelatinase MMP-2 eine bedeutendere Rolle zusprachen. So zeigten sich hier bei 77% der Patienten mit Lymphknotenbeteiligung eine starke MMP-2 Expression und nur 25% der Patienten ohne nodale Metastasierung ließen eine Expression von MMP-2 erkennen.

Auch Sutinen et al. [Sutinen et al. 1998] haben in ihrer Arbeit 1998 auf die klare Überexpression verschiedenster MMPs in invasiven Plattenepithelkarzinomen hingewiesen, die aber teilweise auch bei Lichen ruber planus oder epithelialen Dysplasien vorkam. Über Korrelationen zwischen der MMP-9 Überexpression und Lymphknotenbeteiligung sind in dieser Arbeit keine signifikanten Resultate veröffentlicht.

Derartige statistisch signifikante Korrelationen sind aber von der Arbeitsgruppe um Kurahara 1999 [Kurahara et al. 1999] beschrieben, die neben den Gelatinasen A und B auch eine erhöhte Expression der MMP-1 bei invasiven Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle gefunden haben. Weiterhin ist hier auch eine signifikante Überexpression der TIMP-1, also eines MMP-Inhibitors bei metastasierten Fällen aufgefallen. Dabei ist darauf hingewiesen, dass in diesem Konzept Überlegungen bezüglich des Verhältnisses Überexpression der MMPs versus Überexpression der natürlichen Inhibitoren der TIMPs angestellt worden sind und die Überexpression verschiedener MMPs für die Degradation der Extrazellulärmatrix wichtiger zu sein scheint als nur die Erhöhung einer TIMP im Gegensatz dazu. Dieser Aspekt des Ungleichgewichtes im MMP/TIMP-Verhältnis ist in vielen weiteren Veröffentlichungen untersucht worden und so scheint

auch das Ungleichgewicht der MMPs und ihrer natürlichen Inhibitoren Einfluss auf die Malignität eines Tumors zu haben und könnte prognostische Relevanz bekommen.

Die besondere Stellung der Gelatinasen und hier v.a. der MMP-9 im Invasionsprozess von Oropharynxmalignomen ist nicht zuletzt in der Arbeit von Hong et al. [Hong et al. 2000] publiziert worden, die eine Überexpression beider Gelatinasen beobachten konnten. Aber die gewichtigere Rolle im Metastasierungsprozess haben sie der MMP-9 zugeschrieben und auf ein mögliches Markerpotential dieser MMP hingewiesen.

Durch immunhistochemische Färbungen an 39 Hypopharynxkarzinomen haben 1998 Heissenberg et al. [Heissenberg et al. 1998] nachgewiesen, dass MMP-1 aber v.a. MMP-9 die häufigsten MMPs für diese Tumorentität waren und eine erhöhte MMP-9 Expression zudem bei rekurreierenden Erkrankungen deutlich war. Diese Ergebnisse sind für Oropharynxmalignome bereits 1994 von Kumagai et al. [Kumagai et al. 1994] publiziert und besonders bei invasiven Karzinomen mit Lymphknotenmetastasen ist deren Überexpression deutlich gemacht worden.

Ein besonders enger Zusammenhang zwischen der MMP-9 Expression und der T- bzw. N-Klassifikation und die sich daraus ergebende Schlüsselrolle für diese Proteinase für die Metastasierung von Kopf- und Halskarzinome ist 2001 noch einmal von O-Charoenrat und Mitarbeiter [O-Charoenrat et al. 2001] gezeigt worden, die die Analyse insbesondere von MMP-9 als nützlich für die Einschätzung des malignen Potentials von Kopf- und Halstumoren ansehen.

Diese Beobachtungen sind auch in vorliegender Arbeit gemacht worden, wo eine erhöhte MMP-9 Expression statistisch signifikant mit dem T-Stadium, dem N- und dem UICC-Stadium korreliert. Es gibt sogar Publikationen, wie die von Arenas-Huertero et al. [Arenas-Huertero et al. 1999] von 1999, die sich die MMP-9 Aktivität zur therapeutischen Kontrolle bei Oropharynxtumoren nutzbar machen, indem sie eine niedrige Aktivität mit dem ansprechen auf die Therapie und eine Aktivitätserhöhung mit einer zunehmenden Tumoraggressivität bzw. einem Rezidiv überwacht haben.

5.5. *Ausblick auf die prognostische Eignung und therapeutische Ansätze von MMPs*

In diesem Abschnitt soll ein kurzer Überblick über die aktuelle Studienlage hinsichtlich der prognostischen Eignung und den sich daraus ergebenden diagnostischen und therapeutischen Konsequenzen von MMP-9 gegeben werden.

5.5.1. *Prognostische Eignung von MMP-9*

Die Übertragung der in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse auf den klinischen Alltag ist momentan sicher noch zu früh. Dies liegt weniger an den bisher publizierten Daten, als vielmehr an dem Fehlen eines allgemeingültigen Bewertungssystems des Expressionsverhaltens. Hier verwendet jede Arbeitsgruppe ihr eigenes System, was eine valide Einschätzung der Datenlage erheblich erschwert. Kritisch gesehen, müssen daher alle, auch die Ergebnisse der vorliegenden Dissertationsschrift, unter Vorbehalt betrachtet werden und inwieweit eine Vergleichbarkeit publizierter Daten gegeben ist, ist eher fraglich. Nichtsdestotrotz soll an dieser Stelle auf die mögliche Potenz des MMP-9 Nachweises eingegangen werden und aufzeigen, welche therapeutischen Ansätze bereits heute gesehen werden. Unzweifelhaft ist eine Standardisierung der Untersuchungsmethoden unabdingbare Voraussetzung für eine Implementierung eines MMP-Nachweises in den klinischen Alltag. Aber auch im Hinblick auf die wissenschaftliche Verwertbarkeit ist dies eine der vordringlichsten Aufgaben der Zukunft.

Der immunhistochemische Nachweis der Expressionslevel von MMPs und TIMPs in Plattenepithelkarzinomebiopsaten könnte eine präoperative diagnostische Bedeutung zukommen. So könnte gerade im Falle eines klinischen N0-Halses die Gewinnung von Untersuchungsmaterial auf minimal-invasive Verfahren beschränkt bleiben und im Falle einer Eignung eines MMP-Expressionsprofils die Entscheidung zu einem eher Abwartenden Verhalten oder einer therapeutischen Neck dissection erleichtert werden.

Eine weitere diagnostische Möglichkeit ist die Messung von MMP-Aktivitäten bzw. die quantitative MMP-Messung im Patientenserum. Möglicherweise ist auch dies eine wenig invasive Methode mit der Möglichkeit, die Tumoraggressivität abzuschätzen. Für MMP-9 ist dieses Verfahren bei Plattenepithelkarzinomen der Lunge [Izasa et al. 1999] und für das hepatozelluläre Karzinom beim Menschen berichtet worden [Hayasaka et al. 1996]. Bei Karzinomen des Kopf- und Halsbereiches ist in dieser Hinsicht widersprüchliches in der Literatur publiziert und wird sicher in den nächsten Jahren erst endgültig, wenn überhaupt, hinsichtlich seiner Wertigkeit abschätzbar sein. Riedel et al. haben 2000 [Riedel et al. 2000] gezeigt, dass in ihrer Untersuchung erhöhte MMP-9-Serumlevel mit Karzinomen in einem fortgeschrittenen Stadium gegenüber geringinvasiven Malignomen korrelierten. Ranuncolo et al. [Ranuncolo et al. 2002] haben in ihrer Arbeit aus 2002 zwar erhöhte Serumlevel an MMP-9 bei Oropharynxkarzinomen finden, jedoch keine Korrelationen zu klinischen Parametern eruieren können.

Eine ebenfalls minimal-invasive Form, MMPs als Marker für pathologische Parameter maligner Tumoren nutzbar zu machen, wurde beschrieben, indem MMP-9 durch Blasenpülungen bei Patienten mit Blasenkarzinomen nachgewiesen wurde [Bianco et al. 1998]. Auch wurde versucht, MMP-9 im Urin von Tumorpatienten nachzuweisen [Moses et al. 1998, Özdemir et al. 1999], um auch hier mit vielversprechendem Ergebnis Malignitätsgrade von Tumoren einschätzen zu können.

Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse zu dieser Thematik scheint es noch weiterer Untersuchungen zu bedürfen, um diese minimal- bis gar nicht-invasiven Diagnosemethoden klinisch zu etablieren.

5.5.2. Moderne Therapieansätze von Malignomen mittels MMP-Hemmung

Die Bedeutung der Gelatinasen MMP-2 und -9 für das metastatische Verhalten von Malignomen wurde tierexperimentell insbesondere von Itoh [Itoh et al. 1998, Itoh et al. 1999] hervorgehoben. Er wies durch ein Tiermodell an MMP-2- und MMP-9-defizient Mäusen nach, dass die Tumorprogression, die Metastasierungsrate und letztlich auch

die Angiogenese nach Implantation von Tumoren in diesen Mäusen gegenüber einer Kontrollgruppe reduziert waren. Diese Resultate unterstreichen die Wichtigkeit der beiden Gelatinasen für die Metastasierung und implizieren gleichzeitig, dass die Inhibierung von MMPs einen neuen und nützlichen Weg darstellen könnte, die Metastasierung maligner Tumoren zu beeinflussen. Diese Aufgabe übernehmen physiologischerweise z.T. die TIMP-1, -2, -3 oder -4 [Chambers et al. 1997].

Man hat sich diese Beobachtungen zu Nutze gemacht, indem versucht wurde, mittels synthetisch hergestellter TIMPs die Tumorprogression zu inhibieren. Damit würde das Tumorwachstum v.a. dadurch verlangsamt, dass die Angiogenese des Tumors inhibiert, Apoptose der Tumorzellen induziert und letztendlich eine fibrotische Kapsel um den Tumor entstehen kann, ohne durch MMPs lysiert zu werden. Einer der ersten Inhibitoren ist das Batimastat (BB-94) und sein Analogon das Marimastat (BB-2516), synthetische MMP-Inhibitoren, die durch Chelatbildung das für die MMP-Funktion notwendigen Metallionen binden und so die Exposition der katalytischen Domäne verhindern können [Brown 1997]. Der inhibitorische Effekt von BB-94 wurde sowohl in vitro [Davies et al. 1993, Wang et al. 1994, Sledge et al. 1995] als auch in vivo [Chirivi et al. 1994, Watson et al. 1995, Aparicio et al. 1999, Eccles et al. 1996, Prontera et al. 1999] bewiesen. So reduzierte BB-94 das Wachstum und die Metastasierung von Melanomen [Chirivi et al. 1994], Kolon- [Watson et al. 1995, Aparicio et al. 1999], Mamma- [Eccles et al. 1996] und Lungenkarzinomzellen [Prontera et al. 1999]. Die Arbeitsgruppe um Zervos bestätigte die oben erwähnten Ergebnisse bezüglich Pankreaskarzinomen [Haq et al. 2000]. Neben positiven Effekten hinsichtlich des invasiven und metastatischen Verhaltens der malignen Tumoren ist gleichsam eine Verlängerung der Überlebenszeit gezeigt worden. Dagegen sind aktuellste klinische Phase III-Studien mit den oben genannten Marimastat und Batimastat allein oder in Kombination mit Chemotherapie bei fortgeschrittenen Tumoren enttäuschend verlaufen, was mit der schon fortgeschrittenen Tumorprogression in Zusammenhang zu bringen sein muss. Weitere Studien konzentrieren sich nun auf den Einsatz dieser Medikamente in früheren Tumorstadien, evt. sogar mit der Messung des MMP-Serumlevels, um ein Ansprechen der Therapie zu dokumentieren [Zucker et al. 2000]. Neben BB-94 existieren eine Reihe anderer MMP-Inhibitoren, die sich ebenfalls schon in klinischen Versuchsreihen befinden. Erst in den

letzten Jahren sind selektive MMP-Inhibitoren erforscht worden, die nur bestimmte Subtypen aus der MMP-Familie inhibieren können [Stetler-Stevenson et al. 2001, McCawley et al. 2000, Vihinen et al. 2002], teilweise sind die Ergebnisse relativ vielversprechend [Brown 1997]. Erste Versuche mit den synthetischen MMP-Inhibitoren BAY 12-9566 oder AG 3340 sind gemacht, die über verbesserte orale Bioverfügbarkeit und pharmakologische Spezifität verfügten, doch auch hier müssen die Ergebnisse abgewartet werden [Moore et al. 2000]. Auch kam das Neovastat (AE-941) zum Einsatz zusammen mit Retinoiden, Tetrazyklinderivaten und Biphosphonaten [Hidalgo et al. 2001]. Die Ergebnisse dazu müssen abgewartet werden. Insgesamt ist die Erforschung weiterer synthetischer MMP-Inhibitoren eine Herausforderung und Thema interessanter Diskussionen in der aktuellen Literatur [Zucker et al. 2000, Rudek et al. 2002].

Eine andere Form der MMP-Inhibition wurde mit Hilfe eines Calciuminflux-Inhibitors gemacht, der den intrazellulären Kalziumspiegel aus dem Gleichgewicht bringt, die MMP-2 und -9 Produktion reduziert und gleichzeitig die Zellproliferation und -migration stört [Wu et al. 1997]. Dieses Therapieregime ist von Wu et al. bisher nur in vitro getestet, in vivo-Versuche stehen aus. Desweiteren gibt es in der Literatur einen weiteren Ansatz über die Blockierung des Protein-Kinase-C-Signalweges, über den MMP-9 Effekte in die Zelle transduziert werden [Tsai et al. 2003].

Alle genannten Versuche bieten erste Ansätze für eine interessante und moderne Art der Therapie maligner Tumoren durch Inhibierung von MMPs und somit Verringerung der Metastasierungsfrequenz. Allerdings ist das MMP-System sehr komplex und noch nicht endgültig verstanden, so dass es weiterer Forschung bedarf, um hier wirklich Klarheit zu erlangen. Ob und in wieweit dann synthetische MMP-Inhibitoren klinische Etablierung in der Behandlung von Malignomen einnehmen und wie die Therapieform aussehen könnte, bedarf weiterer Untersuchungen.

6. Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome gehören zu den häufigsten malignen Tumoren im Kopf- Halsbereich. Sie sind im allgemeinen chirurgisch oder alternativ auch strahlentherapeutisch vollständig zu therapieren, ihre z.T. schlechte Prognose wird von Faktoren, wie dem Ausmaß der Tumorinvasion, der Metastasierung in die regionären Lymphknoten und dem Vorkommen von Fernmetastasen bestimmt. Bei der Invasion müssen die malignen Zellen Makromoleküle der extrazellären Matrix und der Basalmembranen auflösen. Diese proteolytische Aktivität wird hauptsächlich von Matrix Metalloproteinasen (MMPs) hervorgerufen, die befähigt sind, nahezu alle Komponenten der Extrazellulärmatrix und der Basalmembranen abzubauen. MMPs haben auch eine physiologische Bedeutung inne und kommen besonders in Situationen vor, in denen ein rascher Umbau der Extrazellulärmatrix gefordert wird, wie beispielsweise der Embryogenese. Diese Umbauvorgänge sind dadurch gekennzeichnet, dass sie streng reguliert sind und mit Beseitigung der Stimuli sistieren. Ein Hauptinteresse an den MMPs liegt an der Rolle, die sie beim invasiven und metastatischen Verhalten maligner Neoplasien spielen. In Malignomen werden verschiedene MMPs von Tumorzellen und/oder Zellen des umgebenden Stromas, besonders in der invasiven Front, sezerniert.

Es sind derzeit über 20 verschiedene MMPs bekannt, die nach strukturellen Gesichtspunkten 5 Untergruppen (Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine / stromelysinähnliche MMPs, membrangebundene und neue MMPs) zugeordnet werden. Zur Familie der MMPs zählt man weiterhin 4 Gewebehemmer (TIMPs), die als negative Regulatoren des Abbauprozesses der Extrazellulärmatrix fungieren.

In der vorliegenden Untersuchung wurde das Expressionsmuster von MMP-9 per Immunhistochemischer Färbemethode anhand von 105 Plattenepithelkarzinombiopsaten des Oropharynx untersucht. Dabei zeigte sich gegenüber dem gesunden Gewebe eine deutliche Überexpression von MMP-9 in den malignen Schnittpräparaten. Ebenso ließ sich erkennen, dass die Expression von MMP-9 mit den besonders aggressiven Phenotypen von Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx assoziiert war. So konnten Korrelationen zwischen der MMP-Synthese und klinischen Parametern wie

dem T-Stadium ($p < 0.05$) sowie der regionären Lymphknotenmetastasierung (N-Stadium, $p < 0.01$) und des UICC-Stadiums ($p < 0.01$) gefunden werden. Eine deutlich geringere Korrelation bestand zwischen dem Grading des Tumors und der MMP-9 Expression.

Die Resultate der vorliegenden Dissertationsschrift geben einen Hinweis darauf, dass MMP-9 eine Rolle beim Metastasierungsverhalten von Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx zukommt. Nicht zuletzt aufgrund ihrer Fähigkeit, Typ-IV-Kollagen und andere Hauptbestandteile der Extrazellulärmatrix und der Basalmembranen zu zerstören, ist eine Modulatorfunktion von MMP-9 für das maligne Verhalten von Karzinomen des Kopf- und Halsbereiches denkbar.

In der vorliegenden Dissertationsschrift unberücksichtigt blieb die Expression natürlicher TIMPs, die z.T. die MMP-Aktivität inhibieren. Diese Untersuchungen müssen in der Zukunft zeigen, inwieweit eine zusätzliche Expression von TIMPs eine Überexpression von MMP-9 hinsichtlich des lymphogenen Metastisierungspotentials beeinflusst. Festzuhalten bleibt jedoch, dass, basierend auf den Ergebnissen dieser Dissertation, der Expression von MMP-9 in Oropharynxkarzinomen eine Rolle beim Metastisierungsprozeß zukommt.

Aufgabe der unmittelbaren Zukunft wird, bei aller Diskussion der Implementierbarkeit von molekularen Markern in die klinische Routine, jedoch zunächst die Schaffung eines allgemein anerkannten Auswertungsscores der immunhistochemischen Färbungen sein. Erst eine standardisierte Beurteilung wird eine valide Ergebnisbewertung und internationale Vergleichbarkeit publizierter Daten erlauben.

Daraus ließen sich prognostische Konsequenzen und diagnostische Möglichkeiten als Hilfestellung für den behandelnden Arzt ableiten. Mit Hilfe der Analyse des Expressionslevels von MMP-9 integriert in ein Risikoprofil vieler anderer tumorbiologischer Marker könnte es möglich sein, die Aggressivität und das klinische Verhalten eines Karzinoms besser einzuordnen und somit therapeutische Konsequenzen daraus zu ziehen. Analog zu den TIMPs wurden mittlerweile synthetische Inhibitoren der MMPs

entwickelt, die auf dem gleichen Prinzip wie die Inhibition durch die natürlich vorkommenden TIMPs basieren. Mit diesen war es im Tierversuch zunächst möglich, das invasive und metastatische Verhalten maligner Tumoren einzudämmen und die Überlebensrate zu erhöhen. Weitere Versuchsreihen haben sich als wenig hilfreich erwiesen. Ob sich diese Verfahren durchsetzen und der Diagnostik und Therapie von Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereiches eine moderne therapeutische Variante hinzugefügt werden kann, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

7. Literaturverzeichnis

A

Aparicio T, Kermorgant S, Dessirier V, Lewin MJ, Lehy T (1999): Matrix metalloproteinase inhibition prevents colon cancer peritoneal carcinomatosis development and prolongs survival in rats. *Carcinogenesis* 20: 1445-1451

Arenas-Huertero FJ, Herrera-Goepfert R, Delgado-Chavez R, Zinser-Sierra JW, De la Garza-Salazar JG, Herrera-Gomez A, Perez-Cardenas E (1999): Matrix metalloproteinases expressed in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlation with neo-adjuvant chemotherapy response. *J Exp Clin Cancer Res* 18: 279-284

B

Bataini JP (1993): Radiotherapy in N0 head and neck cancer patients. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 250: 442-445

Bäumken J, Lippert BM, Schulz HG, Folz BJ, Seiwerts M, Weber E, Werner JA (1998): MMP and TIMP mRNA expression in head and neck squamous cell carcinomas: a tentative correlation with metastatic potential. *Br J Cancer* 77 (Suppl. 1): 51

Bianco FJ Jr, Gervasi DC, Tiguert R, Grignon DJ, Pontes JE, Crissman JD, Fridman R, Wood DP Jr (1998): Matrix metalloproteinase-9 expression in bladder washes from bladder cancer patients predicts pathological stage and grade. *Clin Cancer Res* 4: 3011-3016

Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK (1993): Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 4: 197-250

Black RJ, Bray F, Ferlay J, Parkin DM (1997): Cancer incidence and mortality in the European Union: cancer registry data and estimates of national incidence for 1990. *Eur J Cancer* 33: 1075-1107

Bosch FX, Schuhmann A, Kartenbeck J (2001): On the role of cell-cell adhesion in metastasis formation in head and neck cancer. In: Lippert BM, Werner JA (eds) *Metastasis in Head and Neck cancer*. Tectum, Marburg, 79-86

Bramhall SR, Neoptolemos JP, Stamp GWH., Lemoine NR (1997): Imbalance of expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of the matrix metalloproteinases (TIMPs) in human pancreatic carcinoma. *J Pathol* 182: 347-355

Brown PD (1997): Matrix Metalloproteinase inhibitors in the treatment of cancer. *Med Oncol* 14: 1-10

Buckley JG, Feber T (2001): Surgical treatment of cervical node metastases from squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: evaluation of the evidence for modifications of neck dissection. *Head Neck* 23: 907-915

Burian M, Quint C, Neuchrist C (1999): Angiogenic factors in laryngeal carcinoma: do they have prognostic relevance? *Acta Otolaryngol.* 119: 289-292

C

Chambers AF, Matrisian LM (1997): Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 89: 1260-1270

Charous SJ, Stricklin GP, Nanney LB, Netterville JL, Burkey BB (1997): Expression of metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 106: 271-278

Chirivi RG, Garofalo A, Crimmin MJ, Bawden LJ, Stoppacciaro A, Brown PD, Giavazzi R (1994): Inhibition of the metastatic spread and growth of B16-BL6 murine melanoma by a synthetic matrix metalloproteinase inhibitor. *Int J Cancer* 58: 460-464

D

David L, Nesland J, Holm R, Sobrinho-Simoes M (1994): Expression of laminin, collagen IV, fibronectin, and type IV collagenase in gastric carcinoma. An immunohistochemical study of 87 patients. *Cancer* 73: 518-527

Davidson B, Goldberg I, Kopolovic J, Lerner-Geva L, Gotlieb WH, Weis B, Ben-Baruch G, Reich R (1999): MMP-2 and TIMP-2 Expression correlates with poor prognosis in cervical carcinoma – a clinicopathologic study using immunohistochemistry and mRNA *in situ* hybridization. *Gynecol Oncol* 73: 372-382

Davies B, Brown PD, East N, Crimmin MJ, Balkwill FR (1993): A synthetic matrix metalloproteinase inhibitor decreases tumor burden and prolongs survival of mice bearing human ovarian carcinoma xenografts. *Cancer Res* 53: 2087-2091

Dérrico A, Garbisa S, Liotta L, Astronovo V, Stetler-Stevenson WG, Grigioni W (1991): Augmentation of type IV collagenase, laminin receptor, and Ki67 proliferation antigen associated with human colon, gastric and breast carcinoma progression. *Mod Pathol* 4: 239-246

E

Easty DM, Easty GC (1982): Establishment of an *in vitro* cell line from the rabbit VX2-carcinoma. *Virchows Arch B (Cell Pathol)* 39: 333-337

Eccles SA, Box GM, Court WJ, Bone EA, Thomas W, Brown PD (1996): Control of lymphatic and hematogenous metastasis of a rat mammary carcinoma by the matrix metalloproteinase inhibitor batimastat (BB-94). *Cancer Res* 56: 2815-2822

F

Falkenberg S, Rathcke IO, Lippert BM et al. (1999): Expression of MMP-2,-7,-9, and -13 as well as TIMP-1,-2, and -3 in squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Cancer Res Clin Oncol* 125: 122

Fidler IJ, Kripke ML (1977): Metastasis results from pre-existing variant cells within a malignant tumor. *Science* 197: 893

Folkman J (1995): Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med* 1: 27-31

Franci A, Santucci M, Masini E, Sardi I, Paglierani M, Gallo O (2002): Expression of matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 in carcinoma of the head and neck. *Cancer* 1, 95 (9): 1902-1910

G

Gallegos NC, Smales C, Savage FJ, Hembry RM, Boulos PB (1995): The distribution of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in colorectal cancer. *Surg Oncol* 4: 21-29

Garbett EA, Reed MW, Brown NJ (1999): Proteolysis in human breast and colorectal cancer. *Br J Cancer* 81: 287-293

Gavilán C, Gavilán J (1989): Five-year results of functional neck dissection for cancer of the larynx. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 115: 1193-1196

Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP (1997): Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 74(2): 111-122

González-Avila G, Iturría C, Vadillo F, Terán L, Selman M, Pérez-Tamayo R (1998): 72-kD (MMP-2) and 92-kD (MMP-9) type IV collagenase production and activity in different histologic types of lung cancer cells. *Pathobiology* 66: 5-15

Grandner D (1998): How do mutated oncogenes and tumor suppressor genes cause cancer? *Med Oncol* 15: 20-26

H

Haq M, Shafii A, Zervos EE, Rosemurgy AS (2000): Addition of matrix metalloproteinase inhibition to conventional cytotoxic therapy reduces tumor implantation and prolongs survival in a murine model of human pancreatic cancer. *Cancer Res* 60: 3207-3211

Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, Uchijima E, Iwata K (1992): Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. *FEBS Lett* 298(1): 29-32

Hayasaka A, Suzuki N, Fujimoto N, Iwama S, Fukuyama E, Kanda Y, Saisho H (1996): Elevated plasma levels of matrix metalloproteinase-9 (92 kd type IV collagenase / gelatinase B) in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 24: 1058-1062

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

Herbst RS, Yano S, Kuniyasu H, Khuri FR, Bucana CD, Guo F, Liu D, Kemp B, Lee JJ, Hong WK, Fidler IJ (2000): Differential expression of E-cadherin and type IV collagenase genes predicts outcome in patients with stage I non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 6: 790-797

Hermanek P, Hutter RVP, Sobin LH, Wagner G, Wittekind C (1997): TNM-Atlas. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo, 1-64

Hewitt RE, Leach IH, Powe DG, Clarke IM, Cawston TE, Turner DR (1991): Distribution of collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP) in colorectal tumours. *Int J Cancer* 49: 666-672

Hidalgo M, Eckhardt SG (2001): Matrix metalloproteinase inhibitors: how can we optimize their development? *Ann Oncol* 12: 285-228

Himmelstein BP, Canete-Soler R, Bernhard EJ, Muschel RJ (1994): Induction of fibroblast 92 kDa gelatinase/type IV collagenase expression by direct contact with metastatic tumor cells. *J Cell Sci* 107: 477-486

Hong SD, Hong SP, Lee JI, Lim CY (2000): Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oral squamous cell carcinomas with regard to the metastatic potential. *Oral Oncol* 36: 207-213

Hosal AS, Carrau RL, Johnson JT, Myers EN (2000): Selective neck dissection in the management of the clinically node-negative neck. *Laryngoscope* 110: 2037-2040

Höyhtä M, Fridman R, Komarek D, Porter-Jordan K, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Liang CM (1994): Immunohistochemical localization of matrix metalloproteinase-2 and its specific inhibitor TIMP-2 in neoplastic tissues with monoclonal antibodies. *Int J Cancer* 56: 500-505

Huebner RJ, Todaro GJ (1969): Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 64: 1087-1094

Hunter T (1991): Cooperation between oncogenes. *Cell* 64: 249-270

I

Iizasa T, Fujisawa T, Suzuki M, Motohashi S, Yasufuku K, Yasukawa T, Baba M, Shiba M (1998): Elevated levels of circulating plasma matrix metalloproteinase 9 in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 5(1): 149-153

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

Ikebe T, Takeuchi H, Jimi E, Beppu M, Shinohara M, Shirasuna K (1998): Involvement of proteasomes in migration and matrix metalloproteinase-9 production of oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 77(4): 578-85

Imai K, Yokohama Y, Nakanishi I, Ohuchi E, Fujii Y, Nakai N, Okada Y (1995): Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) from human rectal carcinoma cells. Activation of the precursor, interaction with other matrix metalloproteinases and enzymic properties. *J Biol Chem* 270(12): 6691-6697

Itoh T, Tanioka M, Matsuda H, Nishimoto H, Yoshioka T, Suzuki R, Uehira M (1999): Experimental metastasis is suppressed in MMP-9-deficient mice. *Clin Exp Metastasis* 17: 177-181

Izasa T, Fujisawa T, Suzuki M, Motohashi S, Yasufuku K, Yasukawa T, Baba M, Shiba M (1999): Elevated levels of circulating plasma matrix metalloproteinase 9 in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 5: 149-153

J

Johansson N, Airola K, Grenman R, Kariniemi AL, Saarialho-Kere U, Kahari VM (1997) Expression of collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Am J Pathol* 151(2): 499-508

Jones AS, Fenton JE, Husband DJ (2003): The treatment of squamous cell carcinoma of the tonsil with neck node metastases. *Head Neck* 25: 24-31

Juarez J, Clayman G, Nakajima M, Kenneth KT, Hideyuki S, Gart LN (1993): Role and regulation of expression of 92-kDa type IV collagenase (MMP-9) in 2 invasive squamous-cell-carcinoma cell lines of the oral cavity. *Int J Cancer* 55: 10-18

K

Kahari VM, Saarialh-Kere U (1999): Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumor growth and invasion. *Ann Med* 31: 34-45

Kanayama H (2001): Matrix metalloproteinases and bladder cancer. *J Med Invest* 48: 31-43

Kanayama H, Yokota K, Kurokawa Y, Murakami Y, Nishitani M, Kagawa S (1998): Prognostic values of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in bladder cancer. *Cancer* 82: 1359-1366

Kawano N, Osawa H, Ito T, Nagashima Y, Hirahara F, Inayama Y, Nakatani Y, Kimura S, Kitajima H, Koshikawa N, Miyazaki K, Kitamura H (1997): Expression of gelatinase A, tissue inhibitor of metalloproteinases-2, matrilysin and trypsin(ogen) in lung neoplasms; an immunohistochemical study. *Hum Pathol* 28: 613-622

Kawata R, Shimada T, Maruyama S, Hisa Y, Takenaka H, Murakami Y (2002): Enhanced production of matrix metalloproteinase-2 in human head and neck carcinomas is correlated with lymph node metastasis. *Acta Otolaryngol* 122: 101-106

Kerkelä E, Saarialho-Kere U (2003): Matrix Metalloproteinases in tumor progression: Focus on basal and squamous cell skin cancer. *Exp Dermatol* (12): 109-125

Kobayashi T, Onoda N, Takagi T, Hori H, Hattori S, Nagai Y, Tajima S, Nishikawa T (1996): Immunolocalizations of human gelatinase (type IV collagenase, MMP-9) and TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) in normal epidermis and some epidermal tumors. *Arch Dermatol Res* 288: 239-244

Koong AC, Denko NC, Hudson KM, Schindler C, Swiersz L, Koch C, Evans S, Ibrahim H, Le QT, Terris DJ, Giaccia AJ (2000): Candidate genes for the hypoxic tumor phenotype. *Cancer Res* 60(4): 883-887

Kossakowska AE, Hutchcroft SA, Urbanski SJ, Edwards DR (1996): Comparative analysis of the expression patterns of metalloproteinases and their inhibitors in breast neoplasia, sporadic colorectal neoplasia, pulmonary carcinomas and malignant non-Hodgkin's lymphomas in humans. *Br J Cancer* 73: 1401-1408

Kumagai S, Kojima S, Imai K, Kawashiri S, Yamamoto E (1994): Localization of matrix metalloproteinases and their inhibitors in oral squamous cell carcinomas. *Head Neck* 16: 484

Kurahara S, Shinohara M, Ikebe T, Nakamura S, Beppu M, Hiraki A, Takeuchi H, Shirasuna K (1999): Expression of MMPs, MT-MMP, and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumor invasion and metastasis. *Head Neck* 21: 627-638

Kuropkat C, Lippert BM, Werner JA (1999): Follow-up with serum Cyfra 21-1 in patients with squamous cell carcinomas of the head and neck. *Oncology* 63(3): 280-285

Kuropkat C, Plehn S, Herz U, Dünne AA, Renz H, Werner JA (2002): Tumor Marker Potential of Serum Matrix Metalloproteinases in Patients with Head and Neck Cancer. *Anticancer Res* 22: 2221-2228

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

L

Lapis K, Paku S, Liotta LA (1988): Endothelialization of embolized tumor cells during metastasis formation. *Clin Exp Metastasis* 6: 73

Liabakk NB, Talbot I, Smith RA, Wilkinson K, Balkwill F (1996): Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) type IV collagenases in colorectal cancer. *Cancer Res* 56: 190-196

Liotta L, Kleinermann J, Saidel G (1974): Quantitative relationship of intravascular tumor cells, tumor vessels and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res* 34: 997-1004

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

Long L, Navab R, Brodt P (1998): Regulation of the Mr 72,000 type IV collagenase by the type I insulin-like growth factor receptor. *Cancer Res* 58(15): 3243-3247

M

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

Magary SP, Ryan MW, Tarnuzzer RW, Kornberg L (2000): Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in laryngeal and pharyngeal squamous cell carcinoma: a quantitative analysis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 122: 712-716

Mann EA, Hibbs MS, Spiro JD, Bowik C, Wang XZ, Clawson M, Chen LL (1995): Cytokine regulation of gelatinase production by head and neck squamous cell carcinoma: the role of tumor necrosis factor-alpha. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 104(3): 203-209

Matrisian LM (1992): The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays* 14: 455-463

Mc Cawley L, Matrisian LM (2000): Matrix Metalloproteinases: Multifunctional contributors to tumor progression. *Mol Med Today* 6: 149-156

Mignatti P, Robbins E, Rifkin DB (1986): Tumor invasion through the human amniotic membrane: Requirement for a protein cascade. *Cell* 47: 487-498

Mira E, Benazzo M, Rossi V, Zanoletti E (2002): Efficacy of selective lymph node dissection in clinically negative neck. *Otolaryngol Head Neck Surg* 127: 279-283

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

Miyake H, Hara I, Gohji K, Yamanaka K, Hara S, Arakawa S, Nakajima M, Kamidono S (1999): Relative expression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in mouse renal cell carcinoma cells regulates their metastatic potential. *Clin Cancer Res* 5: 2824-2829

Moore MJ, Hamm J, Eisenberg P, et al. (2000): A comparison between gemcitabine and the matrix metalloproteinase inhibitor BAY 12-9566 in patients with advanced pancreatic cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 19: 240a

Morawski K, Gabriel A, Namyslowski G, Ziolkowski A, Pietrawska V, Steplewska K (1999): Clinical application of proliferating cell nuclear antigen, oncoprotein p53 and tumor front grading analysis in patients operated on for laryngeal cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 256(8): 378-383

Moses MA, Wiederschain D, Loughlin KR, Zurakowski D, Lamb CC, Freeman MR (1998): Increased incidence of matrix metalloproteinases in urine of cancer patients. *Cancer Res* 58: 1395-1399

Murphy G, Cockett MI, Ward RV, Docherty AJP (1991): Matrix metalloproteinase degradation of elastin, type IV collagen and proteoglycan. A quantitative comparison of the activities of 95 kDa and 72 kDa gelatinases, stromelysins-1 and -2 punctuated metalloproteinase (PUMP). *Biochem J* 277: 277-279

Murray GI, Duncan ME, O'Neil P, McKay JA, Melvin WT., Fothergill JE (1998): Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in oesophageal cancer. *J Pathol* 185: 256-261

N

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

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

Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM (2000): Matrix Metalloproteinases: biological activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 18: 1135-1149

Newell KJ, Witty JP, Rodgers WH, Matrisian LM (1994): Expression and localization of matrix-degrading metalloproteinases during colorectal tumorigenesis. *Mol Carcinog* 10: 199-206

Nielsen BS, Timshel S, Kjeldsen L, Sehested M, Pyke C, Borregaard N, Dano K (1996): 92 kDa type IV collagenase (MMP-9) is expressed in neutrophils and macrophages but not in malignant epithelial cells in human colon cancer. *Int J Cancer* 65: 57-62

Niemann AM, Goeroegh T, Gottschlich S, Lippert BM, Werner JA (1997): Cut-off value determination of CYFRA 21-1 for squamous cell carcinomas of the head and neck (SCCHN). *Anticancer Res* 17(4B): 2859-60

Nomura H, Fujimoto N, Seiki M, Mai M, Okada Y (1996): Enhanced production of matrix metalloproteinases and activation of matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) in human gastric carcinomas. *Int J Cancer* 69(1): 9-16

O

O'Brien CJ, Traynor SJ, McNeil E, McMahon JD, Chaplin JM (2000): The use of clinical criteria alone in the management of the clinically negative neck among patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 126: 360-365

O-charoenrat P, Rhys-Evans P, Modjtahedi H, Court W, Box G, Eccles S (2000): Overexpression of epidermal growth factor receptor in human head and neck squamous carcinoma cell lines correlates with matrix metalloproteinase-9 expression and in vitro invasion. *Int J Cancer* 86(3): 307-17

O-charoenrat P, Rhys-Evans PH, Eccles SA (2001): Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*: 127: 813-820

O-charoenrat P, Modjtahedi H, Rhys-Evans P, Court WJ, Box GM, Eccles SA (2000): Epidermal growth factor-like ligands differentially up-regulate matrix metalloproteinase 9 in head and neck squamous carcinoma cells. *Cancer Res* 60(4): 1121-1128

O-charoenrat P, Rhys-Evans P, Court WJ, Box GM, Eccles SA (1999): Differential modulation of proliferation, matrix metalloproteinase expression and invasion of human head and neck squamous carcinoma cells by c-erbB ligands. *Clin Exp Metastasis* 17(7): 631-639

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 carcinoma. *Cancer*: 88: 2201-2209

Ohuchi E, Imai K, Fujii Y et al. (1997) : Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules . *J Biol Chem* 272: 2446-2451

Okada Y, Naka K, Kawamura K, Matsumoto T, Nakanishi I, Fujimoto N, Sato H, Seiki M (1995): Localization of matrix metalloproteinase-9 (92 kDa gelatinase/type IV collagenase = gelatinase B) in osteoclasts; implications for bone resorption. *Lab Invest* 72: 311-322

Özdemir E, Kakehi Y, Okuno H, Yoshida O (1999): Role of matrix metalloproteinase-9 in the basement membrane destruction of superficial urothelial carcinomas. *J Urol* 161: 1359-1363

P

Papathoma AS, Petraki C, Grigorakis A, Papkonstantinou H, Karavana V, Stefanakis S, Sot-siou F, Pintzas A (2000): Prognostic significance of matrix metalloproteinases 2 and 9 in bladder cancer. *Anticancer Res* 20: 2009-2013

Pickett KL, Harber GJ, DeCarlo AA, Louis P, Shaneyfelt S, Windsor LJ, Bodden MK (1999): 92K-GL (MMP-9) and 72K-GL (MMP-2) are produced in vivo by human oral squamous cell carcinomas and can enhance FIB-CL (MMP-1) activity in vitro. *J Dent Res* 78: 1354-1361

Pindborg JJ, Reichart PA, Smith CJ, van der Waal I (1997): International histological classification of tumours / World Health Organization: Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa, 2nd edn. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo, 1-87

Prontera C, Mariani B, Rossi C, Poggi A, Rotilio D (1999): Inhibition of gelatinase A (MMP-2) by batimastat and captopril reduces tumor growth and lung metastases in mice bearing Lewis lung carcinoma. *Int J Cancer* 81: 761-766

Pyke C, Ralfkiaer E, Huhtala P, Hurskainen T, Dano K, Tryggvason K (1992): Localization of messenger RNA for Mr 72,000 and 92,000 type IV collagenases in human skin cancers by in situ hybridization. *Cancer Res* 52(5): 1336-1341

Pyke C, Ralfkiaer E, Tryggvason K, Dano K (1993): Messenger RNA for two type IV collagenases is located in stromal cells in human colon cancer. *Am J Pathol* 142: 359-364

R

Rabuzzi DD, Chung CT, Saagerman RH (1980) Prophylactic neck irradiation. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 106: 454-455

Ranuncolo SM, Matos E, Loria D, Vilensky M, Rojo R, Bal de Kier Joffe E, Ines Puricelli L (2002): Circulating 92-kilodalton matrix metalloproteinases (MMP-9) activity is enhanced in

the euglobulin plasma fraction of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 1, 94 (5): 1483-1491

Riedel F, Götte K, Bergler W, Hörmann K (2001): Inverse correlation of apoptotic and angiogenic markers in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oncol Rep* 8: 471-476

Riedel F, Götte K, Schwalb J, Bergler W, Hörmann K (2000): Expression of 92-kDa type IV collagenase correlates with angiogenic markers and poor survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 17(6): 1099-1105

Riedel F, Götte K, Schwalb J, Hörmann K (2000): Serum levels of matrix metalloproteinase-2 and -9 in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 20: 3045-3049

Risau W (1997): Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386: 671-674

Rooprai HK, Rucklidge GJ, Panou C, Pilkington GJ (2000): The effects of exogenous growth factors on matrix metalloproteinase secretion by human brain tumour cells. *Br J Cancer* 82(1): 52-55

Rudek MA, Venitz J, Figg WD (2002): Matrix metalloproteinase inhibitors: do they have a place in anticancer therapy? *Pharmacotherapy* 22 (6): 705-720

S

Samantaray S, Sharma R, Chattopadhyaya TK, Datta Gupta S, Ralhan R (2004): Increased expression of MMP-2 and MMP-9 in esophageal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 130 (1): 37-40

Satoh K, Ohtani H, Shimosegawa T, Koizumi M, Sawai T, Toyota T (1994): Infrequent stromal expression of gelatinase A and intact basement membrane in intraductal neoplasms of the pancreas. *Gastroenterology* 107: 1488-1495

Schantz SP (2002): Biologic markers, cellular differentiation, and metastatic head and neck cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 250(8): 424-428

Schipper JH, Frixen UH, Behrens J, Unger A, Jahnke K, Birchmeier W (1991): E-cadherin expression in squamous cell carcinomas of head and neck: Inverse correlation with tumor dedifferentiation and lymph node metastasis. *Cancer Res* 51: 6328-6337

Schmidt M, Polednik C, Hoppe F (1999): Proteolytic patterns of head and neck squamous cell carcinoma. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 256: 346-350

Schoedel KE, Greco MA, Stetler-Stevenson WG, Ohori NP, Goswami S, Present D, Steiner GC (1996): Expression of metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in giant cell tumor of bone: an immunohistochemical study with clinical correlation. *Hum Pathol* 27: 1144-1148

Schulz HG, Görögh T, Bäumken J, Höf S, Stöhlmacher J, Order BM, Werner, JA (1998): Expression of metalloproteinases and their inhibitors in squamous cell carcinoma cell lines of the head and neck. *Br. J. Cancer* 77 (Suppl. 1): 50

Segain JP, Harb J, Grégoire M, Meflah K, Menanteau J (1996): Induction of fibroblast gelatinase B expression by direct contact with cell lines derived from primary tumor but not from metastases. *Cancer Res* 56: 5506-5512

Seifert G (2000): International histological classification of tumours / World Health Organization: Histological typing of salivary gland tumors, 2nd edn. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo, 1-113

Senior RM, Griffin GL, Fliszar CJ, Shapiro SD, Goldberg GI, Welgus HG (1991): Human 92- and 72-kilodalton type IV collagenases are elastases. *J Biol Chem* 266: 7870-7875

Shah JP, Strong E, Spiro RH, Vikram B (1981): Surgical grand rounds. Neck dissection: Current status and future possibilities. *Clin Bull* 11:25-33

Shanmugaratnam K (1991): International histological classification of tumours / World Health Organization: Histological typing of the upper respiratory tract and ear, 2nd edn. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo, 1-201

Shestak KC, Jones NF, Wu W, Johnson JT, Myers EN (1992): Effect of advanced age and medical disease on the outcome of microvascular reconstruction for head and neck defects. *Head Neck* 14:14-18

Shima I, Sasaguri Y, Kusakawa J, Nakano R, Yamana H, Fujita H, Kakegawa T, Morimatsu M (1993): Production of matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase) by human oesophageal squamous cell carcinoma in response to epidermal growth factor. *Br J Cancer* 67: 721-727

Shinohara M, Hiraki A, Ikebe T, Nakamura S, Kurahara S-I, Shirasuna K, Garrod DR (1998): Immunohistochemical study of desmosomes in oral squamous cell carcinoma: Correlation with cytokeratin and E-cadherin staining, and with tumour behaviour. *J Pathol* 84: 369-381

Shlopov BS, Lie WR, Mainardi CL, Cole AA, Chubinskaya S, Hasty KA (1997): Osteoarthritic lesions. *Arthritis Rheum* 40: 2065-2074

Sledge GW Jr, Qulali M, Goulet R, Bone EA, Fife R (1995): Effect of matrix metalloproteinase inhibitor batimastat on breast cancer regrowth and metastasis in athymic mice. *J Natl Cancer Inst* 87: 1546-1550

Sobin LH, Wittekind C (1997): TNM Classification of malignant tumours. 5th edn. Wiley & Sons, New York

Stähle-Bäckdahl M, Parks WC (1993): 92-kd gelatinase is actively expressed by eosinophils and stored by neutrophils in squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* 142: 995-1000

Steinhart H, Kleinsasser O (1993): Growth and spread of squamous cell carcinoma of the floor of the mouth. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 250: 358-361

Sternlicht MD, Werb Z (2001): How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Ann Rev Cell Dev Biol* 17: 463-516

Stetler-Stevenson W, Yu AE (2001): Proteases in invasion: matrix metalloproteinases. *Semin Cancer Biol* 11: 143-153

Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA (1993): Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9: 541-573

Sugiura Y, Shimada H., Seeger RC, Laug WE, DeClerck YA (1998): Matrix metalloproteinases-2 and -9 are expressed in human neuroblastoma: contribution of stromal cells to their production and correlation with metastasis. *Cancer Res* 58: 2209-2216

Sutinen M, Kainulainen T, Hurskainen T, Vesterlund E, Alexander JP, Overall CM, Sorsa T, Salo T (1998): Expression of matrix metalloproteinases (MMP-1 and -2) and their inhibitors (TIMP-1, -2 and -3) in oral lichen planus, dysplasia, squamous cell carcinoma and lymph node metastasis. *Br J Cancer* 77: 2239-2245

T

Taylor C, Levy BM, Simpson JW (1970): Collagenolytic activity of sarcoma tissues in culture. *Nature* 228: 366-367

Teichgraeber JF, Clairmont AA (1984): The incidence of occult metastases for cancer of the oral tongue and floor of the mouth: treatment rationale. *Head Neck Surg* 7(1):15-21

Thorgeirsson UP, Liotta LA, Kalebic T (1982): Effect of natural protease inhibitors and a chemoattractant on tumor cell invasion in vitro. *J Natl Cancer Instb* 69:1049

Tokuraku M, Sato H, Murakami S, Okada Y, Watanabe Y, Seiki M (1995): Activation of the precursor of gelatinase A / 72 kDa type IV collagenase / MMP-2 in lung carcinomas correlates with the expression of membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) and with lymph node metastasis. *Int J Cancer* 64: 355-359

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

Tsai CH, Hsieh YS, Yang SF, Chou MY, Chang YC (2003): Matrix metalloproteinase 9 expression in human oral squamous cell carcinoma and the effect of protein kinase C inhibitors: preliminary observations. *Oral surg oral med oral pathol oral radiol endod* 95 (6): 710-716

U

Unemori E, Ferrara N, Bauer E, Amento E (1992): Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J. Cell Physiol.* 153: 557-562

Uria JA, Ferrando AA, Velasco G, Freije JM, Lopez-Otin C (1994): Structure and expression in breast tumors of human TIMP-3, a new member of the metalloproteinase inhibitor family. *Cancer Res* 54(8): 2091-2094

V

Van den Brekel MW, Castelijns JA, Stel HV, Golding RP, Meyer CJ, Snow GB (1993): Modern imaging techniques and ultrasound-guided aspiration cytology for the assessment of neck node metastases: a prospective comparative study. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 250: 11-17

Van den Brekel MW, Castelijns JA, Stel HV, Luth WJ, Valk J, van der Waal I, Snow GB (1991): Occult metastatic neck disease: detection with US and US-guided fine-needle aspiration cytology. *Radiology* 180: 457-461

Van den Brekel MW, Stel HV, Castelijns JA, Nauta JJ, van der Waal I, Valk J, Meyer CJ, Snow GB (1990): Cervical lymph node metastasis: assessment of radiologic criteria. *Radiology* 177: 379-384

Van den Brekel MW, van der Waal I, Meijer CJ, Freeman JL, Castelijns JA, Snow GB (1996): The incidence of micrometastases in neck dissection specimens obtained from elective neck dissections. *Laryngoscope* 106: 987-991

Van den Brekel MW, Castelijns JA, Snow GB (1994): Detection of lymph node metastases in the neck: radiologic criteria. *Radiology* 192: 617-618

Van den Brekel MW, van der Waal I, Meijer CJLM, Freeman JL, Castelijns JA, Snow GB (1996): The incidence of micrometastases in neck dissection specimens obtained from elective neck dissections. *Laryngoscope* 106: 987-991

Van den Brekel MW. Lymph node metastases: CT and MRI (2000): *Eur J Radiol* 33: 230-238

Vihinen P, Kähäri VM (2002): Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int J Cancer* 10, 99(2): 157-66

W

Wang X, Fu X, Brown PD, Crimmin MJ, Hoffman RM (1994): Matrix metalloproteinase inhibitor BB-94 (batimastat) inhibits human colon tumor growth and spread in a patient-like orthotopic model in nude mice. *Cancer Res* 54: 4726-4728

Watson SA, Morris TM, Robinson G, Crimmin MJ, Brown PD, Hardcastle JD (1995): Inhibition of organ invasion by the matrix metalloproteinase inhibitor batimastat (BB-94) in two human colon carcinoma metastasis models. *Cancer Res* 55: 3629-3633

Werb Z, Burleigh MC, Barrett AJ, Starkey PM (1974): The interaction of alpha2-macroglobulin with proteinases. Binding and inhibition of mammalian collagenases and other metal proteinases. *Biochem J* 139(2): 359-68

Werner JA (1995): Untersuchungen zum Lymphgefäßsystem von Mundhöhle und Rachen. *Laryngo-Rhino-Otol* 74: 622-628

Werner JA, Rathcke IO, Mandic R (2002): The role of matrix metalloproteinases in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Exp Metastasis* 19(4): 275-82

Werner JA (2002): Lymphknotenerkrankungen im Kopf-Hals-Bereich. *Onkologie und Differentialdiagnostik*. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo, 2002

Wood M, Fudge K, Mohler JL, Frost AR, Garcia F, Wang M, Stearns ME (1997): In situ hybridization studies of metalloproteinases 2 and 9 and TIMP-1 and TIMP-2 expression in human prostate cancer. *Clin Exp Metastasis* 15: 246-258

Woolgar JA (1999): Micrometastasis in oral/oropharyngeal squamous cell carcinoma: Incidence, histopathological features and clinical implications. *Br J Oral Maxillofac Surg* 37: 181-186

Wu Y, Palad AJ, Wasilenko WJ, Blackmore PF, Pincus WA, Schechter GL, Spoonster JR, Kohn EC, Somers KD (1997): Inhibition of head and neck squamous cell carcinoma growth and invasion by the calcium influx inhibitor carboxyamido-triazole. *Clin Cancer Res* 3: 1915-1921

Y

Yagel S, Khokha R, Denhardt DT, Kerbel RS, Parhar RS, Lala PK (1989): Mechanisms of cellular invasiveness: a comparison of amnion invasion *in vitro* and metastatic behaviour *in vivo*. *J Natl Cancer Inst* 81: 768-775

Z

Zeng ZS, Guillem JG (1995): Distinct pattern of matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 mRNA expression in human colorectal cancers and liver metastases. *Br J Cancer* 72: 575-582

Zucker S, Cao J, Chen WT (2000): Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment. *Oncogene* 2000 (19): 6642-6650

8. Anhang

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|--------------------|---|
| Abbildung 1 | Avidin-Biotin-Methode: vorgeformte Avidin-Biotin-Komplexe reagieren mit biotinylierten Sekundärantikörpern |
| Abbildung 2 | Immunhistochemische Färbung von MMP-9 nach der ABC-Methode, die die Anfärbung von weniger als 50% der Tumorzellen bzw. des Stromagewebes eines Oropharynxtumorpräparates zeigt (40-fache Vergrößerung) und somit in die Kategorie 1+ einzuklassifizieren ist. |
| Abbildung 3 | Immunhistochemische Färbung von MMP-9 nach der ABC-Methode, die eine ausgedehnte Anfärbung der Tumorzellen bzw. des Stromagewebes eines Oropharynxtumorpräparates zeigt (40-fache Vergrößerung) und somit in die Kategorie 3+ einzuklassifizieren ist. |

TABELLENVERZEICHNIS

| | |
|------------------|---|
| Tabelle 1 | Verhältnis zwischen dem MMP-9 Expressionslevel und dem Grading der Oropharynxkarzinome. |
| Tabelle 2 | Verhältnis zwischen dem MMP-9 Expressionslevel und dem T-Stadium der Oropharynxkarzinome. |
| Tabelle 3 | Verhältnis zwischen dem MMP-9 Expressionslevel und dem Lymphknotenbefall der Oropharynxkarzinome. |
| Tabelle 4 | Verhältnis zwischen dem MMP-9 Expressionslevel und dem N-Stadium der Oropharynxkarzinome. |
| Tabelle 5 | Verhältnis zwischen dem MMP-9 Expressionslevel und dem UICC-Stadium der Oropharynxkarzinome. |

DANKSAGUNG

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. J. A. Werner, Direktor des Medizinischen Zentrums für Hals-, Nasen und Ohrenheilkunde der Philipps-Universität Marburg, gilt mein ganz besonders herzlicher Dank. Er regte das Thema an und gab mir so die Chance, eine bereits angefangene und aussichtslos erscheinende Dissertation abzubrechen und in seiner Klinik noch eine Dissertation fertig zu stellen. Ich danke ihm gleichfalls für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und aller zur Durchführung dieser Arbeit erforderlichen Materialien.

Besonders danke ich Frau PD Dr. med. Anja-A. Dünne, Leiterin der Sektion Experimentelle HNO-Heilkunde, für ihren unermüdlichen Einsatz und ihre wissenschaftliche Betreuung bei der Durchführung und Gestaltung dieser Arbeit. Ich konnte stets durch ihre hervorragende wissenschaftliche Betreuung und wohlwollende Förderung auf ihre Unterstützung vertrauen und hatte in ihr immer eine Ansprechpartnerin. Ihre wertvollen Verbesserungsvorschläge waren sehr hilfreich und haben zur Fertigstellung dieser Arbeit erheblich beigetragen.

Weiter danke ich Herrn Prof. Dr. med. P. Barth, Leitender Oberarzt des Instituts für Pathologie, für die konstruktive Kritik an der angewandten Methode und für die Hilfestellung bei der Bewertung der Befunde. Danken möchte ich auch Frau Dr. med. C. Kuropkat für ihre stetige Unterstützung und konstruktive Kritik. Mit großem Zeitaufwand und persönlichem Engagement haben beide mir die Fertigstellung dieser Dissertation erst ermöglicht.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei Frau R. Peldszus und Frau G. Sadowski für ihre technische Assistenz und Unterstützung bei dem experimentellen Teil der vorliegenden Arbeit bedanken.

Ebenso danke ich dem gesamten Team des Labors für Experimentelle Onkologie des Medizinischen Zentrums für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Philipps-Universität Marburg, insbesondere Herrn Dr. med. Robert Mandic und Herrn N. Sapundziev für die Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.

Ganz besonders herzlich danke ich meiner Familie und meiner Freundin, Frau Benina Majunke, für ihre Liebe, Geduld und Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

AKADEMISCHER LEBENSLAUF

Vor Drucklegung entnommen.

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Vor Drucklegung entnommen.

VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER

*Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Universitätsprofessoren/-innen
und Dozenten/-tinnen*

Marburg, Deutschland:



| | | |
|--------------|------------|------------|
| ARNOLD | HAPPLE | REMSCHMIDT |
| AUMÜLLER | HASILIK | RENZ |
| BACH | HELLINGER | RÖHM |
| BARTH | HOFMANN | SCHÄFER |
| BASLER | JUNGCLAS | SCHMIDT |
| BAUM | KERN | SEITZ |
| CHRISTIANSEN | KLENK | SEYBERTH |
| DAUT | KOOLMAN | SLENCZKA |
| EILERS | KRETSCHMER | STEINIGER |
| FEUSER | KRIEG | SUSKE |
| FRUHSTORFER | KROLL | VOHLAND |
| GEUS | LAMMEL | VOIGT |
| GOTZEN | LANG | WEIHE |
| GRISS | MOLL | WERNER |
| GRZESCHIK | MUTTERS | WESTERMANN |
| GUDERMANN | OERTEL | WULF |

Münsterlingen, Schweiz:



| | | |
|---------------|---------------|---------|
| DE MONTMOLLIN | RÖTHLIN | SCHÜLER |
| RITZLER | SCHÖNENBERGER | SZÖNYI |

Hong Kong, China (SAR):



| | | |
|--------|---------|-------|
| CHEUNG | SAMMAN | YEUNG |
| CHIU | TIDEMAN | |

