

Die Expression der Matrix-Metalloproteinasen
MMP-2 und MMP-9 beim Kolon- und
Rektumkarzinom

Marlies Arndt

Die Expression der Matrix-Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9
beim Kolon- und Rektumkarzinom

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
einer Doktorin der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Marlies Arndt geb. Hoor

aus

Essen

Berichter: Frau Professorin
Dr. med. Elke Roeb

Herr Universitätsprofessor
Dr. med. Dr. E. h. (GUS) Volker Schumpelick

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Dezember 2005

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar

Veröffentlichungen

Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits unter folgenden Titeln veröffentlicht:

Abstracts

ROEB E, NGYEN HN, **HOOR M**, BREUER B, SCHUMPELICK V, MATERN S. Unterschiedliche Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) in Kolon- und Rektumkarzinom. 4. AGO Winterkurs, Hannover, Lebertumore (Abstract/Poster), 2/1998

ROEB E, NGYEN HN, **HOOR M**, BREUER B, SCHUMPELICK V, MATERN S. MMP-2 und MMP-9 werden beim kolorektalen Karzinom verstärkt und TIMP-1 vermindert exprimiert. Rheinisch-Westfälische Gesellschaft für Innere Medizin, 170. Tagung Düsseldorf (Abstract/Vortrag). *Diese Arbeit wurde mit dem Preis für den besten Vortrag ausgezeichnet*, 5/1998

ROEB E, **HOOR M**, BREUER B, WINOGRAD R, NGYEN HN, SCHUMPELICK V, MATERN S. Unterschiedliche Expression von MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 bei kolorektalen Karzinomen im Vergleich zu gesundem Darmgewebe. DVGS, Kiel, Zeitung für Gastroenterologie, 36: 715, 9/1998

HAMACHER S, **ARNDT M**, JANSEN B, SCHUMPELICK V, MATERN S, ROEB E. Simultane Bestimmung der Genexpression von Matrix-Metalloproteinasen (MMP)-7, MMP-1, MMP-3 und MMP-13 durch Multiplex-PCR in kolorektalen Karzinomen. Rheinisch-Westfälische Gesellschaft für Innere Medizin (Abstract/Vortrag). *Ausgezeichnet mit dem Preis für das beste Abstract*, 11/2003

ROEB E, **ARNDT M**, JANSEN B, SCHUMPELICK V, MATERN S. Multiplex PCR revealed a simultaneous upregulation of matrix metalloproteinase (MMP)-7 and MMP-13 gene expression in colorectal carcinomas. 10. AGO Winterkurs, Tübingen, Multimodale Therapiekonzepte in der gastroenterologischen Onkologie (Abstract/Poster), 2/2004

Originalarbeiten

ROEB E, DIETRICH CG, WINOGRAD R, **ARNDT M**, BREUER B, FASS J, SCHUMPELICK V, MATERN S. Activity and Cellular Origin of Gelatinases in Patients with Colon and Rectal Carcinoma. Differential Activity of Matrix-Metalloproteinase-9. *Cancer*, 92 (10): 2680–91, 2001

ROEB E, **ARNDT M**, JANSEN B, SCHUMPELICK V, MATERN S. Simultaneous determination of matrix (MMP)-7 and MMP-1, -3 and -13 gene expression by multiplex PCR in colorectal carcinomas. *International Journal of Colorectal Diseases*, 19 (6): 518–24, 2004

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	3
2.1	Das kolorektale Karzinom	3
2.1.1	Epidemiologie	3
2.1.2	Ätiologie und Pathogenese	3
2.1.3	Klinik	4
2.1.4	Therapie	5
2.1.5	Stadien und Prognosefaktoren	5
2.1.6	Metastasierungswege	8
2.2	Tumormetastasierung	8
2.2.1	Allgemeines	8
2.2.2	Wechselwirkungen der Tumorzellen mit der Extrazellulärmatrix	8
2.2.3	Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)	9
2.2.4	MMP-2 und MMP-9	10
2.2.5	Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs)	13
2.2.6	MMPs beim kolorektalen Karzinom	14
2.2.7	TIMPs beim kolorektalen Karzinom	18
3	Fragestellung	20
4	Material und Methoden	22
4.1	Material, Chemikalien	22
4.2	Zusammentragen klinischer Daten	22
4.3	Materialgewinnung	23
4.4	Herstellung von Zellysaten	23
4.5	Proteinbestimmung nach Bradford und Verdünnung der Proben . . .	24
4.6	Zymographie	24
4.6.1	Herstellung der Gele	25
4.6.2	Auftrennung der Proteine und Spalten der Gelatine	26
4.7	Western-Blot-Analyse	27
4.7.1	Proteintrennung	28

4.7.2	Blotting-Methode	29
4.7.3	Protein-Detektion	30
4.8	Auswertung	31
4.8.1	Densitometrie	31
4.9	Statistik	32
4.9.1	Signifikanztests	32
5	Ergebnisse und Auswertung	36
5.1	Klinische Daten	36
5.2	Zymographien	39
5.2.1	Auswertung der Zymographien	46
5.2.2	Signifikanzberechnung Karzinomgewebe versus normales Ge- webe	50
5.2.3	Signifikanzberechnung Kolon- versus Rektumkarzinom	51
5.3	Western Blots	56
6	Diskussion	64
6.1	Diskussion der Methoden	64
6.1.1	Materialgewinnung und klinische Daten	64
6.1.2	Zymographie	65
6.1.3	Western Blot	66
6.1.4	Statistik	67
6.1.5	Vergleich klinischer Variablen	67
6.2	Diskussion der Ergebnisse	67
6.2.1	Kolonkarzinom	67
6.2.2	Rektumkarzinom	68
6.2.3	Kolorektales Karzinom in der Literatur	68
6.2.4	Bedeutung der MMPs für Prognose und Therapie des kolorek- talen Karzinoms	71
7	Zusammenfassung	76
	Abkürzungsverzeichnis	85
	Danksagung	87
	Lebenslauf	88

Abbildungsverzeichnis

2.1	Pathogenese des kolorektalen Karzinoms	4
2.2	MMPs und TIMPs in der Extrazellulärmatrix	14
5.1	Zymographie K1 und K2	40
5.2	Zymographie K10, K11, K12, R4	40
5.3	Zymographie K13, K14, K15, A1	41
5.4	Zymographie K3, K4, K5, R1, R2	41
5.5	Zymographie K6, K7, K8, K9	42
5.6	Zymographie K16, K17, K18, K19	42
5.7	Zymographie R8, R9, R10, K8	43
5.8	Zymographie R6, R7	43
5.9	Zymographie R3	44
5.10	Zymographie R10, R5, R6, R7, R8	44
5.11	Zymographie K16, K9, K15, K18, K19	45
5.12	Zymographie-Auswertung Kolon	48
5.13	Zymographie-Auswertung Rektum	48
5.14	Zymographie-Auswertung Kolon versus Rektum	49
5.15	Western Blot MMP-2, K1, K2, K3, K5, K6	56
5.16	Western Blot MMP-2, K4, R1, R2, K7, R3	57
5.17	Western Blot MMP-2 K8, K9, K10, K11, R5	57
5.18	Western Blot MMP-2 K12, R4, R6, A1, R9	58
5.19	Western Blot MMP-2 K16, R10, K17, K18, K19	58
5.20	Western Blot MMP-2 R1, R2, R7, R8	59
5.21	Western Blot MMP-2 R7, R8, K13, K15	59
5.22	Western Blot MMP-9 K1, R2, K8, K5	60
5.23	Western Blot MMP-9 K6, K3, K4, K7, K12	60
5.24	Western Blot MMP-9 K8, K9, K10, K11, R5	61
5.25	Western Blot MMP-9 K16, R10, K17, K18, K19	61
5.26	Western Blot MMP-9 R1, R2, R3, R4	62
5.27	Western Blot MMP-9 R1, R2, R7, R8	62
5.28	Western Blot MMP-9 R6, A1, R9, K1, K2	63
5.29	Western Blot MMP-9 R7, R8, K13, K14, K15	63

Tabellenverzeichnis

2.1	T-Kategorien: Primärtumor	6
2.2	N-Kategorien: regionäre Lymphknoten	6
2.3	M-Kategorien: Fernmetastasen	6
2.4	Stadiengruppierung	7
2.5	Zusammenfassung der MMPs	11
2.6	Zusammenfassung der MMPs, Fortsetzung	12
2.7	MMPs und klinische Variablen beim Kolonkarziom	18
2.8	TIMPs und klinische Variablen beim Kolonkarzinom	19
5.1	Klinikopathologische Variablen der Kolonkarzinompatienten	37
5.2	Laborparameter der Kolonkarzinompatienten	38
5.3	Klinikopathologische Variablen der Rektumkarzinompatienten	38
5.4	Laborparameter der Rektumkarzinompatienten	39
5.5	Zymographie-Auswertung Kolon	46
5.6	Zymographie-Auswertung Rektum	47
5.7	Signifikanz der Ergebnisse Normal- versus Karzinomgewebe	50
5.8	Signifikanz der Ergebnisse Kolon versus Rektum	51
5.9	Kolmogoroff-Smirnoff-Test MMP-9 Kolon	52
5.10	Kolmogoroff-Smirnoff-Test MMP-2 (72 kDa)Kolon	52
5.11	Kolmogoroff-Smirnoff-Test MMP-2 (66 kDa) Kolon	53
5.12	Kolmogoroff-Smirnoff-Test MMP-9 Rektum	53
5.13	Kolmogoroff-Smirnoff-Test MMP-2 (72 kDa) Rektum	53
5.14	Kolmogoroff-Smirnoff-Test MMP-2 (66 kDa) Rektum	54
5.15	Mann-Whitney-Test. Kolon versus Rektum. MMP-9.	54
5.16	Mann-Whitney-Test. Kolon versus Rektum. MMP-2 (72 kDa).	55
5.17	Mann-Whitney-Test. Kolon versus Rektum. MMP-2 (66 kDa).	55

Kapitel 1

Einleitung

Das kolorektale Karzinom ist einer der häufigsten Tumoren des Menschen. In Ländern mit hohem sozioökonomischen Status ist die Inzidenz am höchsten. Das kolorektale Karzinom ist beim Mann der dritthäufigste, bei der Frau der zweithäufigste maligne Tumor [Scho 2001]. Bei einer insgesamt ansteigenden Rate maligner Erkrankungen und bei noch wenig ausreichenden präventiven Möglichkeiten ist die Erforschung einer suffizienten Krebstherapie von enormer Bedeutung. Die Prognose des Kolonkarzinoms hängt bei guten kurativen chirurgischen Möglichkeiten entscheidend vom Tumorstadium, das heißt von Invasivität und Metastasierung, ab. Ist es zu einer fortgeschrittenen Metastasierung gekommen, so ist die Prognose schlecht, in frühen Stadien dagegen ist das kolorektale Karzinom chirurgisch-kurativ gut behandelbar.

Die Erforschung der Mechanismen von Invasion und Metastasierung eines Tumors ist daher von erheblicher Relevanz. In den vergangenen Jahren ist in der Literatur viel zu dieser Thematik veröffentlicht worden und es wurden neue Therapieansätze erörtert [Li 1991], [Ze 1996], [Roe 2001a]. Die drei wichtigsten Schritte der Metastasierung sind das Anheften der Tumorzelle an die Extrazellulärmatrix (ECM), die Sekretion gewebsauflösender Enzyme mit Degradierung der ECM und die Zellwanderung. Einen wichtigen Stellenwert in diesem Prozess hat die Degradierung der ECM. Dies ist ein komplexer Vorgang, an dem eine Vielzahl regulatorischer Mechanismen beteiligt sind. Es wurde festgestellt, dass verschiedene ECM-degradierende Proteinase von aggressiven und invasiven Tumoren vermehrt exprimiert werden [Li 1991], [Ze 1996]. Zu diesen gehören unter anderem eine große Anzahl von Matrix-Metalloproteinase (MMPs). In der Tumorprogression beim kolorektalen Karzinom spielen besonders die MMP-2 und die MMP-9 eine besondere Rolle [To 1994], [Dun 1996], [Roe 2001a]. Diese MMPs haben unter anderem die besondere Eigenschaft, Kollagen IV spalten zu können - ein wichtiger Schritt beim Durchbruch der Basalmembran und somit bei der Gewebsinvasion und Tumormetastasierung.

Dies lässt vermuten, dass MMPs, beim Kolonkarzinom besonders MMP-2 und MMP-9, ein großes prognostisches und therapeutisches Potential bergen. Die Untersuchung von Expression, Aktivierung und Regulation könnte daher neue therapeutische Wege eröffnen. Dabei sind mittlerweile natürliche sowie synthetische MMP-Inhibitoren isoliert bzw. entwickelt worden [Ka 1999], [Br 1998], [Ma 1999]. Zu den natürlichen, im menschlichen Organismus vorkommenden Inhibitoren gehören zum Beispiel die Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs).

Diese Arbeit leistet einen Beitrag zur Frage der Expression von aktiver MMP-2 und MMP-9 in kolorektalem Karzinomgewebe verglichen mit gesundem Darmgewebe. Mit Hilfe der Methode der Zymographie wurde die MMP-2- und MMP-9-Expression in menschlichem kolorektalem Gewebe aus Operationsresektaten untersucht. Wir stellten uns dabei die Frage, ob sich die in der Literatur beschriebene Tendenz bestätigt, dass diese Metalloproteinasen im kolorektalen Karzinomgewebe vermehrt exprimiert werden. Weiterhin verglichen wir die Expression der Metalloproteinasen MMP-2 und -9 von Kolonkarzinomgewebe mit rektalem Karzinomgewebe, da verschiedene Metastasierungswege beider Lokalisationen Unterschiede vermuten lassen. Dies wurde bislang in der Literatur nicht ausreichend untersucht, könnte aber therapeutische Konsequenzen haben.

Kapitel 2

Theoretische Grundlagen

2.1 Das kolorektale Karzinom

2.1.1 Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom ist einer der häufigsten Tumoren des Menschen. In Ländern mit hohem sozioökonomischen Status ist die Inzidenz am höchsten. Das kolorektale Karzinom ist beim Mann der dritthäufigste, bei der Frau der zweithäufigste maligne Tumor [Scho 2001]. Die Inzidenz ist zunehmend. Weltweit gesehen gibt es aber große geographische Unterschiede. In Afrika oder Südamerika wird das kolorektale Karzinom im Gegensatz zu den „westlichen Ländern“ wesentlich seltener diagnostiziert [Cla 1998]. Maligne Dickdarmgeschwulste, in 95 % der Fälle histologisch Adenokarzinome, sind am häufigsten im Rektum lokalisiert (ca. 45 %), gefolgt vom Sigma (ca. 30 %). Sie sind Tumoren des höheren Lebensalters. 90 % der kolorektalen Karzinome treten jenseits des 50. Lebensjahres auf, der Altersgipfel liegt zwischen dem 70. und 75. Lebensjahr [Schu 1999].

2.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Als Ursache für die Entstehung des kolorektalen Karzinoms geht man davon aus, dass Umweltfaktoren besonderen Einfluss auf die Krebsentstehung haben. Dabei handelt es sich vor allem um Ernährungsfaktoren wie an tierischen Fetten reiche, faserarme und fleischreiche Kost. Aber auch andere Faktoren wie Adipositas, langjährige entzündliche Darmerkrankungen oder Uretrosigmoidostomie können an der Krebsentstehung beteiligt sein [Har 1995]. Weiterhin gibt es erbliche Faktoren und Syndrome, die prädisponierend für die Karzinomentstehung im Darm sind, wie zum Beispiel die Polyposis Coli, das Gardener-Syndrom oder das Turcot-Syndrom [Har 1995]. Pathogenetisch entstehen kolorektale Karzinome in der Regel aus einer Adenom-Karzinom-Sequenz [Fe 1990]. Hierbei entwickelt sich der maligne Tumor langsam aus einer gutartigen Geschwulst, einem Adenom. Es dauert dann viele

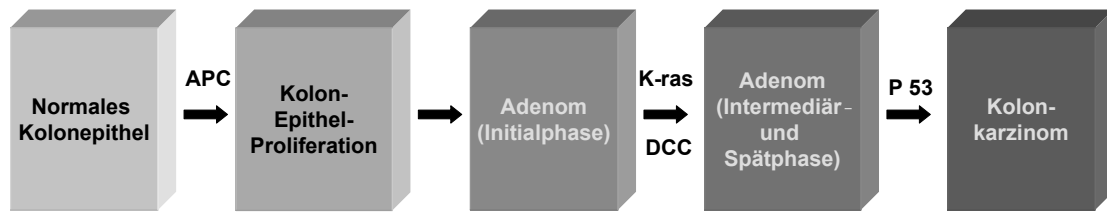


Abbildung 2.1: Pathogenese des kolorektalen Karzinoms in Form eines molekular-pathogenetischen Mehrstufenprozesses (die zugrundeliegenden Genmutationen stehen über den Pfeilen)

Jahre, bis sich in dem Adenom Zelldysplasien entwickeln, die letztendlich in eine maligne Geschwulst übergehen können. Man nimmt an, dass der Umwandlungsprozess von der noch benignen in die maligne Zelle durch Mutation oder Verlust von Tumorsuppressorgenen und Onkogenen vorangetrieben wird. Dabei spielt das APC-Gen (adenomatous polyposis colon) eine wichtige Rolle. Ein Genverlust oder Mutation dieses Gens führt zu einer Veränderung der Zellreplikation, -adhäsion und -migration. Dadurch kommt es zur Ausbildung eines Adenoms. Hervorgerufen durch diese Veränderungen kommt es zu einer gesteigerten Proliferation und zu einer Akkumulation genetischer und chromosomaler Veränderungen. Zu diesen gehören zum Beispiel K-ras, DCC oder P 53. Abbildung 2.1 verdeutlicht die Zusammenhänge zwischen Genmutationen und der Adenom-Karzinom-Sequenz.

2.1.3 Klinik

Die Klinik des kolorektalen Karzinoms ist nicht charakteristisch. Hinweise auf das Vorhandensein eines Karzinoms können sein:

- Blut im Stuhl
- Plötzliche Änderung der Stuhlgewohnheiten
- Abdominale Krämpfe
- Ileus
- Müdigkeit und Leistungsminderung
- Anämie
- Fieber und Gewichtsverlust

Die Diagnose wird anhand der rektalen Untersuchung und der Koloskopie des gesamten Kolons mit Biopsien sowie der Histologie gestellt. Ergänzende Untersuchungen sind die Röntgen-Doppelkontrastuntersuchung des Kolons, die abdominale Sonographie (besonders wichtig bei der Metastasensuche), die Computertomographie und die transrektale Endosonographie (Beurteilung der Tumorausdehnung und Operabilität beim Rektumkarzinom).

2.1.4 Therapie

Die Therapie der Wahl des kolorektalen Karzinoms ist die Totalresektion nach den Prinzipien der Tumorchirurgie mit kurativer Zielsetzung. Dabei gibt es einige Ausnahmen: Ein tiefsitzendes Rektumkarzinom im Stadium T1N0M0 kann auch durch „disc excision“ lokal behandelt werden [Schu 1999]. Sind schon Fernmetastasen bekannt, kann eventuell ein weniger radikaler Eingriff indiziert sein, als die Totalresektion. Die beste Palliativoperation ist die lokale radikale Tumorextirpation. An adjuvanten Therapiemöglichkeiten steht zum einen die Strahlentherapie zur Verfügung. Zum anderen zeigte chemotherapeutisch eine Behandlung mit 5-Fluorouracil (5-FU) in Kombination mit Leucovorin und Oxaliplatin die besten Ergebnisse [An 2004]. Auch kann eine Therapie mit Irinotecan als Monotherapie oder in Kombination mit 5-FU durchgeführt werden [Arn 2003], [Scho 2001]. Die Strahlentherapie ist bei jedem Rektumkarzinom indiziert, da dies eine große Wahrscheinlichkeit der Lokalrezidivbildung aufweist. Auch präoperativ ist die Strahlentherapie dann indiziert, wenn die Tumormasse so groß ist, dass der Tumor potentiell nicht operabel ist (Downstaging). Beim Kolonkarzinom hat sich gezeigt, dass die adjuvante Chemotherapie besonders im Stadium Dukes C (s. Kapitel 2.1.5) die 5-Jahres-Überlebensrate um 10 % bessert und die Rezidivwahrscheinlichkeit senkt.

Nach der Radikaloperation sollten sich die Patienten 5 Jahre lang jedes halbe Jahr einer körperlichen Untersuchung unterziehen sowie Laborkontrollen durchführen lassen. Außerdem ist alle 3 Jahre eine erneute Koloskopie und Röntgenkontrastuntersuchung des gesamten Dickdarms indiziert, um ein Tumorrezidiv auszuschließen [Har 1995].

2.1.5 Stadien und Prognosefaktoren

Da die Klinik des kolorektalen Karzinoms so wenig charakteristisch, die Prognose des Tumors aber im Frühstadium noch relativ günstig ist, hängt diese stark von der Früherkennung ab. Ist der Tumor bereits metastasiert, so ist die Prognose schlecht. Um diese im Einzelfall einschätzen zu können und um die sinnvollste Therapie einzusetzen, wird der Tumor nach den Kategorien der TNM-Klassifikation (Invasionstiefe (T), Lymphknotenbefall (N) und Fernmetastasierung (M)) eingeteilt (Staging). Noch entscheidender für die 5-Jahres-Überlebensrate und die Prognose ist allerdings die Stadieneinteilung nach Dukes. Die Tabellen 2.1, 2.2 und 2.3 definieren

die verschiedenen Kategorien (T, N oder M) der TNM-Klassifikation; eine Zusammenfassung über verschiedene Kategorien und die Gruppierung in die Dukes-Stadien gibt Tabelle 2.4.

Bezeichnung	Definition
Tis	Carcinoma in situ
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Tumor infiltriert Submukosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert durch die Muscularis propria in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe
T4	Tumor perforiert das viszerale Peritoneum oder infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden

Tabelle 2.1: T-Kategorien: Primärtumor

Bezeichnung	Definition
N0	Kein Anhalt für Befall regionärer Lymphknoten
N1	Metastasen in 1-3 perikolischen bzw. perirektalen Lymphknoten
N2	Metastasen in 4 oder mehr perikolischen bzw. perirektalen Lymphknoten
N3	Metastasen in Lymphknoten entlang eines benannten Gefäßstammes und/oder Metastase(n) in apikalen Lymphknoten (wenn vom Chirurgen markiert)
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden

Tabelle 2.2: N-Kategorien: regionäre Lymphknoten

Bezeichnung	Definition
M0:	Keine Evidenz für Fernmetastasen
M1:	Fernmetastasen vorhanden
MX:	Das Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden

Tabelle 2.3: M-Kategorien: Fernmetastasen

Stadium	TNM-System	Dukes
0	Tis N0 M0	
I	T1 N0 M0 T2 N0 M0	A
II	T3 N0 M0 T4 N0 M0	B
III	jedes T N1 M0 jedes T N2,N3 M0	C
IV	jedes T jedes N, M1	D

Tabelle 2.4: Stadiengruppierung

Es gibt noch weitere Faktoren, die Rückschlüsse auf die Prognose des Kolonkarzinoms erlauben. Einer davon ist der histologische Differenzierungsgrad (G1–3), bei dem die Prognose um so schlechter ist, je weniger differenziert die Zellen sind (G1: gut differenziert; G2: mäßig differenziert; G3: undifferenziert).

Ein postoperativer Anstieg der Tumormarker Carcinoembryonales Antigen (CEA) und Ca-19-9 im Serum des Patienten kann ein Hinweis auf ein Rezidiv sein.

Außerdem wurde herausgefunden, dass ein anomaler DNA-Gehalt und spezifische Genommutationen in den Tumorzellen auf eine verstärkte Gefahr der Metastasierung hinweisen [Har 1995]. Besonders die Chromosomen 5q, 17p und 18p sind dabei betroffen. Das maligne Potential kolorektaler Karzinome scheint durch Mutationen und Deletionen von Tumor-Suppressorgen beeinflusst zu werden.

Möglicherweise kann das maligne Potential eines Tumors auch durch Molekularbiologische Analysen von Alterationen der DNA genauer bewertet werden. Beim Kolonkarzinom, besonders beim hereditären, nicht polypösen Typus konnte eine sogenannte Mikrosatelliteninstabilität nachgewiesen werden. Es handelt sich dabei um Replikationsfehler in Mikrosatellitenloki, die im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe eines Patienten beobachtet wurden. Mikrosatelliten sind dabei sich wiederholende Nukleotideinheiten, die sich in Introns oder zwischen Genen befinden [Scho 2001].

Weitere mögliche Prognosefaktoren im Hinblick auf die Metastasierung (Matrix-Metalloproteinasen und Tissue Inhibitors of Metalloproteinasen s. u.) sind in dieser Arbeit untersucht worden. Die 5-Jahres-Überlebensrate eines Karzinoms drückt prozentual aus, wie viele Patienten 5 Jahre nach der Diagnosestellung noch leben. Beim kolorektalen Karzinom korreliert die 5-Jahres-Überlebensrate mit den Dukes-Stadien. Diese verhält sich folgendermaßen: Dukes A bis 100 %, Dukes B bis 80 %, Dukes C bis 60 %, bei Dukes D beträgt die mittlere Überlebenszeit zwischen 6–9 bzw. 24–30 Monaten (je nach Schwere des Leberbefalls).

2.1.6 Metastasierungswege

Bei der Metastasierung des kolorektalen Karzinoms ist zu beachten, dass das distale Rektum einen anderen Metastasierungsweg durchläuft als das Restkolon. Der übliche Metastasierungsweg des Kolonkarzinoms führt zunächst in die regionalen Lymphknoten. Er erreicht dann über den Pfortaderkreislauf die Leber. Sie ist somit das bei der Fernmetastasierung am häufigsten befallene Organ. Es können über den Lungenkreislauf weiterhin Lunge, supraklavikuläre Lymphknoten, Knochen oder Gehirn befallen sein. Dies kommt nur selten ohne vorherigen Befall der Leber vor. Anders verhält es sich beim Karzinom des distalen Rektums. Beim distalen Rektumkarzinom wird der Pfortaderkreislauf durch Ausbreitung über die paravertebralen Venenplexus umgangen und Lunge und supraklavikuläre Lymphknoten direkt befallen.

2.2 Tumormetastasierung

2.2.1 Allgemeines

Die Tumormetastasierung ist das Phänomen, das am häufigsten die Ursache für den gefürchteten Krebsstod ist. Wie bereits beim Kolonkarzinom beschrieben, ist die Metastasierung *das* entscheidende Kriterium für die Prognose eines Tumorleidens. Metastasierung bedeutet, dass die Tumorzellen ihre Adhärenz zu ihrem Ursprungsgewebe verlieren, ihre Nachbargewebe infiltrieren, in Blutgefäße und Lymphspalten eindringen, mit dem Blutstrom in andere Gewebe verschleppt werden und die Fähigkeit haben, sich in fremder Umgebung weiterhin zu teilen. Dies kann zur Destruktion anderer lebenswichtiger Organe führen (beim Kolonkarzinom z. B. vor allem die Leber).

2.2.2 Wechselwirkungen der Tumorzellen mit der Extrazellulärmatrix

Wie kommt es zur Metastasierung? Zunächst sind die Tumorzellen noch in einem festen Gewebsverband, der von der Extrazellulärmatrix (ECM) begrenzt ist. Sie besteht u. a. aus verschiedenen Kollagenen und Proteoglykanen oder einer Basalmembran, die vorwiegend aus Typ-IV-Kollagen besteht. Für die Metastasierung ist ein Durchbruch durch diese Begrenzungen notwendig. Dies geschieht durch Wechselwirkungen der Tumorzelle mit der ECM und umfasst folgende drei Hauptschritte [Har 1995], [Li 1991]:

1. **Anheften** der Tumorzelle an die ECM (Basalmembran)
2. **Sekretion** gewebeauflösender Enzyme (z. B. Metalloproteinasen)

3. Zellwanderung in das aufgelöste Gewebe

Man vermutet, dass das Anheften an die ECM durch Rezeptoren geschieht, die der Plasmamembran der Krebszelle aufsitzen und die an Proteine der ECM wie Fibronectin, Typ-IV-Kollagen oder Laminin binden. Schon zwei bis acht Stunden nach Bindung an die ECM beginnt die Lyse und die Degradierung der den Tumor umgebenden Matrix. Dies geschieht einerseits durch direkte Produktion lysierender Enzyme, andererseits aber auch durch Induktion der Produktion ECM-degradierender Enzyme durch das gesunde, umliegende Gewebe [Ze 1996]. Das normalerweise bestehende Gleichgewicht zwischen gewebsauflösenden Enzymen und deren Inhibitoren wird im Fall der Tumordinvasion gestört. Im 3. Schritt wandern die Tumorzellen durch Ausbildung von Pseudopodien in das lysierte Gewebe ein. Die Bewegung ist gerichtet und kann durch Zytokine reguliert werden [Li 1991].

2.2.3 Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)

Ein entscheidender Schritt bei der Tumormetastasierung ist die Degradierung der ECM durch eine Produktion von lysierenden Enzymen, den Proteinasen. Es wurden eine Reihe Proteinase entdeckt, die bei aggressiven, invasiven Tumoren vermehrt exprimiert werden. Dazu gehören unter anderen Heparinasen, Serin, Thiol und die *Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)* [Li 1991]. Matrix-Metalloproteinasen sind eine Familie von mindestens 26 zink- oder kalziumabhängigen Hydrolasen, die sich durch ihre Substratspezifität und ihr Molekulargewicht unterscheiden. Im Jahr 2001 wurde MMP-28 kloniert [Mar 2001]. Sie werden von verschiedensten Zellen der ECM exprimiert wie zum Beispiel von Fibroblasten, Entzündungszellen, Endothel und Epithelzellen [Mo 1995]. Aber auch in verschiedenen Tumorzellen ist eine Expression von Metalloproteinasen (besonders MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9) nachgewiesen worden [Mo 1995], [Li 1991], [Dun 1996], [Em 1994], [Hon 1996], [Lev 1991], [The 1996], [Tur 1985], [Ze 1996]. MMPs sind in neutralem pH-Wert aktiv und werden in zymogener (inaktiver) Form sezerniert [Li 1989]. Das bedeutet, dass MMPs als Proenzyme abgegeben werden, deren Inaktivität durch die Interaktion einer Seitenketten-Sulfhydrylgruppe (Cystin) mit dem Metallatom des aktiven Zentrums aufrecht erhalten wird [Li 1991]. Die Aktivierung geschieht dann durch Reaktion verschiedener Substanzen (z. B. Trypsin, Plasmin, Hypochlorsäure) mit dem ans aktive Zentrum bindenden Cystin, wodurch dieses in eine nicht bindende Form überführt wird. Daraufhin wird eine Aminosäuresequenz (Propeptid) autokatalytisch abgespalten.

Die Regulation der Produktion und Aktivität von MMPs ist komplex und hängt u. a. von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und den *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs)* ab.

MMPs werden nach ihrer Substratspezifität in folgende Hauptgruppen eingeteilt [Li 1991], [Roe 2001a]:

1. **Kollagenasen**
2. **Gelatinasen** (Typ IV Kollagenasen)
3. **Stromelysine**
4. **Elastase**
5. **Membrangebundene MMPs**
6. **Matrilysin**
7. **Nicht klassifizierte MMPs**

Die Kollagenasen (MMP-1, -8 und -13), die hauptsächlich Kollagene vom Typ I, II, III und V spalten, initiieren die Degradation des nativen fibrillären Kollagens. Die dabei entstehenden Fragmente werden durch andere MMPs, wie z. B. die Gelatinasen (MMP-2 und -9), die vor allem selektiv Kollagen vom Typ IV spalten, weiter abgebaut. Stromelysine (MMP-3, -7, -10 und -11) können verschiedene Komponenten der ECM degradieren. Dazu gehören Proteoglykane, Nicht-Kollagen-Glykoproteine und die nicht kollagenen Domänen des Typ-IV-Kollagens. Die Elastase wird auch als MMP-12 bezeichnet. Die membrangebundenen MMPs, oder auch MT-MMPs (MMP-14, -15, -16, -17, -24 und -25), zeichnen sich durch eine transmembranäre Domäne in ihrer Struktur aus. Ein Überblick über die verschiedenen Matrix-Metalloproteinasen, ihre zahlreichen Pseudonyme, ihre Substrate und die Zellen, von denen sie exprimiert werden, ist in Tabellen 2.5 und 2.6 aufgeführt.

2.2.4 MMP-2 und MMP-9

Für die Tumormetastasierung beim Kolonkarzinom, die mit Durchbruch der Basalmembran der betreffenden Gewebsschicht beginnt, scheinen MMP-2 und MMP-9 von besonderer Wichtigkeit zu sein, da diese Matrix-Metalloproteinasen vornehmlich Typ-IV-Kollagen spalten, aus dem die Basalmembran größtenteils besteht. In Zellkulturen wurde nachgewiesen, dass die Höhe der Expression von MMP-9 und MMP-2 in Tumorzelllinien mit deren metastatischem Potential einhergeht. Bei Zellen mit hoher Aggressivität war die Expression von MMP-9 und MMP-2 im Gegensatz zu Zellen mit niedriger Aggressivität signifikant erhöht [Ber 1990], [Tur 1985], [Ura 1989].

MMP-2 (Gelatinase A) ist ein Enzym mit einem Molekulargewicht von 72 kDa in der inaktiven Form und 66 kDa in der aktiven Form und wird von Fibroblasten, Endothel und Tumorzellen (Mamma, Kolorektum, Pulmo, Prostata, Pankreas, Ovar) exprimiert. Neben der Spaltung von Typ-IV-Kollagen, spaltet sie auch Kollagen vom Typ V, VII, X und XI, Gelatin, Laminin, Fibronectin, Galektin-3

MMP	Namen	Substrate	Exprimierende Zellen
1	Typ-I-Kollagenase, Interstitielle Kollagenase, Gewebeskollagenase	Kollagene I, II, III, VII, X, Gelatine, Aggrecan, Kasein, α_1 -Proteinase-Inhibitor, Versican, Proteoglycan-Link-Protein, α_2 -Makroglobulin, Pregnancy-Zone-Protein, Ovostatin, Nidogen, Myelinbase-Protein, proTNF, L-Selektin, MMP-2, MMP-9	Tumorzellen (Mamma, Kolorektum, Prostata), Fibroblasten, Entzündungszellen
2	Gelatinase A, 72-kDa-Gelatinase, TBE-1	Kollagene I, IV, V, VII, X, XI, XIV, Gelatine, Elastin, Fibronectin, α_1 -Proteinase-Inhibitor, Laminin, Aggrecan, Versican, Proteoglycan-Link-Protein, Myelinbase-Protein, B Amyloid, APP 695, proTNF, MMP-9, MMP-13	Tumorzellen (Mamma, Kolorektum, Lunge, Prostata, Pankreas, Ovar), Fibroblasten, Endothel
3	Stromelysin-1, SL-1, PTR protein, Transin-1	Kollagene III, IV, VII, IX, X, Gelatine, Laminin, Fibronectin, Prokollagenase, Proteoglykan, Aggrecan, Versican, Perlean, Proteoglycan-Link-Protein, Elastin, Kasein, Fibrinogen, AT-III, α_2 -Makroglobulin, Ovostatin, α_1 -Proteinase-Inhibitor, Myelinbase-Protein, proTNF, MMP-1, -7, -8, -9 -13.	Tumorzellen (Mamma, Kolorektum, Lunge, Prostata, Pankreas), Fibroblasten, Endothel
7	PUMP-1 Protease, Matrilysin, Matrin, Uterine Metalloprotease	Kollagene VI,X, Gelatine, Laminin, Fibronectin, Kasein, Prokollagenase, Proteoglykan, Aggrecan, Proteoglycan-Link-Protein, Entactin, Elastin, Transferrin, Myelinbase-Protein, α_1 -Proteinase-Inhibitor, proTNF, MMP-1, -2, -9	Tumorzellen (Mamma, Kolorektum, Lunge, Prostata), Fibroblasten, Endothel
8	Neutrophile Kollagenase, PMNL-CL	Kollagene I, II, III, V, VII, VII, X, Gelatine, Aggrecan, α_1 -Proteinase-Inhibitor, α_2 -Antiplasmin, Fibronectin	Tumorzellen (Mamma)

Tabelle 2.5: Zusammenfassung der MMPs

MMP	Namen	Substrate	Exprimierende Zellen
9	Gelatinase B, 92-kDa-Gelatinase	Kollagene III, IV, V, VII, X, XIV, Gelatine, Elastin, Aggrecan, Versican, Proteoglycan-Link-Protein, Fibronectin, Nidogen, Myelinbase-Protein, proTNF, α_1 -Proteinase-Inhibitor	Tumorzellen (Mamma, Kolorektum, Lunge, Prostata, Pankreas, Ovar), Endothel, Entzündungszellen, Epithelzellen
10	Stromelysin-2, Transin-2, SL-2	Kollagene III, IV, V, IX, X, Gelatine, Laminin, Fibronectin, Prokollagenase, Kasein, Aggrecan, Elastin, Proteoglycan-Link-Protein, Fibronectin, MMP-1, -8	Fibroblasten
11	Stromelysin-3, SL-3, ST3	Laminin, Fibronectin, α_1 -Proteinase-Inhibitor	Tumorzellen (Mamma, Kolorektum, Lunge), Fibroblasten
12	Makrophagen-Metalloelastase, HME	Elastin (löslich und unlöslich), Insulin (β -Kette), Kollagen IV, α_1 -Proteinase-Inhibitor, Fibronectin, Vitronectin, Laminin, proTNF, Myelinbase-Protein	Tumorzellen (epitheliale Hauttumoren)
13	Kollagenase 3	Kollagene I, II, III, IV, Gelatine, Aggrecan, Perlecan, Tenascin	Tumorzellen (Mamma)
14	MT1-MMP	Kollagen I, II, III, Gelatine, Kasein, Elastin, Fibronectin, Laminin-B-Kette, Vitronectin, Aggrecan, Dermatansulphat-Proteoglykan, MMP-2, -13, proTNF	Tumorzellen (Mamma, Lunge, Pankreas, Ovar)
15	MT2-MMP	MMP-2, Gelatine, Fibronectin, Tenascin, Nidogen, Laminin	
16	MT3-MMP	MMP-2	
17	MT4-MMP	Fibrinogen, Fibrin, proTNF	
19		Aggrecan, COMP	
20	Enamelysin	Aggrecan, COMP	Tumorzellen (odontogene Tumoren)
23			
24	MT5-MMP	proMMP-2	
25	MT6-MMP		Tumorzellen (Kolon SW480, anaplastische Astrozytome, Glioblastome)

Tabelle 2.6: Zusammenfassung der MMPs, Fortsetzung

[Och 1994], Elastin und eine Anzahl weiterer Substrate.

MMP-9 (Gelatinase B) ist eine Gelatinase höheren Molekulargewichts. In ihrer inaktiven Form weist sie 92 kDa auf, in ihrer aktiven Form 86 kDa. MMP-9 wird ebenfalls von Tumorzellen (Mamma, Kolorektum, Pulmo, Prostata, Pankreas) und Endothel sezerniert, aber auch von Entzündungs- und Epithelzellen. Sie degradiert neben den Kollagenen vom Typ II, IV und V unter anderem auch Gelatin, Galektin-3 und Elastin.

2.2.5 Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs)

Die Sekretion und Aktivierung von Metalloproteinasen trägt zur Tumordinvasion- und Metastasierung bei, kann aber diese allein nicht bewirken. Grund dafür ist, dass in der Extrazellulärmatrix ebenfalls Inhibitor-Proteine von den Tumorzellen und den umgebenden Zellen sezerniert werden, die die Proteinase hemmen. Hauptvertreter der Inhibitorproteine sind die *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs)*. Man nimmt an, dass es erst bei einem Überhang von Metalloproteinasen in der Extrazellulärmatrix zur Tumordinvasion und -metastasierung kommt [Li 1991]. Das Gegenteil scheint der Fall zu sein, wenn ein Überhang an TIMPs vorliegt: es kommt zur Fibrose [Ire 1994], [Ire 2003], [Art 1998], [Ben 1996]. Abbildung 2.2 verdeutlicht in einem Modell den Zusammenhang zwischen MMPs und TIMPs in der ECM sowie die Auswirkungen einer Dysbalance.

Bisher sind folgende TIMPs bekannt: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 und TIMP-4. TIMPs sind Proteine, die sich an aktivierte Metalloproteinase spezifisch binden und diese hemmen können. Sie werden unabhängig voneinander von Substanzen wie dem Wachstumshormon TGF β und Zytokinen reguliert [Li 1991], [Ste 1990].

TIMP-1 ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 28.5–30 kDa. Es wird von Fibroblasten, Monozyten, Makrophagen, Chondrozyten, Synovialzellen und humanen Hepatomzellen exprimiert [Ko 1992]. Es kann alle MMPs außer MMP-14 und -19 binden. Weiterhin bindet es an proMMP-9. Positiv reguliert wird TIMP-1 durch TGF β 1, LIF, IL-6, IL-11, CNTF und andere Zytokine [Roe 1994]. Hemmend auf die Synthese wirken je nach Zelllinie IL-1 und TNF α . TIMP-1 bindet spezifisch an aktivierte MMP-1, Stromelysin und MMP-9. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine künstlich durch Transfektion hervorgerufene Überexpression von TIMP-1 in invasiven Tumorzellen die Invasionsfähigkeit der Zellen signifikant gesenkt hat [Kho 1992], [DCI 1992], so dass eine Hemmung der Metastasierung und Invasion durch eine Überexpression von TIMP-1 angenommen werden kann.

TIMP-2 ist ein nicht glykosylierter Proteaseinhibitor mit einem Molekulargewicht von 21 kDa. Es wird von Melanomzellen, Lungenfibroblasten, Fibrosakomzellen und anderen Tumoren sezerniert und, im Gegensatz zu TIMP-1, durch TGF β downreguliert [Ste 1990]. Eine Verstärkung der TIMP-2-Expression wird durch Prostaglandin

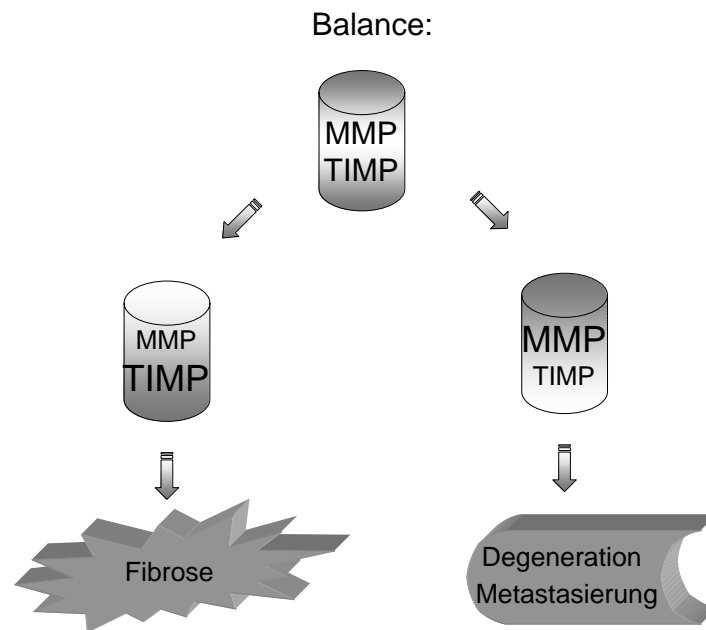


Abbildung 2.2: Gleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs in der Extrazellulärmatrix

E_2 (im Gegensatz zu TIMP-1) und Zytokine erreicht [Roe 1995]. TIMP-2 hat die Eigenschaft, an alle MMPs und proMMP-2 binden zu können. Albini et al. haben in Zellkulturen mit humanen Fibrosarkomzellen HT-1080 gezeigt, dass die Zugabe von endogenem TIMP-2 die Zellinvasion dieser Zelllinie blockiert [Alb 1991].

2.2.6 MMPs beim kolorektalen Karzinom

Wie bei vielen anderen Tumorarten spielen auch bei der Kolonkarzinommetastasierung und -invasion MMPs und TIMPs eine entscheidende Rolle. In einer Studie von Tomita et al. [To 1994] wurden unterschiedliche Stadien der Adenom-Karzinom-Sequenz von normaler Mukosa über Polypen bis zum Carcinoma in situ auf deren Expression von Metalloproteinasen und TIMPs untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Expression von MMP-2 und -9 sowie TIMP-1 und -2 korrelierend mit der Adenom-Karzinom-Sequenz stetig anstieg. Auffällig war aber, dass es bei der Expression der MMPs und TIMPs zwischen villösem Adenom und dem Carcinoma in situ einen deutlichen Sprung gab. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf eine Beteiligung von MMPs und TIMPs an der Tumorgenese des kolorektalen Karzinoms. Zu ähnlichen Ergebnissen kam eine Studie von Newell et al. [New 1994], bei der festgestellt wurde, dass MMP-2, MMP-3, MMP-7 und MMP-11 stärker in karzinomatösem Gewebe als in adenomatösem Gewebe exprimiert wurden.

Die Erkenntnis über die Regulation der Tumormetastasierung beim Kolonkarzinom kann für zukünftige Prognosefaktoren sowie Therapiemöglichkeiten eine große Rolle

spielen. Auch ist die Untersuchung der MMPs und TIMPs in menschlichem Karzinomgewebe von großer Wichtigkeit, um die Verhältnisse *in vivo* zu untersuchen. Daher wurden mittlerweile eine Anzahl von Studien über die Expression von MMPs und TIMPs beim kolorektalen Karzinom an menschlichem kolorektalen Karzinomgewebe durchgeführt. Da in Zellkulturen bereits eine Korrelation zwischen der Expression von Metalloproteinasen und der Tendenz zur Metastasierung und Invasion nachgewiesen wurde, ist auch die Untersuchung einer Korrelation zwischen der Expression von Metalloproteinasen und TIMPs und den klinischen Stadien des Kolonkarzinoms *in vivo* von besonders großem Interesse.

Insgesamt gesehen sind viele Matrix-Metalloproteinasen beim Kolonkarzinom in verschiedenen Studien identifiziert und deren Expression im Tumorgewebe mit der MMP-Expression in gesundem Darmgewebe verglichen worden. Zudem wurde eine Korrelation zu klinikopathologischen Variablen hergestellt.

Zu den im Kolonkarzinom identifizierten MMPs gehören MMP-1, -2, -3, -7, -9, und -13 [Roe 2004]. *Nicht* zu den im kolorektalen Karzinom beschriebenen Metalloproteinasen zählt zum Beispiel die MMP-10 [To 1994], [New 1994], [McD 1991].

Die **MMP-1** ist beim Kolonkarzinom im Gegensatz zu gesundem Gewebe als signifikant erhöht beschrieben worden. Als Methode war die Immunfixation mit monoklonalen Antikörpern gegen MMP-1 sowie die ELISA-Methode [Ba 2000], [Ga 1999a] angewandt worden. Es wurde auch eine Korrelation zwischen der MMP-1-Konzentration und einer schlechten Prognose des Patienten hergestellt [Mur 1996], [Dun 1996], die aber unabhängig vom Dukes-Stadium war. Die schlechte Prognose wurde damit erklärt, dass die MMP-1 vornehmlich die Kollagene I, II, und III degradiert, die Hauptbestandteile des Gastrointestinaltrakts sind. Baker et al. [Ba 2000] fanden dagegen eine Korrelation der MMP-1-Expression mit dem Dukes-Stadium, der Tumordifferenzierung und der Lymphknoteninvasion.

Eine Vielzahl von Autoren hat eine signifikante Erhöhung der **MMP-2** beim Kolonkarzinom beschrieben, die aufgrund ihrer Fähigkeit Kollagen IV zu spalten besonders am Prozess des Durchbruchs der Basalmembran zwischen Mukosa und Submukosa beteiligt sein soll. Es muss zwischen aktiver (66 kDa) und inaktiver MMP-2 (72 kDa) unterschieden werden [Pa 1998]. Dabei wurden zum Nachweis die Methoden der Immunfixation [Dun 1996], [Lev 1991], [New 1994], [To 1994], [Ri 1997], der Western- und Northern-Blot-Hybridisierung [Lev 1991], [Mu 1996], der Mikrodisektion [Em 1994], der In-Situ-Hybridisierung [New 1994], der qRT-PCR [He 2001], des Activity Assays [Ba 2001], [Wa 2002] und der Zymographie [To 1994], [Lia 1996], [Ga 1999a], [Pa 1998], [Ba 2000], [Wa 2002] angewandt. Die Ergebnisse über Korrelationen mit dem Dukes-Stadium waren widersprüchlich. Levi et al. 1991 [Lev 1991] haben mit Hilfe der Immunhistochemie eine Korrelation zwischen der Höhe der exprimierten MMP-2 und dem Dukes-Stadium festgestellt, in

der Northern-Blot-Hybridisierung konnte dies aber nicht bestätigt werden. Liabakk et al. [Lia 1996] untersuchten eine große Anzahl von Biopsien zymographisch und verglichen sie mit dem Dukes-Stadium. Dabei konnte keine klare Korrelation mit der Höhe der MMP-Expression festgestellt werden. Auch ergaben sich keine Korrelationen mit der Tumordifferenzierung und der 5-Jahres-Überlebensrate.

Baker et al. [Ba 2001] bestätigten diese Ergebnisse in ihren Zymographieuntersuchungen, haben jedoch mit Hilfe des Activity Assays ein Korrelation der gesamt MMP-2 (und MMP-9) mit Dukes-Stadium und Lymphknoteninvasion herstellen können. Dies konnte jedoch nicht für die aktive MMP-2 beschrieben werden.

Waas et al. [Wa 2002] beschreiben, dass sie mittels Zymographie eine signifikant negative Korrelation zwischen der Menge an aktiver und inaktiver MMP-2 und dem Tumorstadium (Dukes und TNM) herstellen konnten. Die MMP-2-Menge nahm also in den Gewebeproben höherer Tumorstadien ab. Es ergab sich kein Zusammenhang zwischen MMP-2-Aktivität und Alter, Tumorgröße oder Differenzierungsgrad.

Ring et al. 1997 [Ri 1997] konnten eine positive Beziehung zwischen der MMP-2-Expression und einem schlechten Differenzierungsgrad herstellen.

Arii et al. 1998 [Ar 1998] haben mit Hilfe der Northern-Blot-Hybridisierung MMP-2, MMP-9 und MT1-MMP in Kolonkarzinommetastasen (vor allem der Leber) untersucht und dabei festgestellt, dass Patienten, die gleichzeitig Lebermetastasen ausgebildet hatten, eine signifikant höhere Expression von mRNA aller MMPs aufwiesen als diejenigen ohne. Eine Korrelation mit anderen klinikopathologischen Variablen wie Alter, Geschlecht, Lokalisation [Mu 1996] oder der 5-Jahres-Überlebensrate [Ri 1997] wurde nicht beschrieben.

Weiterhin wurde eine Erhöhung der **MMP-7** im kolorektalen Karzinom gefunden. Dabei wurden Methoden der Immunfixation [Dun 1996], [New 1994], [McD 1991], der In-Situ-Hybridisierung [New 1994], [McD 1991], des Northern-Blots [McD 1991], [Mo 1995] und der Multiplex PCR [Roe 2004] angewandt. Mori et al. [Mo 1995] haben eine Korrelation zwischen der Höhe der MMP-7-Expression und dem Dukes-Stadium herstellen können, nicht aber mit Alter, Geschlecht, Tumor-Lokalisation, Größe oder Differenzierungsgrad des Tumors.

Die **MMP-9**, die wie die MMP-2 maßgeblich am Durchbruch durch die Basalmembran beteiligt ist, ist ebenfalls von vielen Autoren im kolorektalen Karzinom als erhöht beschrieben worden. Folgende Methoden wurden dabei angewandt: Immunfixation [Dun 1996], [Ri 1997], [To 1994], [Ze 1996], Zymographie [To 1994], [Lia 1996], [Ga 1999a], [Pa 1998], [Ba 2000], [Ba 2001], [Wa 2002], Northern-Blot-Hybridisierung [Ze 1996], [Mu 1996], Western-Blot-Analyse [Ze 1996] und Mikrodissektion [Em 1994] und qRT-PCR [He 2001] und der Activity Assay [Ba 2001], [Wa 2002]. Bernhard et al. berichten über eine Korrelation zwischen der Höhe der MMP-9-Expression und experimentellen Metastasen transformierter embryonaler Zellen bei Ratten [Ber 1990]. Koumura et al. [Kou 1997] konnten das in

vivo bestätigen, indem sie anhand der RT-PCR-Methode die MMP-9-DNA-Menge primärer Kolonkarzinom-Läsionen von Patienten mit Lebermetastasen mit denen von Patienten ohne bekannte Lebermetastasen verglichen. Bei Patienten mit Lebermetastasen war die MMP-9-DNA signifikant erhöht im Vergleich zu denen ohne Lebermetastasen.

Waas et al. [Wa 2002] stellten mittels Zymographie und Activity Assay keine Beziehungen zu klinikopathologischen Variablen her. Ausnahme war eine signifikante Beziehung zwischen MMP-9 und der *Tumorlokalisation*. Sie stellten dabei fest, dass die niedrigsten Pro-MMP-9-Mengen im Rektum und die höchsten im Colon ascendens zu finden waren.

Baker et al. [Ba 2001] haben mit Hilfe des Activity Assays eine Korrelation der Gesamt-MMP-9 mit Dukes-Stadium und Lymphknoteninvasion herstellen können. Die konnte allerdings nicht allein für die aktive MMP-9 beschrieben werden.

Eine Korrelation zwischen MMP-9-Expression und Tumordifferenzierung [Ze 1996], [Lia 1996], Dukes-Stadium [To 1994], [Lia 1996], [Ri 1997], Größe [Ze 1996] sowie Alter, Geschlecht, Lokalisation [Mu 1996] und der 5-Jahres-Überlebensrate [Ri 1997], [Lia 1996] konnte nicht hergestellt werden.

Eine weitere der zahlreichen MMPs beim Kolonkarzinom ist die **MMP-11**. Dies wurde mit Hilfe der Immunfixation [New 1994], der In-Situ-Hybridisierung [New 1994], [The 1996] und der Northern-Blot-Analyse [The 1996] nachgewiesen. Thewes et al. [The 1996] konnten dabei tendentielle Korrelationen der MMP-11-Erhöpfung mit der Tumorinvasivität, Lymphknotenmetastasen, Fernmetastasen und dem Differenzierungsgrad herstellen, es bestand allerdings keine Signifikanz. Sie machten ebenfalls die überraschende Entdeckung, dass um so mehr Lymphknoten vom Tumorgewebe befallen waren, je weniger MMP-11 produziert wurde. Die Variation der MMP-11-Expression zwischen den einzelnen Tumoren war groß, so dass MMP-11 nicht als geeigneter Prognosefaktor für das kolorektale Karzinom angenommen wurde.

Tabelle 2.7 fasst die relevanten MMPs beim Kolonkarzinom noch einmal zusammen und gibt einen Überblick über die Korrelation der MMP-Expression mit klinikopathologischen Variablen.

MMP-2 und MMP-9 im Blutplasma von Kolonkarzinompatienten

Zucker et al. [Zu 1993] machten die interessante Entdeckung, dass MMP-9 auch im Blutplasma von Patienten mit kolorektalem Karzinom erhöht war. Dies korrelierte aber nicht mit dem Krebsstadium. Tutton et al. [Tu 2003] haben mittels ELISA bestätigen können, dass MMP-9 und auch MMP-2 im Blutplasma von Patienten mit kolorektalem Karzinom verglichen mit gesunden Probanden signifikant erhöht waren. Die MMP-2- und MMP-9-Spiegel korrelierten dabei positiv mit dem Dukes-

MMP	Korrelation mit	keine Korrelation mit
1	Schlechter Prognose [Mur 1996][Dun 1996] Dukes Stadium [Ba 2000] Tumordifferenzierung [Ba 2000] Lymphknoteninvasion [Ba 2000]	Dukes Stadium [Mur 1996][Dun 1996]
2	Schlechtem Differenzierungsgrad [Ri 1997] Dukes Stadium [Lev 1991][Ba 2001] Lymphknotenbefall [Ba 2001] negative Korrelation zu Dukes [Wa 2002] Lebermetastasen [Ar 1998]	Alter [Mur 1996][Wa 2002] Geschlecht [Mur 1996][Wa 2002] Lokalisation [Mur 1996] 5-J.-Überlebensrate [Lia 1996][Ri 1997] Diff.-Grad [Lia 1996][Wa 2002] Dukes Stadium [Lia 1996] Tumorgroße [Wa 2002]
7	Dukes Stadium [Mo 1995]	Alter [Mo 1995] Geschlecht [Mo 1995] Lokalisation [Mo 1995] Größe [Mo 1995] Diff.-Grad [Mo 1995]
9	experimentellen Metastasen [Zu 1993] Lebermetastasen [Kou 1997] Lokalisation [Wa 2002] Dukes Stadium [Ba 2001] Lymphknotenbefall [Ba 2001]	Dukes Stadium [Wa 2002] Alter [Wa 2002], [Mu 1996] Geschlecht [Wa 2002][Mu 1996] Lokalisation [Mu 1996] Größe [Wa 2002][Ze 1996] Diff.-Grad [Wa 2002][Ze 1996][Lia 1996] 5-J.-Überlebensrate
11	negative Korrelation zu Lymphknotenbefall [The 1996]	Invasivität [The 1996] LK-Metastasen [The 1996] Fernmetastasen [The 1996] Differenzierungsgrad [The 1996]

Tabelle 2.7: Zusammenfassung der MMPs beim Kolonkarzinom und ihr Bezug zu klinikopathologischen Variablen

Stadium. Des weiteren beobachteten sie 6–12 Monate nach kurativer Therapie mit Tumorresektion einen signifikanten MMP-2- und MMP-9-Abfall im Blut. Sie vermuten daher, dass die Plasma-MMP-Spiegel ein guter Indikator für Invasion und Metastasierung beim Kolonkarzinom sein könnten. Weiterhin könnten sie zur Therapiekontrolle bei der Nachsorge dienen.

2.2.7 TIMPs beim kolorektalen Karzinom

In Zellkulturen wurde bereits die Eigenschaft der TIMPs, Metalloproteinasen und damit auch die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen zu hemmen, beschrieben. Auch wurde eine erniedrigte TIMP-Expression bei Zelllinien mit verstärkter Tumordinvasion und Metastasierung registriert und umgekehrt [Alv 1990]. Anders scheint dies beim kolorektalen Karzinom *in vivo* zu sein. Dort sind sich die meisten Autoren einig, dass die TIMP-Expression positiv mit Tumordinvasion

und Metastasierung korreliert und TIMPs genauso wie MMPs in kolorektalem Tumorgewebe verstärkt sezerniert werden.

Über **TIMP-1** liegen dabei die meisten Erkenntnisse vor. Anhand folgender Methoden ist festgestellt worden, dass TIMP-1 im kolorektalen Karzinomgewebe verglichen mit gesundem Darmgewebe erhöht war: Northern-Blot-Hybridisierung [Mu 1996], [Ze 1995b], Dot-Blot-Hybridisierung [Mu 1996], DNA-Sequenzanalyse [Lu 1991], ELISA [Lu 1991] und In-Situ-Hybridisierung [Ze 1995a]. Es konnten positive Korrelationen der Höhe der TIMP-1-Expression mit Lymphknoten-Metastasen [Mu 1996], [Ze 1995b], Fernmetastasen [Ze 1995b], dem Dukes-Stadium [Ze 1995b], [Mu 1996], der 5-Jahres-Überlebensrate [Mu 1996], der Aggressivität und dem Grad der Tumordinvasion [Lu 1991], [Ze 1995a] hergestellt werden. Alter und Geschlecht [Mu 1996], Größe, Differenzierungsgrad, TNM-Stadium [Ze 1995b] und Lokalisation [Ze 1995b], [Mu 1996] korrelierten dabei *nicht* mit der Höhe der TIMP-1-Expression.

Über **TIMP-2** beim Kolonkarzinom liegen nur sehr wenige Studien vor. Murashige et al. [Mu 1996] haben mit Hilfe der Northern-Blot-Hybridisierung keinen klaren TIMP-2-Nachweis im kolorektalen Karzinomgewebe erbringen können. In der Dot-Blot-Hybridisierung konnte TIMP-2 zwar nachgewiesen werden, war aber nicht signifikant erhöht. Es konnte eine Korrelation zwischen der Höhe der TIMP-2-Expression und dem Dukes-Stadium hergestellt werden, während die Höhe der TIMP-2-Expression *nicht* mit Alter, Geschlecht und Tumorlokalisation korrelierte. Ring et al. [Ri 1997] haben immunhistochemisch in der Basalmembran, im Stroma und subglandulär bei kolorektalem Karzinomgewebe TIMP-2 nachweisen können. Der positive TIMP-2-Nachweis korrelierte dabei mit einer längeren Überlebenszeit, nicht aber mit dem Differenzierungsgrad. Tabelle 2.8 fasst die TIMPs beim Kolonkarzinom zusammen und gibt einen Überblick über die Korrelation der TIMP-Expression mit klinikopathologischen Variablen.

TIMP	Korrelation mit	<i>keine</i> Korrelation mit
1	Invasivität LK-Metastasen Fernmetastasen Dukes-Stadium schlechter 5-Jahres- Überlebensrate	Alter Geschlecht Lokalisation Größe Differenzierungsgrad TNM-Stadium
2	Dukes-Stadium	Alter Geschlecht Lokalisation Differenzierungsgrad

Tabelle 2.8: Zusammenfassung der TIMPs beim Kolonkarzinom und ihr Bezug zu klinikopathologischen Variablen

Kapitel 3

Fragestellung

Metalloproteinasen und deren spezifische Inhibitoren (TIMPs) spielen bei der Tumorprogression des Kolonkarzinoms eine wichtige Rolle. Aus der Erforschung der Regulationsmechanismen der Tumorgenese und Metastasierung beim Kolonkarzinom könnten sich wichtige Hinweise für zukünftige Therapiemöglichkeiten (z. B. Hemmung der Tumormetastasierung durch spezifische TIMPs) oder neue Prognosefaktoren (TIMPs, MMPs) ergeben.

Diese Arbeit befasst sich daher mit der Expression von MMPs beim Kolon- und Rektumkarzinom. Es wurden 20 karzinomatöse Primärläsionen aus dem Kolon und 9 karzinomatöse Primärläsionen aus dem Rektum mit dem jeweiligen gesunden Darmgewebe desselben Patienten verglichen. Die MMP-Aktivität wurde anhand der Zymographie nachgewiesen und in der Western-Blot-Analyse bestätigt.

Beim Kolonkarzinom spielen die Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 durch ihre Aktivität bei der Degradierung der Basalmembran eine besonders wichtige Rolle. In der Literatur ist bereits bekannt, dass diese beiden Metalloproteinasen im Kolonkarzinomgewebe vermehrt exprimiert werden.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit folgenden Fragen zur MMP-2 und MMP-9:

- Bestätigt sich die Tendenz, dass MMP-2 und MMP-9 im kolorektalen Tumorgewebe im Gegensatz zu gesundem Gewebe verstärkt exprimiert werden?
- Welche MMP-2- und MMP-9-Aktivität ergibt sich bei Anwendung der Methode der Zymographie, die den Vorteil hat, die Menge an tatsächlich *aktiviertem* Enzym zu erfassen, im Gegensatz zu anderen Methoden, die die Enzym-Gesamtmenge messen?
- In bisherigen Studien wurde Kolon- und Rektumgewebe bei der Untersuchung von MMPs nicht getrennt betrachtet, obwohl distales Rektum und das Restkolon unterschiedliche Metastasierungswege haben. Unterscheiden sich Kolon und distales Rektum auch in ihrer MMP-Expression?

- Gibt es Korrelationen zwischen der MMP-Expression und klinikopathologischen Variablen wie Alter, Geschlecht, Tumorlokalisierung, TNM-Klassifikation, Dukes-Stadium, Differenzierungsgrad und Prognosefaktoren (CEA, Ca 19-9)?

Kapitel 4

Material und Methoden

Zum qualitativen und semiquantitativen Nachweis von Metalloproteinasen ist in der vorliegenden Arbeit die Zymographie angewendet worden, die die Enzymmenge der aktiven Enzyme zur Darstellung bringt. Mit Hilfe der Western-Blot-Analyse, die einen spezifischen Nachweis von Proteinen erbringen kann, wurden Zuordnung und Identifikation der in der Zymographie dargestellten Enzyme noch einmal bestätigt.

4.1 Material, Chemikalien

Alle Chemikalien, die wir für Zymographie sowie für den Western-Blot verwendeten, bezogen wir von der Firma *Merck*, den Stoff Acrylamid von der Firma *Appli-Chem*. Die Erstantikörper Anti-MMP-2-IgG und Anti-MMP-9-IgG für die Western-Blot-Analyse stellte die Firma *Calbiochem* zur Verfügung, den Anti-h-TIMP-1-IgG-Mausantikörper die Firma *ICN Biomedicals, Inc./Chemical Credential*. Den Anti-TIMP-2-IgG-Antikörper bezogen wir von der Firma *NMI (Novus Molecular Inc.)*, die Zweitantikörper Peroxidase-Konjugierte-Anti-Maus-IgG und Peroxidase-Konjugierte-Anti-Kaninchen-IgG von der Firma *DAKO*. Die für die Western-Blot-Analyse erforderliche Detektionslösung (ECL-Western blotting detection reagens) erhielten wir von der Firma *Amersham*.

4.2 Zusammentragen klinischer Daten

Die in diese Studie einbezogenen Patienten befanden sich zeitweise stationär in der chirurgischen Abteilung des Universitätsklinikums der RWTH Aachen, um sich einer Kolonteilresektion zu unterziehen. Allgemeine Informationen über die Patienten wie die Anamnese und der aktuelle Untersuchungsbefund sowie die bisher durchgeführten diagnostischen Untersuchungen (Sonographie, Endoskopie, CT, pathologische Gewebsuntersuchungen) konnten der Patientenakte entnommen werden. Außerdem wurden im Anschluss an die Resektion die OP-Berichte, Arztbriefe, die pathologi-

schen Befunde und die Daten aus der Poliklinik, in der sich die Patienten im Verlauf ihrer Krankengeschichte vorstellten, zusammengetragen.

4.3 Materialgewinnung

Das für die zymographischen Untersuchungen erforderliche kolorektale Gewebe der Patienten wurde direkt nach Kolonteilresektionen oder Rektumextirpationen aus dem Resektat entnommen. Dabei wurde beachtet, dass der zeitliche Abstand zwischen Resektion und Gewebsentnahme eine halbe Stunde nicht überschritt.

Die Gewebsentnahme erfolgte zunächst aus dem Anteil der gesunden Kolonschleimhaut im Resektat an einer Stelle, die mindestens 5 cm von der karzinomatösen Läsion entfernt war. Die Entnahme des Karzinomgewebes fand an einer Stelle statt, die möglichst nekrosearm und somit noch reich an lebenden Zellen war (Randzone). Das Gewebe wurde unmittelbar nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80°C aufbewahrt.

4.4 Herstellung von Zelllysaten

Für die Durchführung von Zymographien und Western-Blots müssen die Gewebeproben folgendermaßen aufbereitet werden: Aus dem entnommenen Kolonkarzinomgewebe und dem gesunden Gewebe aus der gleichen Resektion wird ein Zelllysat hergestellt, indem die Zellmembranen zerstört werden, die Proteine herausgelöst und vom restlichen Zellmaterial getrennt werden. Zur Herstellung der Zelllysate wird zunächst das bei -80°C aufbewahrte Gewebe unter ständiger Zugabe von flüssigem Stickstoff (N_2) zertrümmert und mit einem Mörser zu einem feinen Pulver zerrieben. Eine kleine Spatelspitze dieses Pulvers wird in $800\ \mu\text{l}$ Lysispuffer gelöst, stark geschüttelt und ca. 1/2 Stunde bei 4°C inkubiert. Danach werden die Proben 10 Minuten bei $14.000\ \text{rpm}$ zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich die Proteine gelöst haben, wird abgenommen, und das Pellet, das Zellkerne, Membranen und anderen Zellabfall enthält, wird verworfen.

Lysispuffer:

1 % Nonidet P40
10 mM Tris/HCl pH 7,4
0.4 % Na-Deoxycholat
60 mM EDTA

4.5 Proteinbestimmung nach Bradford und Verdünnung der Proben

Aus dem beschriebenen Überstand, dem fertigen Lysat, wird nun die Proteinkonzentration photometrisch nach Bradford bestimmt, um aus allen Lysaten Proben gleicher Proteinkonzentration herzustellen. Dazu werden $5 \mu\text{l}$ des Lysats mit $795 \mu\text{l}$ Wasser verdünnt und mit $200 \mu\text{l}$ Bio Rad Protein Assay versetzt. Durch Komplexbildung des im Bio Rad Protein Assay vorhandenen Coomassie-Brilliant-Blue G-250 mit den Proteinbindungen ändert das blaue Farbgemisch die Wellenlänge seines Absorptionsmaximums von 465 nm auf 595 nm . Die Intensität der Blaufärbung verhält sich direkt proportional zu der Konzentration an Proteinbindungen, so dass nun photometrisch die Proteingesamtkonzentration bestimmt werden kann. Nach guter Durchmischung und 5-minütiger Inkubationszeit kann die photometrische Messung erfolgen. Es werden dann Proben gleicher Proteinkonzentration aus den Lysaten hergestellt, die insgesamt ein Volumen von $20 \mu\text{l}$ haben.

4.6 Zymographie

Die Zymographie eignet sich sehr gut zum qualitativen und semiquantitativen Nachweis der aktiven Enzyme. Das Prinzip der Zymographie lässt sich folgendermaßen zusammenfassen:

Jeweils die gleiche Menge der hergestellten einheitlich verdünnten Proben wird auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, das Gelatine enthält. In einer Elektrophoresekammer wird eine Spannung angelegt und die Proteine jedes Lysats trennen sich nach ihrem Molekulargewicht auf. Zur Identifikation der Proteine läuft ein Marker mit Proteinen von genau definiertem Molekulargewicht mit. Als Kontrolle dient ein Standard, der zwei schon bekannte MMPs, nämlich MMP-9 und MMP-2, enthält und auf dem Gel mitläuft. Die Auftrennung der Proteine findet bei einer Temperatur von 4°C statt, bei der die MMPs inaktiv sind. Nach der Proteintrennung inkubiert das Gel über Nacht bei einer Temperatur von 37°C , bei der die Enzyme aktiv werden. Im aktiven Zustand spalten nun die MMPs die Gelatine, die im Gel enthalten ist. Nach dieser Inkubationszeit wird die Gelatine blau angefärbt und die Banden, in denen MMPs vorhanden sind, zeigen sich als helle Aussparungen. An diesen Stellen ist keine Gelatine mehr vorhanden, da sie gespalten worden ist und sich folglich auch nicht blau anfärben lässt. Aus dem Vorhandensein einer Bande kann man qualitativ den Schluss ziehen, dass MMPs an dieser Stelle vorhanden sind und aus der Breite und der Intensität der Bande kann man semiquantitativ auf die Menge an MMPs schließen (Je breiter und je intensiver weiß die Bande, desto größer ist die Menge an MMPs). Die Identifikation der MMPs kann anhand des Zymographiemarkers und des Größenstandards durchgeführt werden.

4.6.1 Herstellung der Gele

Das Zymographiegel, ein SDS-Polyacrylamidgel, besteht aus zwei Anteilen: Dem Sammelgel und dem Trenngel. Das Sammelgel enthält nur 4 %, das Trenngel 10 % Acrylamid. Im Sammelgel werden Taschen zur Auftragung der Proben eingegossen, außerdem hat dieses Gel die Funktion, dass sich die Proben am Übergang zum Trenngel sammeln und dort an einem gemeinsamen Punkt starten können. Im Trenngel werden die Proteingemische aufgetrennt.

Zunächst werden die zwei Glasplatten vorbereitet, zwischen die das Gel gegossen wird. Sie werden mit Alkohol gereinigt, durch einen Spacer (Gummiband) getrennt und mit vier Klemmen aneinander gepresst, so dass zwischen den Platten ein Spalt entsteht.

Danach beginnt man mit der Herstellung der Lösung für das Trenngel: Es werden 2.5 ml Wasser mit 7. mg Gelatine versetzt und so lange im Wasserbad erwärmt, bis sich die Gelatine gelöst hat. Danach wird die Lösung wieder abgekühlt, bevor die weiteren Stoffe hinzugegeben werden. Es werden nun 2.5 ml Acrylamid, 1.9 ml 1.5 M Tris/HCl pH 8.8 und 37.5 μ l SDS (20 %) hinzugefügt. Nach Zugabe von 6 μ l TEMED und 37.5 μ l APS (20 %) beginnt die Polymerisierung. Aus diesem Grund muss man die angefertigte Lösung nun möglichst schnell zwischen die zuvor vorbereiteten Glasplatten gießen. Auf die zwischen den Platten polymerisierende Lösung wird noch eine ca. 1 cm breite Isopropanolschicht gegeben, damit die Oberfläche glatt wird. Das so angefertigte Gel wird ca. 20 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach dieser Zeit hat es die gewünschte Konsistenz erreicht, die Polymerisierungsvorgänge sind abgeschlossen. Der Alkohol, der auf der Oberfläche schwimmt, wird abgegossen und die Oberfläche mit Papier getrocknet.

Herstellung des Sammelgels: Es werden 4 ml H₂O mit 635 μ l Acrylamid, 313 μ l 2 M Tris/HCl pH 6.8, 25 μ l SDS (20 %), 40 μ l APS (20 %) und 5 μ l TEMED versetzt. Dieses Gemisch wird rasch auf das eben angefertigte, sich zwischen den Glasplatten befindende Trenngel gegossen. Dabei muss beachtet werden, dass der Zwischenraum zwischen den Glasplatten ganz ausgefüllt ist. Auf das Sammelgel wird ein Kamm gesteckt. Wenn man diesen später herauszieht, entstehen Taschen für die Probenauftragung. Das Gel polymerisiert 30 Minuten bei Raumtemperatur. Während dieser Zeit können die Proben für die Zymographie aufbereitet werden.

Das Gel ist nun, nachdem man den Kamm herausgezogen hat, fertig und kann zwischen den Glasplatten in die Elektrophoresekammer eingebaut werden. Die Kammer wird mit einem Puffer gefüllt. Dabei muss ein geschlossenes System zwischen oberem und unterem Teil der Kammer entstehen. Eine mit Puffer gefüllte Spritze dient dazu, am Gel haftende Luftblasen zu entfernen und die Taschen im Sammelgel zu reinigen. Die Reinigung der Taschen ist besonders wichtig, da sonst bei Beginn der Zymographie nicht das ganze Probenvolumen in die Tasche passt, überläuft und die Ergebnisse verfälscht.

Trenngel (10 %):

2.95 ml H₂O
 7.5 mg Gelatine
 2.5 ml Acrylamid (30 %)
 1.9 ml 1.5 M Tris, pH 8.8
 37.5 μ l SDS (20 %)
 37.5 μ l APS (20 %)
 6 μ l TEMED

Sammelgel (4 %):

4 ml H₂O
 635 μ l Acrylamid (30 %)
 313 μ l 2 M Tris/HCl pH 6.8
 25 μ l SDS (20 %)
 40 μ l APS (20 % in H₂O)
 5 μ l TEMED

4.6.2 Auftrennung der Proteine und Spalten der Gelatine

Zunächst müssen die in gleicher Verdünnung vorliegenden Proben aufbereitet und die Metalloproteinasen aktiviert werden. Dazu werden die Proben mit 0.5 μ l 1M APMA (Aktivator der Metalloproteinasen) versetzt und 10 Minuten bei 37 °C im Wärmebad inkubiert. Danach gibt man ein Viertel des Gesamtvolumens eines Eppendorfgefäßes 4x-Lämmli-puffer dazu. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit bei 37 °C im Wärmebad werden die Proben mit Eis abgekühlt und sind fertig zum Auftragen auf das Gel. Dies muss nach Aktivierung der MMPs rasch erfolgen. Die Auftrennung der Proben erfolgt bei 4 °C (MMPs wieder inaktiv). Die Proben werden vorsichtig in die Taschen des Gels gefüllt. Dabei muss beachtet werden, dass keine Luftblasen entstehen und auch nichts von der Probe in die nächste Tasche überläuft. Auch der Marker (See Blue Pre-Stained Standard) wird, nachdem er fünf Minuten bei 95 °C behandelt wurde, auf das Gel aufgetragen. Er enthält Proteine mit Molekulargewichten in einer Spanne von 4–250 kDa. Nachdem auch der Standard auf das Gel aufgetragen wurde, kann die Spannung angelegt werden. Die Zymographie läuft ungefähr zwei Stunden bei 25–30 mA. Bei längerer Laufzeit wird das Gel zu heiß und die MMPs werden aktiv. Die Spannung wird auf 200 V limitiert. Die Proteine laufen von der Anode (-) zur Kathode (+). Nach Beendigung der Laufzeit wird die Spannung abgestellt und das Gel von der Kammer in eine Wanne mit Waschpuffer I gelegt. Darin wird es schwenkend zweimal eine Stunde gewaschen. Danach wird das Gel gründlich mit Wasser gespült, bis der ganze Waschpuffer entfernt ist. Das Gel inkubiert über Nacht in Waschpuffer II bei 37 °C. Während dieser Zeit sind die MMPs aktiv und zersetzen die Gelatine im Gel.

Am nächsten Tag wird das Gel eine Stunde in Coomassie-Blue gefärbt und danach in Methyl-Essigtfärber ein bis zwei Stunden entfärbt. Dabei werden langsam die weißen Banden auf dem tiefblauen Hintergrund des Coomassie-Blue sichtbar. Die Zymographie ist beendet, wenn die weißen Banden deutlich sichtbar sind, der Kontrast zum blauen Hintergrund aber noch groß genug ist. Die fertigen Zymographien werden nach Entfärbung fotografiert und dann im Vakuum zwischen Einmachfolie getrocknet.

Lämmli-puffer:

40 % Glycerin
8 % SDS
250 mM Tris/HCl pH 6.8
4 % Bromphenolblau

Waschpuffer I:

2.5 % Triton pur
50 M Tris/HCl pH 7.5
5 mM CaCl₂

Waschpuffer II:

50 mM Tris/HCl pH 7.5
1 M CaCl₂

Entfärber:

10 Vol % Eisessig
10 Vol % Methanol
80 Vol % H₂O

Coomassie-Blue-Farblösung:

1 g Coomassie-Blue
12 Vol % Isopropanol
40 ml Essig

4.7 Western-Blot-Analyse

Im Gegensatz zur Zymographie beruht der Vorteil der Western-Blot-Analyse auf seiner Spezifität. Diese wird dadurch erreicht, dass Proteine durch Bindung an einen spezifischen Antikörper detektiert werden können. Dies geschieht folgendermaßen: Zunächst wird, wie bei der Zymographie, das Proteingemisch im Lysat in einer Elektrophoresekammer auf einem SDS-Acrylamidgel aufgetrennt. Die Proteine, die sich nun auf dem Gel befinden, werden auf eine PVDF-Membran (Nitrocellulosemembran) „geblottet“. „Blotten“ bedeutet, dass die Proteine durch Anlegen einer Spannung vom Gel horizontal auf eine Membran wandern. Die Banden, die durch die Proteintrennung entstanden sind, bleiben dabei erhalten. Die Membran kann dann zur Antikörperpräzipitation weiterverwendet werden. Dazu wird sie zuerst in einer Blockierlösung inkubiert. Diese Blockierlösung sättigt alle überschüssigen Proteinbindungen ab. Danach wird die Membran mit dem spezifischen Antikörper gegen das gesuchte Protein inkubiert. Der Antikörper bindet an die zu detektierenden Proteine. Daraufhin inkubiert man die Membran mit einem zweiten Antikörper, der den spezifischen, an das Protein gebundenen Antikörper erkennt und mit dem Enzym Peroxidase (HRP= Horseradish Peroxidase) beladen ist. Dieser zweite Antikörper bindet an den ersten. Dabei wird ausgenutzt, dass Peroxidase zusammen mit Was-

serstoffperoxid in alkalischem Milieu Luminol oxidieren kann. Luminol wird so in einen angeregten Zustand überführt und emittiert beim Übergang in den Grundzustand Licht. Inkubiert man also die mit dem zweiten Antikörper beladene Membran in einer Detektionslösung, die u. a. Luminol und Wasserstoffperoxid enthält, so wird von den Proteinbanden, in denen sich Proteine spezifisch an den Antikörper gebunden haben, Licht emittiert. Indem man die Membran auf einen Fotofilm legt und diesen entwickelt, kann man anhand der schwarzen Banden auf dem entwickelten Film die Banden erkennen, die Licht emittiert hatten. In diesen Banden befinden sich die gesuchten Proteine.

4.7.1 Proteintrennung

Die Methode der Auftrennung der Proteine gleicht der bei der Zymographie angewandten Technik. Es wird ebenfalls ein SDS-Polyacrylamidgel verwendet, bei dem die Inhaltsstoffe die gleichen sind. Lediglich die Gelatine fehlt. Wir haben ein doppelt so großes, 12,5 %-iges Gel verwandt, um auch TIMPs detektieren zu können, die ein niedrigeres Molekulargewicht haben als die Metalloproteinasen (TIMP-1: 30 kDa, TIMP-2: 21 kDa).

Bevor die Proben auf das Gel aufgetragen werden, werden diese mit 1/4 Volumen Lämmli-puffer mit Mercaptoethanol versetzt, was zur Folge hat, dass die Proteine sich in der Lösung trennen. Diese wird gemischt und herunterzentrifugiert, bevor sie fünf Minuten bei 95 °C inkubiert. Dabei wird die Trennung der Proteine begünstigt. Danach werden die Proben zwei Minuten auf Eis abgekühlt und noch einmal zentrifugiert. Sie werden anschließend in die Taschen des Gels pipettiert.

In der Elektrophoresekammer fließt ein Strom mit 30 mA pro Gel. Es entsteht eine Spannung von ca. 300 mV. Die Spannung wird so lange angelegt, bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht hat.

Trenngel (12,5 %):

6.7 H₂O
5 ml Trenngelpuffer
8.3 ml Acrylamid (30 %)
150 µl APS (20 %)
5 µl TEMED

Sammelgel (3 %):

6.5 ml H₂O
2.5 ml Sammelgelpuffer
1.0 ml Acrylamid (30 %)
80 µl APS (20 % in H₂O)
5 µl TEMED

4x Lämmli-puffer mit Mercaptoethanol:

40 % Glycerin
8 % SDS
250 mM Tris/HCl pH 6,8
0.4 % Bromphenolblau
20 % Mercaptoethanol

4.7.2 Blotting-Methode

Der Sinn der Blotting-Methode besteht darin, dass die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Membran übertragen werden, die weiter bearbeitet werden kann.

Dazu wird ein Sandwich aus neun Lagen Whatman-Filter-Papier, der PVDF-Membran, dem SDS-Gel und abermals sechs Lagen Whatman-Filter-Papier gebildet. Die übereinandergelegten Membranen werden folgendermaßen vorbereitet:

Die PVDF-Membran wird fünf Sekunden in Methanol gehalten, fünf Minuten mit Wasser gespült und dann 10–20 Minuten in Anodenpuffer-II äquilibriert. Das SDS-Gel wird fünf Minuten in Kathodenpuffer äquilibriert. Während dessen werden sechs Whatman-Papiere kurz in Anodenpuffer-I und drei Whatman-Papiere in Anodenpuffer-II getränkt. Danach wird die PVDF-Membran aus der Schale mit Anodenpuffer-II und das Gel aus der Schale mit Kathodenpuffer herausgeholt. Weitere sechs Whatman-Filter-Papiere werden dann in Kathodenpuffer getränkt. Die vorbereiteten Membranen werden in die Elektrobloiting-Apparatur eingebaut und ein Strom mit einer Stromstärke von 10 mA/cm² Gelfläche wird für 1 Stunde angelegt. Der Strom fließt vertikal, d. h. vom Whatman-Filter-Papier über das SDS-Gel und die PVDF-Membran zum Whatman-Filter-Papier. Die negativ geladenen Proteine laufen in dieser Zeit vom Gel auf die PVDF-Membran in Richtung Kathode (+).

Anodenpuffer I:

0.3 M Tris-Base
20 % Methanol

Anodenpuffer II:

0.025 M Tris-Base
20 % Methanol

Kathodenpuffer:

0.04 M ϵ -Aminocapronsäure
20 % Methanol
0.01 % SDS

4.7.3 Protein-Detektion

Die PVDF-Membran mit den Proteinbanden wird nach Herausnehmen aus der ElektrobloTTing-Apparatur 10 Minuten in der Blockierlösung BSA (10 % in TBS-N-Puffer) geblockt. Dabei sollte beachtet werden, dass sich die Seite der Membran, auf der die Proteine aufliegen, in der Inkubationsschale oben befindet. Danach wird die Membran zwei mal 15 Minuten in TBS-N-Puffer gewaschen. Es folgt die einstündige Inkubation mit dem ersten Antikörper. Dabei handelt es sich je nach zu detektierendem Protein um Anti-MMP-2-, Anti-MMP-9- oder Anti-TIMP-1-Immunglobuline von der Maus und Anti-TIMP-2-Immunglobuline vom Kaninchen in antikörper-spezifischer Verdünnung. Weitere Waschgänge von einmal 15 Minuten und dann zweimal fünf Minuten in TBS-N-Puffer schließen sich an, bevor die Membran 30 Minuten im zweiten Antikörper inkubiert wird. Dabei handelt es sich um Peroxidase-Konjugierte-Anti-Maus-Immunglobuline vom Kaninchen für MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 und von der Ziege für TIMP-2. Wieder folgen Waschgänge von einmal 15 Minuten und vier mal fünf Minuten in TBS-N. Nun kann mit der eigentlichen Detektion begonnen werden. Dazu werden die Detektionslösungen A und B in gleicher Menge gemischt, und die Blotmembran wird eine Minute mit diesem Gemisch in Berührung gebracht. Nachdem diese gut abgetropft ist, wird sie luftblasenfrei in Folie eingewickelt, in eine Dunkelkammer gebracht und dort zur Exposition jeweils 30 Sekunden, 60 Sekunden und fünf Minuten auf einen Fotofilm gelegt. Daraufhin wird dieser entwickelt. Die Proteinbanden sind an den durch Lichtemission entstandenen schwarzen Banden erkennbar.

TBS-N-Puffer, pH 7.6:

20 mM Tris pH 7.5
137 mM NaCl
0.1 % Nonidet P 40
ad 1000 ml mit H₂O,
mit HCl den pH einstellen

Blockierlösung:

10 % BSA in TBS-N-Puffer

Anti-MMP-2-IgG (1.AK):

Klon: 42-5D11(5)
AK: monoklonal, Maus
Firma: Calbiochem
Verdünnung 1:1000

Anti-MMP-9-IgG (1.AK):

Klon: 7-11C(5.7)
AK: monoklonal, Maus
Firma: Calbiochem
Verdünnung 2:1000

Anti-hTIMP-1-IgG (1.AK):

Klon: 147-6D11

AK: monoklonal, Maus

Firma: Chemical Credential (ICN)

Verdünnung 1:1000

Anti-TIMP-2-IgG (1.AK):

Katalog-Nr.: N 40360

AK: polyklonal, Kaninchen

Firma: NMI

Verdünnung 1:1000

Peroxidase-Konjugierte-Anti-Maus-IgG (2.AK) :

Code No: P 0260; Lot 095

AK: Kaninchen, konjugiert mit HRP

Firma: DAKO

Verdünnung 1:1000

Peroxidase-Konjugierte-Anti-Kaninchen-IgG (2.AK) :

Code No: P 0448

AK: Ziege, konjugiert mit HRP

Firma: DAKO

Verdünnung 1:1000

Detektionslösung:

ECL-Western blotting detection reagens

Firma: Asherham

4.8 Auswertung

4.8.1 Densitometrie

Um die in der Zymographie entstandenen Banden semiquantitativ auszuwerten, wandten wir eine densitometrische Methode unter Zuhilfenahme des Fluor-S-Multi-Imager-Systems der Firma Bio Rad an. Dieses besteht aus einem Multi-Imager und einem Rechner der Firma Macintosh mit der Software Multi-Analyst. Im Multi-Imager ist eine Filmkamera installiert, die die auszuwertenden Objekte (z. B. Gele) filmt. Mithilfe des oben genannten Programms kann man dann die optische Dichte der auszuwertenden Objekte, in unserem Fall die einzelnen Banden der Zymographiegele, pro Quadratmillimeter messen. Als Bezugsdichte null ist der Hintergrund

definiert. Setzt man den gemessenen Dichtewert der Bande in Beziehung zum Hintergrundwert und bildet die Differenz, so ergibt sich daraus ein Absolutwert für jede Bande.

Entscheidend für die Auswertung ist aber nicht der Absolutwert selbst, sondern der Faktor, um den sich in jedem Bandenpaar die Absolutwerte des Karzinomgewebes von denen des gesunden Gewebes unterscheiden. Wir bildeten daher rechnerisch aus den Absolutwerten eines jeden Bandenpaars, das jeweils zu einem Patient gehörte, einen normierten Wert. Der Absolutwert des jeweils gesunden Gewebes wurde als 1 definiert. Mithilfe des Dreisatzes berechneten wir den Faktor, um den sich der Absolutwert des Karzinomgewebes vom Normalgewebe, d. h. vom Faktor 1 unterschied.

4.9 Statistik

Der normierte Wert wurde für alle Patienten aufsummiert, der Mittelwert gebildet und die Standardabweichung mit dem dazugehörigen mittleren Fehler der Standardabweichung (SEM) berechnet. Die daraus entstandenen summierten Werte für MMP-9 und MMP-2 (92 und 72 kDa) wurden in Blockdiagrammen dargestellt.

Folgende Formeln wurden zur Berechnung angewandt:

Mittelwert (M)

$$m = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_i$$

Standardabweichung (S)

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X_i - M)^2}$$

Standardfehler des Mittelwerts (SEM)

$$SEM = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

4.9.1 Signifikanztests

Bei der Beurteilung der Signifikanz stellen sich folgende Fragen:

1. Werden die MMPs im karzinomatösen Gewebe der Patienten signifikant stärker exprimiert als im nicht erkrankten Gewebe desselben Patienten?

2. Unterscheiden sich Kolon- und Rektumkarzinomgewebe in Bezug auf den MMP-Anstieg signifikant voneinander?

Aufgrund der unterschiedlichen Ausgangssituationen müssen in Fall 1 und 2 verschiedene Tests zur Anwendung kommen. Dabei wurde bei der Signifikanzberechnung Karzinomgewebe versus Normalgewebe (Fall 1) der *Kolmogoroff-Smirnoff-Test* und für die Signifikanzberechnung Rektum versus Kolon (Fall 2) der *Mann-Whitney-Test* verwendet.

Der Kolmogoroff-Smirnoff-Test

Bei der Signifikanzberechnung des MMP-Anstiegs im Karzinomgewebe versus Normalgewebe ergibt sich das Problem, dass wir bei unserer Auswertung einen normierten Wert aus der Konstante 1 (Normalgewebe) und aus einem absoluten Messwert berechnet haben. Da die beiden Messwerte voneinander abhängig sind, setzten wir für unsere Signifikanzberechnung nicht zwei Normalverteilungen voraus, sondern behandelten unsere Messreihe als *eine* Stichprobe. Aus diesem Grund war für die Signifikanzberechnung ein Einstichprobenrangtest, z.B. der Test nach Kolmogoroff-Smirnoff [Sa 2002] geeignet. Bei diesem Test wird eine theoretisch erwartete Verteilung in unserem Fall eine Konstante 1 (Normalgewebe)- mit einer gemessenen und rechnerisch angepassten Verteilung (normierte Werte) verglichen. Der Test ist verteilungsunabhängig und eignet sich besonders für kleine Stichproben.

Die *Nullhypothese* H_0 lautet: „Die Stichprobe entstammt der Verteilung“. Die *Alternativhypothese* H_1 lautet: „Die Stichprobe entstammt *nicht* der erwarteten Verteilung“. Das bedeutet, dass die Alternativhypothese gelten würde, wenn es eine signifikante Unterscheidung zwischen Normal- und Karzinomgewebe geben sollte.

Zur Überprüfung der Signifikanz wird der *Prüfquotient* D ermittelt. Ist der errechnete *Prüfquotient* D größer oder gleich dem aus einer Tabelle bei entsprechender Stichprobenzahl (n) und Signifikanzniveau (α) entnommenen, *kritischen Prüfquotient* $D_{n,\alpha}$, so wird die Nullhypothese verworfen und die beiden Verteilungen unterscheiden sich signifikant. Es gilt:

$D \geq D_{n,\alpha} :$ Die Nullhypothese wird verworfen.

$D < D_{n,\alpha} :$ Die Nullhypothese wird *nicht* verworfen.

Der *Prüfquotient* D wird folgendermaßen berechnet: Zunächst werden die unter der Nullhypothese erwarteten absoluten Häufigkeiten (E), in unserem Fall entsprechend der Konstante 1 des Normalgewebes, und die der beobachteten absoluten Häufigkeiten (B), in unserem Fall entsprechend den normierten Werten, bestimmt. Daraus

werden Summenhäufigkeiten (F_E, F_B) gebildet, zwischen denen Differenzen berechnet werden. Die maximale Differenz ($\max(|F_E - F_B|)$) geht in die Bestimmung von D ein, indem sie durch die Stichprobenanzahl (n) geteilt wird.

$$D = \frac{\max(|F_E - F_B|)}{n}$$

Der Mann-Whitney-Test

Beim Vergleich zweier gleichwertiger Stichproben, nämlich der normierten Werte der Kolonpatienten mit denen der Rektumpatienten, kann ein Zweistichprobentest verwendet werden. Da es sich nicht sicher um zwei Normalverteilungen handelt und die Stichprobenzahl sehr klein ist, eignet sich ein Rangtest. Der Mann-Whitney-Test eignet sich bei ordinalen Daten und kleinen Stichproben und ist verteilungsunabhängig.

Auch bei diesem Test gibt es eine Null- und eine Alternativhypothese. Die *Nullhypothese* H_0 lautet: „Die Stichproben unterscheiden sich *nicht*.“ Die *Alternativhypothese* H_1 lautet: „Die Stichproben unterscheiden sich.“ In unserem Falle würde sich Kolon von Rektumgewebe signifikant unterscheiden, wenn die Alternativhypothese gelten würde.

Als Kriterium wird eine *Prüfgröße* U ermittelt, die mit einer tabellarisch entnommenen, *kritischen Prüfgröße* $U_{n,\alpha}$, abhängig von Stichprobenanzahl und Signifikanzniveau, verglichen wird. Ist die errechnete *Prüfgröße* U kleiner oder gleich der *kritischen Prüfgröße* $U_{n,\alpha}$, so wird die Nullhypothese verworfen und die Verteilungen unterscheiden sich signifikant. Es gilt:

$U \leq U_{n,\alpha}$: Die Nullhypothese wird verworfen.

$U > U_{n,\alpha}$: Die Nullhypothese wird *nicht* verworfen.

Zur Berechnung der Prüfgröße U werden für beide Stichproben Rangreihen aufgestellt und Rangnummern nach Messwertgröße zugeordnet. Getrennt für beide Stichproben werden dann die Rangnummern addiert und Rangsummen (R_1, R_2) berechnet. Aus R_1 und R_2 werden in Abhängigkeit der Stichprobengrößen (m, n), in unserem Falle 19 und 10, die Größen U_1 und U_2 nach folgender Formel berechnet:

$$U_1 = mn + \frac{1}{2}m(m+1) - R_1$$

$$U_2 = mn + \frac{1}{2}n(n+1) - R_2$$

Als Prüfgröße U gilt die kleinere der beiden Zahlen U_1 und U_2 :

$$U = \min(U_1, U_2)$$

P-Werte

Die Ergebnisse der beiden Tests wurden in P-Werte umgerechnet. Dies ist das maximale Niveau, zu dem der Test die Nullhypothese noch ablehnt. Von einem statistisch signifikanten Gruppenunterschied wird gesprochen, wenn rechnerisch das Signifikanzniveau von $\alpha=0.05$ unterschritten wird. Als hochsignifikant gelten Unterschiede, bei dem der P-Wert kleiner als das Signifikanzniveau $\alpha=0.01$ ist.

Kapitel 5

Ergebnisse und Auswertung

5.1 Klinische Daten

Es wurden 20 Patienten mit histologisch gesichertem Kolon- und 9 Patienten mit histologisch gesichertem Rektumkarzinom in unsere Studie aufgenommen und jeweils eine Gewebeprobe asserviert. Die klinischen Daten stammen aus den Patientenakten des Universitätsklinikums Aachen. Als wichtigste klinikopathologische Variablen für diese Arbeit wurden Alter, Geschlecht (Geschl.), Tumorlokalisation (Lok.), TNM-Stadium, Dukes-Stadium und Differenzierungsgrad G (Diff.-G) gezählt. Sie sind für die Kolonkarzinompatienten in Tabelle 5.1, für die Rektumkarzinompatienten in Tabelle 5.3 zusammengefasst. Tabellen 5.2 und 5.4 führen die Tumormarker CEA und Ca 19-9, die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG), das C-reaktive Protein (CRP), die Laktatdehydrogenase (LDH) und den Hämoglobinwert (Hb) bei Kolon- und Rektumkarzinompatienten auf.

Bei der Dokumentation der Laborparameter war es nicht möglich alle Daten vollständig zu erheben, da präoperativ bei vielen Patienten nicht alle der oben genannten Werte bestimmt worden waren.

Bei den Kolonkarzinompatienten (Tabelle 5.1) beobachteten wir eine Altersspanne von 37–86 Jahren, das Durchschnittsalter lag bei 65 Jahren. 55 % der Patienten waren männlichen, 45 % weiblichen Geschlechts. Bei der Mehrzahl der Patienten, bei 75 %, war der Tumor im Sigma (Sig.) lokalisiert, bei 10 % im Colon descendens (C. d.), bei 5 % an der rechten Fexur (r. F.) und bei 10 % im Coecum (Coe.). Zum Zeitpunkt der Operation befanden sich 15 % der Patienten im Stadium Dukes A, 40 % im Stadium Dukes B, 35 % im Stadium Dukes C und 10 % im Stadium der Fernmetastasierung Dukes D. Der Differenzierungsgrad reichte von G1–G3, wobei 5 % einen Differenzierungsgrad von 1–2 hatten, 45 % einen Differenzierungsgrad von G2, 35 % G2–3 und 15 % einen Differenzierungsgrad von G3.

Bei den Laborparametern (Tabelle 5.2) war auffällig, dass bei 53 % der Patienten der CEA-Wert erhöht war, der Ca 19-9-Wert nur bei 7 % der darauf untersuchten Patienten. Die LDH-Werte lagen bis auf eine Ausnahme im Normalbereich, der Hb

Pat.-Nr.	Alter (J.)	Geschl. (m/w)	Lok. (cm)		TNM	Dukes	Diff.-G
K 1	67	m	Sig	18	T2N0M0	A	2-3
K 2	60	m	Sig	36	T4N0M0	B	2
K 3	47	m	C. d.	50	T3N2Mx	C	2-3
K 4	86	w	r. F.	70	T3N0M0	B	2
K 5	56	w	Sig	18	T3N2M1	D	2-3
K 6	63	w	Sig	15	T3N0M0	B	2-3
K 7	48	m	Sig.	35	T3N2Mx	C	2-3
K 8	66	m	Sig	40	T4N2Mx	C	3
K 9	59	w	Coe.	n. d.	T3N0Mx	B	2
K 10	58	m	Sig	30	T3N2M1	D	2-3
K 11	77	w	Sig	25	T3N2Mx	C	2
K 12	37	m	Sig	20	T3N1Mx	C	3
K 13	68	m	Coe.	n. d.	T3N0Mx	B	3
K 14	84	w	Sig		T3N1Mx	C	2
K 15	73	m	Sig	26	T3N0Mx	B	2-3
K 16	65	w	Sig	29	T3N0Mx	B	2
K 17	77	m	Sig	22	T3N0Mx	B	1-2
K 18	63	w	Sig	32	T2N0Mx	A	2
K 19	71	m	C. d.	50	T3N2Mx	C	2
K 20	77	w	Sig	15	T2N0Mx	A	2

Tabelle 5.1: Klinikopathologische Variablen der Kolonkarzinompatienten

war bei 38 % der Patienten erniedrigt.

Bei den Rektumkarzinompatienten (Tabelle 5.3) beobachteten wir eine Altersspanne von 37–79 Jahren und ein Durchschnittsalter von 61 Jahren. 46 % der Patienten waren männlichen und 44 % weiblichen Geschlechts. Die Tumoren waren alle im Rektum (bis 14 cm ab ano) lokalisiert, dabei 33 % im distalen Rektum (< 6 cm). Es befand sich keiner der untersuchten Patienten im Stadium Dukes A, 11 % im Stadium B, 67 % im Stadium Dukes C und 22 % im Stadium der Fernmetastasierung Dukes D.

Unter den Laborparametern (Tabelle 5.4) waren bei 78 % die CEA-Werte erhöht, die Ca 19-9-Werte bei 56 %. Bei den nur 5 auf die BSG untersuchten Patienten zeigte diese bei 3 (60 %) von ihnen eine Erhöhung, die LDH war bei 86 % der darauf untersuchten Patienten normal. Der Hb war bei 71 % der darauf untersuchten Patienten erniedrigt.

Pat.- Nr.	CEA (ug/l)	Ca 19-9 (U/l)	BSG (mm/h)	CRP (ng/l)	LDH (U/l)	Hb (g/l)
K 1	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
K 2	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
K 3	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	139 n	90 -
K 4	7.4 +	6.0 n	n. d.	n. d.	174 n	124 n
K 5	4310.0 ++	n. d.	48 ++	n. d.	421 ++	137 n
K 6	8.8 +	39.0 +	n. d.	n. d.	192 n	135 n
K 7	24.9 +	<5 n	n. d.	<5 n	163 n	99 -
K 8	21.8 +	17.6 n	n. d.	n. d.	131 n	140 n
K 9	0.7 n	<5 n	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
K 10	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	178 n	135 n
K 11	8.4 +	5.0 n	n. d.	<5 n	153 n	116 -
K 12	4.5 n	25.3 n	n. d.	n. d.	179 n	112 -
K 13	9.7 +	36.7 n	n. d.	n. d.	133 n	145 n
K 14	19.9 +	<5 n	n. d.	122 +	142 n	118 -
K 15	2.3 n	17.1 n	n	n	194 n	141 n
K 16	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
K 17	2.3 n	13.0 n	7/19 n	n. d.	185 n	152 n
K 18	3.2 n	2.2 n	73/120 +	15 +	152 n	122 n
K 19	1.4 n	23.0 n	n. d.	n. d.	184 n	144 n
K 20	3.0 n	13.2 n	n. d.	13 +	197 n	97 -

Tabelle 5.2: Laborparameter der Kolonkarzinompatienten (- erniedrigt; **n** normal; + erhöht; ++ stark erhöht; **n.d.**: nicht dokumentiert)

Pat.- Nr.	Alter (J.)	Geschl. (m/w)	Lok. (cm)	TNM	Dukes	Diff.- G
R 1	69	w	prox. R.	T3N2M1	D	3
R 2	73	w	6	T4N2Mx	C	3
R 3	79	m	14	T3N2Mx	C	2
R 4	37	m	6	T3N1Mx	C	3
R 5	59	m	6	T3N2Mx	C	2-3
R 6	70	m	5	T3N2M1	D	2-3
R 7	57	w	6	T3N1Mx	C	2-3
R 8	45	w	1	T3N0Mx	B	2
R 9	60	m	1	T2N1Mx	C	2

Tabelle 5.3: Klinikopathologische Variablen der Rektumkarzinompatienten

Pat.- Nr.	CEA (ug/l)	Ca 19-9 (U/l)	BSG (mm/h)	CRP (ng/l)	LDH (U/l)	Hb (g/l)
R 1	145.0 ++	685.0 ++	150/80 +	146 +	1734 ++	107 -
R 2	10.6 +	55.0 +	130/70 +	n. d.	138 n	115 -
R 3	19.4 +	17.9 n	52/85 +	n. d.	191 n	121 -
R 4	4.5 n	25.3 n	n. d.	n. d.	179 n	112 -
R 5	29.3 +	42.5 +	n. d.	n. d.	187 n	158 n
R 6	8514.0 ++	2296.0 ++	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
R 7	46.9 +	88.2 +	9/27 n	n. d.	183 n	132 n
R 8	32.0 +	51.1 n	44/74 +	n. d.	157 n	111 -
R 9	1.9 n	< 5 n	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.

Tabelle 5.4: Laborparameter der Rektumkarzinompatienten (- erniedrigt; **n** normal; + erhöht; ++ stark erhöht; **n.d.**: nicht dokumentiert)

5.2 Zymographien

Im folgenden werden die Zymographien der Patienten mit Kolon- und Rektumkarzinom dargestellt. Die Beschriftungsnummer in den Bildern und Diagrammen stimmt mit der Patientenummer (Pat.-Nr.) der klinischen Tabellen überein. Zum direkten Vergleich wurde bei der Zymographie das gesunde Gewebe der Patienten neben dem karzinomatösen Gewebe aufgetragen. Das heisst, dass auf dem Zymographiegel pro Patient zwei Banden zu sehen sind. Links ist immer das gesunde Darmgewebe (G), rechts das Karzinomgewebe (Ca) abgebildet. So konnte gesundes Gewebe direkt mit karzinomatösem verglichen und ausgewertet werden. Dabei galt, dass die Bande um so deutlicher war, je größer die Aktivität des Enzyms war. Die Lysate sind in der Reihenfolge der Gewebsasservation aufgetragen worden, so dass die Reihenfolge der Patienten nicht nach Kolon- und Rektumkarzinom geordnet ist und die Bandenpaare nicht der Reihenfolge der Patientenummern entsprechen. Es wurden 3 Banden ausgewertet, die von MMP-9 und MMP-2 hervorgerufen wurden. Die erste Bande bei 92 kDa entspricht der MMP-9. Die MMP-2-Fraktion teilt sich in 2 Banden auf, die 72 kDa-Bande (schwere Form der MMP-2) und die 66 kDa-Bande (leichte Form der MMP-2). Die schwere Form entspricht dabei der inaktiven MMP-2 (Proenzym ist noch nicht abgespalten), die leichte der schon aktivierten Form. Die MMP-9-Bande besteht ebenfalls aus zwei sehr nahe beieinander laufenden Banden. Da diese aber in fast allen Fällen gleiche Densitometriewerte ergaben, wurde nur die obere Bande ausgewertet und für die Statistik verwandt.

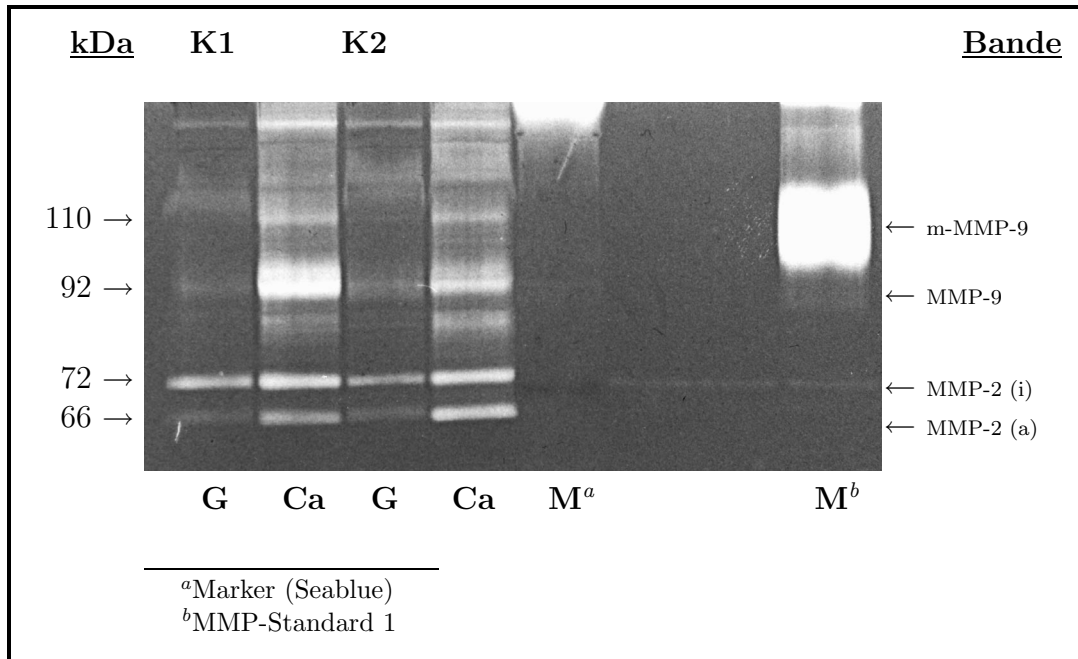


Abbildung 5.1: Zymographie. **K**: Kolon, **G**: gesundes Gewebe, **Ca**: Karzinomgewebe, weiße Banden: positiver Proteinase-Nachweis, **kDa**: Molekulargewicht, **m-MMP-9**: murine MMP-9, **MMP-2 (i)**: inaktive MMP-2, **MMP-2 (a)**: aktive MMP-2.

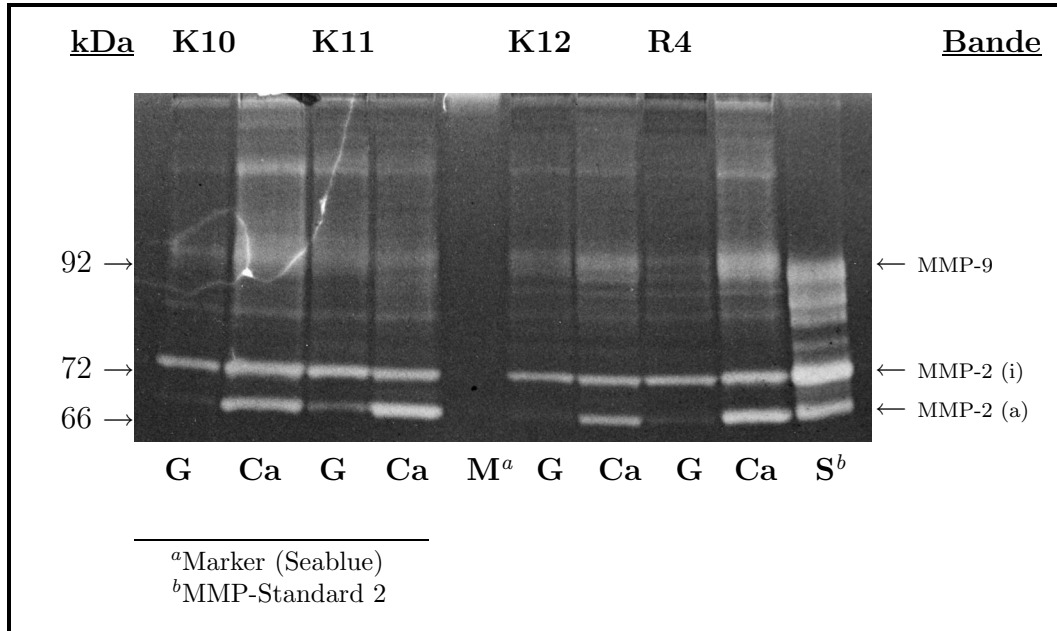


Abbildung 5.2: Zymographie. **K**: Kolon, **R**: Rektum, **G**: gesundes Gewebe, **Ca**: Karzinomgewebe, weiße Banden: positiver Proteinase-Nachweis, **kDa**: Molekulargewicht, **MMP-2 (i)**: inaktive MMP-2, **MMP-2 (a)**: aktive MMP-2.

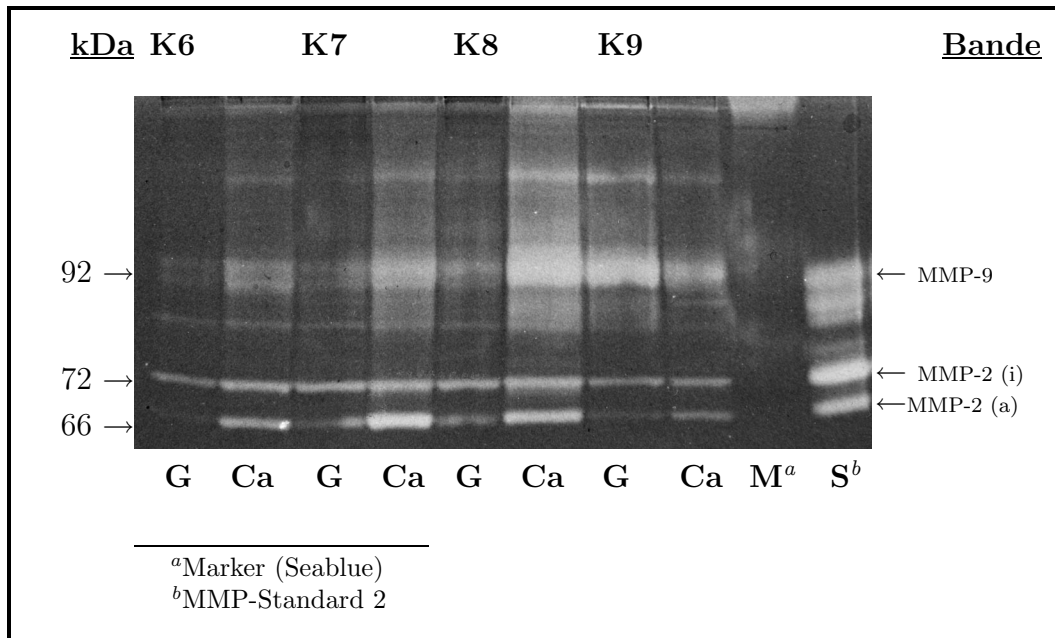


Abbildung 5.5: Zymographie. **K**: Kolon, **G**: gesundes Gewebe, **Ca**: Karzinomgewebe, weiße Banden: positiver Proteinase-Nachweis, **kDa**: Molekulargewicht, **MMP-2 (i)**: inaktive MMP-2, **MMP-2 (a)**: aktive MMP-2.

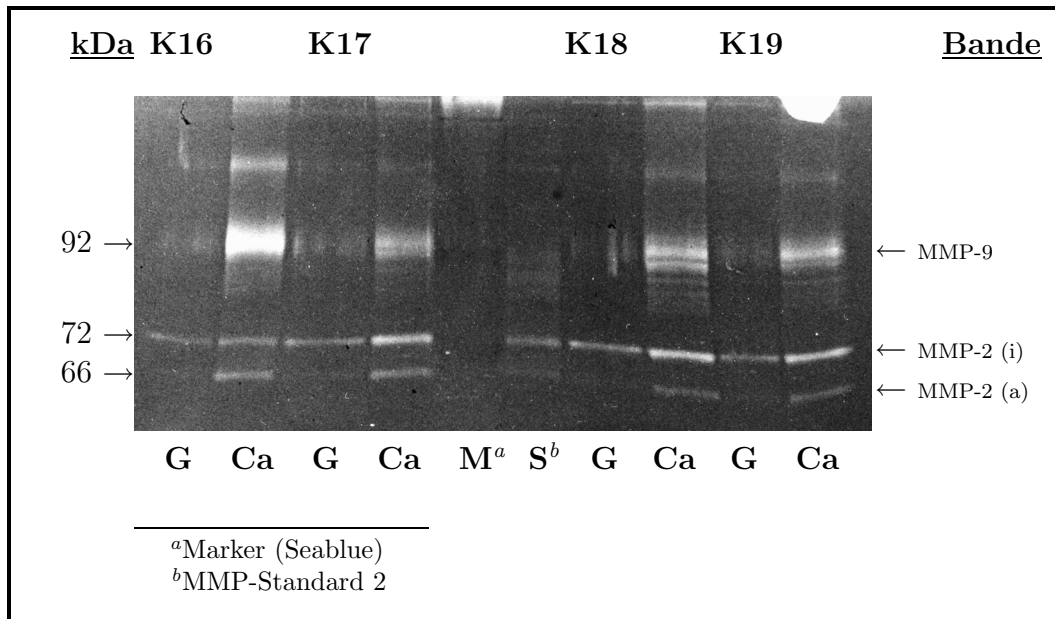


Abbildung 5.6: Zymographie. **K**: Kolon, **G**: gesundes Gewebe, **Ca**: Karzinomgewebe, weiße Banden: positiver Proteinase-Nachweis, **kDa**: Molekulargewicht, **MMP-2 (i)**: inaktive MMP-2, **MMP-2 (a)**: aktive MMP-2.

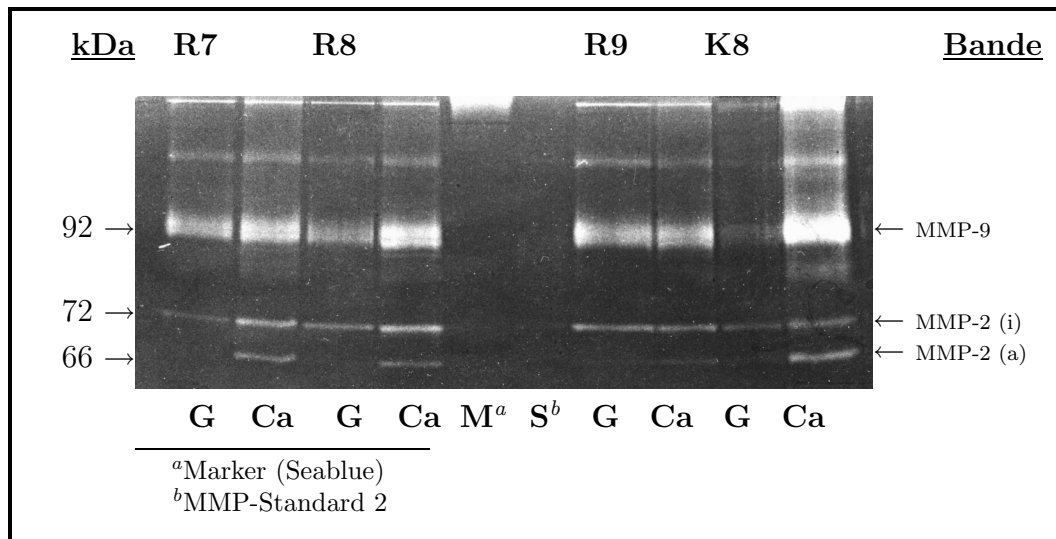


Abbildung 5.7: Zymographie. **K**: Kolon, **R**: Rektum, **G**: gesundes Gewebe, **Ca**: Karzinomgewebe, weiße Banden: positiver Proteinase-Nachweis, **kDa**: Molekulargewicht, **MMP-2 (i)**: inaktive MMP-2, **MMP-2 (a)**: aktive MMP-2.

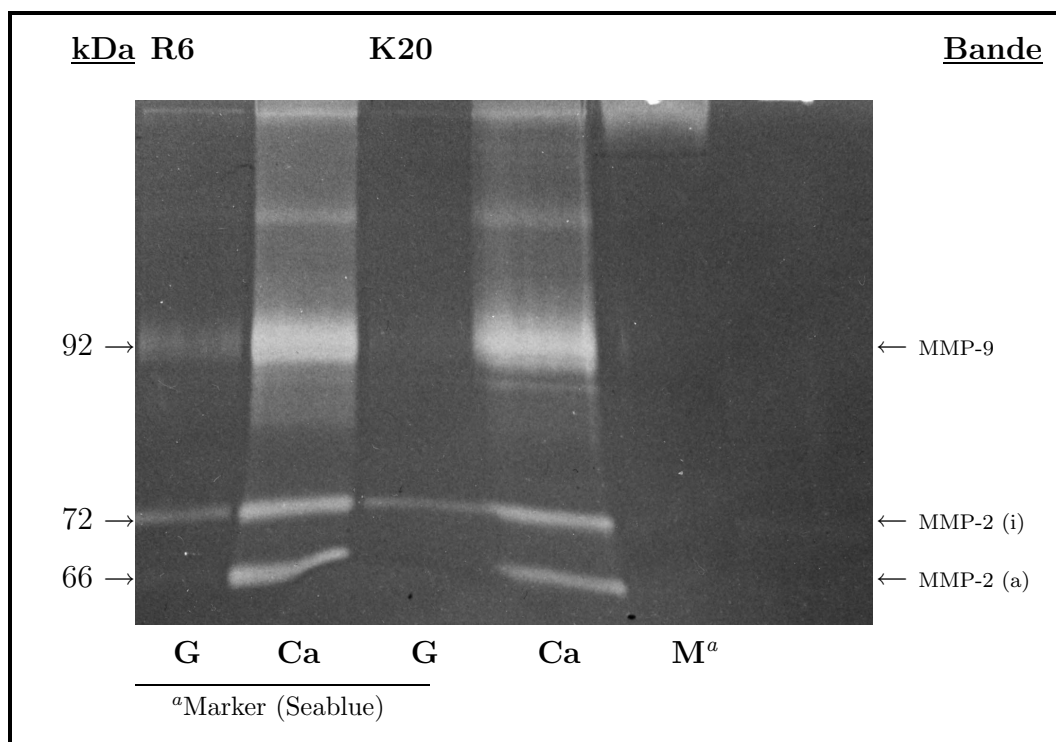


Abbildung 5.8: Zymographie. **R**: Rektum, **G**: gesundes Gewebe, **Ca**: Karzinomgewebe, weiße Banden: positiver Proteinase-Nachweis, **kDa**: Molekulargewicht, **MMP-2 (i)**: inaktive MMP-2, **MMP-2 (a)**: aktive MMP-2.

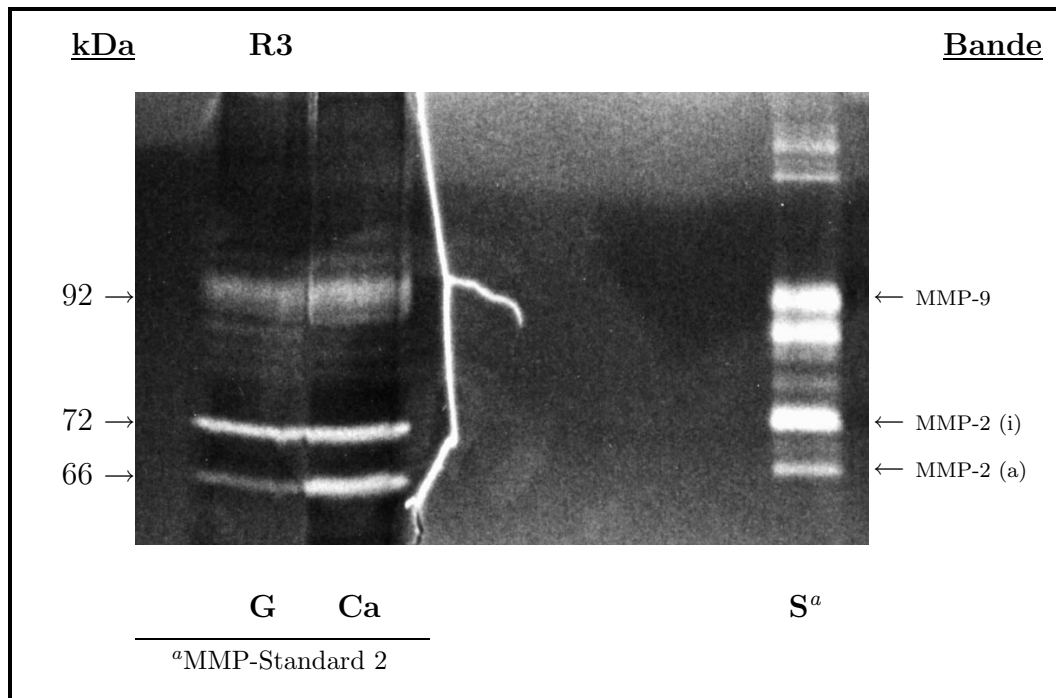


Abbildung 5.9: Zymographie. **R**: Rektum, **G**: gesundes Gewebe, **Ca**: Karzinomgewebe, weiße Banden: positiver Proteinase-Nachweis, **kDa**: Molekulargewicht, **MMP-2 (i)**: inaktive MMP-2, **MMP-2 (a)**: aktive MMP-2.

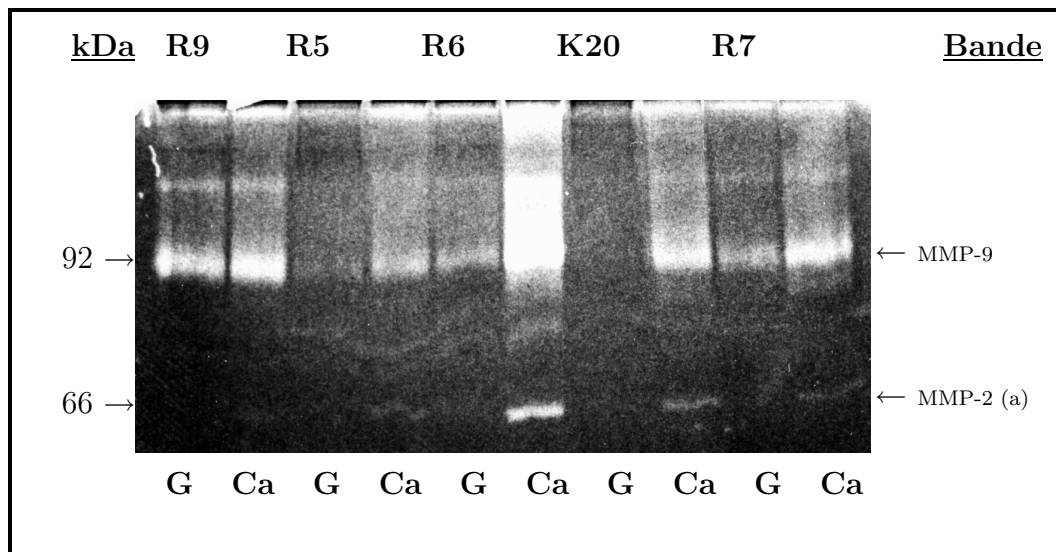


Abbildung 5.10: Zymographie. **R**: Rektum, **G**: gesundes Gewebe, **Ca**: Karzinomgewebe, weiße Banden: positiver Proteinase-Nachweis, **kDa**: Molekulargewicht, **MMP-2 (i)**: inaktive MMP-2, **MMP-2 (a)**: aktive MMP-2.

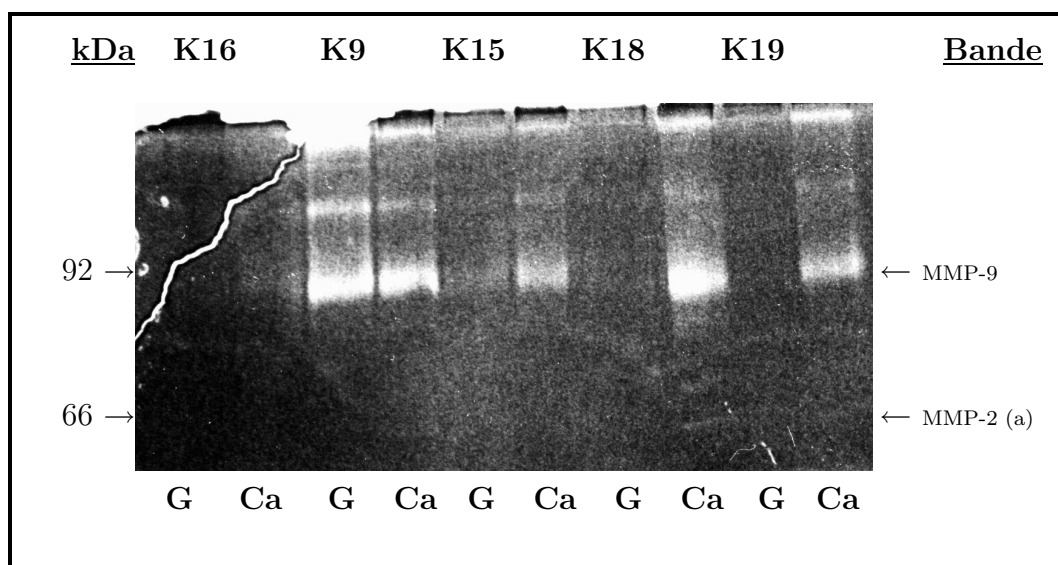


Abbildung 5.11: Zymographie. **K**: Kolon, **G**: gesundes Gewebe, **Ca**: Karzinomgewebe, weiße Banden: positiver Proteinase-Nachweis, **kDa**: Molekulargewicht, **MMP-2 (i)**: inaktive MMP-2, **MMP-2 (a)**: aktive MMP-2.

5.2.1 Auswertung der Zymographien

Die Auswertung der Zymographien erfolgte densitometrisch, wie in Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben. Tabelle 5.5 stellt normierte Werte dar, die aus gesundem (Referenzwert 1) und karzinomatösem Kolongewebe ermittelt wurden. Der normierte Wert ist der Faktor, um den sich die Enzymaktivität des Karzinomgewebes im Vergleich zum gesunden Gewebe unterscheidet. Ist der Wert größer als 1, so hat die Aktivität zugenommen, ist er gleich 1, so ist sie gleich geblieben. Ist der normierte Wert kleiner als 1, so hat die Aktivität abgenommen. Tabelle 5.6 zeigt die entsprechenden Daten für das Rektumkarzinom.

Pat.-Nr.	MMP-9	MMP-2 (72 kDa)	MMP-2 (66 kDa)
K 1	7.24	1.57	2.68
K 2	2.53	2.19	3.35
K 3	1.42	4.99	5.68
K 4	2.03	4.87	5.68
K 5	5.66	2.00	5.07
K 6	6.50	4.29	4.79
K 7	3.26	1.62	5.94
K 8	11.77	1.73	2.56
K 9	0.92	0.88	1.06
K 10	10.31	5.78	5.80
K 11	1.10	1.09	6.93
K 12	1.39	1.12	1.75
K 13	5.47	1.44	1.78
K 14	1.10	1.80	1.62
K 15	1.50	0.61	0.94
K 16	13.45	2.30	2.79
K 17	2.87	2.34	2.32
K 18	5.30	1.96	1.10
K 19	4.27	1.33	1.59
K 20	10.50	1.97	2.13
<i>M</i>	4.93	2.29	3.28
<i>S</i>	3.92	1.47	1.95
<i>SEM</i>	0.88	0.32	0.44

Tabelle 5.5: Normierte Werte beim Kolonkarzinom in **Arbitrary Units**. **M** = Mittelwert der normierten Werte, **S** = Standardabweichung, **SEM** = Standardfehler des Mittelwertes.

Die Ergebnisse der in den Tabellen aufgeführten Werte sind graphisch in Abbildung 5.12 für das Kolonkarzinom und in Abbildung 5.13 für das Rektumkarzinom wiedergegeben. Der linke Balken zeigt das Normalgewebe (als Referenzwert gleich 1 gesetzt) und der rechte Balken den Mittelwert des normierten Wertes. Abbildung 5.14 zeigt den Vergleich der Ergebnisse der Kolonkarzinompatienten mit denen der Rektumkarzinompatienten.

Pat.-Nr.	MMP-9	MMP-2 (72 kDa)	MMP-2 (66 kDa)
R 1	0.93	0.63	1.66
R 2	0.98	2.16	8.75
R 3	1.77	1.09	2.64
R 4	2.23	1.25	4.07
R 5	1.60	1.36	1.52
R 6	7.60	3.97	14.32
R 7	1.54	2.76	1.90
R 8	2.34	2.20	1.60
R 9	0.73	0.43	0.57
<i>M</i>	2.19	1.76	4.11
<i>S</i>	2.10	1.13	4.53
<i>SEM</i>	0.70	0.37	1.50

Tabelle 5.6: Normierte Werte beim Rektumkarzinom in **Arbitrary Units**. **M** = Mittelwert der normierten Werte, **S** = Standardabweichung, **SEM** = Standardfehler des Mittelwertes.

Bei der Untersuchung der Rektumkarzinompatienten fiel unter den densitometrisch erhobenen Absolutwerten insgesamt ein erhöhter MMP-9-Gehalt des gesunden Rektumgewebes auf (Ergebnisse nicht abgebildet).

Aus den Balkendiagrammen und Tabellen lässt sich insgesamt ein Anstieg der MMP-2- und der MMP-9-Aktivität sowohl im Rektum- als auch im Kolongewebe feststellen. Außerdem ist beim Vergleich von Kolon- und Rektumkarzinompatienten ersichtlich, dass sich die Metalloproteinasen in Aktivität und Enzymmuster unterscheiden (Abbildung 5.14).

In Tabelle 5.5 und in Abbildung 5.12 sind die Ergebnisse der Kolonkarzinompatienten darstellt. Insgesamt imponierte am deutlichsten ein Anstieg der MMP-9-Aktivität mit 4.93 Units (entsprechend Faktor 4.93) im Mittel. Bis auf einen Patienten (K9) wiesen alle anderen einen Anstieg der MMP-9-Aktivität auf. Bei zehn Patienten war er sehr stark ausgeprägt (K1, 5, 6, 8, 10, 13, 16, 18, 19, 20). Die Erhöhung der leichten Form der MMP-2 war mit einem Mittelwert von 3.28 Units am zweitstärksten ausgeprägt. Bei einem Patienten kam es zu einem Rückgang der Aktivität (K15), insgesamt gab es nicht so steile Konzentrations- und Aktivitätsanstiege bei der MMP-2 wie bei der MMP-9. Am schwächsten ausgeprägt war der Anstieg der schweren MMP-2-Form mit 2.29 Units im Mittel.

Tabelle 5.6 und Abbildung 5.13 zeigen die entsprechenden Ergebnisse der Rektumkarzinompatienten. Die deutlichste MMP-Aktivitätszunahme konnte hier, im

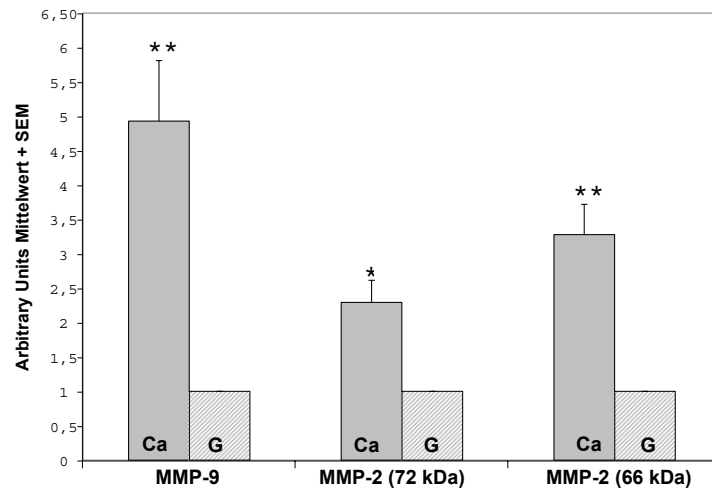


Abbildung 5.12: MMP-2- und MMP-9-Aktivität der Kolonkarzinompatienten. Mittelwerte der aus densitometrischen Absolutwerten gewonnenen normierten Werte, gemessen in **Arbitrary Units**. **G**: Gesundes Darmgewebe, **Ca**: Karzinomgewebe. *: signifikanter Anstieg Karzinomgewebe versus gesundes Darmgewebe ($P < 0.05$), **: hochsignifikanter Anstieg Karzinomgewebe versus gesundes Darmgewebe ($P < 0.01$). MMP-9 (Ca versus G): $P = 0.0037$, MMP-2 (72 kDa) (Ca versus G): $P = 0.01$, MMP-2 (66 kDa) (Ca versus G): $P = 0.006$.

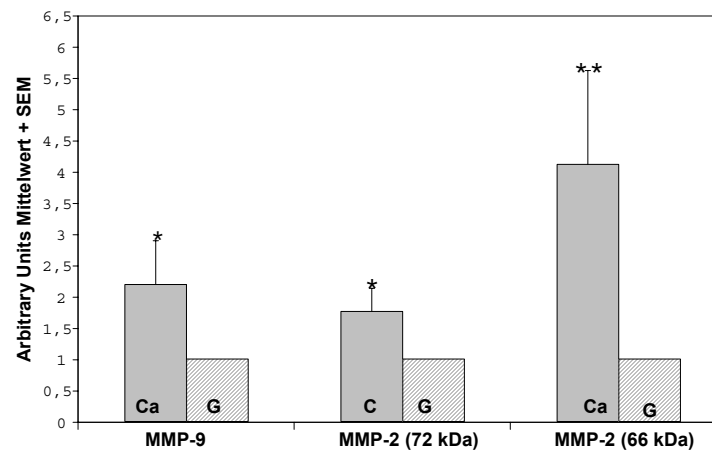


Abbildung 5.13: MMP-2- und MMP-9-Aktivität der Rektumkarzinompatienten. Mittelwerte der aus densitometrischen Absolutwerten gewonnenen normierten Werte, gemessen in **Arbitrary Units**. **G**: Gesundes Darmgewebe, **Ca**: Karzinomgewebe. *: signifikanter Anstieg Karzinomgewebe versus gesundes Darmgewebe ($P < 0.05$), **: hochsignifikanter Anstieg Karzinomgewebe versus gesundes Darmgewebe ($P < 0.01$). MMP-9 (Ca versus G): $P = 0.018$, MMP-2 (72 kDa) (Ca versus G): $P = 0.028$, MMP-2 (66 kDa) (Ca versus G): $P = 0.0068$.

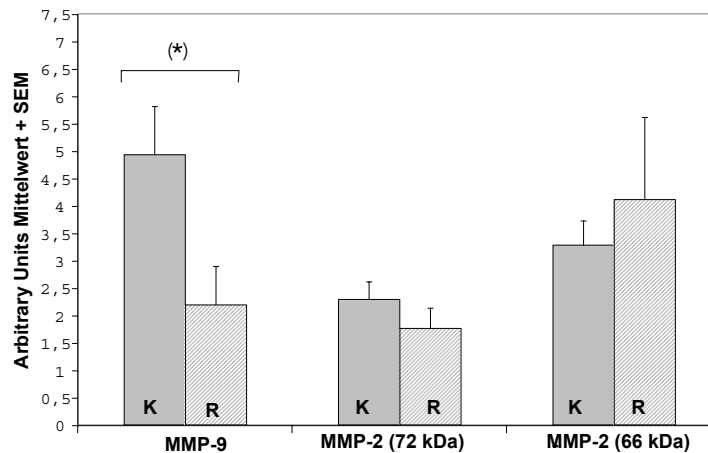


Abbildung 5.14: MMP-2- und MMP-9-Aktivität im Vergleich von Kolon- und Rektumkarzinompatienten. Mittelwerte der aus densitometrischen Absolutwerten gewonnenen normierten Werte, gemessen in **Arbitrary Units**. **K**: Kolon, **R**: Rektum. *: signifikanter Anstieg im Kolon- versus Rektumkarzinomgewebe ($P < 0.05$). (*): Beim Mann-Whitney-Test MMP-9 (K versus R): $P = 0.052$, beim Studentischen t-Test MMP-9 (K versus R): $P = 0.021$. Mann-Whitney-Test: MMP-2 (72 kDa) (K versus R): $P = 0.074$, MMP-2 (66 kDa) (K versus R): $P = 0.084$.

Gegensatz zum Kolonkarzinom, bei der aktivierten MMP-2 (66 kDa) beobachtet werden. Diese war im Karzinomgewebe im Mittel um den Faktor 4.11 erhöht. Ein Patient (R9) wies einen Rückgang der MMP-2-Aktivität auf. Die MMP-9 zeigte eine geringere Aktivitätszunahme. Dabei verzeichneten wir bei drei Patienten einen leichten Rückgang der MMP-9 (R1, R2 und R9), fünf Patienten wiesen eine gleiche bis leicht angestiegene MMP-9 auf und bei einem Patienten kam es zu einem kräftigen MMP-9-Anstieg (R6). Im Mittel ergab sich daraus eine im Karzinomgewebe um den Faktor 2.19 erhöhte MMP-9. Bei der MMP-2 (72 kDa) zeigte sich ein insgesamt homogeneres Bild mit einem im Mittel am schwächsten ausgeprägten Anstieg der Enzymaktivität (1.76 Units).

Vergleicht man Rektum- und Kolonkarzinompatienten miteinander, so lässt sich feststellen, dass im Kolongewebe die MMP-9-Aktivität tendenziell stärker ansteigt als im Rektumgewebe (Abbildung 5.14). Dagegen ist beim Rektumkarzinom ein tendenziell stärkerer Anstieg der leichten MMP-2 zu beobachten. Der Anstieg der schweren Form der MMP-2 ist beim Kolon- sowie beim Rektumkarzinom am schwächsten ausgeprägt.

5.2.2 Signifikanzberechnung Karzinomgewebe versus normales Gewebe

Wie im vorigen Kapitel beschrieben, sind deutliche Anstiege der MMPs im Karzinomgewebe zu verzeichnen. Ob diese Anstiege signifikant sind, wurde mit Hilfe des Kolmogoroff-Smirnoff-Test berechnet, der im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben wurde.

Die Tabellen 5.9, 5.10, 5.11, 5.12, 5.13 und 5.14 zeigen dabei die für Kolon- und Rektumkarzinom ermittelte Größe $\max |F_E - F_B|$ (fettgedruckt), die zur Berechnung des *Prüfquotients* D benötigt wird, der sich aus dem Quotient von $\max |F_E - F_B|$ und der Stichprobenanzahl n ergibt. B ist die Verteilung der Ergebnisse (in Arbitrary Units) des normalen Gewebes, E die Verteilung der Ergebnisse (in Arbitrary Units) des Karzinomgewebes, F_B die Summe der Werte für gesundes Gewebe, F_E die Summe der Werte für das Karzinomgewebe. $|F_E - F_B|$ ist die Differenz der beiden Summen.

Tabelle 5.7 zeigt die Zusammenfassung der Ergebnisse. Es besteht Signifikanz, wenn der *Prüfquotient* D den *kritischen Prüfquotienten* $D_{n,\alpha}$, das bedeutet beim Kolonkarzinom den Prüfquotienten $D_{20,0.05}$ und beim Rektumkarzinom $D_{9,0.05}$, überschreitet bzw. wenn der P-Wert unter 0.05 liegt. Aus den in Tabelle 5.7 aufgeführten Ergebnissen ist zu ersehen, dass sowohl beim Kolon- als auch beim Rektumkarzinom *alle* Metalloproteinasen im Karzinomgewebe verglichen mit dem gesunden Gewebe *signifikant* angestiegen sind. Bei der MMP-9 ($P=0.0037$) und MMP-2 (66 kDa) ($P=0.006$) beim Kolonkarzinom sowie bei der MMP-2 (66 kDa) ($P=0.0068$) beim Rektumkarzinom handelt es sich sogar um einen *hochsignifikanten* Anstieg. Das Signifikanzniveau des MMP-9-Anstiegs ist beim Rektumkarzinom wesentlich niedriger als beim Kolonkarzinom. Beim Anstieg der inaktiven MMP-2 ist es bei Kolon- und Rektumkarzinom am niedrigsten.

Kolon	$\max F_E - F_B $	$D_{n,\alpha}$ = $D_{20,0.05}$	D	P	Signifikanz
MMP-9	78.59	0.294	3.93	0.0037	ja
MMP-2 (72 kDa)	25.90	0.294	1.30	0.0100	ja
MMP-2 (66 kDa)	46.16	0.294	2.31	0.0060	ja
Rektum	$\max F_E - F_B $	$D_{n,\alpha}$ = $D_{9,0.05}$	D	P	Signifikanz
MMP-9	10.72	0.430	1.19	0.0180	ja
MMP-2 (72 kDa)	7.42	0.430	0.76	0.0280	ja
MMP-2 (66 kDa)	28.46	0.430	3.16	0.0068	ja

Tabelle 5.7: Zusammenfassung des Kolmogoroff-Smirnoff-Tests bei Kolon- und Rektumkarzinom.

5.2.3 Signifikanzberechnung Kolon- versus Rektumkarzinom

Die unterschiedlichen Enzymmuster zwischen Kolon- und Rektumkarzinom, die sich in den Ergebnissen abzeichnen, wurden anhand des Mann-Whitney-Tests auf ihre Signifikanz überprüft. Die Tabellen 5.15, 5.16 und 5.17 zeigen die Ermittlung der Prüfgröße U aus den aufgestellten Rangnummern und berechneten Rangsummen. Tabelle 5.8 vergleicht die ermittelte Prüfgröße U mit der kritischen Prüfgröße $U_{n,\alpha}$, in unserem Falle $U_{20,9;0.05}$ und gibt die P-Werte an.

Signifikanz ergibt sich in dem Falle, wenn die Prüfgröße U kleiner gleich der kritischen Prüfgröße ist oder wenn der P-Wert 0.05 unterschreitet. Dies ist beim Vergleich der MMP-9-Aktivität zwischen Kolon und Rektum knapp verfehlt ($P = 0.052$). Die Aktivitäten der MMP-2-Formen unterscheiden sich ebenfalls nicht signifikant (MMP-2 (72 kDa): $P = 0.074$, MMP-2 (66 kDa): $P = 0.084$). Setzt man eine Normalverteilung der Stichproben voraus und wendet den Studentschen t -Test an, so unterscheiden sich Kolon- und Rektumkarzinom im Hinblick auf die MMP-9-Aktivität allerdings signifikant ($P = 0.021$). Der MMP-2 (h) und MMP-2 (l)-Anstieg unterscheidet sich bei beiden Tests nicht signifikant.

	U $\min(U_1, U_2)$	U _{m,n,α} $= U_{20,9;0.05}$	P	Signifikanz
MMP-9	50	48	0.052	nein
MMP-2 72 kDa	71.5	48	0.074	nein
MMP-2 66 kDa	81	48	0.084	nein

Tabelle 5.8: Zusammenfassung des Mann-Whitney-Tests bei Kolon- und Rektumkarzinom.

B	E	F_B	F_E	 F_E - F_B
1	7.24	1	7.24	6.24
1	2.53	2	9.77	7.77
1	1.42	3	11.19	8.19
1	2.03	4	13.22	9.22
1	5.66	5	18.88	13.88
1	6.50	6	25.38	19.38
1	3.26	7	28.64	21.64
1	11.77	8	40.41	32.41
1	0.92	9	41.33	32.33
1	10.31	10	51.64	41.64
1	1.10	11	52.74	41.74
1	1.39	12	54.13	42.13
1	5.47	13	59.60	46.60
1	1.10	14	60.70	46.70
1	1.50	15	62.20	47.20
1	13.45	16	75.65	59.65
1	2.87	17	78.50	61.50
1	5.30	18	83.80	65.80
1	4.27	19	88.09	69.09
1	10.5	20	98.59	78.59

Tabelle 5.9: Kolmogoroff-Smirnoff-Test bei der MMP-9 beim Kolonkarzinom.

B	E	F_B	F_E	 F_E - F_B
1	1.57	1	1.57	0.57
1	2.19	2	3.76	1.76
1	4.99	3	8.75	5.75
1	4.87	4	13.62	9.62
1	2.00	5	15.62	10.62
1	4.29	6	19.91	13.91
1	1.62	7	21.53	14.53
1	1.73	8	23.26	15.26
1	0.88	9	24.24	15.24
1	5.78	10	29.92	19.92
1	1.09	11	31.01	20.01
1	1.12	12	32.13	20.13
1	1.44	13	33.57	20.57
1	1.80	14	35.37	21.37
1	0.61	15	35.98	20.98
1	2.30	16	38.28	22.28
1	2.34	17	40.62	23.62
1	1.96	18	42.58	24.58
1	1.33	19	43.93	24.93
1	1.97	20	45.90	25.90

Tabelle 5.10: Kolmogoroff-Smirnoff-Test bei der MMP-2 (72 kDa) beim Kolonkarzinom.

B	E	F_B	F_E	 F_E - F_B
1	2.68	1	2.68	1.68
1	3.35	2	6.03	4.03
1	5.68	3	11.71	8.71
1	5.68	4	17.39	13.39
1	5.07	5	22.46	17.46
1	4.79	6	27.25	21.25
1	5.94	7	33.19	26.19
1	2.56	8	35.75	27.75
1	1.06	9	36.81	27.81
1	5.80	10	42.61	32.61
1	6.93	11	49.54	38.54
1	1.75	12	51.29	39.29
1	1.78	13	53.01	40.07
1	1.62	14	54.69	40.69
1	0.94	15	55.63	40.63
1	2.79	16	58.42	42.42
1	2.32	17	61.34	44.34
1	1.10	18	62.44	44.44
1	1.59	19	64.03	45.03
1	2.13	20	66.16	46.16

Tabelle 5.11: Kolmogoroff-Smirnoff-Test bei der MMP-2 (66 kDa) beim Kolonkarzinom.

B	E	F_B	F_E	 F_E - F_B
1	0.93	1	0.93	0.07
1	0.98	2	1.91	0.09
1	1.77	3	3.68	0.68
1	2.23	4	5.91	1.91
1	1.60	5	7.51	2.51
1	7.60	6	15.11	9.11
1	1.54	7	16.65	9.65
1	2.34	8	18.99	10.99
1	0.73	9	19.72	10.72

Tabelle 5.12: Kolmogoroff-Smirnoff-Test bei der MMP-9 beim Rektumkarzinom.

B	E	F_B	F_E	 F_E - F_B
1	0.63	1	0.63	0.37
1	2.16	2	2.79	0.79
1	1.09	3	3.88	0.88
1	1.25	4	5.13	1.13
1	1.36	5	6.49	1.49
1	3.97	6	10.46	4.46
1	2.76	7	13.22	6.77
1	2.20	8	15.42	7.42
1	0.43	9	15.85	6.85

Tabelle 5.13: Kolmogoroff-Smirnoff-Test bei der MMP-2 (72 kDa) beim Rektumkarzinom.

B	E	F_B	F_E	$F_E - F_B$
1	1.66	1	1.66	0.66
1	8.75	2	10.41	8.41
1	2.64	3	13.05	10.05
1	4.07	4	17.12	13.12
1	1.52	5	18.64	13.64
1	14.32	6	32.96	26.96
1	1.90	7	34.86	27.86
1	1.60	9	36.46	28.46
1	0.57	10	37.03	28.03

Tabelle 5.14: Kolmogoroff-Smirnoff-Test bei der MMP-2 (66 kDa) beim Rektumkarzinom.

	Rangreihe Kolon	Rang-Nr. Kolon	Rangreihe Rektum	Rang-Nr. Rektum
	0.92	2	0.73	1
	1.10	5.50	0.93	3
	1.10	5.50	0.98	4
	1.39	7	1.54	10
	1.42	8	1.60	11
	1.50	9	1.77	12
	2.03	13	2.23	14
	2.53	16	2.34	15
	2.87	17	7.60	25
	3.26	18		
	4.27	19		
	5.30	20		
	5.47	21		
	5.66	22		
	6.50	23		
	7.24	24		
	10.31	26		
	10.50	27		
	11.77	28		
	13.45	29		
Rang- summe		340 (R ₁)		95 (R ₂)
Prüf- größe		50 (U ₁)		134 (U ₂)

Tabelle 5.15: Mann-Whitney-Test. Kolon versus Rektum. MMP-9.

	Rangreihe Kolon	Rang-Nr. Kolon	Rangreihe Rektum	Rang-Nr. Rektum
	0.61	2	0.43	1
	0.88	4	0.63	3
	1.09	5.50	1.09	5.50
	1.12	7	1.25	8
	1.33	9	1.36	10
	1.44	11	2.16	19
	1.57	12	2.20	21
	1.62	13	2.76	24
	1.73	14	3.97	25
	1.80	15		
	1.96	16		
	1.97	17		
	2.00	18		
	2.19	20		
	2.30	22		
	6.34	23		
	4.29	26		
	4.87	27		
	4.99	28		
	5.78	29		
Rang- summe		318.5 (R_1)		116.5 (R_2)
Prüf- größe		71.5 (U_1)		108.5 (U_2)

Tabelle 5.16: Mann-Whitney-Test. Kolon versus Rektum. MMP-2 (72 kDa).

	Rangreihe Kolon	Rang-Nr. Kolon	Rangreihe Rektum	Rang-Nr. Rektum
	0.94	2	0.57	1
	1.06	3	1.52	5
	1.10	4	1.60	7
	1.59	6	1.66	9
	1.62	8	1.90	12
	1.75	10	2.64	15
	1.78	11	4.07	20
	2.13	13	8.75	28
	2.32	14	14.32	29
	2.56	16		
	2.68	17		
	2.79	18		
	3.35	19		
	4.79	21		
	5.07	22		
	5.68	23.5		
	5.68	23.5		
	5.80	25		
	5.94	26		
	6.93	27		
Rang- summe		309 (R_1)		126 (R_2)
Prüf- größe		81 (U_1)		99 (U_2)

Tabelle 5.17: Mann-Whitney-Test. Kolon versus Rektum. MMP-2 (66 kDa).

5.3 Western Blots

In dieser Arbeit wurden von allen Patienten Western-Blots angefertigt, um einen spezifischen Nachweis der Metalloproteinasen im Gewebe zu erbringen.

Im folgenden werden einige Western-Blots exemplarisch abgebildet. Die Abbildungen zeigen, dass, wie bei den Zymographien, das gesunde Gewebe links, das Karzinomgewebe rechts davon aufgetragen worden ist. Ein positiver Enzymnachweis ist an den schwarzen Banden erkennbar.

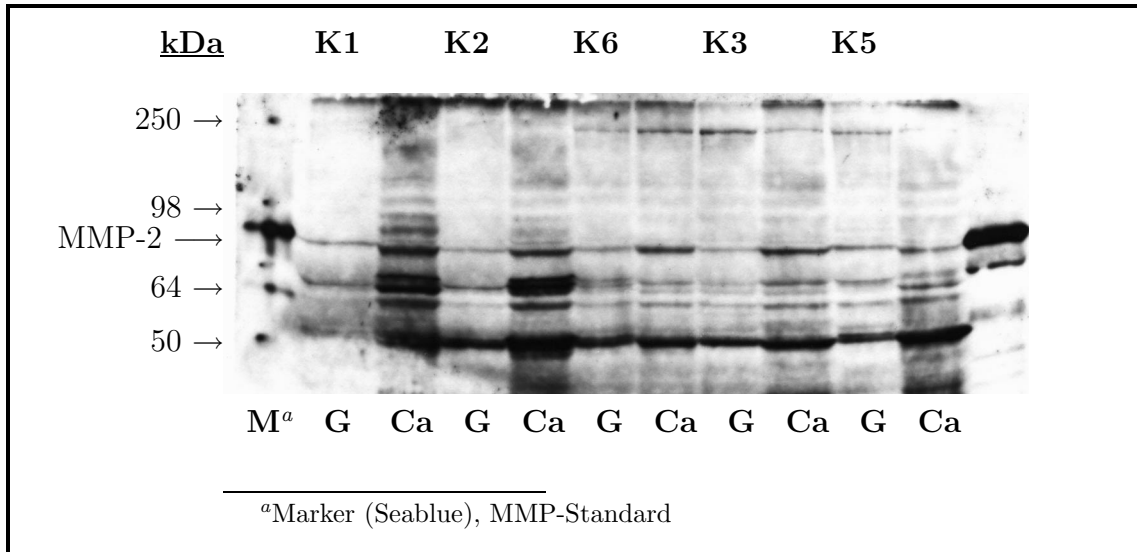


Abbildung 5.15: MMP-2-Nachweis im Western Blot. **K**: Kolon, **G**: gesundes Gewebe, **Ca**: Karzinomgewebe, Schwarze Banden: positiver Protein-Nachweis, **kDa**: Molekulargewicht.

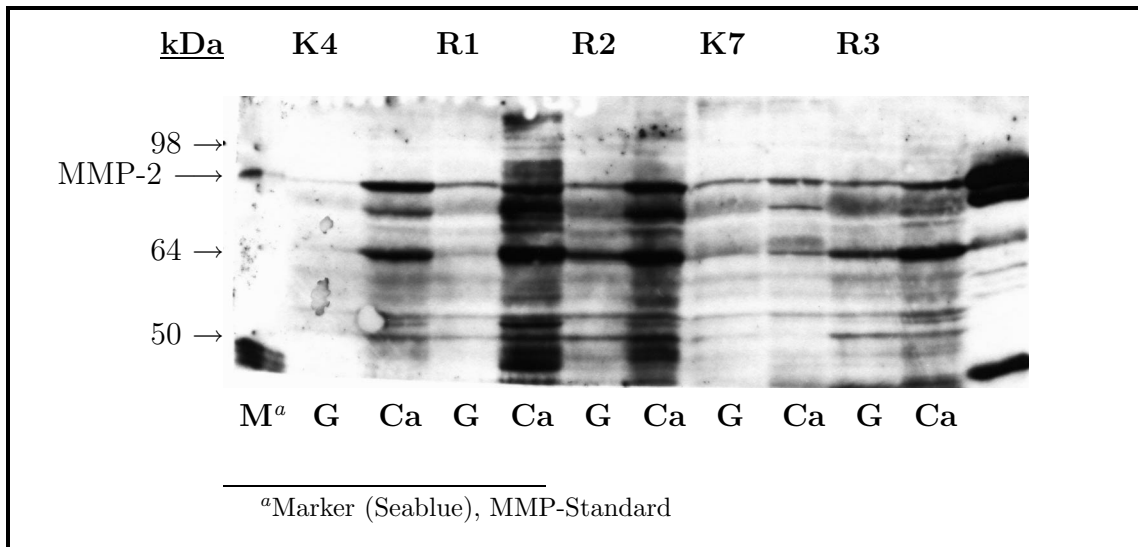


Abbildung 5.16: MMP-2-Nachweis im Western Blot. **K**: Kolon, **R**: Rektum, **G**: gesundes Gewebe, **Ca**: Karzinomgewebe, Schwarze Banden: positiver Protein-Nachweis, **kDa**: Molekulargewicht.

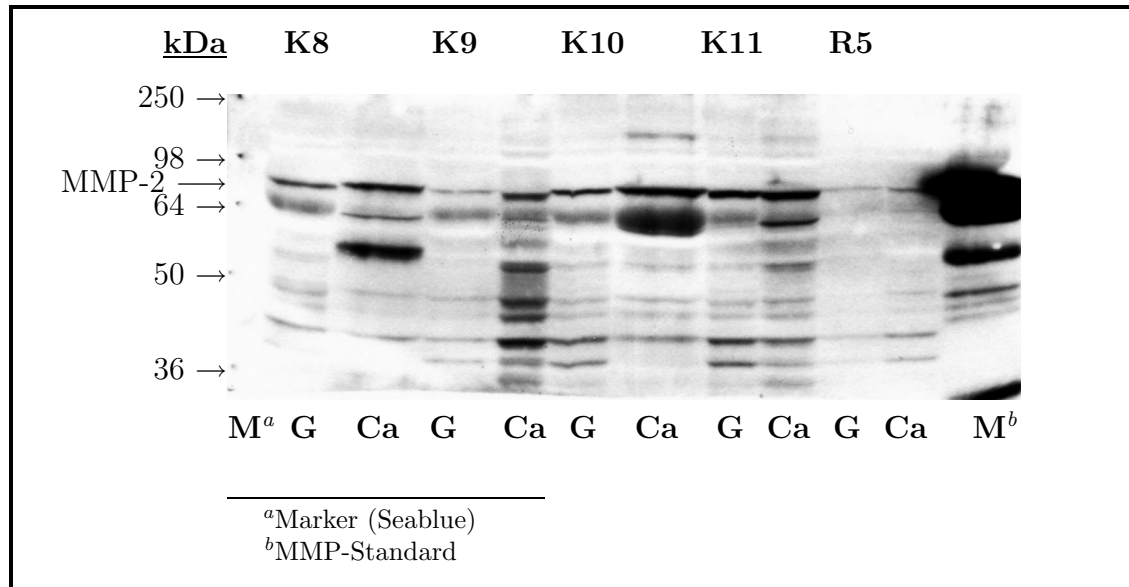


Abbildung 5.17: MMP-2-Nachweis im Western Blot. **K**: Kolon, **R**: Rektum, **G**: gesundes Gewebe, **Ca**: Karzinomgewebe, Schwarze Banden: positiver Protein-Nachweis, **kDa**: Molekulargewicht.

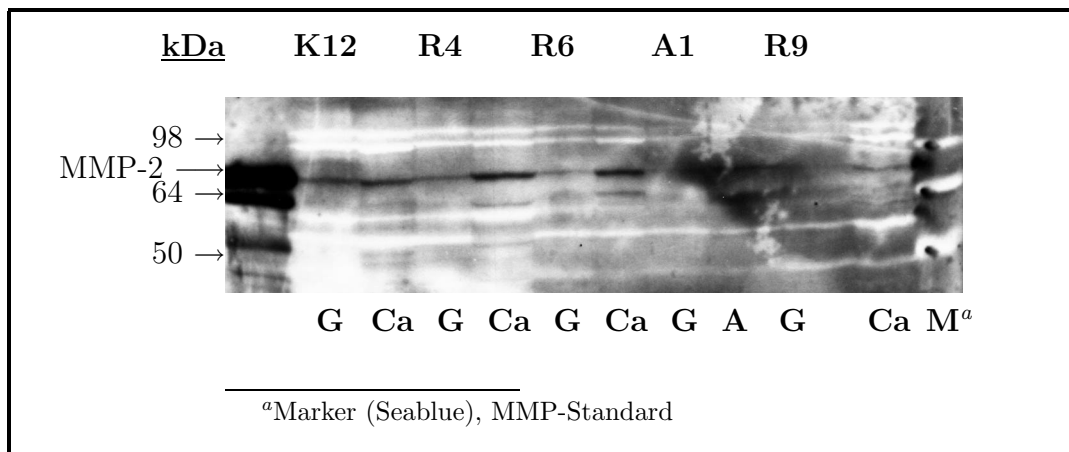


Abbildung 5.18: MMP-2-Nachweis im Western Blot. **K**: Kolon, **R**: Rektum, **A**: Adenom, **G**: gesundes Gewebe, **Ca**: Karzinomgewebe, Schwarze Banden: positiver Protein-Nachweis, **kDa**: Molekulargewicht.

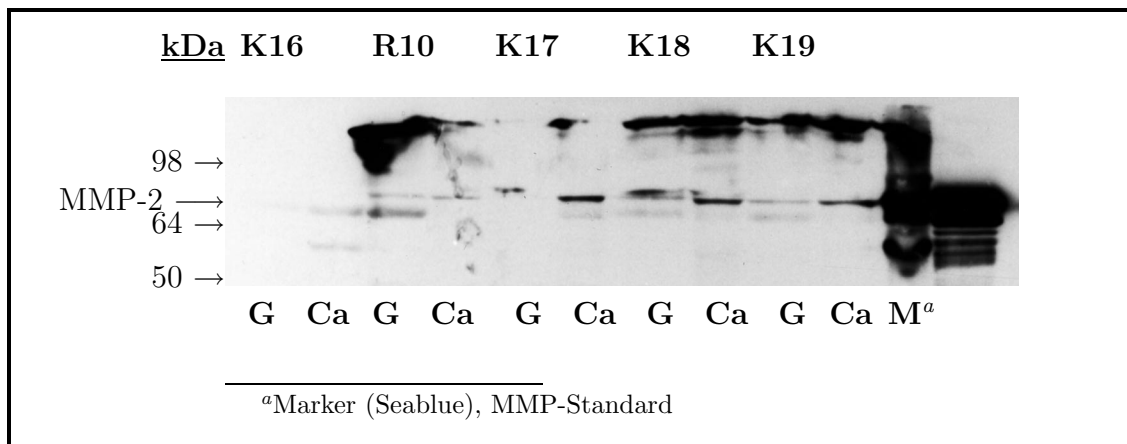


Abbildung 5.19: MMP-2-Nachweis im Western Blot. **K**: Kolon, **R**: Rektum, **A**: Adenom, **G**: gesundes Gewebe, **Ca**: Karzinomgewebe, Schwarze Banden: positiver Protein-Nachweis, **kDa**: Molekulargewicht.

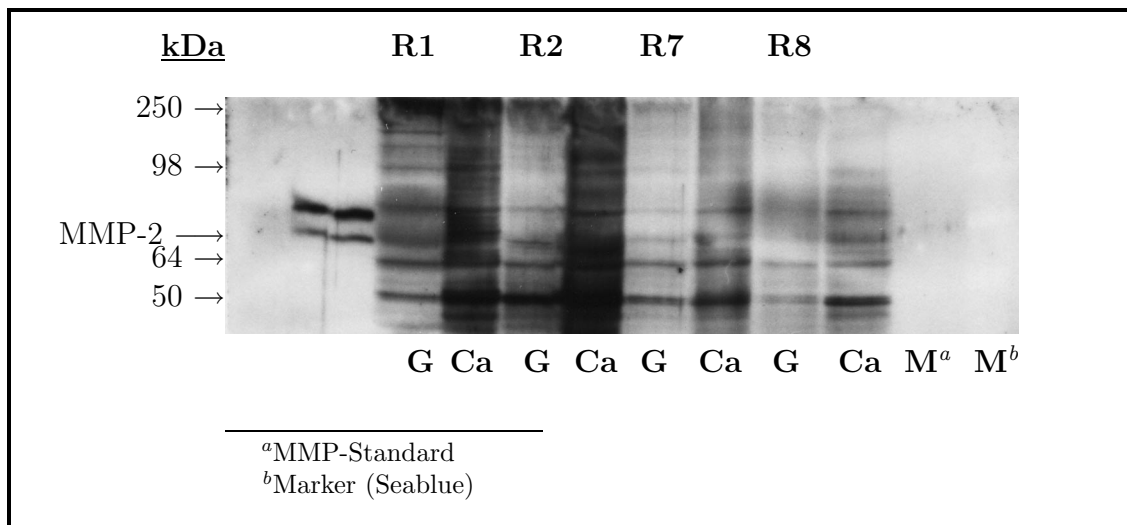


Abbildung 5.20: MMP-2-Nachweis im Western Blot. **R**: Rektum, **G**: gesundes Gewebe, **Ca**: Karzinomgewebe, Schwarze Banden: positiver Protein-Nachweis, **kDa**: Molekulargewicht.

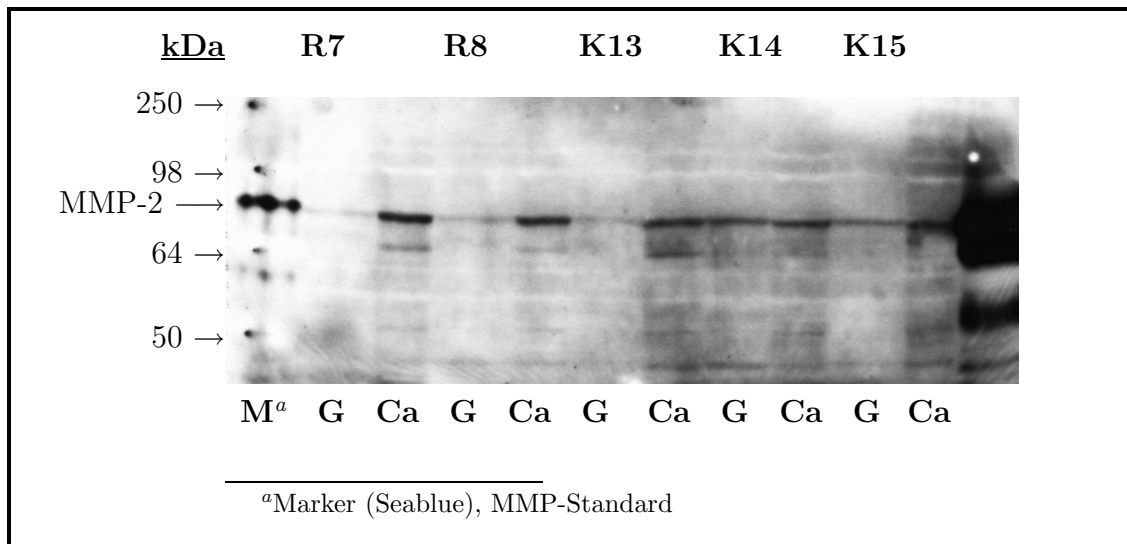


Abbildung 5.21: MMP-2-Nachweis im Western Blot. **K**: Kolon, **R**: Rektum, **G**: gesundes Gewebe, **Ca**: Karzinomgewebe, Schwarze Banden: positiver Protein-Nachweis, **kDa**: Molekulargewicht.

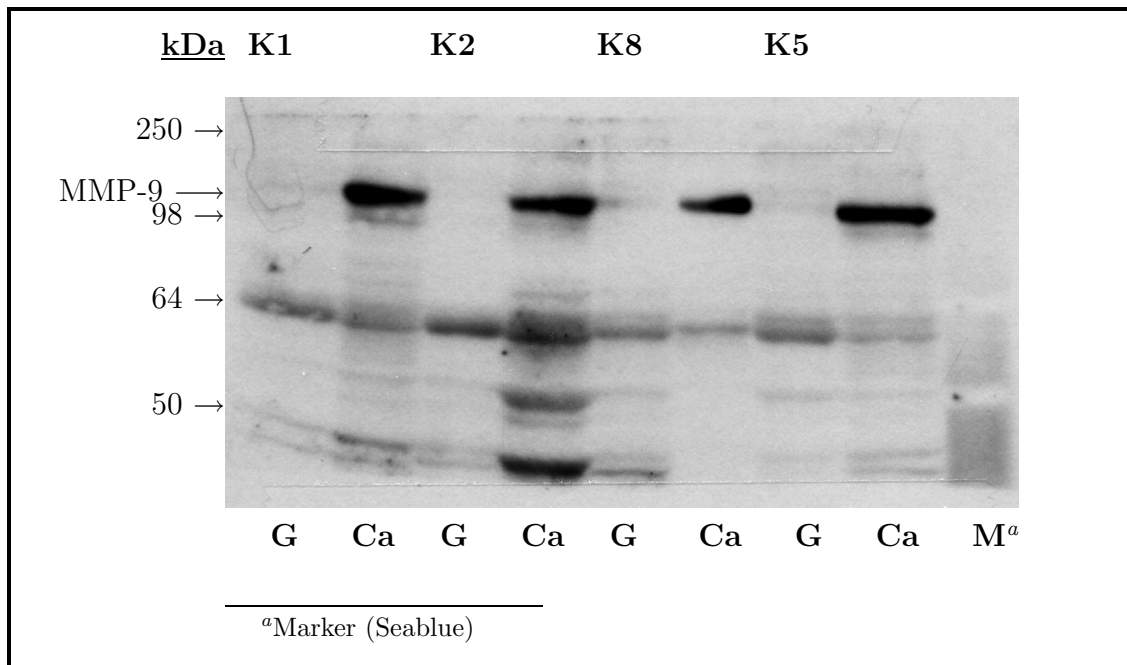


Abbildung 5.22: MMP-9-Nachweis im Western Blot. **K**: Kolon, **R**: Rektum, **G**: gesundes Gewebe, **Ca**: Karzinomgewebe, Schwarze Banden: positiver Protein-Nachweis, **kDa**: Molekulargewicht.

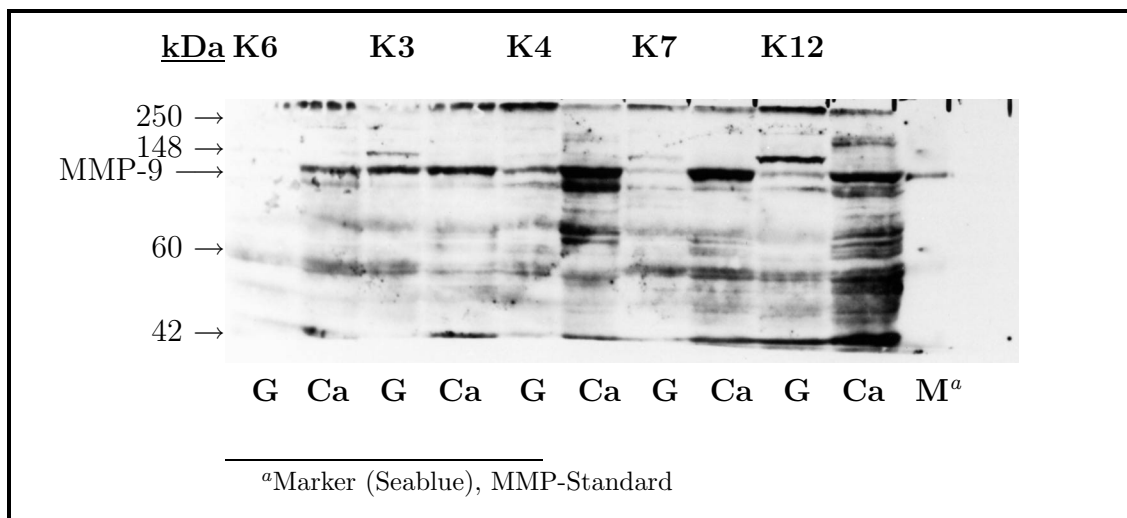


Abbildung 5.23: MMP-9-Nachweis im Western Blot. **K**: Kolon, **G**: gesundes Gewebe, **Ca**: Karzinomgewebe, Schwarze Banden: positiver Protein-Nachweis, **kDa**: Molekulargewicht.

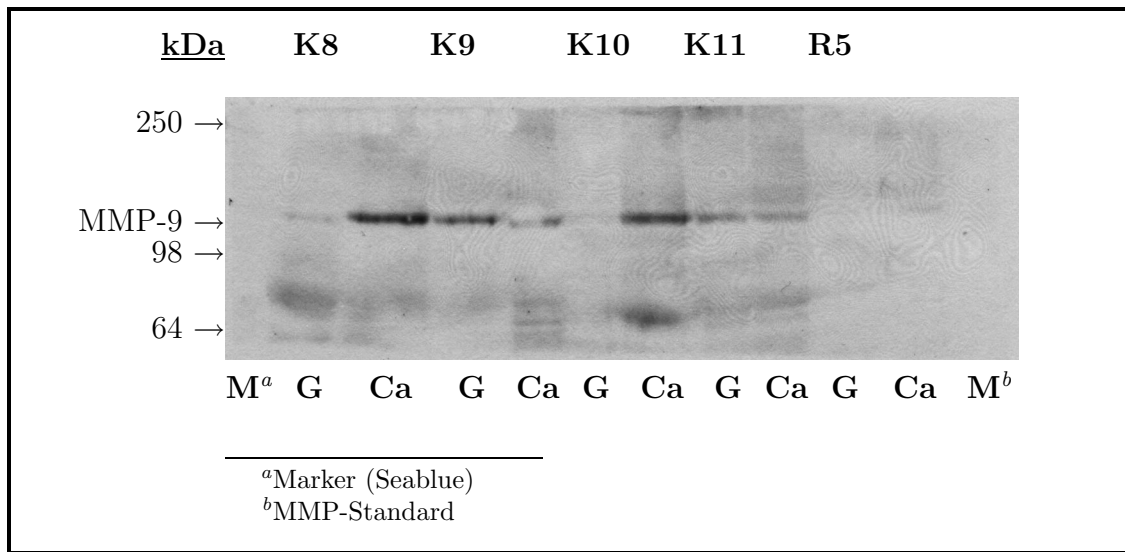


Abbildung 5.24: MMP-9-Nachweis im Western Blot. **K**: Kolon, **R**: Rektum, **G**: gesundes Gewebe, **Ca**: Karzinomgewebe, Schwarze Banden: positiver Protein-Nachweis, **kDa**: Molekulargewicht.

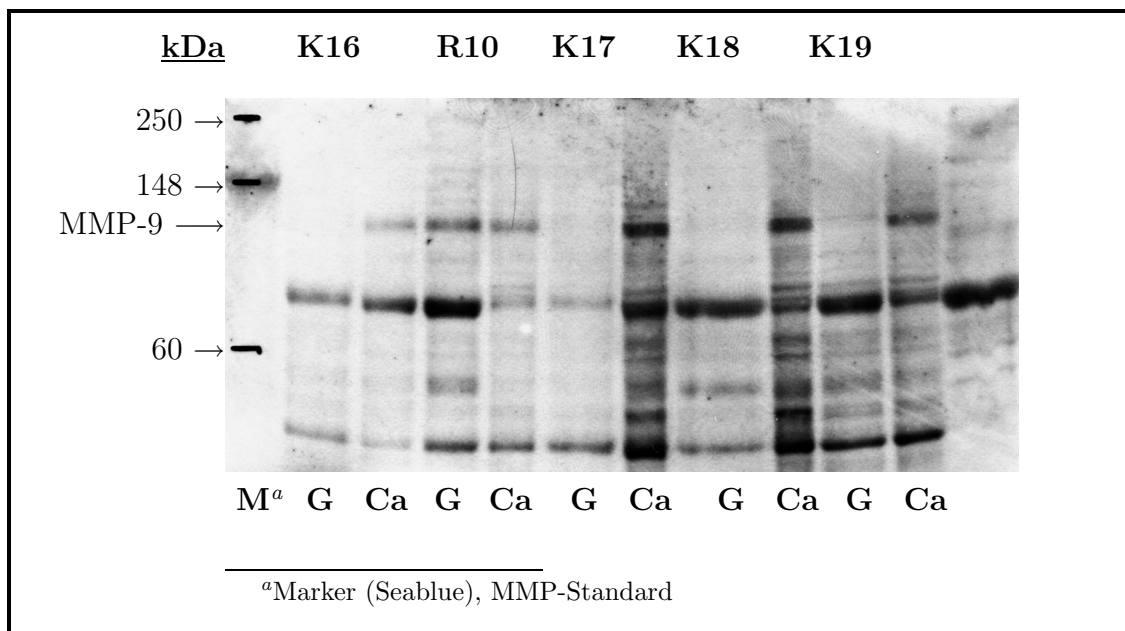


Abbildung 5.25: MMP-9-Nachweis im Western Blot. **K**: Kolon, **R**: Rektum, **G**: gesundes Gewebe, **Ca**: Karzinomgewebe, Schwarze Banden: positiver Protein-Nachweis, **kDa**: Molekulargewicht.

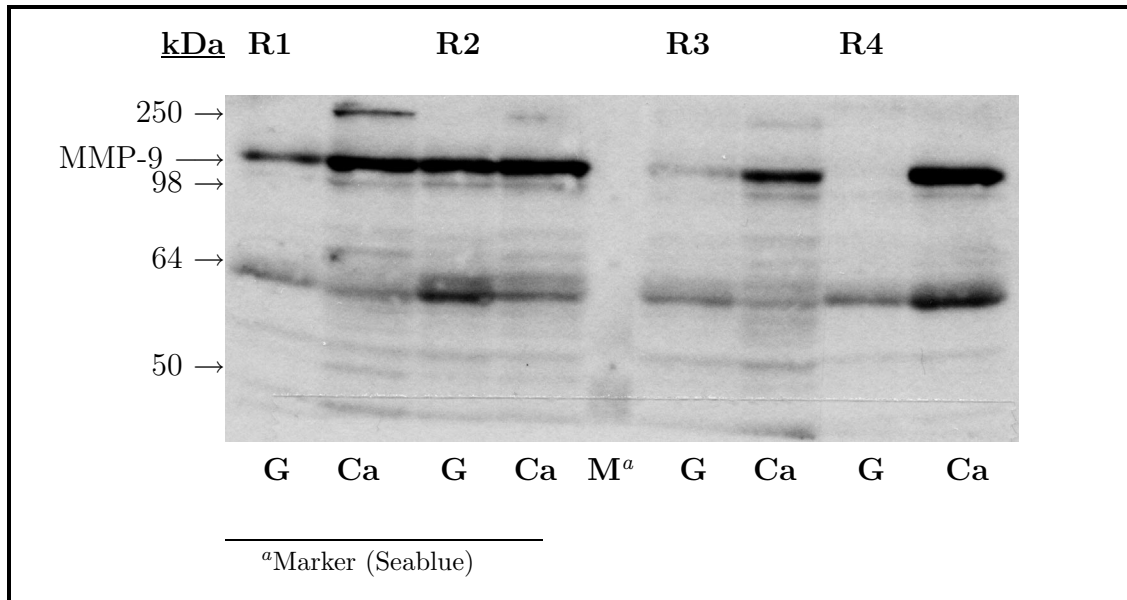


Abbildung 5.26: MMP-9-Nachweis im Western Blot. **R**: Rektum, **G**: gesundes Gewebe, **Ca**: Karzinom, Schwarze Banden: positiver Protein-Nachweis, **kDa**: Molekulargewicht.

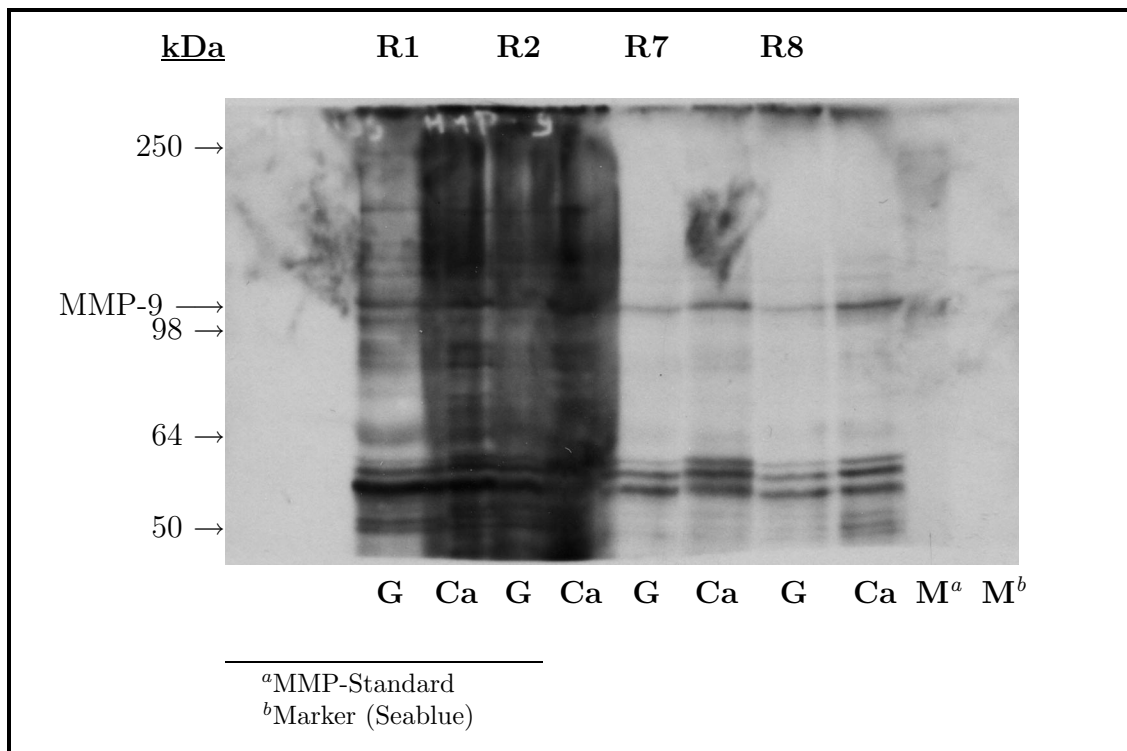


Abbildung 5.27: MMP-9-Nachweis im Western Blot. **R**: Rektum, **G**: gesundes Gewebe, **Ca**: Karzinom, Schwarze Banden: positiver Protein-Nachweis, **kDa**: Molekulargewicht.

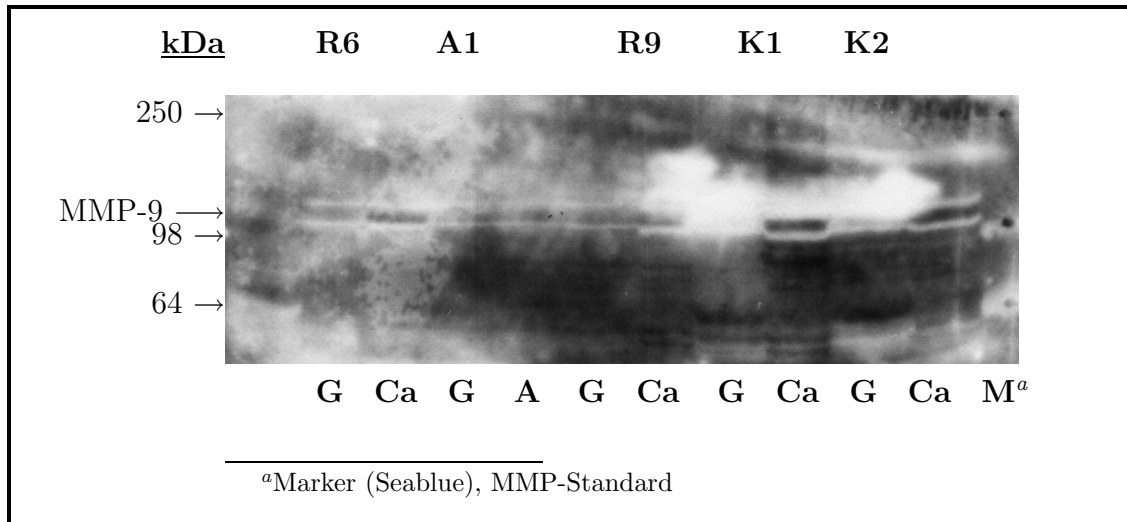


Abbildung 5.28: MMP-9-Nachweis im Western Blot. **K:** Kolon, **R:** Rektum, **A:** Adenom, **G:** gesundes Gewebe, **Ca:** Karzinomgewebe, Schwarze Banden: positiver Protein-Nachweis, **kDa:** Molekulargewicht.

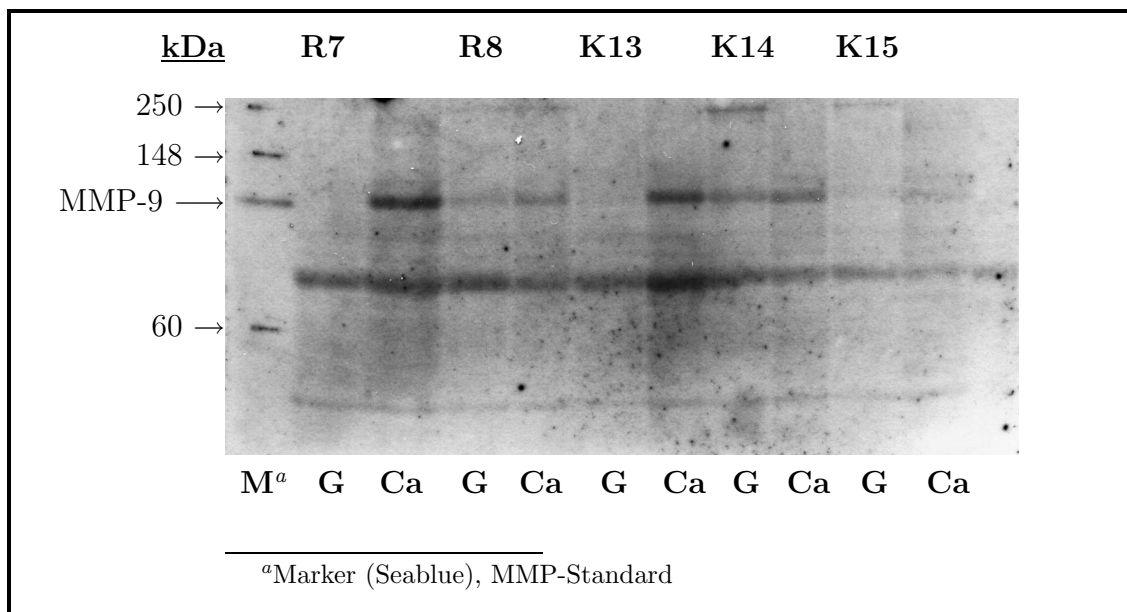


Abbildung 5.29: MMP-9-Nachweis im Western Blot. **K:** Kolon, **R:** Rektum, **G:** gesundes Gewebe, **Ca:** Karzinomgewebe, Schwarze Banden: positiver Protein-Nachweis, **kDa:** Molekulargewicht.

Kapitel 6

Diskussion

Im Rahmen der Untersuchung neuer Prognosefaktoren und Therapiemöglichkeiten des kolorektalen Karzinoms wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die Metalloproteinasen MMP-9 und MMP-2 im Karzinomgewebe verstärkt exprimiert werden. Ein weiterer Schwerpunkt war die Frage, ob sich die Enzymmuster von Kolon- und Rektumgewebe unterscheiden und ob es eine Beziehung zu klinischen Parametern gibt.

6.1 Diskussion der Methoden

In der Literatur wurden zur Untersuchung von Metalloproteinasen bereits verschiedene Methoden angewandt. In Zellkulturen konnte eine Beziehung zwischen Aggressivität, Invasivität und metastatischem Potential von Tumorzellen und der Expression von MMP-2 und MMP-9 hergestellt werden [Ber 1990], [Tur 1985], [Ura 1989]. Nachteil dieser Methode ist, dass sie keinen Aufschluss über die Verhältnisse in vivo gibt. Dazu sind Untersuchungen an menschlichem kolorektalen Gewebe notwendig. In der Literatur wird in diesem Zusammenhang die Methode der Zymographie [Ba 2000], [To 1994], [Lia 1996], [Ga 1999a], Northern Blot [Ar 1998], Western Blot [Ze 1996] oder Mikrodisektion [Em 1994] beschrieben. Neuerdings wird auch der Activity Assay immer häufiger angewandt [Ba 2001], der es ermöglicht, auch freie Metalloproteinasen, die sich nicht in einer Komplexbindung befinden, zu erfassen. Auch kann man zwischen Gesamt-MMP und aktiver MMP unterscheiden. In dieser Arbeit wurden die Methoden der Zymographie und des Western Blot angewandt, denen eine sorgfältige Materialasservierung und Rekrutierung klinischer Daten vorausging.

6.1.1 Materialgewinnung und klinische Daten

In dieser Arbeit wurden direkte Untersuchungen an menschlichem kolorektalen Gewebe vorgenommen. Dies hat den Vorteil einer erhöhten Aussagekraft über die

Verhältnisse im menschlichen Organismus im Vergleich zu nur bedingt auf den Menschen übertragbaren Tierversuchen oder Zellkulturen.

Jedoch war die Gewebsasservation mit einem großen zeitlichen und organisatorischen Aufwand verbunden, da das Gewebe zeitnah aus dem Operationsresektat entnommen werden musste. Daher konnte nur eine geringe Patientenzahl, insgesamt 30 Patienten, von denen 29 in die Studie eingeschlossen wurden, rekrutiert werden. Dies ist trotzdem eine mit Literaturdaten vergleichbare Anzahl. Voraussetzung für die Asservation des Gewebes war eine gute Zusammenarbeit der verschiedenen beteiligten Kliniken. Eine Fehlerquelle bei der Materialgewinnung ist der Entnahmezzeitpunkt, der nicht später als 30 Minuten nach Resektion liegen sollte, sowie die Entnahmestelle, die möglichst wenig nekrotisches Gewebe enthalten sollte. Dies spielte besonders bei schon sehr zerfallenen und bei sehr kleinen Tumoren eine Rolle.

Eine weitere Schwierigkeit stellte die Erhebung vergleichbarer klinischer Daten dar, da bestimmte Prognosefaktoren und Laborwerte präoperativ nicht erhoben worden waren. Der weitere Krankheitsverlauf im Rahmen der Nachsorge war durch eine zum Teil mangelnde Compliance der Patienten nur schwer beurteilbar und in unserer Arbeit nicht verwertbar. Eine statistisch relevante Korrelation zwischen den klinischen Daten und der MMP-Aktivierung im Karzinomgewebe war wegen der geringen Patientenzahl in jeder prognostischen Gruppe nicht möglich. Diese Korrelation wurde in der Literatur von einigen Autoren [Ar 1998], [Ze 1996], [Ri 1997], [Am 1997] und [Ba 2000] durchgeführt. Liabakk et al. [Lia 1996] untersuchten dabei zymographisch außergewöhnlich große Patientenzahlen (insgesamt 192 Biopsien von kolorektalen Karzinomen, Adenomen und Normalgewebe) und stellten positive Korrelationen zwischen MMP-9 und aktiver MMP-2 im Tumorgewebe der Dukes-Stadien A und C und den Normalgeweben und Adenomen fest. Die inaktive Form der MMP-2 war bei allen Dukes-Stadien gegenüber den Normalgeweben und Adenomen signifikant erhöht.

6.1.2 Zymographie

Die Zymographie ist eine, in Bezug auf MMP-2 und MMP-9, bereits sehr häufig angewandte, verhältnismäßig einfach durchführbare, preisgünstige und sehr sensitive Methode. Sie ermöglicht es, aktiviertes Enzym im Zelllysate eines Gewebes nachzuweisen. Dabei ist keine Verwendung radioaktiv markierter Materialien, wie zum Beispiel beim Northern Blot, oder ein spezifischer Antikörper, wie zum Beispiel beim Western Blot, erforderlich. Qualitativ ist das Ergebnis leicht abzulesen.

Ein Nachteil dieser Methode ist, dass man mit Hilfe der Zymographie nicht zwischen freien und in Komplexen (z. B. mit TIMPs) gebundenen MMPs unterscheiden kann. Weiterhin gibt es nur semiquantitative Auswertungsmöglichkeiten. Dies erschwert unter anderem die statistische Beurteilung. Da die auf das Zymographiegel aufge-

tragenen Zelllysate von Patient zu Patient sehr differieren und unterschiedlichen, personenabhängigen Variablen unterliegen, sind die densitometrisch erhobenen Absolutwerte verschiedener Patienten nicht direkt miteinander vergleichbar. Das Kriterium der Vergleichbarkeit ist nur zwischen gesundem und karzinomatösem Gewebe jeweils *eines* Patienten gegeben. Daraus resultiert die Berechnung eines Faktors, um den sich Normal- und Karzinomgewebe eines Patienten unterscheidet. Erst dieser macht einen Vergleich verschiedener Patienten miteinander möglich.

Trotz Kühlung bei -80°C degradieren Zelllysate im Laufe der Zeit. Daher sollten Zymographien zeitnah durchgeführt werden, um gute Ergebnisse zu erzielen. Werden Zelllysate zu lange gelagert, so kann dies zu weniger eindeutigen Ergebnissen führen.

Durch die Durchführung vieler methodischer Einzelschritte müssen einige weitere Fehlerquellen berücksichtigt werden. Zum Beispiel kann das tiefgefrorene Gewebe bei der Herstellung von Lysaten und bei der Bearbeitung zu warm werden. Dadurch können enzymatische Umbauprozesse in Gang kommen, die die Qualität des Gewebes beeinträchtigen können. Dies kann die Ergebnisse und die Konzentration der Metalloproteinasen in der Zymographie verfälschen, indem zu niedrige Werte gemessen werden.

Trotz der Herstellung von Lysaten mit gleichen Proteinkonzentrationen können diese von Lysat zu Lysat schwanken und unterschiedliche Bandenstärken hervorrufen. Auch können dadurch Banden verunreinigt und das Ergebnis verwaschen werden. Bei der Herstellung der Gele und bei der Probenauftragung können schnell Fehler gemacht werden, wenn Geltaschen nicht ausreichend gesäubert werden und so der Probeninhalt nicht vollständig in die Tasche passt. Dabei kann ein Teil des Probeninhaltes in eine andere Tasche überlaufen. Auf diese Weise kann das Ergebnis der Probe falsch negativ oder zu niedrig ausfallen, während das der angrenzenden Probe zu hoch ausfällt.

Ein Nachteil der Gele ist ihre starke Neigung zur Brüchigkeit nach dem Austrocknen, die das Ablesen erschweren kann. Es werden daher Fotografien der Gele angefertigt und ausgewertet.

6.1.3 Western Blot

Die Western-Blot-Methode hat den Vorteil der spezifischen Proteindetektion, kann aber nicht zwischen aktivem und nicht-aktivem Enzym unterscheiden. Wir haben diese Methode daher zum spezifischen Proteinnachweis angewandt. Im Gegensatz zur Zymographie ist die Durchführung der Western Blots aufwändiger und fehleranfälliger.

Die Western-Blot-Methode ist dabei von einem spezifisch an das gesuchte Protein bindenden Antikörper abhängig, dessen Beschaffenheit große Qualitätsunterschiede aufweisen kann. Ist die Qualität schlecht, so ist die Bandenstärke nicht gut ausge-

prägt. Auch durch Proteinverunreinigungen können Ergebnisse unklar oder verwaschen werden. Bei der Proteindetektion müssen die Zeitvorgaben für die Wirksamkeit des Horseradish-Proxidase-Antikörpers genau eingehalten werden.

6.1.4 Statistik

Die statistische Auswertung war durch die geringe Stichprobenzahl und die Anwendung einer semiquantitativen Methode erschwert, da die zu vergleichenden Werte (Kolon- versus Normalgewebe) voneinander abhängig sind. Wir entschieden uns daher für einen Einstichproben-Rangtest. Beim Vergleich Kolon versus Rektum handelte es sich zwar um zwei unabhängige Verteilungen, jedoch nicht sicher um Normalverteilungen, so dass uns ein Zweistichprobenrangtest am geeignetsten erschien. Die geringe Stichprobenanzahl bei einem statistischen Test schwächt dessen Aussagekraft. Beim Vergleich Karzinom- versus Normalgewebe waren trotz geringer Stichprobenzahl alle MMP-Anstiege signifikant oder sogar hochsignifikant, was für die Eindeutigkeit der Ergebnisse spricht. Der Vergleich Kolon versus Rektum hinsichtlich der MMP-9-Expression zeigte im Mann-Whitney-Test keine signifikanten Ergebnisse. Bei Anwendung des Studentschen t-Tests unter Voraussetzung zweier Normalverteilungen ergeben sich allerdings signifikante Ergebnisse. Eine größere Stichprobenzahl würde eventuell unsere Hypothese eines unterschiedlichen Enzymmusters auch bei strengeren Testbedingungen bestätigen. Aufgrund der oben genannten schwierigen Erhebung der klinischen Daten und Materialgewinnung war dies im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht möglich.

6.1.5 Vergleich klinischer Variablen

Der Vergleich klinischer Variablen mit den von uns gefundenen Ergebnissen war wegen der geringen Stichprobenanzahl in den einzelnen Prognosegruppen und der nur unvollständigen Dokumentation von Nachsorge- und präoperativen Befunden nicht möglich. Nur in Einzelfällen lassen sich mögliche Beziehungen zu diesen Daten diskutieren (s. u.).

6.2 Diskussion der Ergebnisse

6.2.1 Kolonkarzinom

Die MMP-9- und MMP-2-Aktivität war beim Kolonkarzinom signifikant erhöht ($P < 0.05$). Der MMP-9-Anstieg war dabei hochsignifikant ($P = 0.0037$), ebenfalls der Anstieg der aktiven Form der MMP-2 ($P = 0.006$). Die Expression der MMP-9 unterlag dabei einer besonders großen Streuung ($S = 3.92$, $SEM = 0.88$). Mögliche Einflussgrößen waren dabei personenbezogene Differenzen, klinische Daten (Tumorstadium, Differenzierungsgrad) oder methodenabhängige Störgrößen und Feh-

ler. Bei den Ausreißern der MMP-9-Expression gibt es offensichtlich keine direkte Regelmäßigkeit oder Erklärung. Die Patienten, bei denen die MMP-9 stark vom Mittelwert abweicht, zeigen bis auf 2 Ausnahmen (K3 und K10) nicht gleichzeitig Abweichungen der MMP-2-Expression vom Mittelwert, so dass ein systematischer Fehler dieser Einzelprobe unwahrscheinlich ist. Patient K3 weist eine unterdurchschnittlich niedrige MMP-9-Aktivität bei überdurchschnittlich hohen Aktivitäten aller MMP-2-Formen auf. Bei K10 wurden alle MMPs überdurchschnittlich stark exprimiert. Bei diesem Patienten wurde ein Dukes-Stadium D und Fernmetastasen diagnostiziert, was damit in Zusammenhang stehen könnte. Bei K5, bei dem ebenfalls eine Fernmetastase diagnostiziert wurde, wurden ebenfalls überdurchschnittlich hohe MMP-9- und MMP-2 (1)-Werte gemessen.

6.2.2 Rektumkarzinom

Auch beim Rektumkarzinom war die MMP-9- und die MMP-2-Aktivität im Karzinomgewebe signifikant erhöht ($P < 0.05$). Im Gegensatz zum Kolonkarzinom hatte die verstärkte Expression der aktivierten MMP-2-Form das höchste Signifikanzniveau ($P = 0.0068$), gefolgt von der MMP-9 ($P = 0.018$). Die aktive MMP-2 unterlag, wahrscheinlich aus gleichen Gründen wie die MMP-9 beim Kolonkarzinom, einer großen Streuung ($S = 4.53$, $SEM = 1.5$). Bei R6 zeigt sowohl die MMP-2- als auch die MMP-9-Expression überdurchschnittlich hohe Werte. Bei diesem Patienten ist ein Stadium Dukes D mit Fernmetastase diagnostiziert worden und das legt einen Zusammenhang mit den erhöhten Werten nahe. Dagegen weist R1, bei dem ebenfalls ein Dukes-D-Stadium diagnostiziert wurde, überdurchschnittlich niedrige MMP-Expressionen auf.

6.2.3 Kolorektales Karzinom in der Literatur

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse sprechen dafür, dass beim Kolon- und Rektumkarzinom sowohl MMP-9 als auch MMP-2 vermehrt exprimiert aber auch vermehrt aktiviert werden (stärkere Expression der aktiven MMP-2 gegenüber der inaktiven). Dies bestätigt zahlreiche Studien in der Literatur, die ebenfalls mittels Zymographie die MMP-9 und MMP-2 beim kolorektalen Karzinom untersuchten [To 1994], [Lia 1996], [Pa 1998], [Ga 1999a], [Ba 2000], [Ba 2001] und [Wa 2002]. Dem widersprechende Studien liegen bis zum heutigen Zeitpunkt nicht vor.

Tomita et al. [To 1994] haben in ihrer Arbeit bei der Untersuchung der Metalloproteinasen in der Adenom-Karzinom-Sequenz deutliche Erhöhungen der MMP-2 und MMP-9 im Tumorgewebe zymographisch nachweisen können. Die Auswertung fand allerdings qualitativ statt und bestätigte ähnliche immunhistochemisch gewonnene Ergebnisse. Wegen der nur qualitativ durchgeführten Auswertung fand keine statistische Signifikanzberechnung statt.

Liabakk et al. [Lia 1996] untersuchten 36 Normalgewebe, 35 Adenome und 131 maligne kolorektale Karzinome u. a. zymographisch. Dabei wurden densitometrisch erworbene Absolutwerte miteinander verglichen und nicht, wie in dieser Arbeit, ein semiquantitativer relativer Wert. Wegen der patientenbezogenen Streuung ist die Aussagekraft dieser Methode reduziert und eine Korrelation aller Karzinomgewebe gegenüber allen Normalgeweben nicht verlässlich. Die Untersucher kamen zu dem Ergebnis, dass die MMP-9 und die aktive MMP-2 im Tumorgewebe der Dukes-Stadien A und C gegenüber den Normalgeweben und Adenomen signifikant erhöht war. Die inaktive Form der MMP-2 war bei allen Dukes-Stadien gegenüber den Normalgeweben und Adenomen signifikant erhöht.

Parsons et al. [Pa 1998] untersuchten 53 kolorektale Karzinome und entsprechendes Normalgewebe nur zymographisch. Eine quantitative Auswertung wurde mit Hilfe von seriell angefertigten Verdünnungen eines MMP-Standards, die mit den zymographischen Ergebnissen verglichen wurden, durchgeführt. Ein Korrekturfaktor für unterschiedliche Hintergrundstärken wurde mit einbezogen. Es zeigten sich signifikante Erhöhungen der MMP-2 und MMP-9 im Karzinomgewebe verglichen mit dem dazugehörigen Normalgewebe.

Garbett et al. [Ga 1999a] untersuchten 24 kolorektale Gewebsproben zymographisch und verglichen sie mit dem dazugehörigen Normalgewebe. Es fand eine semiquantitative Auswertung mit Laserdensitometrie statt, bei der Gewicht, Fläche und optische Dichte bestimmt wurden. Die relative Proteinase-Aktivität wurde durch Multiplikation der Fläche jeder Bande mit der optischen Dichte bestimmt. Die inaktive MMP-2 war bei 18 von 24 untersuchten Paaren im Tumorgewebe signifikant erhöht, die aktive MMP-2 bei 23 von 24. Die Arbeit unterscheidet zwischen inaktiver und aktiver MMP-9. Die inaktive MMP-9 wurde in allen Tumor- und Normalgeweben nachgewiesen. Die aktive MMP-9 (84 kDa) war in allen Tumorgeweben exprimiert, dagegen aber nur in 3 der 24 Normalgeweben.

Baker et al. [Ba 2000] führten bei 46 kolorektalen Karzinomgeweben und dazugehörigen Normalgeweben u. a. Zymographien durch und kamen zu dem Ergebnis einer *signifikanten* Erhöhung aktiver MMP-2 und MMP-9 im Tumorgewebe verglichen mit dem Normalgewebe.

Baker et al. [Ba 2001] verglichen ein Jahr später bei 77 kolorektalen Gewebsproben die Zymographie mit dem Gelatinase Activity Assay. In der Zymographie sowie im Assay ergaben sich im Tumorgewebe erhöhte MMP-Spiegel. Sie unterschieden dabei mittels Zymographie nicht nur die aktive und latente MMP-2 sondern werteten auch zwei Lysebanden der MMP-9 (aktive und inaktive MMP-9) aus. Die aktive und latente MMP-2 und MMP-9 waren erhöht exprimiert.

Waas et al. [Wa 2002] untersuchten 73 gepaarte Gewebsproben (Tumor- versus Normalgewebe) zymographisch und mittels Activity Assay. Auch in dieser Studie wurde in der Zymographie zwischen aktiver und latenter MMP-9 unterschieden. Auch hier war die Erhöhung aller MMP-2 und MMP-9-Formen im Tumorgewebe signifikant.

In allen oben genannten Arbeiten wurde allerdings nie zwischen Kolon- und Rektumkarzinom unterschieden.

Kolon versus Rektum

In der vorliegenden Arbeit zeichnet sich eine deutliche Tendenz darauf ab, dass sich die Enzymmuster von Kolon- und Rektumkarzinom voneinander unterscheiden. Beim Kolonkarzinom kommt es dabei zu einem erheblich stärkeren Anstieg der MMP-9 als beim Rektumkarzinom, bei dem der Anstieg der aktiven MMP-2-Form überwiegt. Im statistischen Vergleich des MMP-9-Anstiegs Kolon versus Rektum ist im Mann-Whitney-Test lediglich ein Trend zu verzeichnen. Eine Signifikanz ist nur sehr knapp verfehlt worden ($P = 0.052$). Die Untersuchung einer größeren Stichprobenanzahl würde hier möglicherweise zu signifikanten Ergebnissen führen. Auch wurden hier zur Signifikanzberechnung strenge Testbedingungen festgelegt und ein Test angewandt, bei dem keine Normalverteilungen vorausgesetzt wurden. Setzt man Normalverteilungen voraus und wendet den Studentschen t-Test an, so unterscheidet sich die MMP-9-Expression in Kolon- und Rektumkarzinomgewebe signifikant ($P = 0.021$).

Warum ist der MMP-9-Anstieg im Rektumgewebe deutlich geringer als beim Kolon? Als ein Erklärungsmodell könnte die oben beschriebene generell erhöhte Gesamtaktivität der MMP-9 im rektalen Normalgewebe dienen. Dies könnte zu einer verminderten Differenz zwischen gesundem Gewebe und Karzinomgewebe führen. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ergibt sich aus der Feststellung von Waas et al. [Wa 2002], dass die MMP-9-Aktivität von der Tumorlokalisation abhängig ist. Sie machen die Aussage, dass der Pro-MMP-9-Gehalt im Tumorgewebe von proximal nach distal abnimmt. Das bedeutet, dass in Rektumtumoren weniger Pro-MMP-9 vorhanden ist, als in Kolontumoren. Da der MMP-Gehalt des Normalgewebes im Rektum vermutlich erhöht ist, ergibt sich daraus eine geringere Differenz zwischen Tumor- und Normalgewebe. Andere Autoren haben die Abhängigkeit der MMP-9 von der Lokalisation allerdings nicht gefunden [Ze 1996].

In der Literatur wurde bislang bei der Untersuchung der Metalloproteinasen des kolorektalen Karzinoms überwiegend Kolon- und Rektumgewebe zusammengefasst und gemeinsam untersucht. Eine Ausnahme bilden Liabakk et al. [Lia 1996], die mittels Zymographie die MMP-2 und MMP-9 im kolorektalen Karzinomgewebe mit großer Stichprobenanzahl untersucht und dabei unter anderem Kolon- mit Rektumgewebe verglichen haben. Dabei fanden sie ebenfalls *keine* signifikanten Unterschiede zwischen Kolon- und Rektumgewebe. Dies könnte damit erklärt werden, dass in dieser Arbeit mit Absolutwerten im karzinogenen Gewebe gerechnet wurde und nicht mit einem, vom Vergleich zwischen gesundem und Karzinomgewebe abhängigen Faktor. Dadurch könnte auch hier die erhöhte Gesamtaktivität im Rektumnormalgewe-

be für die rechnerisch nicht vorhandene Signifikanz verantwortlich sein. In diesem Falle wäre eine Berechnung eines normierten Wertes aufschlussreich gewesen. Des Weiteren wurden die archivierten Daten nicht klar in Kolon- und Rektumgewebe getrennt. In der vorliegenden Arbeit wurden diese genau getrennt.

Ob es einen Zusammenhang zwischen unterschiedlicher MMP-9-Expression in Kolon- und Rektumgewebe und dem klinischen Verlauf, der Prognose und der Therapie bei Rektum- und Kolonkarzinompatienten gibt, müsste in weiteren Studien genauer untersucht werden. Bekannt ist, dass das distale Rektumkarzinom eine höhere Lokalrezidivrate und andere Metastasierungswege aufweist. Ob dies mit einer, verglichen mit dem Kolongewebe unterschiedlichen MMP-9-Expression zusammenhängt, könnte Thema weiterer Untersuchungen sein.

Mit Hilfe der Western-Blot-Analyse konnte auf Proteinebene das in der Zymographie festgestellte unterschiedliche Enzymmuster von Kolon- und Rektumpatienten bestätigt werden. Die Ursache für eine unterschiedliche MMP-9-Aktivität von Kolon- und Rektumkarzinomen könnte daher auf Proteinebene liegen oder auf einen früheren Schritt in der Proteinexpression zurückzuführen sein [Roe 2001b].

6.2.4 Bedeutung der MMPs für Prognose und Therapie des kolorektalen Karzinoms

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die in der Literatur zahlreich beschriebene Beobachtung, dass die Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 im Karzinomgewebe kolorektaler Karzinome erhöht exprimiert werden. In allen untersuchten Karzinomgeweben waren sie signifikant erhöht.

MMP-2 und MMP-9 spielen eine entscheidende Rolle bei der Karzinommetastasierung. Wie im Kapitel „Theoretische Grundlagen“ beschrieben, sind die Metalloproteinasen-2 und -9 mit ihrer Fähigkeit, Kollagen IV zu spalten, hauptsächlich für den Durchbruch der Basalmembran bei der Karzinommetastasierung verantwortlich. Das lässt vermuten, dass sie ein großes diagnostisches und therapeutisches Potential in der Karzinomtherapie haben.

MMP-2 und MMP-9 sollten getrennt betrachtet werden, da es sich mehr und mehr zeigt, dass diese beiden MMPs trotz ihrer Ähnlichkeiten auch unterschiedliche Rollen in der Tumorprogression zu haben scheinen. Waas et al. [Wa 2002] untersuchten aktive und inaktive MMP-2- und MMP-9-Formen zymographisch und per Activity Assay und fanden sowohl im Hinblick auf die Verteilung als auch auf klinikopathologische Variablen deutliche Unterschiede zwischen den beiden MMPs. Laut ihren Untersuchungen korreliert die MMP-2 negativ mit Dukes Stadium und TNM-Klassifikation. Die MMP-9 dagegen korreliert nicht mit klinikopathologischen Variablen, nur mit

der Tumorlokalisierung. Des Weiteren war der Quotient aktives Enzym/Proenzym für die MMP-9 im Normalgewebe und für die MMP-2 im Tumorgewebe am höchsten. In der Tumordinvasion scheint also die MMP-2-Aktivierung von entscheidender Bedeutung zu sein. Bei der MMP-9 steigt vor allem die Produktion der Proform im Laufe der Karzinomsequenz. Es wird diskutiert, dass dies möglicherweise durch eine vermehrte Induktion der MMP-9-Sekretion durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten erklärbar ist.

In bisherigen Studien ergibt sich kein einheitliches Bild über die prognostische Nutzbarkeit von MMP-2 und MMP-9. Vielfach ist die Höhe der MMP-2- und MMP-9-Expression in der Literatur mit unterschiedlichen Prognosefaktoren verglichen worden. In den meisten Studien wurde jedoch *kein* signifikanter Zusammenhang mit den bisherigen Klassifizierungssystemen gefunden. Es ergaben sich häufig widersprüchliche Ergebnisse.

Die Feststellung von Waas et al. hinsichtlich einer negativen Korrelation der MMP-2 mit dem Dukes Stadium sind neu. Levi et al. [Lev 1991] haben demgegenüber eine positive Korrelation zwischen MMP-2 und Dukes Stadium hergestellt. Auch Baker et al. [Ba 2001] fanden eine positive MMP-2-Korrelation mit dem Dukes Stadium und Lymphknotenbefall. Liabakk et al. [Lia 1996], die die größte Stichprobenzahl untersuchten, fanden keinen Zusammenhang zwischen MMP-2 und Dukes Stadium. Die MMP-2 wurde weiterhin positiv mit einem schlechten Differenzierungsgrad [Ri 1997] und Lebermetastasen [Ar 1998] korreliert.

Bei der MMP-9 ergaben sich insgesamt weniger Zusammenhänge mit klinischen Parametern. Aussagen dazu ob die MMP-9-Expression im kolorektalen Tumorgewebe mit dem Dukes Stadium korrelierte war, wie bei der MMP-2, widersprüchlich. Baker et al. [Ba 2001] fanden einen positiven Zusammenhang, Waas et al. [Wa 2002] nicht. Baker et al. beschrieben weiterhin eine positive Korrelation mit einem Lymphknotenbefall, Waas et al. fanden hauptsächlich einen Zusammenhang zwischen der MMP-9-Expression und der Lokalisation (proximal-distal).

Die meisten Autoren sind sich darin einig, dass es keine eindeutigen Korrelationen zwischen MMP-2 bzw. MMP-9 und Geschlecht, Alter und 5-Jahres-Überlebensrate gibt.

Warum sind die Ergebnisse so uneinheitlich? Zu vermuten ist eine Methodenabhängigkeit der Ergebnisse und möglicherweise falsche Schlüsse aufgrund zu kleiner Stichprobenzahlen. Sollte es jedoch einen eindeutigen Zusammenhang von MMP-2 und MMP-9 mit irgendeinem klinischen Parameter geben, so sollte dieser trotz verschiedener angewandter Methoden bei der großen Anzahl von Studien, die bereits durchgeführt wurden, ersichtlich sein. Vielmehr ist zu überlegen, ob die Untersuchung von Tumorgewebe auf MMP-2 und MMP-9 mit Hilfe von Methoden wie der Zymographie oder Activity Assay als Prognosefaktor ungeeignet ist. Der Grund liegt darin, dass diese beiden MMPs nicht spezifisch von den Tumorzellen sezerniert wer-

den. Zum Beispiel wird MMP-9 auch von Entzündungszellen im den Tumor umgebenden Stroma sezerniert. Mit Hilfe der Zymographie kann die Herkunft der MMPs nicht bestimmt werden und unterliegt großen, personenabhängigen Schwankungen. Es stellt sich die Frage, ob MMP-Spiegelmessungen im Blutplasma von Karzinompatienten eine geeignete Alternative zu den Gewebsuntersuchungen wären. Zucker et al. [Zu 1993] fanden eine erhöhte MMP-9-Expression im Blutplasma von Kolonkarzinompatienten, die aber nicht mit dem Krebsstadium korrelierte. Tutton et al. [Tu 2003] haben mittels ELISA bestätigen können, dass MMP-9 und auch MMP-2 im Blutplasma von Patienten mit kolorektalem Karzinom verglichen mit gesunden Probanden signifikant erhöht waren. Die MMP-2- und MMP-9-Spiegel korrelierten dabei positiv mit dem Dukes Stadium. Des weiteren beobachteten sie 6–12 Monate nach kurativer Therapie mit Tumorresektion einen signifikanten MMP-2- und MMP-9-Abfall im Blut. Sie vermuteten daher, dass die Plasma-MMP-Spiegel ein guter Indikator für Invasion und Metastasierung beim Kolonkarzinom sind und zur Therapiekontrolle dienen könnten.

Baker et al. [Ba 2000] beschrieben, dass im Gegensatz zur MMP-2 und MMP-9, bei der MMP-1 Korrelationen mit klinischen Daten wesentlich eindeutiger sind und hielten diese als Prognosefaktor für besser geeignet.

Gegenüber der Möglichkeit MMP-2 und MMP-9 als zukünftige Prognosefaktoren zu betrachten ist zu bedenken, inwieweit unsere Ergebnisse für die Entwicklung einer verbesserten Karzinomtherapie durch eine Metastasierungshemmung bzw. Tumorzell-Invasionshemmung wertvoll sind. Beim komplexen Metastasierungsvorgang gibt es verschiedene Ansätze, und jede Ebene der MMP-Expression und -Aktivierung kann Ziel einer therapeutischen Intervention sein. Die katalytische Funktion der MMP-9 ist komplex. Die Expression wird transkriptionell durch extrazelluläre Faktoren wie Zytokine oder Wachstumsfaktoren sowie den Zellkontakt zur ECM reguliert (s. Kapitel „Theoretische Grundlagen“).

Die Aktivierung der Metalloproteinasen ist ebenfalls von entscheidender Bedeutung. Die inaktive MMP-2 zum Beispiel ist im gesunden Gewebe ubiquitär verbreitet [Pa 1998]. Im Rahmen der Adenom-Karzinom-Sequenz kommt es zu einem dramatischen Anstieg der aktiven MMP-2 [Lia 1996], was zeigt, dass die Aktivierung der MMP-2 für die Invasivität eines Gewebes besonders bedeutend ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen dies. Sowohl im Kolon- als auch im Rektumgewebe war die Expression der inaktiven MMP-2 am wenigsten erhöht, die aktive war dagegen verstärkt exprimiert.

Bei der MMP-9 ist zymographisch die Unterscheidung zwischen aktiver (82 kDa) und inaktiver (92 kDa) MMP-9 nur schwer möglich. Einige Autoren vermuten eine Vermischung der beiden Banden (aktiv und inaktiv) in der Zymographie z. B. [Dav 1993a]. Wir haben aus diesen Gründen auf eine getrennte Auswertung der

Doppelbande verzichtet. Parsons et al. [Pa 1998], Garbett et al. [Ga 1999a], Waas et al. [Wa 2002] und Baker et al. [Ba 2001] beschrieben eine Trennlinie zwischen aktiver und inaktiver MMP-9. Garbett et al. [Ga 1999a] wiesen die aktive MMP-9 fast nur in Tumorgewebe nach, während die inaktive in allen Normal- und Tumorgewebe vorhanden war. Bei der MMP-2 waren die Unterschiede weniger dramatisch, aber auch vorhanden. Waas et al. fanden ebenfalls einen signifikanten Anstieg aller aktiven Formen und Proformen von MMP-2 und MMP-9 im Tumorgewebe. Bezeichnend war jedoch die Feststellung, dass der Quotient aktives Enzym/Proform für MMP-9 im Normalgewebe am größten war und im Tumorgewebe am geringsten, während für die MMP-2 das umgekehrte galt. Dies weist darauf hin, dass möglicherweise für die Invasivität die MMP-2-Aktivierung von besonderer Bedeutung ist. Die MMP-9 wird offensichtlich im Gesamttumorgewebe besonders in ihrer Proform verstärkt exprimiert. Die eben dargelegten Faktoren zeigen abermals die Wichtigkeit der Proteinase-Aktivierung im metastatischen Prozess, besonders aber auch die Unterschiede zwischen MMP-2 und MMP-9. Sie legen nahe, dass ein Schwerpunkt weiterer Studien auch auf der unterschiedlichen Regulation der Aktivierung von Metalloproteinasen liegen sollte.

Eine weitere Möglichkeit ist die Hemmung des bereits aktivierten Enzyms. TIMP-1 kann aktivierte MMP-9 hemmen. Neben den TIMPs wurden bereits auch synthetische MMP-Inhibitoren entwickelt, die MMPs inaktivieren und somit die ECM-Degradierung verhindern können. Zu diesen zählt zum Beispiel der MMP-Inhibitor Marimastat, der sich in der klinischen Phase III befand [Ka 1999], [Br 1998]. Batimastat, ein Breitspektrum-MMP-Inhibitor, hat bei guter Verträglichkeit bereits in der Therapie maligner Pleuraergüsse zu einer deutlichen Besserung der Dyspnoe geführt [Ma 1999].

Dass die beschriebenen Inhibitoren in größeren Studien keine signifikanten Verbesserungen erzielen konnten, liegt an folgenden Punkten:

1. Die Inhibitoren hemmen relativ unspezifisch viele MMPs. Es gibt jedoch auch „gute“ MMPs, deren Aktivität zur Tumorrepression benötigt wird [Cou 2002].
2. Für diese Studien wurden nur Patienten mit ausgedehnten Tumoren im palliativen Ansatz recherchiert. Vermutlich sollte die MMP-Inhibitoren-Gabe aber relativ früh in der Tumorrepression erfolgen.

Ein anderer Mechanismus ist die Hemmung des Tumorwachstums durch Induktion einer Apoptose in malignen Zellen. Dieser kann zum Beispiel durch TIMP-3 oder Tetrazykline angestoßen werden [Fi 1997], [Ba 1998].

Im Kapitel „Theoretische Grundlagen“ wurde auf die antiproteolytische Wirkung von TIMPs hingewiesen. Auch darin könnte in Zukunft ein protektives Potential zur Invasionshemmung von Metastasen liegen. In tierexperimentellen Studien konnte durch eine Überexpression des TIMP-2-Gens in Nacktmäusen eine Reduktion der

Lebermetastasierung erzielt werden [Bra 2000].

Die Rolle der Metalloproteinasen bei der Entwicklung des kolorektalen Karzinoms ist von großer Bedeutung und erste Schritte der Entwicklung therapeutischer Möglichkeiten im Hinblick auf die Hemmung von MMPs wurden bereits getan. Dennoch sind noch weitere detaillierte Erkenntnisse über die Funktion, Aktivierung und Herkunft der verschiedenen Metalloproteinasen zur Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten notwendig.

Kapitel 7

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit widmete sich der Expression der Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 beim kolorektalen Karzinom mittels Zymographie und Western-Blot-Methode. Es wurden 20 Kolon- und 9 Rektumkarzinompatienten untersucht. Wir fanden einen signifikanten Anstieg der MMP-2 und MMP-9 im kolorektalen Karzinomgewebe verglichen mit dem gesunden Darmgewebe des jeweils gleichen Patienten ($P < 0.05$). Weiterhin konnten wir beim Vergleich von Kolon- und Rektumkarzinomgewebe tendenziell eine unterschiedliche MMP-Expression erkennen. Der MMP-9-Anstieg war beim Kolonkarzinomgewebe deutlich stärker ausgeprägt als beim Rektumkarzinomgewebe. Unter Voraussetzung strenger statistischer Testbedingungen (Mann-Whitney-Test) war dieser Unterschied rechnerisch knapp nicht signifikant ($P = 0.052$), bei Anwendung des Studentschen t-Tests differierten Kolon- und Rektumkarzinomgewebe signifikant ($P = 0.021$). Beim Rektumkarzinom war dagegen die Expression der aktiven MMP-2 am stärksten ausgeprägt.

Dieses unterschiedliche MMP-Enzymmuster von Kolon- und Rektumkarzinompatienten zeichnete sich in dieser Arbeit, verglichen mit bisher publizierten Daten, zum ersten Mal ab. Durch die Untersuchung einer größeren Stichprobenzahl hätten gegebenenfalls noch eindeutiger Ergebnisse erzielt werden können. Ein differentielles MMP-Enzymmuster könnte ein unterschiedliches therapeutisches Prozedere für Patienten mit Kolon- oder Rektumkarzinom nach sich ziehen.

Die Ergebnisse der signifikanten MMP-2- und MMP-9-Erhöhungen im Kolon- und Rektumkarzinomgewebe, verglichen mit gesundem Darmgewebe, bestätigen zum Teil bereits publizierte Daten.

Verglichen mit anderen Studien wurden in dieser Arbeit erstmalig Kolon- und Rektumgewebe getrennt voneinander asserviert, ausgewertet und miteinander verglichen. Wir haben für die vorliegenden Studien als Hauptmethode die Zymographie

angewandt, da sie die Möglichkeit der sensitiven Untersuchung aktiver Enzyme in menschlichem Darmgewebe bietet. Methodische Probleme dieser Arbeit waren dabei allerdings die aufwändige Gewebeasservierung und die somit nur geringe Patientenzahl, die in die Studie eingeschlossen werden konnte. Auch konnten mangels Patientencompliance oder mangelnder Dokumentation klinische Daten nicht vollständig rekrutiert werden. Ein weiteres Problem bereitete die semiquantitative Densitometrie, die die statistische Auswertung erschwerte.

Zusammen mit einer Aufarbeitung der Literatur zeigen unsere Ergebnisse, dass die Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 als sensitive Prognosefaktoren geeignet sind. Die Gelatinaseexpression ist allerdings wenig spezifisch. Unsere Ergebnisse bestätigen die wichtige Rolle der Metalloproteinasen bei der Karzinominvasion und -metastasierung und sind somit richtungsweisend für die weitere Krebstherapieforschung. Ein Schwerpunkt könnte dabei auf der Hemmung von Metalloproteinasen liegen, die auf verschiedenen Ebenen der MMP-Expression und MMP-Aktivierung stattfinden kann. Dennoch sind für eine gezielte Therapie weitere Erkenntnisse über die komplexen Regulationsmechanismen der MMPs notwendig.

Literaturverzeichnis

- [Alb 1991] ALBINI A, MELCHIORI A, SANTI L, LIOTTA LA, BROWN PD, SETLER-STEVENSON WG. Tumor Cell Invasion Inhibited by TIMP-2. *Journal of the National Cancer Institute*, 83 (11): 775–779, 1991
- [Alv 1990] ALVAREZ OA, CARMICHAEL DF, DE CLERK YA. Inhibition of Collagenolytic Activity and Metastases of Tumor Cells by Recombinant Human Tissue Inhibitor of Metalloproteinases. *Journal of the National Cancer Institute*, 82: 589–595, 1990
- [Am 1997] AMBIRU S, MIYAZAKI M, ITO H, NAKAGAWA K, SHIMIZU H, NUKUI Y, NOZAWA S, OKUNO A, YOSHITOMI H, NAKAJIMA N: A Prospective Study of Prognostic Value of Type IV Collagenase Activity in Colorectal Cancer Tissue. *Digestive Disease and Sciences*, 42 (8): 1660–1665, 1997
- [An 2004] ANDRE T, CORRADO B, LAMIA M-B, et al. Oxaliplatin, Fluorouracil and Leucovorin as Adjuvant Treatment for Colon Cancer. *New England Journal of Medicine*, 350 (23): 2343–2351, 2004
- [Ar 1998] ARII S, ISHIGAMI S, MORI A, ONODERA H, IMAMURA M. Implication of VEGF and MMPs in Hepatic Metastases of Human Colon Cancer. *Nippon-Geka-Gakki-Zasshi*, 99 (7): 436–40, 1998
- [Arn 2003] ARNOLD D, GROTHEY A, SCHMOLL H-J. Neue Entwicklungen in der systemischen Therapie des fortgeschrittenen Kolonkarzinoms. *Onkologie*, 9: 847–859, 2003
- [Art 1998] ARTHUR MJ, MANN DA, IREDALE JP. Tissue Inhibitor of Metalloproteinases, Hepatic Stellate Cells and Liver Fibrosis. *Gastroenterol Hepatol*, 13 Suppl: S 33–38, 1998
- [Ba 2001] BAKER EA, LEAPER DJ. Measuring Glatinase Activity in Colorectal Cancer. *European Journal of Surgical Oncology*, 28: 24–29, 2001
- [Ba 2000] BAKER EA, BERGIN FG, LEAPER DJ. Matrix Metalloproteinases, their Tissue Inhibitors and Colorectal Cancer Staging. *British Journal of Surgery*, 87 (9): 1215–1221, 2000

- [Ba 1998] BAKER AH, ZALTSMAN AB, GEORGE SJ, NEWBY AC. Divergent Effects of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases -1, -2, or -3 Overexpression on Rat Vascular Smooth Muscle Cell Invasion, Proliferation and Death in vitro: TIMP-3 promotes Apoptosis. *Journal of Clinical Investigation*, 101: 1478–1487, 1998
- [Ben 1996] BENYON RC, IREDALE JP, GODDARD S, WINWOOD PJ, ARTHUR MJ. Expression of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases -1 and -2 is increased in fibrotic human liver. *Gastroenterology*, 110 (3): 821–831, 1996
- [Ber 1990] BERNARD EJ, MUSCHEL RJ, HUGHES EN. Mr 92.000 Gelatinase Release Correlates with the Metastatic Phenotype in Transformed Rat Embryo Cells. *Cancer Research*, 50: 3872–3877, 1990
- [Bra 2000] BRAND K, BAKER AH, PEREZ-CANTO ET AL. Treatment of Colorectal Liver Metastases by Adenoviral Transfer of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-2 into the Liver Tissue. *Cancer Research*, 60: 5723–5730, 2000
- [Br 1998] BROWN PD. Synthetic Inhibitors of Matrix Metalloproteinases. In: PARKS WC, MECHAM RP (Hrsg). *Matrix Metalloproteinases*. San Diego: Academic Press, 243–262, 1998
- [Cla 1998] CLASSEN/DIEHL/KOCHSIECK. Lehrbuch der Inneren Medizin, 4. Auflage, 1998
- [Cou 2002] COUSSENS LM, WERB Z. Inflammation and Cancer. *Nature*, 420 (6917): 860–867
- [Dav 1993a] DAVIES B, HAPPERFIELD L, NAYLOR M, BOBROW L, RUBENS R, BALKWILL F. Activity of Type IV Collagenases in Benign and Malignant Breast Disease. *British Journal of Cancer*, 67: 1126–1131, 1993
- [DCI 1992] DE CLERK YA, PEREZ N, SHIMADA H, BOONE TC, LANGLEY KE, TAYLOR SM. Inhibition of Invasion and Metastasis in Cells Transfected with an Inhibitor of Metalloproteinases. *Cancer Research*, 52: 701–708, 1992
- [Dun 1996] DUNCAN ME, MURRAY GI, O'NEIL P, MELVIN WT, FOTHERGILL J. Expression of Metalloproteinases in Colorectal Cancer. *Biochemical Society Transactions*, 24 (2): 329S, 1996
- [Em 1994] EMMERT-BUCK M, ROTH MJ, ZHUANG Z, CAMPO E, ROZHIN J, SLOANE BF, LIOTTA LA, STETLER-STEVENSON WG. Increased Gelatinase A (MMP-2) and Cathepsin B in Invasive Tumor Regions of Human Colon Samples. *American Journal of Pathology*, 145: 1285–1290, 1994

- [Fe 1990] FEARON ER, VOGELSTEIN B. A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell*, 61: 759–67, 1990
- [Fi 1997] FIFE RS, ROUGRAFF BT, PROCTOR C, SLEDGE GW JR. Inhibition of Proliferation and Induction of Apoptosis by Doxycycline in Cultured Human Osteosarcoma Cells. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 130: 530–534, 1997
- [Ga 1999a] GARBETT EA, REED MWR, BROWN NJ. Proteolysis in Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 52: 140–145
- [Ga 1999b] GARBETT EA, REED MWR, BROWN NJ. Proteolysis in human Breast and Colorectal Cancer. *British Journal of Cancer*, 81 (2): 287–293, 1999
- [Har 1995] HARRISON. Innere Medizin, 13. deutsche Auflage, 1995
- [He 2001] HESLIN MJ, YAN J, JOHNSON MR, WEISS H, DIASIO RB, URIST MM. Role of Matrix Metalloproteinases in Colorectal Carcinogenesis. *Annals of Surgery*, 233 (6): 786–792, 2001
- [Hon 1996] HONDA M, MORI M, UEO H, SUGIMACHI H, AKIYOSHI T. Matrix Metalloproteinase-7 Expression in Gastric Carcinoma. *Gut*, 39: 444–448, 1996
- [Ire 1994] IREDALE JP, ARTHUR MJ. Hepatocyte-Matrix Interactions. *Gut*, 35 (6): 729–732, 1994
- [Ire 2003] IREDALE JP. Cirrhosis: New Research provides a Basis for rational and targeted Treatments. *British Medical Journal*, 327: 143–147, 2003
- [Ka 1999] KÄHÄRI VM, SAARIALHO-KERE U. Matrix Metalloproteinases and their Inhibitors in Tumor Growth and Invasion. *Annals of Medicine*, 31: 34–45, 1999
- [Kho 1992] KHOKKA R, ZIMMER MJ, GRAHAM CH, LALA PK, WATERHOUSE P. Suppression of Invasoin by Inducible Expression of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 (TIMP-1) in B16-F10 Melanoma Cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 84 (13): 1017–1022, 1992
- [Ko 1992] KORDULA T, GÜTTGEMANN I, ROSE-JOHN S, ROEB E, OSTHUES A, TSCHESCHE H, KOJ A, HEINRICH PC, GRAEVE L. Synthesis of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 (TIMP-1) in Human Hepatoma Cells (HepG2). *FEBS- Letters*, 313 (2): 143–147, 1992
- [Kou 1997] KOUMURA H, SUGIYMA Y, KUNIEDA K, SAJI S. Significance in Gene Expression of Matrix Metalloproteinase -9, Urokinase-Type Plasminogen Activator and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase for Metastases of Gastric and Colorectal Cancer. *Gan-To Kagaku-Ryoho*, 24 Suppl 2: 324–331, 1997

- [Lev 1991] LEVY AT, CIOCE V, SOBEL ME, GARBISE S, GRIGIONI WF, LIOTTA LA, STETLER-STEVENSON WG. Increased Expression of the Mr 72.000 Type IV Collagenase in Human Colonic Adenocarcinoma. *Cancer Research*, 51: 439–444, 1991
- [Lia 1996] LIABAKK N-B, TALBOT I, SMITH RA, WILKINSON K, BALKWILL F. MMP-2 and MMP-9 Type IV Collagenases in Colorectal Cancer. *Cancer Research*, 56: 190–196, 1996
- [Li 1989] LIOTTA LA, STETLER-STEVENSON WG. Metalloproteinases and Malignant Conversion: Does Correlation Imply Causality? *Journal of the National Cancer Institute*, 81 (8): 556–557, 1989
- [Li 1991] LIOTTA LA, STETLER-STEVENSON WG. Tumor Invasion and Metastasis: An Imbalance of Positive and Negative Regulation. *Cancer Research*, 51: 5054s–5059s, 1991
- [Lo 1994] LORENZ RJ. Grundbegriffe der Biometrie, 4. Auflage. Fischer-Verlag. S 164–169, 1994
- [Lu 1991] LU X, LEVY M, WEINSTEIN B, SANTELLA RM. Immunological Quantitation of Levels of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase -1 in Human Colon Cancer. *Cancer Research*, 51: 6231–6235, 1991
- [Ma 1999] MACAULAY VM, O BYRNE KJ, SAUNDERS MP ET AL. Phase I Study of intrapleural Batimastat (BB-94), a Matrix Metalloproteinase Inhibitor, in the Treatment of Malignant Pleural Effusions. *Clinical Cancer research*, 5: 513–520, 1999
- [Mar 2001] MARCHENKO GN, STRONGIN AY. MMP-28, a new Human Matrix Metalloproteinase with an unusual Cysteine-Switch Sequence is widely expressed in Tumors. *Gene*, 265: 87–93, 2001
- [McD 1991] MC DONNELL S, NAVRE M, COFFEY R, JR, MATRISIAN LM. Expression and Localisation of Matrix Metalloproteinase Pump-1 (MMP-7) in Human Gastric and Colon Carcinomas. *Molecular Carcinogenesis*, 4: 527–533, 1991
- [Mo 1995] MORI M, BERNARD GF, MIMORI K, UEO H, AKIYOSHI T, SUGIMACHI K. Overexpression of Matrix Metalloproteinase-7 mRNA in Human Colon Carcinomas. *Cancer*, 75: 1516–1519, 1995
- [Mu 1996] MURASHIGE M, MIYAHARA M, SHIRAISHI N, SAITO T, KOHNO K, KOBAYASHI M. Enhanced Expression of Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in Human Colorectal Tumors. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 26 (5): 303–109, 1996

- [Mur 1996] MURRAY GI, DUNCAN ME, O'NEIL P, MELVIN WT, FOTHERGILL JE. Matrix Metalloproteinase-1 is Associated with Poor Prognosis in Colorectal Cancer. *Nat.-Med*, 2 (4): 461–462, 1996
- [New 1994] NEWELL KJ, WITTY JP, RODGERS WH, MATRISIAN LM. Expression and Localisation of Matrix-Degrading-Metalloproteinases During Colorectal Tumorigenesis. *Molecular Cacinogenesis*, 10: 199–206, 1994
- [Och 1994] OCHIENG J, FRIDMAN R, NANGIA-MAKKER P, KLEINER DE, LIOTTA LA, STETLER-STEVENSON WG, RAZ A. Galectin-3 Is a Novel Substrate for Human Matrix-Metalloproteinases-2 and -9. *Biochemistry*, 33: 14109–14114, 1994
- [Pa 1998] PARSONS SL, WATSON SA, COLLINS HM, GRIFFIN NR, CLARKE PA, STEELE RJC. Gelatinase (MMP-2 and -9) Expression in Gastrointestinal Malignancy. *British Journal of Cancer*, 78 (11): 1495–1502, 1998
- [Ri 1997] RING P, JOHANNSON K, HÖYHTYÄ M, RUBIN K, LINDMARK G. Expression of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases TIMP-2 in Human Colorectal Cancer- A Predictor of Tumor Stage. *Britisch Journal of Cancer*, 76 (6): 805–811, 1997
- [Roe 1994] ROEB E, GRAEVE L, MLLBERG J, MATERN S, ROSE-JOHN S. TIMP-1 Protein Expression is Stimulated by IL-1 and IL-6 in Primary Rat Hepatocytes. *FEBS- Letters*, 349: 45–49, 1994
- [Roe 1995] ROEB E, ROSE-JOHN S, ERREN A, EDWARDS DR, MATERN S, GRAEVE L, HEINRICH PC. Tissue Inhibitor of Metalloproteinases -2 (TIMP-2) in Rat Liver Cells is increased by Lipopolysaccharide and Prostaglandin E2. *FEBS- Letters*, 357: 33–36, 1995
- [Roe 2001a] ROEB E, MATERN S. Matrixmetalloproteinasen als Promotoren der Tumorinvasion und Metastasierung. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 39: 807–813, 2001
- [Roe 2001b] ROEB E, DIETRICH CG, WINOGRAD R, ARNDT M, BREUER B, FASS J, SCHUMPELICK V, MATERN S. Activity and Cellular Origin of Gelatinases in Patients with Colon and Rectal Carcinoma. Differential Activity of Matrix-Metalloproteinase-9. *Cancer*, 92 (10): 2680–2691, 2001
- [Roe 2004] ROEB E, ARNDT M, JANSEN B, SCHUMPELICK V, MATERN S. Simultaneous Determination of Matrix (MMP)-7 and MMP-1, -3 and -13 Gene Expression by Multiplex PCR in Colorectal Carcinomas. *International Journal of Colorectal Diseases*, 19 (6): 518–524, 2004

- [Sa 2002] SACHS L. Angewandte Statistik, 10. Auflage. Springer-Verlag, 2002
- [Scho 2001] SCHÖLMERICH J, SCHMIEGEL W. Leitfaden kolorektales Karzinom -Prophylaxe, Diagnostik, Therapie-, 2001
- [Schu 1999] SCHUMPELICK/BLEESE/MOMMSEN. Chirurgie, 4. Auflage, 1999
- [Ste 1990] STETLER-STEVENSON WG, BROWN PD, ONISTO M, LEVY AT, LIOTTA LA. Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-2 (TIMP-2) mRNA Expression in Tumor Cell Lines and Human Tumor Tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 265 (23): 13933–13938, 1990
- [The 1996] THEWES M, POHLMANN G, ATKINSON M, MUELLER J, PATZ B. Stromelysin-3 (ST-3) mRNA Expression in Colorectal Carcinomas. *Diagnostic Molecular Pathology*, 5 (4): 184–190, 1996
- [To 1994] TOMITA T, IWATA K. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in Colonic Adenomas- Adenocarcinomas. *Diseases Colon Rectum*, 39: 1255–1264, 1996
- [Tur 1985] TURPEENNIEMI-HUJANEN T, THORGEIRSSON UP, HART IR, GRANT SS, LIOTTA LA. Expression of Collagenase IV (Basement Membrane Collagenase) Activity in Murine Tumor Cell Hybrids that differ in Metastatic Potential. *Journal of the National Cancer Institute*, 75: 99–103, 1985
- [Tu 2003] TUTTON MG, GEORGE ML, ECCLES SA, BURTON S, SWIFT I, ABULAFI AM. Use of Plasma MMP-2 and MMP-9 Levels as a Surrogate for Tumor Expression in Colorectal Cancer Patients. *International Journal of Cancer*, 107: 541–550, 2003
- [Ura 1989] URA H, BONFIL RD, REICH R, REDEL R, PFEIFER A, HARRIS CC, KLEIN-SZANTO AJP. Expression of Type IV Collagenase and Procollagen Genes and its Correlation with the Tumorigenic, Invasive and Metastatic Abilities of Oncogene-transformed Human Bronchial Epithelial Cells. *Cancer Research*, 49: 4615–4621, 1989
- [Wa 2002] WAAS ET, LOMME RMLM, DEGROOT J, WOBES TH, HENDRIKS T. Tissue Levels of active Matrix Metalloproteinase-2 and -9 in Colorectal Cancer. *British Journal of Cancer*, 86: 1876–1883, 2002
- [Ze 1996] ZENG ZS, GUILLEM JG. Colocalisation of Matrix Metalloproteinase-9-mRNA and Protein in Human Colorectal Cancer Cells. *British Journal of Cancer*, 74: 1161–1167, 1996

- [Ze 1995a] ZENG ZS, GUILLEM JG. Distinct Pattern of Matrix Metalloproteinase -9 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase -1 mRNA Expression in Human Colorectal Cancer and Liver Metastases. *British Journal of Cancer*, 72: 575–582, 1995
- [Ze 1995b] ZENG ZS, COHEN AM, ZHANG ZF, STETLER-STEVENSON, WG, GUILLEM JG. Elevated Tissue Inhibitor of Metalloproteinase -1 RNA in Colorectal Cancer Stroma correlates with Lymph Node and Distant Metastases. *Clinical Cancer Research*, 1: 899–906, 1995
- [Ze 1999] ZNG ZS, COHEN AM, GUILLEM JG. Loss of Basement Membrane Type IV Collagen is associated with increased expression of Metalloproteinases -2 and -9 (MMP-2 and MMP-9) during Human Colorectal Tumorigenesis. *Carcinogenesis*, 20 (5): 749–755, 1999
- [Zu 1993] ZUCKER S, LYSIK RM, ZARRABI M, MOLL U. Mr 92.000 Type IV Collagenase Is Increased in Plasma of Patients with Colon Cancer and Breast Cancer. *Cancer Research*, 53: 140–146, 1993

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APC-Gen	Adenomatous Polyposis Coli Gen
APS	Amoniumperoxodisulphat
APMA	p-Aminophenyl-Mercuracetat
BSA	Albumin Fraktion V
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
Ca	Karzinomgewebe
CEA	Carcinoembryonales Antigen
C.d.	Colon descendens
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
CRP	C-Reaktives Protein
Coe.	Coecum
DNA	Deoxyribonucleic Acid
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ECM	Extrazellulärmatrix
G	gesundes Darmgewebe
IG	Immunglobulin
IL	Interleukin
HRP	Horseradish Peroxidase
Hb	Hämoglobin
kDa	Kilodalton
LDH	Laktatdehydrogenase
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
M	Mittelwert
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MT-MMP	Membrangebundene Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messanger Ribonucleic Acid
n.d.	not documented
PCR	Polymerase Chain Reaction
PVDF	Polyvenylidene Fluoride Tranfer Membrane
r.F.	rechte Flexur
S	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulphat

SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Sig.	Sigma
TEMED	Tetramethyl-ethylene-diamine
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumor Necrosis Factor

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Elke Roeb für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung und Geduld bei der Vollendung dieser Arbeit.

Bettina Breuer danke ich dafür, dass sie mich im Labor so engagiert angelernt hat und mir jederzeit tatkräftig zur Seite stand. Bei Problemen hatte sie immer für mich Zeit.

Ich danke den Kollegen der Chirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Aachen, besonders Prof. Dr. Dr. Volker Schumpelick, Prof. Dr. Jürgen Faß, den ärztlichen Kollegen und dem Pflegepersonal für ihr freundliches Mitwirken und ihre Kooperation bei der Asservierung von Operationsresektaten und der Rekrutierung klinischer Daten.

Ein weiterer Dank geht an das Institut für Biochemie, das uns flüssigen Stickstoff und Laborräumlichkeiten zur Verfügung gestellt hat.

Herzlichen Dank richte ich auch an Prof. Dr. Martin Schäfer vom Institut für Statistik und Wirtschaftsmathematik an der RWTH Aachen, der mich bei den statistischen Fragestellungen dieser Arbeit beraten hat.

Ein großer Dank geht an meine Eltern, die mir mein Studium und diese Promotion ermöglicht und mich in jeder Lebenslage, besonders aber im Hinblick auf diese Promotion, ermutigt und bestärkt haben.

Meinem Ehemann Martin danke ich für seine große Mithilfe, seine Anregungen und seinen Rat bei dieser Arbeit.

Ich danke Gott, dass er mir die Befähigung für dieses Studium und die Promotion geschenkt hat und mir in schweren Zeiten Halt gegeben hat.

Lebenslauf

Name:	Marlies Arndt, geb. Hoor
Geburtsdatum:	23. 02. 1973
Geburtsort:	Essen
Familienstand:	verheiratet
Nationalität:	deutsch
08/1979 – 06/1983	Gerhard-Hauptmann-Grundschule, Velbert
08/1983 – 06/1992	Geschwister-Scholl-Gymnasium, Velbert
06/1992	Abitur
10/1992 – 04/1999	Studium der Medizin an der Rheinisch-Westfälischen Technischen-Hochschule Aachen
08/1994	Physikum
03/1996	1. Staatsexamen
03/1998	2. Staatsexamen
04/1998 – 04/1999	Praktisches Jahr am Marienhospital Aachen, Wahlfach Psychiatrie
05/1999	3. Staatsexamen
07/1999	Ärztin im Praktikum an der Psychiatrischen Klinik des Universitätsklinikums Aachen
01/2001 – 08/2002	Assistenzärztin an der Psychiatrischen Klinik des Universitätsklinikums Aachen
08/2002 – 05/2004	Mutterschutz und Elternzeit
seit 05/2004	Assistenzärztin an der Psychiatrischen Klinik des Universitätsklinikums Aachen

