

Aus der Klinik für Chirurgie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. H.-P. Bruch

**Immunhistologischer Nachweis und prognostische Bedeutung
von Matrix-Metallproteinasen
beim kurativ resezierten Rektumkarzinom**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät –

vorgelegt von
Alexander Schlamp
aus Hamburg

Lübeck 2007

-
1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Oliver Schwandner
 2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Wolfgang Eichler

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2007
zum Druck genehmigt. Lübeck, den 17.12.2007

Gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

1. EINLEITUNG	6
1.1 Rektumkarzinom	6
1.1.1 Epidemiologie.....	6
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese	6
1.1.3 Klinik und Diagnostik.....	7
1.1.5 Therapie	8
1.2 Prognosefaktoren	9
1.3 Matrix-Metalloproteinasen	11
1.3.1 MMP-2.....	14
1.3.2 Matrilysin (MMP-7).....	14
1.3.3 MT1-MMP	15
1.3.4 TIMP-2	15
2. FRAGESTELLUNG	17
3. MATERIAL UND METHODEN	19
3.1 Patienten.....	19
3.2 Kurative Chirurgie des Rektumkarzinoms.....	21
3.3 Histopathologie.....	23
3.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	24
3.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbungsprotokoll	24
3.5 Immunhistochemische Färbung.....	24
3.5.1 Färbeprotokoll immunhistochemische Färbungen	25
3.5.2 Vorbereitung der HT1080-Fibrosarkom-Zellen Färbung ...	26
3.6 Auswertung und Statistik.....	26
3.6.1 Lichtmikroskopische Auswertung.....	26

3.6.2 Auswahl und Definition der untersuchten Faktoren	27
3.6.3 Endpunkte und statistische Auswertung	28
4. ERGEBNISSE	30
4.1 Klinische, histopathologische und immunhistochemische Parameter	30
4.1.1 MMP-2	31
4.1.2 Matrilysin (MMP-7)	36
4.1.3 MT1- MMP	40
4.1.4 TIMP-2	43
4.2 Subgruppenanalyse im Hinblick auf die Infiltrationstiefe (pT-Status)	47
4.3 Prognostische Daten	48
4.3.1 Tumorprogression	48
4.3.2 Metachrone Fernmetastasen	50
4.3.3 Überlebensanalysen	54
4.3.3.1 Gesamtüberleben (overall survival)	54
4.3.3.2 Rezidivfreies Überleben (disease-free survival)	59
5. DISKUSSION	65
5.1 MMP-2	65
5.2 Matrilysin (MMP-7)	69
5.3 MT1-MMP	71
5.4 TIMP-2	72
5.5 Bewertung der eigenen Ergebnisse und Schlussfolgerung	74
6. ZUSAMMENFASSUNG	77
7. LITERATURVERZEICHNIS	79

8. ANHANG.....	96
8.1 TNM-Klassifikation.....	96
8.2 Daten der Patienten	98
8.3 Materialverzeichnis.....	100
8.3.1 Primärantikörper	100
8.3.2 Sekundärantikörper	100
8.3.3 Negativkontrolle	100
8.3.4 Chemikalien und Lösungen.....	101
8.3.5 Geräte und weitere Materialien	102
8.4 Abkürzungen	103
8.5 Publikation und Preis	104
8.5.1 Vortrags- und Posterpräsentation	104
8.5.2 Publizierter Abstract	104
8.5.3 Publikation	104
8.5.4 Preis	104
8.6 Poster.....	105
9. DANKSAGUNG	106
10. LEBENSLAUF	107

1. Einleitung

1.1 Rektumkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom ist mittlerweile für beide Geschlechter die zweithäufigste Krebserkrankung. Als Rektumkarzinome gelten dabei Tumoren, deren aboraler Rand bei der Messung mit dem starren Rektoskop 16 cm oder weniger von der Anokutanlinie entfernt ist [36]. Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen in Deutschland wird für Männer und Frauen jeweils auf etwas über 35.000 geschätzt. Das mittlere Erkrankungsalter ist bei Männern 69 und bei Frauen 75 Jahren. Das kolorektale Karzinom ist darüber hinaus sowohl für Frauen und Männer die zweithäufigste Krebstodesursache [109].

In Westeuropa und in Nordamerika ist seine Inzidenz weitaus höher als in Asien oder einigen afrikanischen Ländern. So variiert die Inzidenzrate weltweit bis zu 60fach beim Kolonkarzinom und bis zu 18fach beim Rektumkarzinom [15]. Bei Umsiedlung aus einem Gebiet mit geringer Inzidenz in eine Region mit höherer Inzidenz erfolgt eine Anpassung an das dortige Risiko [67].

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Eindeutige Daten zur Ätiologie kolorektaler Karzinome fehlen. Unterschieden wird zwischen sporadischen und hereditären Karzinomen. Das sporadische kolorektale Karzinom entsteht nach heutigem Wissensstand durch genetische Veränderungen im Darmepithel. In engem Zusammenhang damit werden verschiedene Umweltfaktoren gesehen. Ernährungsfaktoren wie eine ballaststoffarme Kost, ein hoher Anteil an tierischen Fetten, der Verzehr von so genanntem „roten Fleisch“ und regelmäßiger Alkoholkonsum werden diskutiert, ebenso Übergewicht und Bewegungsmangel. Risikominimierend scheinen eine obst- und gemüsereiche Kost zu sein. Verwandte ersten Grades von Patienten mit einem sporadischen kolorektalen Karzinom sind selbst überdurchschnittlich häufig betroffen, ob auf Grund von Genveränderungen oder infolge eines gemeinsamen Lebensstils, ist bisher nicht abschließend geklärt.

Etwa 5-10% der kolorektalen Karzinome entstehen auf der Basis von erblichen Faktoren, wie der familiären adenomatösen Polyposis coli (FAP) oder des hereditären nichtpolypösen Kolonkarzinom-Syndroms (HNPCC). Die familiäre adenomatöse Polyposis coli, das Gardner-, Turcot- und Oldfield-Syndrom gelten als obligate Präkanzerosen. Auch eine langjährige Colitis ulcerosa erhöht das Risiko an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken [66, 117].

1.1.3 Klinik und Diagnostik

Rektumkarzinome können relativ lange ohne klinische Symptome bleiben. Im Vordergrund stehen Änderungen der Stuhlgewohnheiten, Obstipation, paradoxe Diarrhoe, Tenesmen, Blutabgänge und Gewichtsverlust. Spätsymptome stellen Anämie, Schmerzen bei ausgedehntem Primärtumor sowie ein Ileus dar.

Die Metastasierung findet beim Rektumkarzinom ähnlich wie beim Kolonkarzinom zuerst meist über den Lymphabfluss statt. Da das Rektum nur relativ wenige Lymphgefäße besitzt, beginnt die Möglichkeit der Metastasierung erst mit der Invasion in die Muscularis mucosae und Submukosa. Dabei verlaufen die Lymphgefäße entlang der A. rectalis superior zur A. mesenterica inferior und über die Aa. rectales inferiores zur seitlichen Beckenwand über die Iliaca-interna-Gefäße. Bei sehr tiefem Tumorsitz besteht aber auch die Möglichkeit, dass der Tumor ähnlich dem Analkarzinom nach distal und inguinal metastasiert.

Nach der UICC-Klassifikation von 1997 werden befallene Lymphknoten distal der Abzweigung der A. mesenterica inferior in das N1- oder N2-Stadium eingeteilt. Darüber hinaus reichende Lymphknoten gelten definitionsgemäß als Fernmetastasen (M1). Die Leber ist aufgrund des venösen Abflusses über das Pfortadersystem das häufigste Metastasierungsorgan (73%). Die Lunge ist mit 10% der zweithäufigste Metastasierungsort vor allem bei tiefsitzenden Rektumkarzinomen [51]. Knochenmetastasen sind mit 1-4% eher selten und befinden sich überwiegend in der Lendenwirbelsäule und im Becken [13, 124]. Eine peritoneale Metastasierung kann sich im fortgeschrittenen Stadium finden.

Als Früherkennungsmaßnahme wird eine Untersuchung auf okkultes Blut im Stuhl und die rektal-digitale Untersuchung ab dem 50. Lebensjahr empfohlen. Eine Sigmoidoskopie ist ab dem 55. Lebensjahr alle fünf Jahre und eine Koloskopie ab dem 55. Lebensjahr alle 10 Jahre für die Früherkennung des kolorektalen Karzinoms sinnvoll [117].

Tumormarker, wie die Konzentration des karzinoembryonalen Antigens (CEA), haben weniger für die Diagnose, als für den Verlauf erhebliche Bedeutung [131] und dienen der postoperativen Überwachung. Es gibt jedoch auch mehrere Studien, die zeigen, dass Patienten mit einem deutlich erhöhten präoperativen CEA-Wert eine schlechtere Prognose haben als Patienten mit einem niedrigen CEA-Wert [22, 41, 46].

1.1.5 Therapie

Die differenzierte chirurgische Therapie hat in der letzten Dekade dazu geführt, dass bei 85% der Patienten eine kurative Resektion möglich ist [17, 19]. Die totale mesorektale Exzision (TME) stellt hierbei die entscheidende Bereicherung in der chirurgisch-onkologischen Behandlung des Rektumkarzinoms dar [18, 20, 21, 92]. So belegen die Ergebnisse der Zentren, die die TME als Dissektionsprinzip bei Karzinomen des mittleren und unteren Rektums anwenden, dass die Lokalrezidivraten bei kurativ behandelten Patienten unter 10% gesenkt werden konnten [5, 8, 12, 21, 39, 82]. Da mit diesem Verfahren das komplette Lymphabflussgebiet des Rektums mitentfernt wird, sollte mit dieser Technik auch bei Vorliegen eines Lymphknotenbefalls eine niedrige Lokalrezidivrate erzielt werden können [23].

Die verbesserte lokale Tumorkontrolle und die damit verbundene Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensraten sind die entscheidenden Zielkriterien in der operativen Therapie des Rektumkarzinoms. Unbestritten ist, dass die onkologischen Ergebnisse der sphinktererhaltenden tiefen Resektion im Vergleich zur abdominoperinealen Rektumexstirpation hinsichtlich der Lokalrezidivrate - bei beiden Operationsverfahren ist die TME obligat - gleichwertig sind [17, 99, 137]. Dabei ist die Lebensqualität nach Sphinktererhalt unvergleichlich höher.

Heute können 85-90% der Rektumkarzinome mit einer kurativen sphinktererhaltenden Resektion behandelt werden, ohne onkologische Qualitätsstandards preiszugeben.

Lange Zeit beruhte die Indikationsstellung zur adjuvanten Radiochemotherapie in den UICC-Stadien II und III auf der mittlerweile mehr als einer Dekade alten Empfehlung des National Institute of Health [94]. Mittlerweile gilt die präoperative Radiochemotherapie (neoadjuvante Therapie) bei fortgeschrittenen Rektumkarzinomen (uT3/T4 bzw. uN+) als Standard [116].

1.2 Prognosefaktoren

Tumorbezogene Prognosefaktoren gewinnen in der Onkologie zunehmend an Bedeutung [134]. Ihre klinische Relevanz liegt darin, den individuellen Krankheitsverlauf eines Patienten vorherzusagen, die optimale Therapiestrategie auszuwählen, Unterschiede im Therapieverlauf zu erklären und spezifische therapeutische Interventionen zu planen [49]. Die Prognose wird hierbei durch drei Faktoren beeinflusst: den Patienten (z.B. Alter, Geschlecht), die Therapie (z.B. Residualtumorfreiheit, Chirurg, adjuvante Therapie) und den Tumor selbst (z.B. Tumorstadium, histologischer Differenzierungsgrad, Tumorbiologie).

Prinzipiell findet man bei malignen Tumoren eine Vielzahl von Variablen, die bei isolierter Betrachtung einen Einfluss auf die Prognose haben. Da zwischen diesen Faktoren jedoch vielfach Wechselwirkungen bestehen, müssen jene Faktoren identifiziert werden, die unabhängig von anderen Parametern eine prognostische Wertigkeit haben [48].

Die weiteste Verbreitung und Akzeptanz als Prognosefaktor hat die anatomische Tumorausbreitung in Form der TNM-Klassifikation der UICC (Union Internationale Contre le Cancer) gefunden, die es erlaubt, jeden Patienten mit einer bestimmten Tumorentität einem vergleichbaren Tumorstadium mit entsprechender Prognose zuzuordnen [140]. Die TNM-Kategorien beschreiben die aktuelle Tumorausdehnung in Form der Tumordinvasionstiefe pT, des nodalen Status pN und der pM-Kategorie (Aufreten von Fernmetastasen). 90% der Patienten mit Tumoren im Stadium I und 40-80% im Stadium II und III werden allein durch chirurgische Intervention geheilt, jedoch nur 10% im Stadium IV [34, 107].

Darüber hinaus ist gerade bei soliden Tumorentitäten die Residualtumorklassifikation (R-Klassifikation) einer der stärksten prognostischen Parameter innerhalb der TNM-Klassifikation. Sie beschreibt die Vollständigkeit der Tumorresektion [140]. Die Vielzahl anatomischer, histopathologischer sowie tumorbiologischer Faktoren hat das College of American Pathologists veranlasst, eine Übersicht in einerseits etablierte und andererseits in Evaluation befindliche bzw. nicht anerkannte Marker zu entwickeln (Tabelle 1):

Tabelle 1: Einteilung potentieller prognostischer Parameter beim kolorektalen Karzinom (modifiziert nach [26, 134])

Kategorie	Definition	Kolorektales Karzinom
I	Definitiv bewiesener prognostischer Parameter mit Einfluss auf das Patientenmanagement	TNM-Klassifikation, R-Klassifikation, Blut- bzw. Lymphgefäßinvasion, präoperative CEA-Erhöhung
IIA	Prognostische Bedeutung wiederholt gezeigt, Erwähnung im Pathologiebericht gerechtfertigt, weitere statistisch eindeutige Studien notwendig	Tumordifferenzierung, TNM- und R-Klassifikation nach neoadjuvanter Therapie (ypTNM), R-Klassifikation nicht peritonealisierter Absetzungsrän-der
IIB	Prognostische Bedeutung in mehreren Studien gezeigt, Datenlage für Kategorie I bzw. IIA nicht ausreichend	Histologischer Tumortyp, histologische Zeichen einer Mikrosatelliteninstabilität (MSI), MSI-H, LOH 18q (DCC), Histologie des Tumorrandes (infiltrativ vs expandierend)
III	Prognostische Bedeutung nicht ausreichend untersucht	Alle, molekularen Marker (außer MSI, LOH 18q), perineurale Invasion, Gefäßdichte, DNA-Gehalt, Proliferation-, Differenzierungs- bzw. Invasionsmarker, peritumorale Fibrose/Inflammation
IV	Gut untersuchte Faktoren ohne prognostische Relevanz	Tumorgröße, makroskopischer Tumortyp

(DCC: deleted in colorectal cancer; MSI: Mikrosatelliteninstabilität; MSI-H: high degree-MSI; LOH: loss of heterozygoty)

1.3 Matrix-Metalloproteinasen

Die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind eine Familie von mindestens 24 zinkabhängigen Endopeptidasen und besitzen eine zentrale Funktion in der Degradation der extrazellulären Matrix. Durch Spaltung von Peptidbindungen sind sie in der Lage verschiedene Faserstrukturen der extrazellulären Matrix wie Kollagene und Elastase abzubauen. Erstmals wurden sie 1962 von Gros und Lapiere [43] als diejenigen Enzyme beschrieben, die durch ihre enzymatische Aktivität gegen Triple-Helix-Kollagen den Abbau des Schwanzes bei der Kaulquappe bewirken.

Die MMPs werden in Kollagenasen (MMPs 1, 8 und 13), Stromelysine (MMPs 3, 10 und 11), Gelatinasen (MMPs 2 und 9), Membrane-Type-(MT)-MMPs (MMPs 14-17, 24 und 25), Matrilysine (MMPs 7 und 26), Makrophagen-Elastase (MMP 12) und andere MMPs (MMPs 19, 21, 23, 27 und 28) unterteilt [71]. Die MMP-Familienmitglieder unterscheiden sich voneinander strukturell durch die Anwesenheit oder Abwesenheit von zusätzlichen Domänen, die zu ihrer Substratspezifität, der Bindung von Inhibitoren, der Bindung an Matrixkomponenten und ihrer Zelloberflächenlokalisation beitragen [112].

Physiologische Funktionen haben die Matrix-Metalloproteinasen u.a. bei der Angiogenese, der Embryogenese, der Wundheilung und der Migration von Leukozyten [7], sie spielen jedoch auch eine wichtige Rolle bei pathologischen Prozessen wie der Tumorinvasion, Tumorangiogenese und Metastasierung [118, 141]. Die Bedeutung der MMPs für die Metastasierung maligner Tumore wurde zuerst von Liotta et al. [76] herausgestellt, die die Proteolyse als einen der entscheidenden Schritte bei der Tumorzellinvasion beschrieben.

Wegen der großen Bandbreite an MMP-Substraten, welche über ECM-Proteine, Wachstumsfaktoren und Chemokine bis hin zu diversen Adhäsionsmolekülen, wie z.B. Integrinen und E-Cadherinen reicht, wird heute davon ausgegangen, dass MMPs in der Krebsentwicklung eine weit größere Rolle zukommt als bisher angenommen [33].

Die MMPs bestehen aus einem Signalpeptid, einer Propeptidregion, einer katalytischen Domäne mit der hochkonservativen Zink bindenden Region und mit Ausnahme von MMP-7 und MMP-27 aus einer Hämopexindomäne, die über eine sog. „hinge region“ mit der katalytischen Domäne verbunden ist. Die membrangebundenen Metalloproteinasen (MT-MMPs) besitzen am C-Terminus zusätzlich eine Transmembrandomäne [112]. MMPs verrichten ihre proteolytische Arbeit stets in Nähe der zellulären Plasmamembran. Freie MMPs werden häufig von anderen Oberflächenproteinen, wie z.B. Integrinen an der Zelloberfläche fixiert und bilden dort polymolekulare Proteinkomplexe, die unter anderem der Regulierung der MMPs dienen [115].

MMPs werden als Proenzyme (Zymogene) von einer großen Anzahl von Zellen, wie Leukozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Keratinozyten, Chondrozyten, Hepatozyten und Osteoklasten sezerniert [136]. Die Inaktivität der Pro-Enzyme wird dabei durch die Interaktion zwischen einem Cystein in der Propeptidregion und dem Zinkion im aktiven Zentrum gewährleistet, diese Bindung blockiert das aktive Zentrum. Die Aktivierung des Enzyms geschieht im Extrazellulärraum durch Abtrennung der Propeptidregion durch MMPs und andere Proteasen, z.B. Plasmin oder Trypsin 2 [120]. Ausnahmen sind MMP-11 und MT1-MMP, die vor ihrer Sekretion durch Golgi-assoziierte furinähnliche Proteasen gespalten werden [118]. Zahlreiche Untersuchungen wie die von Sang [113] und Crabbe [27] haben gezeigt, dass die einzelnen MMPs zur gegenseitigen Aktivierung fähig sind. MMP-3 und -7 können MMP-2 und MMP-9, die beiden letztgenannten sich auch gegenseitig aktivieren. Pro-MMP-2 wird außerdem von MT1-MMP aktiviert [115, 122].

Die aktivierten MMPs werden in vivo von endogenen Inhibitoren wie dem α 2-Makroglobulin, Reck (reversion-inducing-cystein-rich protein with kazal motifs) und den Gewebeinhibitoren der MMPs (TIMP) inhibiert. TIMPs nehmen jedoch auch durch Komplexbildung mit den Gelatinasen auch Einfluss auf die Aktivierung derselben [122]. Zur Aufrechterhaltung des notwendigen Gleichgewichts zwischen MMPs und TIMPs wird die Expression letzterer ebenfalls kontrolliert. Dabei nehmen dieselben Faktoren, die MMPs regulieren, auch auf TIMPs Einfluss.

Die Expression der MMPs in Tumoren wird durch Wachstumsfaktoren und Zytokine, wie Interleukine (IL-1, IL-4, IL-6), TGF und TNF- α parakrin reguliert. Diese regulatorischen Moleküle werden sowohl durch inflammatorische Zellen, die den Tumor infiltrieren, als auch durch Tumorzellen und Stromazellen sezerniert [112]. Zum Teil werden die Wachstumsfaktoren und Zytokine wiederum durch MMPs aktiviert bzw. deaktiviert, so dass ein Feedback-Mechanismus besteht [121]. Einzelne Bestandteile der extrazellulären Matrix spielen selber eine Rolle in der Regulation der MMP-Transkription, z.B. Vitronectin [6], Kollagen und Elastin [44].

Mehrere Studien haben komplexe kontinuierliche Interaktionen zwischen Tumorzellen, Stromazellen und inflammatorischen Zellen während der Tumordinvasion nachgewiesen, durch welche die MMP-Expression reguliert wird [53, 54]. Tumorzellen produzieren EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer), welches die Produktion von MMPs wie MMP-1, MMP-2 und MT1-MMP durch Fibroblasten induziert [9, 56]. Wasylyk et al. [133] zeigten die Möglichkeit der Aktivierung von MMP-Expression durch Onkoproteine wie c-Ets. Als weitere Faktoren mit Expressions-stimulierendem Potential fungieren FGF-2 [86], EGF [60] und VEGF [69].

Eine erhöhte MMP-Aktivität wurde bei zahlreichen Tumorentitäten dokumentiert, z.B. dem Pankreaskarzinom [16], dem Mamma-Karzinom [52], dem Ovarialkarzinom [29], dem Magenkarzinom [145], dem Schilddrüsenkarzinom [90] und dem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus.

Zusätzliche Hinweise für die Rolle der MMPs bei Tumorzellinvasion und Metastasierung wurde durch die Generierung von Knockout-Mäusen gegeben. Mäuse ohne MMP-7 zeigen eine verminderte Tumorigenität im gesamten Intestinum und vor allem im Kolon [138]. Mäuse ohne MMP-2 weisen eine reduzierte Angiogenese und Tumorprogression auf [55].

1.3.1 MMP-2

MMP-2 (72 kDa Gelatinase A) wurde 1979 erstmals von Liotta et al. [75] in einem Tumor der Maus als Typ IV Kollagenase beschrieben und wird von einer Vielzahl normaler und transformierter Zellen exprimiert. MMP-2 degradiert Typ IV Kollagen, eine Hauptkomponente der Basalmembran. Die Degradierung der Basalmembran ist essentiell für das invasive Tumorstadium und die Metastasierung [59, 118, 141].

Weitere Substrate sind Gelatine, Kollagene I, III, V, VII, VIII, X, XI, Aggrecan, Decorin, Laminin, Vitronectin, Fibronectin, Elastin, Fibrin, Fibrinogen, Plasminogen und α 1-Proteinase-Inhibitor [147]. MMP-2 kann zusätzlich auch MMP-9 und MMP-13 aktivieren [9]. Neben der proteolytischen Funktion spielt MMP-2 auch bei der Zelldifferenzierung, der Apoptose, der Angiogenese, der Immunantwort und dem Tumorstadium eine wichtige Rolle [83].

Die erhöhte Expression von MMP-2 in Tumorzellen steht im Zusammenhang mit kürzerer Überlebenszeit beim Magenkarzinom [4, 42], hypopharyngealen Plattenepithelkarzinom [85], Ovarialkarzinom [135], nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom [102], Zervixkarzinom [29], Nierenkarzinom [132] und Mammakarzinom [125]. Obwohl die Tumorzellen in manchen Fällen der Ursprung von MMP-2 sind, wird MMP-2 meist von den Stromazellen exprimiert [104].

1.3.2 Matrilysin (MMP-7)

Matrilysin wurde zuerst im postpartalem Uterus von Ratten entdeckt [142] und in verschiedenen Normalgeweben wie dem Endometrium, der Bronchialschleimhaut, Monozyten und Mesangium-Zellen nachgewiesen [139]. Es wird zudem von malignen Tumorzellen beim Prostata-Karzinom [47], Ösophagus-Karzinom [1, 143] Magen-Karzinom [84], hepatozellulärem Karzinom [144] und kolorektalem Karzinom [3] produziert. Zu den Substraten von MMP-7 gehören u.a. Plasminogen, Fibrinogen, MMP-1, MMP-2, MMP-9, der MMP-9/TIMP-1-Komplex, Kollagen Typ I und IV, Laminin-1, Fibronectin, Proteoglycan, Typ-1-Gelatine und nicht lösliches Elastin [27, 54, 147].

Matrilysin unterscheidet sich von anderen Metalloproteinasen durch sein geringes Molekulargewicht (28 kDa) und dem Fehlen der C-terminalen Domäne. Matrilysin wird, anders als etwa MMP-2, nur von den Tumorzellen selbst synthetisiert [3, 93].

1.3.3 MT1-MMP

1994 wurde von Sato et al. [115] eine neuartige MMP mit einer transmembranen Domäne kloniert und sequenziert: Membrane-type matrix metalloproteinase 1 – MT1-MMP (MMP-14). MT1-MMP kann direkt verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix, wie Kollagen Typ I, II und III, Gelatine, Fibronectin, Vitronectin, Laminin-1 und -5, Aggrecan, Fibrin und Tenascin degradieren [32, 53, 96]. MT1-MMP besitzt eine zentrale Rolle in der Aktivierungskaskade der anderen MMPs [64], insbesondere durch seine Funktion als membranständiger Aktivator von MMP-2 [115]. MT1-MMP wird, im Gegensatz zu den sezernierten MMPs, in der aktiven Form an der Zelloberfläche exprimiert, da seine Aktivierung intrazellulär durch Golgi-assoziierte furinähnliche Proteasen geschieht [118].

Die Expression von MT1-MMP korreliert in einer Vielzahl von Studien mit der Tumorerkrankung, z.B. beim Mamma-Karzinom [103], dem Leberkarzinom [45], dem Lungenkarzinom [103, 128] und dem Magenkarzinom [95].

1.3.4 TIMP-2

Die Aktivität von MMPs wird von spezifischen Gewebeinhibitoren reguliert - tissue inhibitors of matrix-metalloproteinases (TIMPs). Die Gewebeinhibitoren wurden erstmals 1975 identifiziert [10], inzwischen sind vier verschiedene TIMPs bekannt, die in verschiedensten Geweben und Körperflüssigkeiten nachzuweisen sind und allesamt MMP-inhibitorische Aktivität besitzen [40].

TIMPs werden oftmals von denselben Zelltypen exprimiert, die auch die Matrix-Metalloproteinasen produzieren [98]. TIMP-2 wurde zuerst 1986 von Herron et al. [50] beschrieben. Goldberg et al. [38] bemerkten, dass TIMP-2 und proMMP-2, ähnlich wie auch TIMP-1 und proMMP-9, einen nichtkovalenten Komplex bilden. TIMPs binden dabei an die hoch konservierte Zinkregion sowie an die Hämpexindomäne in äquimolaren Mengen. In der Bindungsaffinität der TIMPs zu den jeweiligen MMP bestehen Unterschiede.

TIMPs nehmen jedoch auch durch Komplexbildung mit den Gelatinasen auch Einfluss auf die Aktivierung derselben [122]. In vitro hemmen zwar stöchiometrisch gebundene TIMP-2-Enzyme die proteolytische Aktivität von MMPs reversibel, jedoch scheint in vivo letztendlich das Verhältnis zwischen MMP und ungebundenen TIMP-2 für die resultierende Aktivität der Proteinase verantwortlich zu sein. So bewirken hohe Konzentrationen an TIMP-2 eine Inhibition von MMP-2, niedrige Konzentrationen führen hingegen zu einer Komplexbildung mit MT1-MMP und pro-MMP-2, die zu einer Aktivierung MMP-2 führt. Dabei bindet TIMP-2 sowohl die Hämopexin-Domäne von proMMP-2 als auch die Aktivierungsdomäne von MT1-MMP. Dieser Komplex präsentiert das an der Zelloberfläche gebundene MMP-2-Zymogen einem TIMP-2-freien MT1-MMP zur Aktivierung [53, 63, 122].

Weitere Funktionen der TIMPs sind die Wachstumsstimulation von bestimmten Zelltypen, die Inhibition der Angiogenese und die Induktion von zellmorphologischen Veränderungen [35, 106]. Zunehmend kristallisieren sich auch weitere proteinaseunabhängige Funktionen (z.B. bei der Steroidgenese) heraus.

2. Fragestellung

Ziel der Arbeit war es, die immunhistochemisch ermittelte Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMP-2, MMP-7, MT1-MMP, TIMP-2) (Tabelle 2) sowie klinische und histopathologische Merkmale hinsichtlich ihrer prognostischen Relevanz beim Rektumkarzinom zu untersuchen.

Tabelle 2: Immunhistochemisch untersuchte Metalloproteinasen

Enzym	Synonym	Substrate [147]
MMP-2	Gelatinase A, Type IV Kollagenase	Gelatin; Kollagen I, III, IV, V, VII, VIII, X, XI; Aggrecan; Fibronectin; Laminin; Elastin; Fibrin; Fibrinogen; Plasminogen; proMMP-9; proMMP-13
MMP-7	Matrilysin, PUMP-1, Uterine Metallo- proteinase	Aggretan; Fibronectin; Decorin; Laminin; Kollagen I, IV; Gelatin; Elastin; Enactin; Tenascin; Fibrinogen; Plasminogen
MT1-MMP	Membrane type-1 MMP, MMP-14	Fibronectin; Kollagen I, II, III; Gelatin; Aggrecan; Perlecan; Vitronectin; Tenascin; Fibrinogen; a1Proteinase-Inhibitor; proMMP-2; proMMP-13
TIMP-2	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 2	proMMP-2, MT1-MMP, u.a. MMPs

Um ein homologes Kollektiv zu gewährleisten, wurden nur kurativ resezierte Rektumkarzinome (standardisierte Operation nach onkologischen Grundsätzen mit totaler mesorektaler Exzision, R0-Resektion, standardisierte histopathologische Untersuchung, adjuvante Radiochemotherapie in den UICC-Stadien II und III, komplette Nachsorge durch die Klinik für Chirurgie) in die vorliegende Analyse eingeschlossen.

Im Mittelpunkt standen insbesondere folgende Fragenstellungen:

- Korrelieren die immunhistochemisch ermittelten Enzym-Expressionen mit klinischen Parametern?
- Korrelieren die Enzym-Expressionen mit histopathologischen Parametern, u.a. dem Tumorstadium, der Invasionstiefe oder dem Lymphknotenstatus?
- Besteht eine prognostische Relevanz der immunhistologisch nachgewiesenen MMP-Expressionen im Hinblick auf die Rückfallrate (Lokalrezidiv oder metachrone Fernmetastasen)?
- Lässt sich eine prognostische Signifikanz der immunhistologisch nachgewiesenen Enzyme im Hinblick auf das Überleben (rezidivfreies Überleben, Gesamtüberleben) darstellen?
- Welche klinischen, operativen oder histopathologischen Parameter sind mit der Prognose assoziiert?
- Welche klinischen, operativen oder histopathologischen Parameter üben einen unabhängigen Einfluss auf die Prognose aus?

3. Material und Methoden

3.1 Patienten

Das Patientenkollektiv dieser retrospektiven Untersuchung entstammt dem Tumornachsorgeregister der Klinik für Chirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, in dem alle Patienten mit einem kolorektalen Karzinom prospektiv erfasst werden. Um ein homogenes Patientenkollektiv zu gewährleisten, wurden für einen definierten Zeitraum (Januar 1996 bis November 2002) 94 kurativ behandelte Patienten mit einem Adenokarzinom des Rektums identifiziert und für die vorliegende Studie ausgewählt, die die in Tabelle 3 dargestellten Einschlusskriterien erfüllten.

Tabelle 3: Ein- und Ausschlußkriterien

Eingeschlossen	Ausgeschlossen
Primäre Rektumkarzinome	Hereditäre, synchrone und Colitis-assoziierte Rektumkarzinome
Adenokarzinome	Entdifferenzierte Karzinome
Kurative Resektion mit TME	Lokale Exzision, TEM (Transanale endoskopische Mikrochirurgie)
Adjuvante Radiochemotherapie (UICC II und III)	Neoadjuvante Therapie
Intrainstitutionelle Tumornachsorge	Palliative Resektion, R1/R2-Resektion
Komplette Tumornachsorge	Keine komplette Tumornachsorge

Alle relevanten klinischen, operativen und histopathologischen Daten wurden anhand der PC-Datenbank „Rektumkarzinom“ prospektiv dokumentiert und regelmäßig mit den Daten der Tumornachsorge (gemäß den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Deutsche Krebsgesellschaft und ihre Arbeitsgemeinschaften und Deutsche Gesellschaft für für Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen) aktualisiert.

Die Nachbeobachtung der Patienten mit kolorektalem Karzinom erfolgte während der regelmäßigen Nachsorge in der Klinik für Chirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck (Tabelle 4 und 5).

Tabelle 4: Nachsorgeschema beim Rektumkarzinom: Tumorstadium T1-2 N0 M0

Zeit postoperativ	3 Mon.	1 Jahr	2 Jahre	3 Jahre	4 Jahre	5 Jahre	3-jährlich
Anamnese/Untersuchung	•	•	•	•	•	•	•
Tumormarker		•	•	•	•	•	•
Sonographie		•	•	•	•	•	•
Röntgen Thorax		•	•	•	•	•	•
Endoskopie	•	•		•		•	•

Tabelle 5: Nachsorgeschema beim Rektumkarzinom: Tumorstadium T3-4 N0 M0 oder T1-4 N+ M0

Zeit postoperativ	3 Mon.	1 Jahr	1 ½ Jahre	2 Jahre	2 ½ Jahre	3 Jahre	4 Jahre	5 Jahre	2-jährlich
Anamnese/Untersuchung	•	•	•	•	•	•	•	•	•
Tumormarker		•	•	•	•	•	•	•	•
Sonographie		•	•	•	•	•	•	•	•
Röntgen Thorax		•		•		•	•	•	•
Endoskopie	•	•		•		•	•	•	•

3.2 Kurative Chirurgie des Rektumkarzinoms

Die kurative Resektion (R0-Resektion) wurde in allen Fällen nach den gültigen onkologischen Standards durchgeführt [21]. Sie beinhaltet die Absetzung der A. mesenterica inferior aortennah, sowie der V. mesenterica inferior am Pankreasrand, die komplette Entfernung des Mesorektems (totale mesorektale Exzision) bei Karzinomen der unteren zwei Rektumdrittel, die Einhaltung eines onkologisch angemessenen Sicherheitsabstandes, die en-bloc-Resektion von tumoradhärenten Organen (multiviszzerale Resektion) sowie Erhalt der autonomen Nervenstränge (Plexus hypogastricus, Plexus pudendus) [82]. Entscheidende Operationsschritte sind in den Abbildungen 1-3 dargestellt:

Abbildung 1: Absetzung der Arteria mesenterica inferior

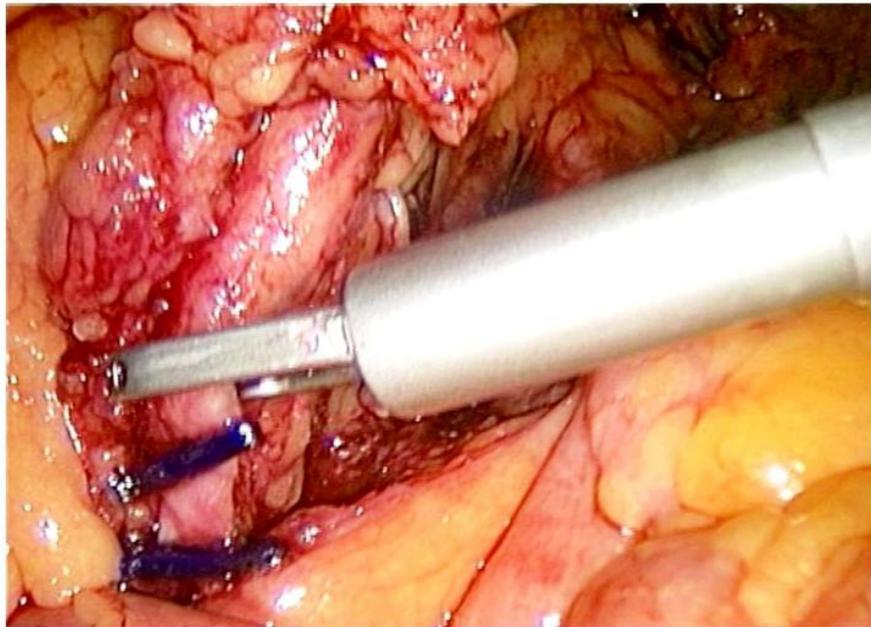


Abbildung 2: TME-Resektat

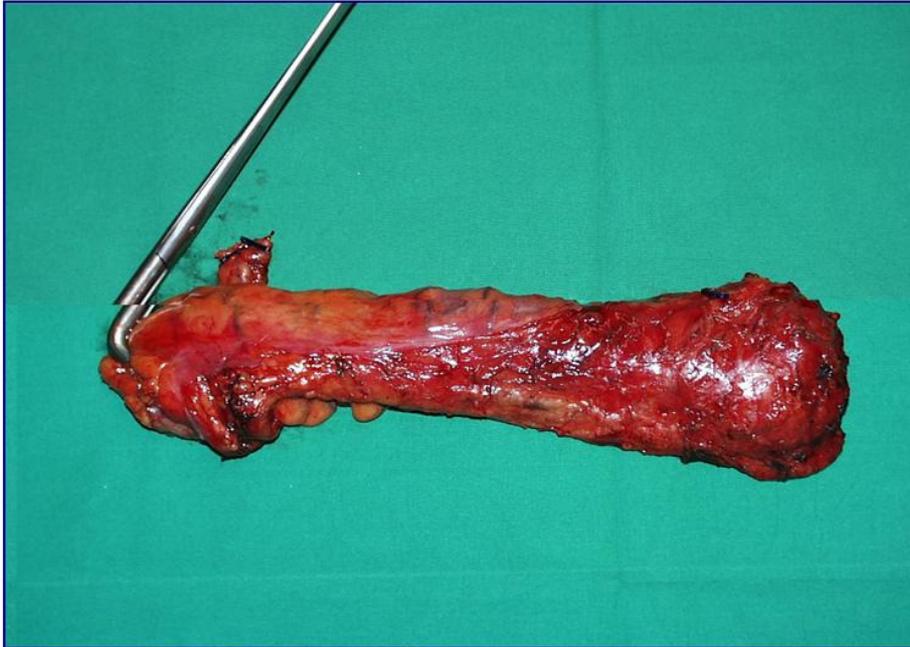
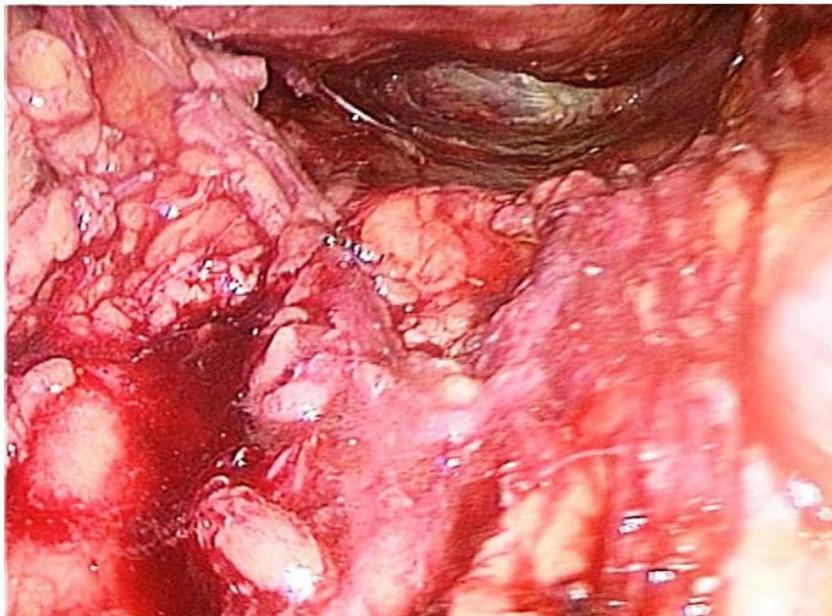


Abbildung 3: Situs nach TME



Bei Karzinomen des oberen Rektumdrittels wurde standardisiert eine anteriore Resektion mit intrapelviner kolorektaler Anastomose durchgeführt, ein aboraler Sicherheitsabstand in der Rektumwand von 5 cm in situ und eine ebenso weit nach aboral reichende Entfernung des Mesorektums waren erforderlich [17, 18, 20, 31]. Bei Karzinomen des mittleren und unteren Rektumdrittels erfolgte eine tiefe oder ultratiefe (intersphinktäre) Resektion mit kompletter Entfernung des Mesorektums (TME) bis zur Puborektalisschlinge. Hierbei wurde die Anastomose (kolorektal, bzw. koloanal) unterhalb von 6 cm ab Anokutanlinie angelegt. Ein aboraler Sicherheitsabstand von 2 cm in situ war erforderlich [17, 18, 20, 31].

Eine abdominoperineale Rektumexstirpation wurde immer dann zwingend notwendig, wenn der Tumor in den Analkanal eingewachsen war, d.h. Sphinkteren und Beckenboden infiltrierte [17]. Nach R0-Resektionen wurden Patienten in den UICC-Stadien II oder III nach den Empfehlungen der Konsensuskonferenz adjuvant nachbehandelt (Radiochemotherapie) [94].

3.3 Histopathologie

Die postoperative histopathologische Klassifikation der Tumoren erfolgte im Rahmen der routinemäßigen Begutachtung des Resektates durch das Institut für Pathologie (Direktor: Prof. Dr. med. A.C. Feller). Grundlage der Begutachtung waren stets die WHO-Klassifikation und das TNM-System, wobei die erhobenen Daten jeweils gemäß der aktuellen Auflage der UICC aktualisiert wurden [140].

Die Begutachtung des intakten TME-Präparats erfolgte intraoperativ durch den Operateur. Von jeder Tumorprobe wurden Tumor- und Normalgewebe formalinfixiert und in Paraffin eingebettet. Für die weitere immunhistochemische Bearbeitung wurden von den Paraffinblöcken mehrere Schnitte von ca. 4 µm Dicke angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Die Objektträger wurden über Nacht bei 56°C getrocknet.

3.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Aus den routinemäßig in Formalin fixierten und anschließend in Paraffin eingebetteten Tumorblöcken wurden jeweils 4 µm-dicke Gewebeschnitte immunhistochemisch untersucht. Vor jeder immunhistochemischen Analyse wurden HE-Färbungen (Hämatoxylin/Eosin) angefertigt, um repräsentative Schnitte mit ausreichend Tumorgewebe zu gewährleisten.

3.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbungsprotokoll

1. Objektträger entparaffinisieren (3x Xylol je 5 Minuten; absteigende Alkoholreihe: 100%, 100%, 96%, 96%, 70% jeweils 3 min)
2. In Millipore spülen
3. In Leitungswasser spülen
4. Färbung in Hämatoxylin für 5 Minuten
5. Bläuen in fließendem Leitungswasser für 10 Minuten
6. Gegenfärbung mit Eosin G-Lösung 0,5 % für 20 - 40 Sekunden
7. In Leitungswasser spülen
8. Aufsteigende Alkoholreihe
9. 3x Xylol je 5 Minuten
10. Eindecken mit Eukitt®

3.5 Immunhistochemische Färbung

Die EnVision+ System-HRP® Labelled Polymer Färbemethode basiert auf dem Einsatz eines enzym- als auch antikörpermarkierten Polymerkonjugats, das aus einem inerten Dextranmolekül (Polysaccharid) besteht, an welches durchschnittlich 70 Meerrettichperoxidasen und 10 Antikörper gebunden sind. AEC wurde bei allen Untersuchungen als Substrat-Chromogen verwendet. Die MMP-Antikörper (Tabelle 6) erkennen sowohl die latente wie auch aktive Form des Enzyms.

Alle Färbungen wurden mindestens zweimal durchgeführt, als Positivkontrolle dienten in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete positive Rektumkarzinome. Bei der MMP-2- und TIMP-2-Färbung wurden zusätzlich mit Dexamethason behandelte HT-1080 Fibrosarkomzellen auf Cytospins gefärbt.

Eine Negativkontrolle erfolgte bei jeder Färbeserie mit monoklonalen IgG1κ-Mäuse-Antikörpern in gleicher Antikörperkonzentration.

Tabelle 6: Verwendete Antikörper

Parameter	Primärantikörper	Verdünnung	Methode
MMP-2	Anti-MT1-MMP (Ab-3), Human (Mouse); Calbiochem, Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland (Clone 75-7F7, Fuji Chemical, Industries, Japan)	1:200	EnVision+ System-HRP® Labelled Polymer DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
MMP-7	Anti-MMP-7 (Ab-3), Human (Mouse); Calbiochem, Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland (Clone ID2)	1:30	EnVision+ System-HRP® Labelled Polymer, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
MT1-MMP	Anti-MT1-MMP (Ab-3) Human (Mouse); Calbiochem, Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland (Clone 114-6G6, Daiichi Fine Chemical, Toyama, Japan)	1:5	EnVision+ System-HRP® Labelled Polymer, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
TIMP-2	Anti-TIMP-2 (Ab-4) Human (Mouse); Calbiochem, Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland (Clone T2-N IC3, Daiichi Fine Chemical, Toyama, Japan)	1:30	EnVision+ System-HRP® Labelled Polymer, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark

3.5.1 Färbeprotokoll immunhistochemische Färbungen

1.Tag:

1. Objektträger entparaffinisieren (3 x Xylol jeweils 10 min; Alkoholreihe: 100%, 100%, 96%, 96%, 70% jeweils 3 min; danach in Millipore)
2. Antigen Retrieval: mit Citratpuffer pH 6 in der Mikrowelle aufkochen (15 min bei 700 Watt)
3. 20 min abkühlen lassen
4. in Millipore spülen
5. Peroxidase Blocking Reagent 10 min
6. 3 x mit Phosphate Buffered Saline spülen
7. Protein Block Serum-Free 10 min
8. Antikörperinkubation (Verdünnungen mit Dako Antibody Diluent); über Nacht in den Kühlschrank (4° C)

2. Tag:

1. 3 x 5 min auf dem Schüttler mit Phosphate Buffered Saline + Tween® spülen
2. 30 min EnVision+ System-HRP Labelled Polymer Anti-mouse
3. 3 x 5 min auf dem Schüttler mit Phosphate Buffered Saline + Tween® spülen
4. 1 Tablette AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazole) in 12 ml N,N-Dimethylformamid auflösen, 100 ml Barbitalpuffer, 100 ml Millipore und 10 µl H₂O₂ 30% dazugeben
5. 20 min auf den Schüttler
6. 10 min in fließendem Leitungswasser spülen
7. Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 50 sec
8. Bläuen in fließendem Leitungswasser für 10 min
9. Eindecken mit Aqua-Tex®

3.5.2 Vorbereitung der HT1080-Fibrosarkom-Zellen Färbung auf Zytospins

Nach der Entnahme aus dem -70° Celsius Gefrierschrank wurden die Zytospins 10 Minuten an der Luft getrocknet und kamen dann für 10 Minuten in 100% Aceton. Nach weiteren 5 Minuten lufttrocknen, wurden die Cytospins mit dem Peroxidase Blocking Reagent behandelt und anschließend nach o.g. Protokoll gefärbt.

3.6 Auswertung und Statistik

3.6.1 Lichtmikroskopische Auswertung

Die lichtmikroskopische Bestimmung der Expression der Matrix-Metalloproteinasen erfolgte durch zwei unabhängige Untersucher (Dr. rer. nat. Ute Windhövel, Cand. med. Alexander Schlamp). Pro Tumor wurden mindestens 1000 Zellen ausgezählt (je 200 Tumorzellen in 5 high-power-fields, Vergrößerung 400fach). Ein Gewebeschnitt wurde dann als „positiv“ definiert, sobald mehr als 10% der Tumorzellen bzw. des Stromas eine Anfärbung zeigten. Die Angabe der „Cut-off“-Werte (jeweils 10%) für negative bzw. positive Expression erfolgte in Übereinstimmung mit der Literatur (61, 97). Bei Divergenz der lichtmikroskopischen Auswertung erfolgte eine Re-Evaluation durch einen weiteren Untersucher (PD Dr. med. Oliver Schwandner).

3.6.2 Auswahl und Definition der untersuchten Faktoren

Alle klinischen, operativen, histopathologischen und immunhistochemisch ermittelten Daten für die Evaluation als Prognosefaktoren wurden – falls möglich – als dichotome Variable eingeteilt und entsprechend definiert (Tabelle 7):

Tabelle 7: In der Studie evaluierte klinische, operative, histopathologische und immunhistochemische Parameter

Parameter	Kategorie
Alter	< 70 Jahre > 70 Jahre
Geschlecht	weiblich männlich
Resektionsverfahren^a	TAR APE ExE
Tumorstadium	UICC I UICC II UICC III UICC IV
Präoperativer CEA-Wert^b	Norm (<5 ng/ml) erhöht (>5 ng/ml)
Differenzierung	Gut und mittelgradig differenziert (G1+2) Mäßig differenziert (G3)
Invasionstiefe	pT1+2 pT3+4
Lymphknotenstatus	negativ positiv
MMP-2-Epithel Status	negativ positiv

MMP-2-Stroma Status	negativ
	positiv
MMP-7 Status	negativ
	positiv
MT1-MMP Status	negativ
	positiv
TIMP-2 Status	negativ
	positiv

^a TAR = Tiefe anteriore Resektion; APE = Abdominoperineale Exstirpation; ExE = Exenteration

^b Patienten mit nicht bestimmbarer CEA (Kreuzreaktivität) nicht eingeschlossen

3.6.3 Endpunkte und statistische Auswertung

Um eine definitive Beurteilung der Prognose nach kurativer Resektion zu gewährleisten, wurden bezüglich des Endpunkts „Überleben“ sowohl das krankheitsfreie oder rezidivfreie Überleben („disease-free survival“, d.h. Wiederauftreten der Tumorerkrankung lokoregionär und/oder Fernmetastasen als erfasstes ungünstigstes Ereignis bzw. „event“) als auch das Gesamtüberleben („overall survival“, d.h. Tod jeder Ursache mit oder ohne Tumorerkrankung als erfasstes ungünstigstes Ereignis bzw. „event“) dokumentiert.

Im Hinblick auf den Endpunkt „Rückfallrate“ wurde zwischen lokoregionäre Rückfallrate (Lokalrezidiv), Fernmetastasierungsrate (metachrone Fernmetastasen) und Gesamtrückfallrate (Tumorprogression durch Lokalrezidiv als auch Fernmetastasen) differenziert. „Prognosefaktoren“ wurden als Faktoren mit unabhängigem Einfluss auf den Krankheitsverlauf ohne Berücksichtigung von Komplikationen definiert [49].

Statistische Signifikanzberechnungen erfolgten uni- und multivariat. Im Rahmen der Univarianalyse (Chi-Quadrat-Test, Student`s t-Test, Pearson Correlation Test mit pair-wise deletion) wurden immunhistochemische, klinische, operative und histopathologische Parameter hinsichtlich ihrer Korrelationen verglichen.

Zusätzlich wurden alle Faktoren bezüglich ihrer prognostischen Relevanz (Endpunkte: Rückfallrate und Überleben) univariat getestet.

Überlebenskurven wurden zensiert nach Kaplan-Meier berechnet und mit dem log-rank-Test statistisch verglichen. Die Univarianzanalysen erfolgten durch Frau C. Killaitis, Dokumentation der Klinik für Chirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (SPSS[®], Chicago, Illinois, USA). Im Hinblick auf die Endpunkte „Rückfallrate“ und „Überleben“ erfolgte zusätzlich eine Multivarianzanalyse (logistic regression model bzw. proportional hazards model; jeweils NCSS[®], Kaysville, Utah, USA).

Alle statistischen Signifikanzberechnungen wurden durch ein unabhängiges Referenzzentrum überprüft (Dr. H. Paul, Institut für Statistik und mathematische Wirtschaftsforschung der Universität Augsburg). Das statistische Signifikanzniveau wurde bei 5% festgelegt ($p < 0,05$ statistisch signifikant).

4. Ergebnisse

4.1 Klinische, histopathologische und immunhistochemische Parameter

Das Kollektiv der 94 Patienten bestand aus 54 Frauen (57,4%) und 40 Männern (42,6%), das mittlere Alter betrug 67,2 (range 32-92) Jahre und der Median lag bei 68,0 Jahren. Patienten- und Tumorcharakteristika sowie die Ergebnisse der Immunhistochemie sind in Tabelle 8 zusammengefasst:

Tabelle 8: Patienten- und Tumorcharakteristika sowie Daten der Immunhistochemie

Parameter	Kategorie	n = 94
Alter	< 70 Jahre	54 (57,4%)
	> 70 Jahre	40 (42,6%)
Geschlecht	weiblich	40 (42,6%)
	männlich	54 (57,4%)
Resektionsverfahren ^a	TAR	83 (88,3%)
	APE	10 (10,6%)
	ExE	1 (1,1%)
Tumorstadium	UICC I	19 (20,2%)
	UICC II	39 (41,5%)
	UICC III	33 (35,1%)
	UICC IV	3 (3,2%)
Präoperativer CEA-Wert ^b	Norm	62 (79,5%)
	erhöht	16 (20,5%)
Differenzierung	G3	22 (23,4%)
	G1+2	72 (76,6%)
Invasionstiefe	pT1+2	29 (30,9%)
	pT3+4	65 (69,1%)
Lymphknotenstatus	negativ	58 (61,7%)
	positiv	36 (38,3%)

MMP-2-Epithel Status	negativ	61 (64,9%)
	positiv	33 (35,1%)
MMP-2-Stroma Status	negativ	22 (23,4%)
	positiv	72 (76,6%)
MMP-7 Status	negativ	43 (45,7%)
	positiv	51 (54,3%)
MT1-MMP Status	negativ	48 (51,1%)
	positiv	46 (48,9%)
TIMP-2 Status	negativ	50 (53,2%)
	positiv	44 (46,8%)

^a TAR = Tiefe anteriore Resektion; APE = Abdominoperineale Exstirpation; ExE = Exenteration

^b Patienten mit nicht bestimmbarer CEA (Kreuzreaktivität) nicht eingeschlossen (n=14)

Einen positiven MMP-2-Epithel Status zeigten 35% (33/94) der Rektumkarzinome, 77% (72/94) waren positiv hinsichtlich der MMP-2-Expression des Stromas. 54% der Tumore (51/94) waren MMP-7-positiv, 49% (46/94) hatten einen positiven MT1-MMP Status und 47% (44/94) waren TIMP-2-positiv.

4.1.1 MMP-2

Die MMP-2-Expression war im Zytoplasma der Tumorzellen und im Stroma lokalisiert. Die MMP-2-Expression im Tumorzell-Zytoplasma (eMMP-2) war in 33 von 94 Fällen (35,1%) positiv, während die Expression im Stroma (sMMP-2) bei 72 (76,6%) der Tumore positiv war. Die Anfärbung des Stromas war meistens in Nähe der Tumorzellen zu beobachten. Im Normalgewebe wurden nur einzelne Epithelzellen angefärbt (Abbildungen 4-7)

Abbildung 4: Normalgewebe mit einigen wenigen MMP-2 positiven Epithelzellen (Originalvergrößerung 200fach)

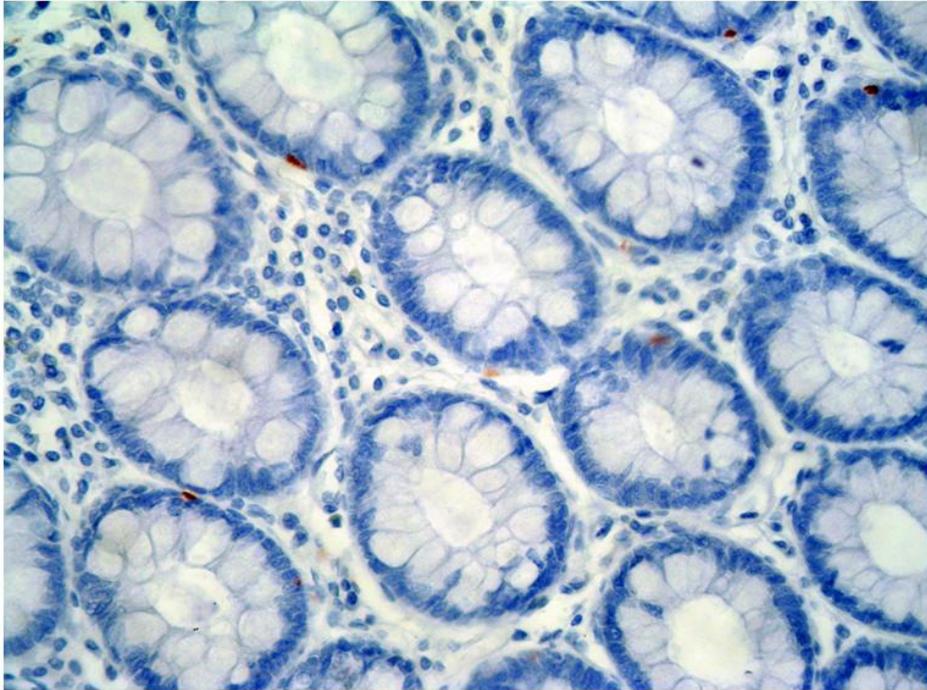


Abbildung 5: MMP-2 Expression im peritumorösen Stroma (Originalvergrößerung 200fach)

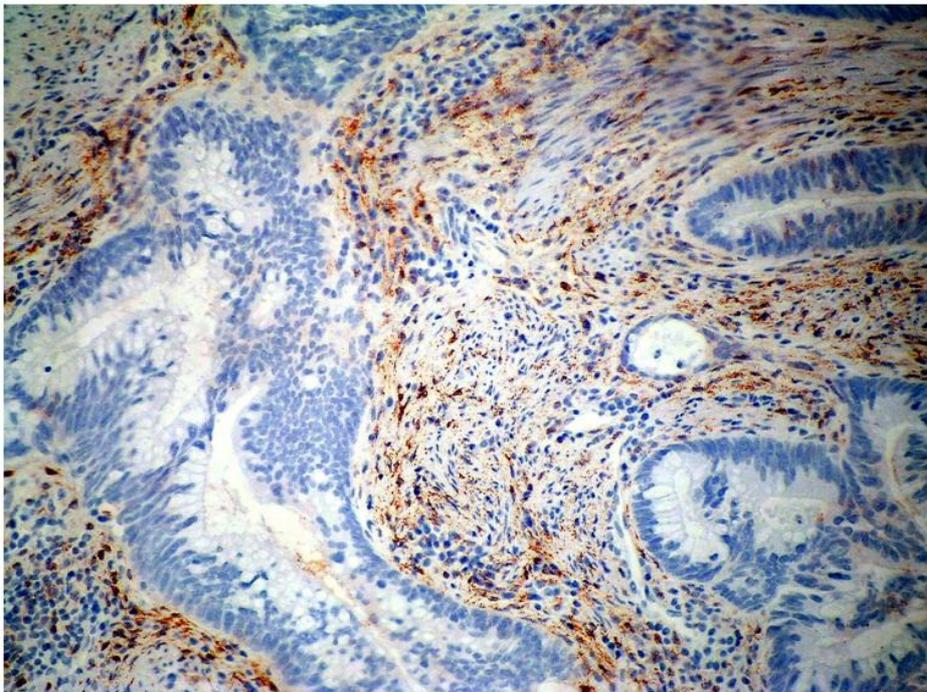


Abbildung 6: MMP-2 negativer Tumor
(Originalvergrößerung x 400fach)

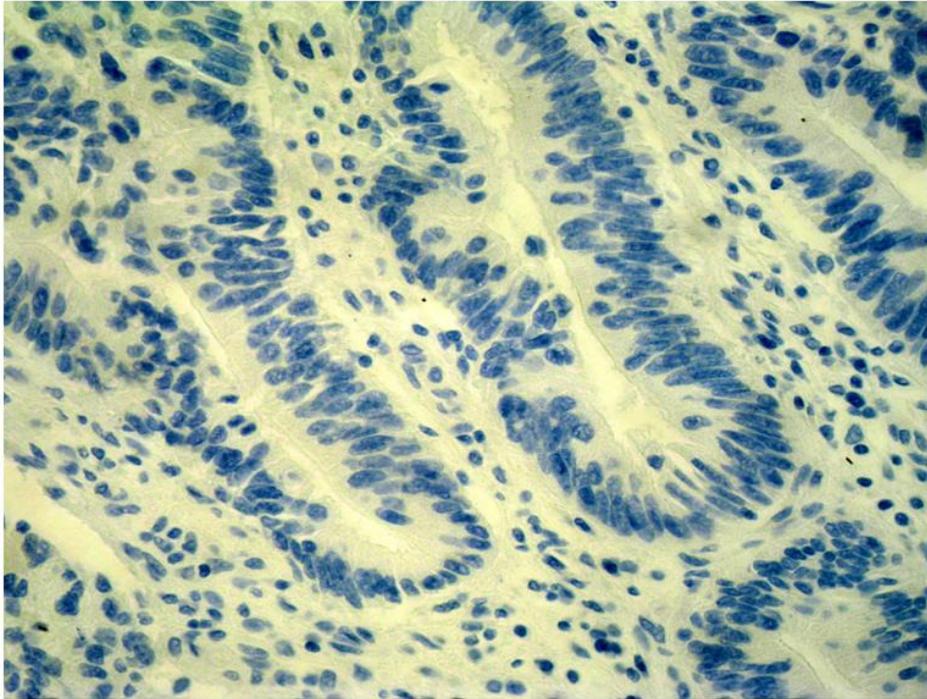
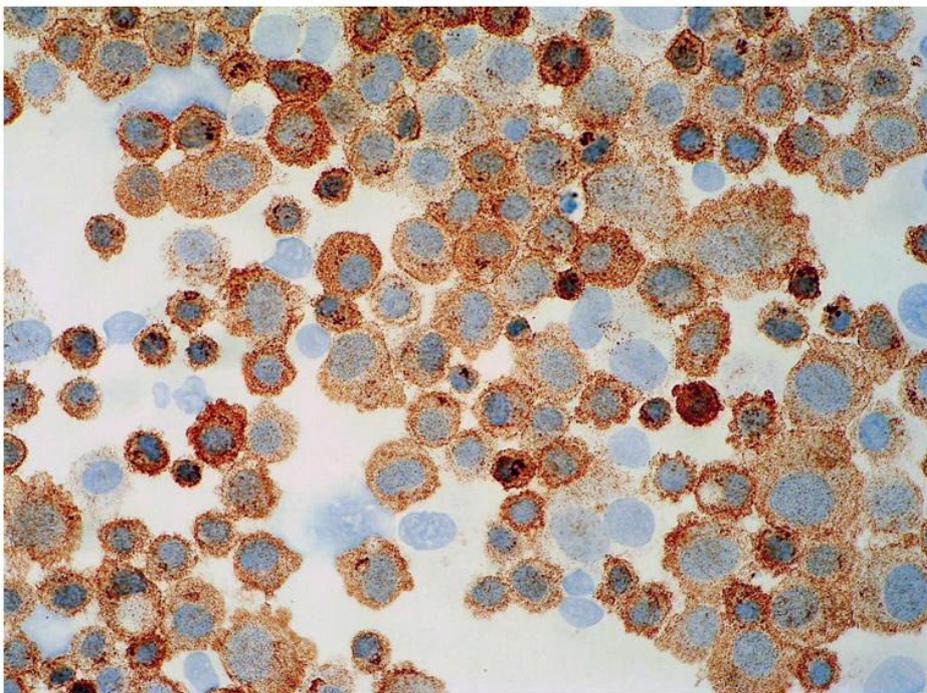


Abbildung 7: MMP-2-Expression von HT-1080
Fibrosarkomzellen (Originalvergrößerung 400fach)



Die Expression von eMMP-2 korrelierte mit der Expression von MMP-7 ($p=0,027$), MT1-MMP ($p=0,036$; Chi^2 -Test) und TIMP-2 ($p<0,001$; Chi^2 -Test). Es fanden sich mehr eMMP-2 positive Tumoren bei Patienten, die jünger als 70 Jahre waren, als bei älteren Patienten. Dieser prozentuale Unterschied erreichte aber keine Signifikanz ($p=0,077$; Chi^2 -Test). (Tabelle 9).

Die stromale MMP-2-Expression korrelierte mit der Invasionstiefe ($p=0,006$; Chi^2 -Test), MMP-7 ($p=0,016$; Chi^2 -Test) und TIMP-2 ($p=0,036$, Chi^2 -Test) (Tabelle 10).

Tabelle 9: Zusammenhang zwischen epithelialer MMP-2-Expression und den Tumoreigenschaften

Parameter	Kategorie	n	MMP-2-Epithel positiv	MMP-2-Epithel negativ	p-Wert (Chi^2)
Gesamt	alle	94	33 (35,1%)	61 (64,9%)	---
Alter	< 70 Jahre	54	23 (42,6%)	31 (57,4%)	(0,077)
	> 70 Jahre	40	10 (25,0%)	30 (75,0%)	
Geschlecht	männlich	54	17 (31,5%)	37 (68,5%)	NS
	weiblich	40	16 (40%)	24 (60,0%)	
Resektionsverfahren^a	TAR	83	28 (33,7%)	55 (66,3%)	NS
	APE	10	4 (40,0%)	6 (60%)	
	ExE	1	1 (100%)	0 (0%)	
Tumorstadium	UICC I	19	6 (31,6%)	13 (68,4%)	NS
	UICC II	39	13 (33,3%)	26 (66,7%)	
	UICC III	33	12 (36,4%)	21 (63,6%)	
	UICC IV	3	2 (66,7%)	1 (33,3%)	
Differenzierung	negativ (G3)	22	8 (36,4%)	14 (63,6%)	NS
	positiv (G1+2)	72	25 (34,7%)	47 (65,3%)	
Invasionstiefe	pT1+2	29	10 (34,5%)	19 (65,5%)	NS
	pT3+4	65	23 (35,4%)	42 (64,6%)	
Lymphknotenstatus	negativ	58	19 (32,8%)	39 (67,2%)	NS
	positiv	36	14 (38,9%)	22 (61,1%)	

Präoperativer CEA-Wert^b	negativ	16	7 (43,8%)	9 (56,3%)	NS
	Norm	62	19 (30,6%)	43 (69,4%)	
	erhöht	16	7 (43,8%)	9 (56,3%)	
MMP-2-Stroma Status	negativ	22	5 (22,7%)	17 (77,3%)	NS
	positiv	72	28 (38,9%)	44 (61,1%)	
MMP-7 Status	negativ	43	10 (23,3%)	33 (76,7%)	0,027
	positiv	51	23 (45,1%)	28 (54,9%)	
MT1-MMP Status	negativ	48	12 (25,0%)	36 (75,0%)	0,036
	positiv	46	23 (45,1%)	28 (54,9%)	
TIMP-2 Status	negativ	50	9 (18,0%)	41 (82,0%)	<0,0001
	positiv	44	24 (54,5%)	20 (45,5%)	

^a TAR = Tiefe anteriore Resektion; APE = Abdominoperineale Exstirpation; ExE = Exenteration

^b Patienten mit nicht bestimmbar CEA (Kreuzreaktivität) nicht eingeschlossen (n=14)

Tabelle 10: Zusammenhang zwischen der MMP-2-Expression im Stroma und den Tumoreigenschaften

Parameter	Kategorie	n	MMP-2- Stroma positiv	MMP-2- Stroma negativ	p-Wert (Chi ²)
Gesamt	alle	94	72 (76,6%)	22 (23,4%)	---
Alter	< 70 Jahre	54	42 (77,8%)	12 (22,2%)	NS
	> 70 Jahre	40	30 (75,0%)	10 (25,0%)	
Geschlecht	männlich	54	39 (72,2%)	15 (27,8%)	NS
	weiblich	40	33 (82,5%)	7 (17,5%)	
Resektionsverfahren^a	TAR	83	63 (75,9%)	20 (24,1%)	NS
	APE	10	8 (80,0%)	2 (20,0%)	
	ExE	1	1 (100,0%)	0 (0%)	

Tumorstadium	UICC I	19	12 (63,2%)	7 (36,8%)	NS
	UICC II	39	30 (76,9%)	9 (23,1%)	
	UICC III	33	28 (84,8%)	5 (15,2%)	
	UICC IV	3	2 (66,7%)	1 (33,3%)	
Differenzierung	negativ (G3)	22	19 (86,4%)	3 (13,6%)	NS
	positiv (G1+2)	72	53 (73,6%)	19 (26,4%)	
Invasionstiefe	pT1+2	29	17 (58,6%)	12 (41,4%)	0,006
	pT3+4	65	55 (84,6%)	10 (15,4%)	
Lymphknotenstatus	negativ	58	42 (72,4%)	16 (27,6%)	NS
	positiv	36	30 (83,3%)	6 (16,7%)	
Präoperativer CEA-Wert^b	nein	16	14 (87,5%)	2 (12,5%)	NS
	Norm	62	46 (74,2%)	16 (25,8%)	
	erhöht	16	12 (75,0%)	4 (25,0%)	
MMP-2-Epithel Status	negativ	61	44 (72,1%)	17 (27,9%)	NS
	positiv	33	28 (84,8%)	5 (15,2%)	
MMP-7 Status	negativ	43	28 (65,1%)	15 (34,9%)	0,016
	positiv	51	44 (86,3%)	7 (13,7%)	
MT1-MMP Status	negativ	48	37 (77,1%)	11 (22,9%)	NS
	positiv	46	35 (76,1%)	11 (23,9%)	
TIMP-2 Status	negativ	50	34 (68,0%)	16 (32,0%)	0,036
	positiv	44	38 (86,4%)	6 (13,6%)	

^a TAR = Tiefe anteriore Resektion; APE = Abdominoperineale Exstirpation; ExE = Exenteration

^b Patienten mit nicht bestimmbar CEA (Kreuzreaktivität) nicht eingeschlossen (n=14)

4.1.2 Matrilysin (MMP-7)

Eine positive MMP-7-Expression konnte im Zytoplasma und an der Zellmembran der Tumorzellen nachgewiesen werden. Stroma-Komponenten, außer einigen Monozyten, wurden nicht angefärbt. Normalgewebe zeigte ebenfalls keine Anfärbung (Abbildungen 8-10).

Abbildung 8: MMP-7 negatives Normalgewebe
(Originalvergrößerung 200fach)

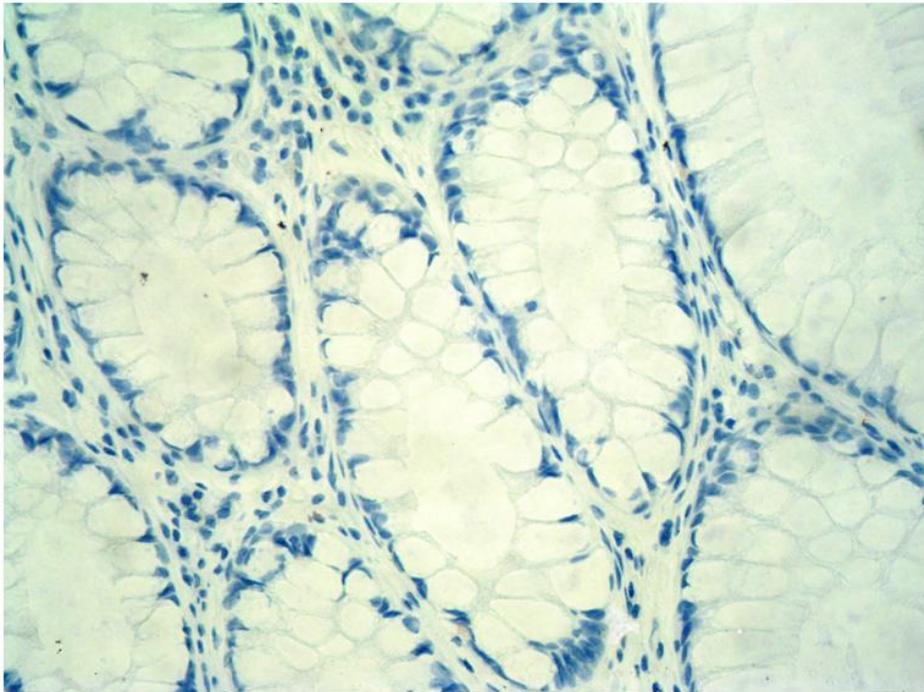


Abbildung 9: MMP-7- Expression im Zytoplasma von
Tumorzellen (Originalvergrößerung 400fach)

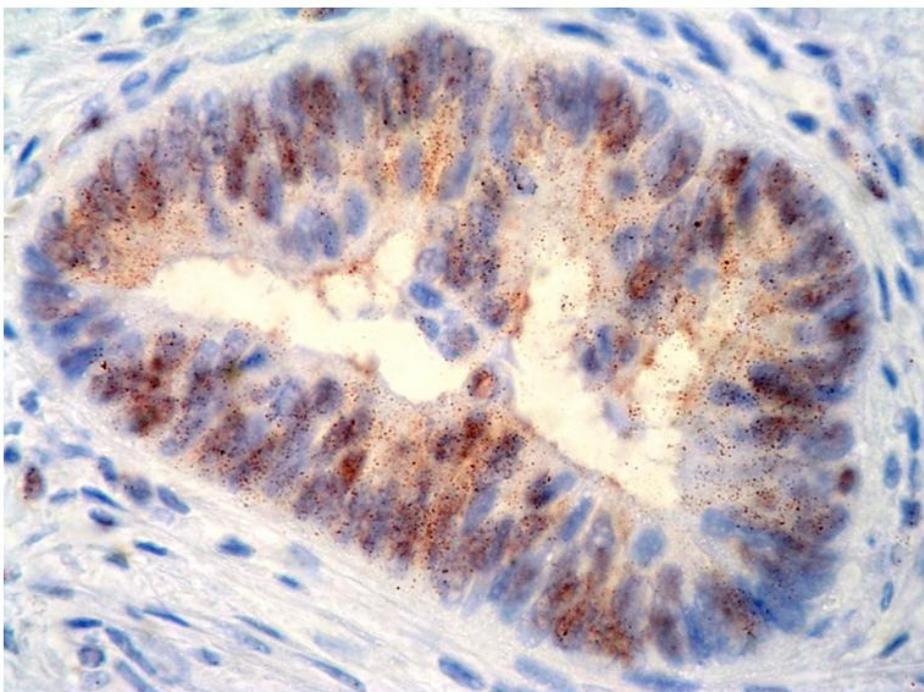
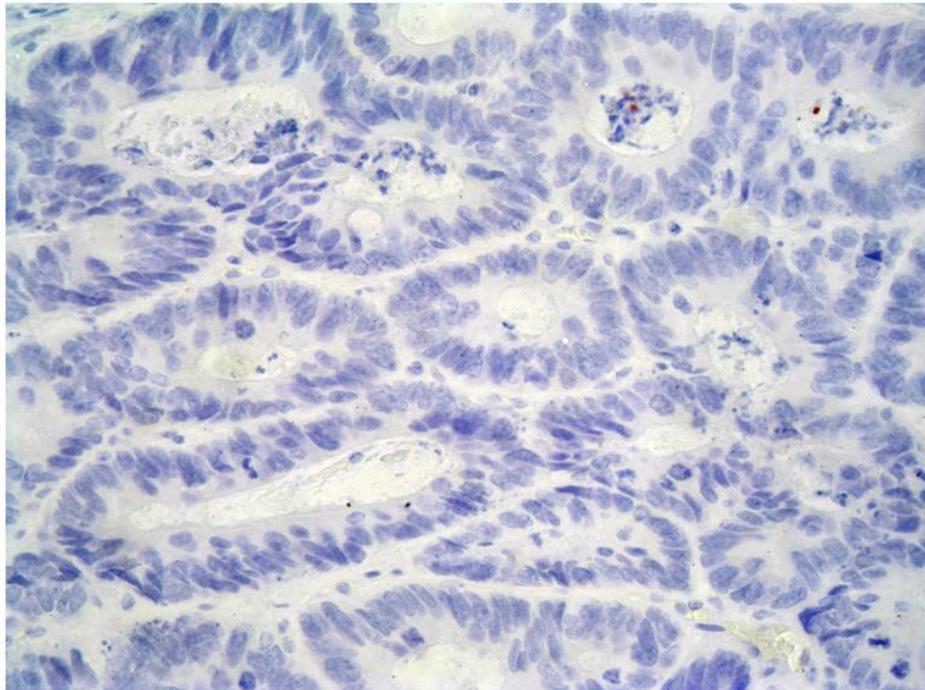


Abbildung 10: MMP-7 negativer Tumor
(Originalvergrößerung 200fach)



In 51 Fällen (54,3%) waren mehr als 10% aller Tumorzellen Matrilysin-positiv. Diese Fälle waren signifikant höher bei Patienten im pT3+4 Stadium (41/65, 63,1%), als bei Patienten im pT1+2 Stadium (10/29, 34,5%; $p=0,01$, Chi^2 -Test). Die Expression von MMP-7 korrelierte auch mit eMMP-2 ($p=0,027$, Chi^2 -Test), sMMP-2 ($p=0,016$; Chi^2 -Test), MT1-MMP ($p=0,004$; Chi^2 -Test) und TIMP-2 ($p<0,0001$, Chi^2 -Test) (Tabelle 11).

Tabelle 11: Zusammenhang zwischen der MMP-7-Expression und den Tumoreigenschaften

Parameter	Kategorie	n	MMP-7-positiv	MMP-7-negativ	p-Wert (Chi^2)
Gesamt	alle	94	51 (54,3%)	43 (45,7%)	---
Alter	< 70 Jahre	54	31 (57,4%)	23 (42,6%)	NS
	> 70 Jahre	40	20 (50,0%)	20 (50,0%)	
Geschlecht	männlich	54	27 (50,0%)	27 (50,0%)	NS
	weiblich	40	24 (60,0%)	16 (40,0%)	

Resektionsverfahren^a	TAR	83	46 (55,4%)	37 (44,6%)	NS
	APE	10	4 (40,0%)	6 (60,0%)	
	ExE	1	1 (100,0%)	0 (0%)	
Tumorstadium	UICC I	19	6 (31,6%)	13 (68,4%)	NS
	UICC II	39	28 (71,8%)	11 (28,2%)	
	UICC III	33	15 (45,5%)	18 (54,5%)	
	UICC IV	3	2 (66,7%)	1 (33,3%)	
Differenzierung	negativ (G3)	22	13 (59,1%)	9 (40,9%)	NS
	positiv (G1+2)	72	38 (52,8%)	34 (47,2%)	
Invasionstiefe	pT1+2	29	10 (34,5%)	19 (65,5%)	0,010
	pT3+4	65	41 (63,1%)	24 (36,9%)	
Lymphknotenstatus	negativ	58	34 (58,6%)	24 (41,4%)	NS
	positiv	36	17 (47,2%)	19 (52,8%)	
Präoperativer CEA-Wert^b	nein	16	11 (68,8%)	5 (31,3%)	NS
	Norm	62	33 (53,2%)	29 (46,8)	
	erhöht	16	7 (43,8%)	9 (56,3%)	
MMP-2-Epithel Status	negativ	61	28 (45,9%)	33 (54,1%)	0,027
	positiv	33	23 (69,7%)	10 (30,3%)	
MMP-2-Stroma Status	negativ	22	7 (31,8%)	15 (68,2%)	0,016
	positiv	72	44 (61,1%)	28 (38,9%)	
MT1-MMP Status	negativ	48	19 (39,6%)	29 (60,4%)	0,004
	positiv	46	32 (69,6%)	14 (30,4%)	
TIMP-2 Status	negativ	50	17 (34,0%)	33 (66,0%)	<0,0001
	positiv	44	34 (77,3%)	10 (22,7%)	

^a TAR = Tiefe anteriore Resektion; APE = Abdominoperineale Exstirpation; ExE = Exenteration

^b Patienten mit nicht bestimmbar CEA (Kreuzreaktivität) nicht eingeschlossen

4.1.3 MT1- MMP

Bei der immunhistochemischen Färbung mit MT1-MMP-Antikörpern wurde das Zytoplasma und die Zytoplasmamembran der Tumorzellen angefärbt. Stromazellen wurden nicht angefärbt. Auch im Normalgewebe zeigte sich keine MT1-MMP-Expression (Abbildungen 11-13).

Abbildung 11: MT1-MMP negatives Normalgewebe
(Originalvergrößerung 200fach)

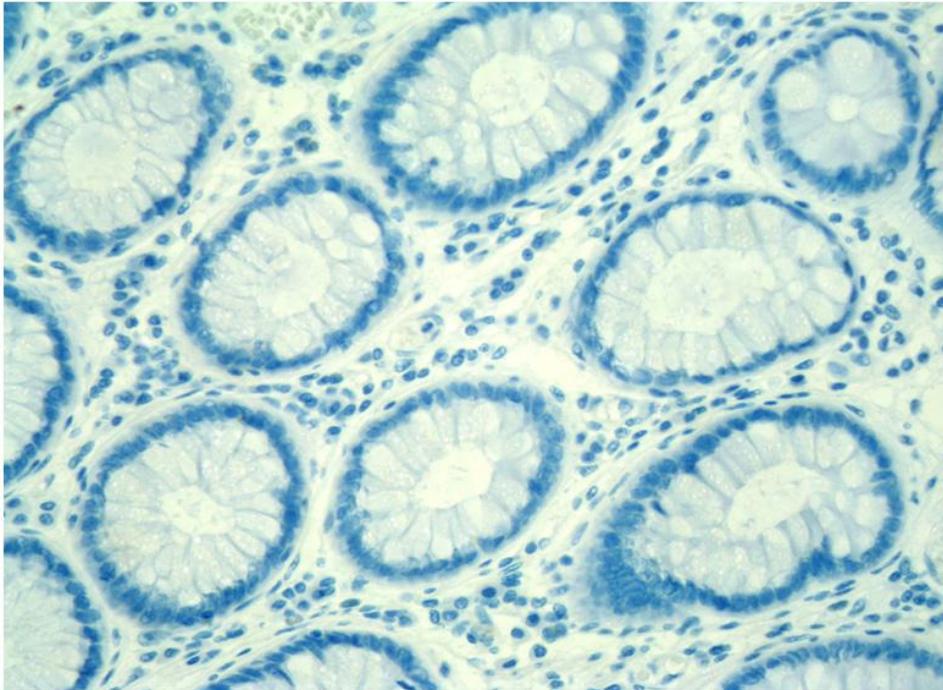
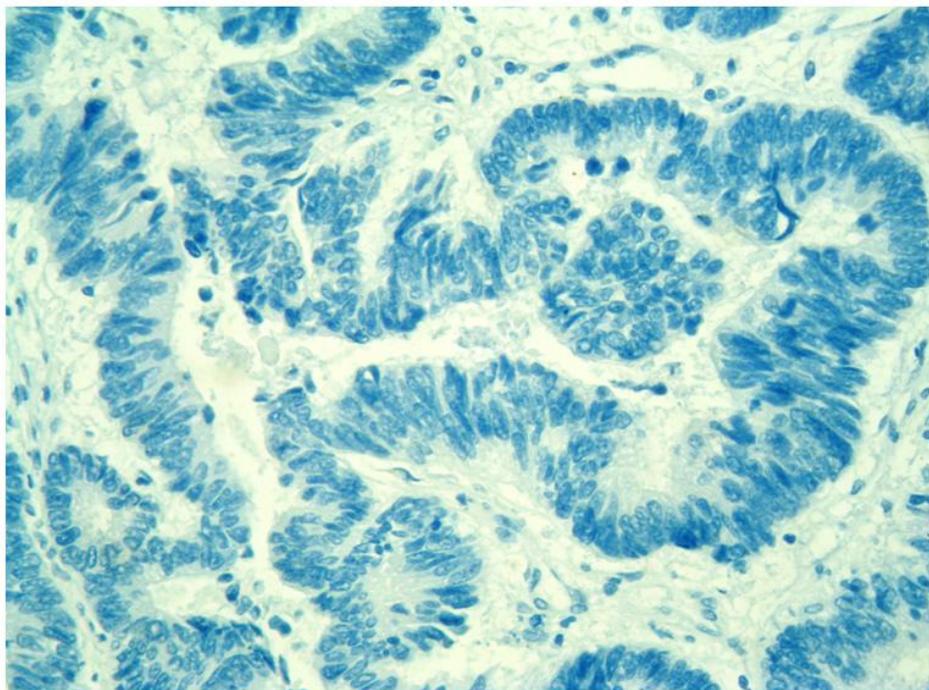


Abbildung 12: Expression von MT1-MMP im Zytoplasma der Tumorzellen (Originalvergrößerung 200fach)



Abbildung 13: MT1-MMP negativer Tumor (Originalvergrößerung 400fach)



46 (48,9%) der Tumoren waren MT1-MMP positiv. Die Expression von MT1-MMP korreliert mit der Expression von eMMP-2 ($p=0,036$; Chi²-Test), MMP-7 ($p=0,004$; Chi²-Test) und TIMP-2 ($p=0,002$; Chi²-Test) (Tabelle 12).

Tabelle 12: Zusammenhang zwischen der MT1-MMP-Expression und den Tumoreigenschaften

Parameter	Kategorie	n	MT1-MMP-positiv	MT1-MMP-negativ	p-Wert (Chi ²)
Gesamt	alle	94	46 (48,9%)	48 (51,1%)	---
Alter	< 70 Jahre	54	27 (50,0%)	27 (50,0%)	NS
	≥ 70 Jahre	40	19 (47,5%)	21 (52,5%)	
Geschlecht	männlich	54	28 (51,9%)	26 (48,1%)	NS
	weiblich	40	18 (45,0%)	22 (55,0%)	
Resektionsverfahren^a	TAR	83	41 (49,1%)	42 (50,6%)	NS
	APE	10	4(40,0%)	6 (60,0%)	
	ExE	1	1 (100,0%)	0 (0%)	
Tumorstadium	UICC I	19	7 (36,8%)	12 (63,2%)	NS
	UICC II	39	21 (53,8%)	18 (46,2%)	
	UICC III	33	17 (51,5%)	16 (48,5%)	
	UICC IV	3	1 (33,3%)	2 (66,7%)	
Differenzierung	negativ (G3)	22	13 (59,1%)	9 (40,9%)	NS
	positiv (G1+2)	72	33 (45,8%)	39 (54,2%)	
Invasionstiefe	pT1+2	29	13 (44,8%)	16 (55,2%)	NS
	pT3+4	65	33 (50,8%)	32 (49,2%)	
Lymphknotenstatus	negativ	58	28 (48,3%)	30 (51,7%)	NS
	positiv	36	18 (50,0%)	18 (50,0%)	
Präoperativer CEA-Wert^b	nein	16	9 (56,3%)	7 (43,8%)	NS
	Norm	62	30 (48,4%)	31 (51,6%)	
	erhöht	16	7 (43,8%)	9 (56,3%)	

MMP-2-Epithel Status	negativ	61	25 (41,0%)	36 (59,0%)	0,036
	positiv	33	21 (63,6%)	12 (36,4%)	
MMP-2-Stroma Status	negativ	22	11 (50,0%)	11 (50,0%)	NS
	positiv	72	35 (48,6%)	37 (51,4%)	
MMP-7 Status	negativ	43	14 (32,6%)	29 (67,4%)	0,004
	positiv	51	32 (62,7%)	19 (37,3%)	
TIMP-2 Status	negativ	50	17 (34,0%)	33 (66,0%)	0,002
	positiv	44	29 (65,9%)	15 (34,1%)	

^a TAR = Tiefe anteriore Resektion; APE = Abdominoperineale Exstirpation; ExE = Exenteration

^b Patienten mit nicht bestimmbarer CEA (Kreuzreaktivität) nicht eingeschlossen (n=14)

4.1.4 TIMP-2

Die Expression des Gewebeinhibitors der Matrix-Metalloproteinasen 2 (TIMP-2) ist ausschließlich im Zytoplasma der Tumorzellen lokalisiert. Weder Normalgewebe noch das peritumoröse Stroma zeigten eine Anfärbung (Abbildungen 14-17).

Abbildung 14: TIMP-2 negatives Normalgewebe
(Originalvergrößerung 200fach)

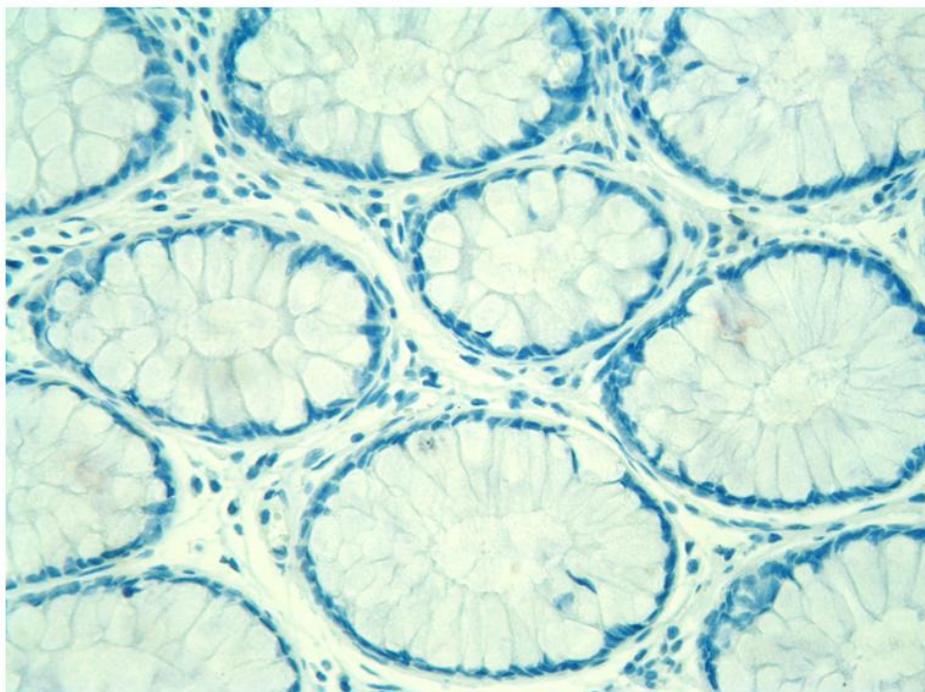


Abbildung 15: TIMP-2-Expression im Zytoplasma der Tumorzellen (Originalvergrößerung 400fach)

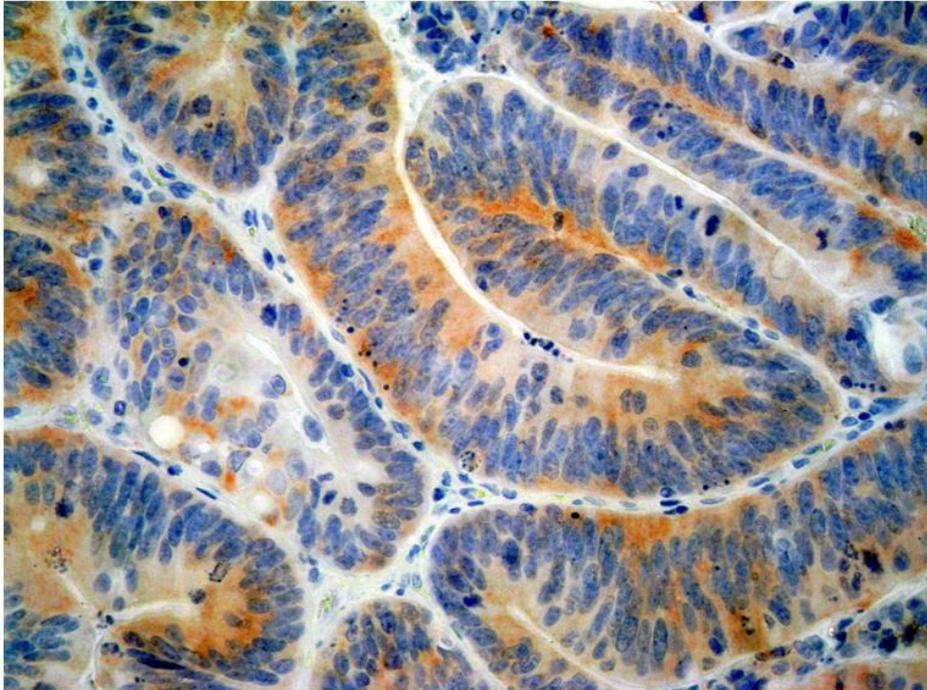


Abbildung 16: TIMP-2 negativer Tumor (Originalvergrößerung 200fach)

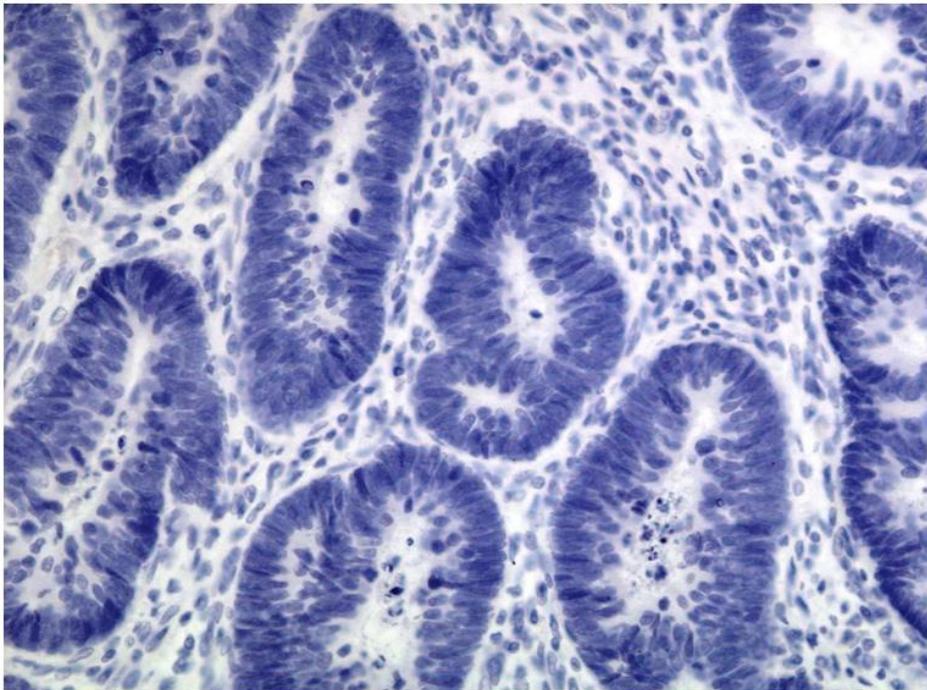
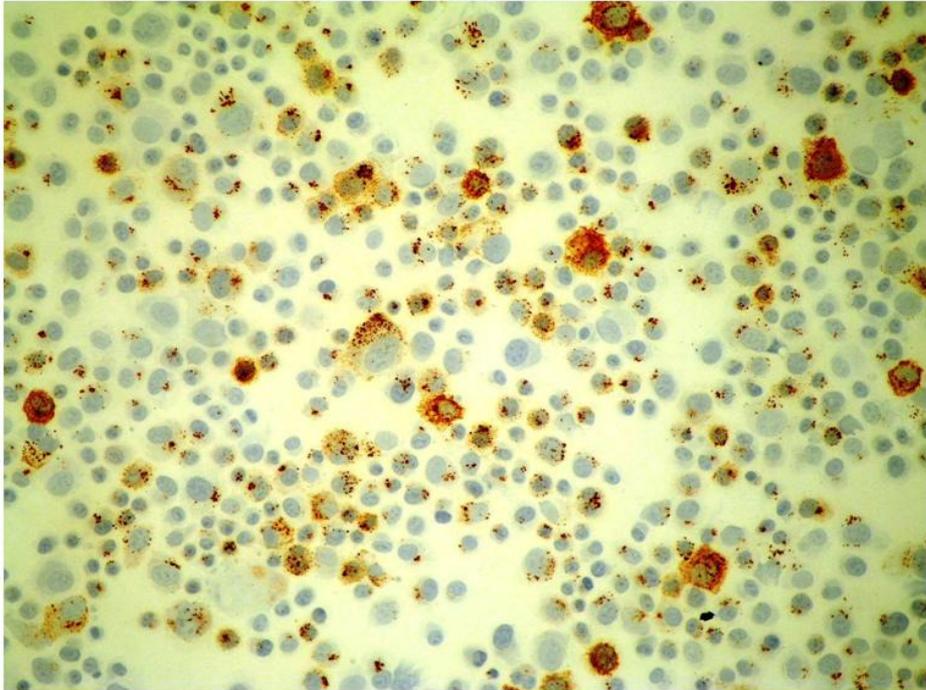


Abbildung 17: TIMP-2-Expression von HT-1080 Fibrosarkomzellen (Originalvergrößerung 200fach)



Die TIMP-2-Expression korrelierte signifikant mit der Invasionstiefe ($p=0,013$), mit der Expression von eMMP-2 ($p<0,0001$), sMMP-2 ($p=0,036$), MMP-7 ($p<0,0001$) und MT1-MMP ($p=0,002$). Zudem fanden sich mehr TIMP-2-positive Tumoren bei weiblichen Patienten – jedoch ohne statistische Signifikanz ($p=0,074$; Chi^2) (Tabelle 13).

Tabelle 13: Zusammenhang zwischen der zytoplasmatischen TIMP-2-Expression und den Tumoreigenschaften

Parameter	Kategorie	n	TIMP-2-positiv	TIMP-2-negativ	p-Wert (Chi ²)
Gesamt	alle	94	44 (46,8%)	50 (53,2%)	---
Alter	< 70 Jahre	54	25 (46,3%)	29 (53,7%)	NS
	≥ 70 Jahre	40	19 (47,5%)	21 (52,5%)	
Geschlecht	männlich	54	21 (38,9%)	33 (61,1%)	(0,074)
	weiblich	40	23 (57,5%)	17 (42,5%)	

Resektionsverfahren^a	TAR	83	38 (45,8%)	45 (54,2%)	NS
	APE	10	5 (50,0%)	5 (50,0%)	
	ExE	1	1 (100,0%)	0 (0%)	
Tumorstadium	UICC I	19	5 (26,3%)	14 (73,7%)	NS
	UICC II	39	20 (51,3%)	19 (48,7%)	
	UICC III	33	16 (48,5%)	17 (51,5%)	
	UICC IV	3	3 (100,0%)	0 (0%)	
Differenzierung	negativ (G3)	22	12 (54,5%)	10 (45,5%)	NS
	positiv (G1+2)	72	32 (44,4%)	40 (55,6%)	
Invasionstiefe	pT1+2	29	8 (27,6%)	21 (72,4%)	0,013
	pT3+4	65	36 (55,4%)	29 (44,6%)	
Lymphknotenstatus	negativ	58	25 (43,1%)	33 (56,9%)	NS
	positiv	36	19 (52,8%)	17 (47,2%)	
Präoperativer CEA-Wert^b	nein	16	10 (62,5%)	6 (37,5%)	NS
	Norm	62	26 (41,9%)	36 (58,1%)	
	erhöht	16	8 (50,0%)	8 (50,0%)	
MMP-2-Epithel Status	negativ	61	20 (32,8%)	41 (67,2%)	<0,0001
	positiv	33	24 (72,7%)	9 (27,3%)	
MMP-2-Stroma Status	negativ	22	6 (27,3%)	16 (72,7%)	0,036
	positiv	72	38 (52,8%)	34 (47,2%)	
MMP-7 Status	negativ	43	10 (23,3%)	33 (76,7%)	<0,0001
	positiv	51	34 (66,7%)	17 (33,3%)	
MT1-MMP Status	negativ	48	15 (31,3%)	33 (68,8%)	0,002
	positiv	46	29 (63,0%)	17 (37,0%)	

^a TAR = Tiefe anteriore Resektion; APE = Abdominoperineale Exstirpation; ExE = Exenteration

^b Patienten mit nicht bestimmbar CEA (Kreuzreaktivität) nicht eingeschlossen (n=14)

4.2 Subgruppenanalyse im Hinblick auf die Infiltrationstiefe (pT-Status)

Von den 94 immunhistochemisch untersuchten Rektumkarzinomen bestand die Minderheit (30,8%, n=29) aus pT1- (n=7) und pT2-Tumoren (n=22), wohingegen die überwiegende Anzahl der Rektumkarzinome ein lokal fortgeschrittenes, wandüberschreitendes Wachstum aufwies (69,2%, n=65; davon pT3, n=60; pT4, n=5).

Im Rahmen der Stratifizierung der immunhistochemisch ermittelten Expressionen von MMP-2, MMP-7, MT1-MMP und TIMP-2 mit der Infiltrationstiefe (pT-Status) zeigten sich keine signifikanten Korrelation der epithelialen MMP-2- bzw. der MT1-MMP-Expression mit dem pT-Status der Rektumkarzinome (jeweils $p > 0,05$).

Die stromale MMP-2 Expression war signifikant mit der Infiltrationstiefe assoziiert, wenn man nicht wandüberschreitende (pT1+2) mit wandüberschreitenden Tumoren (pT3+4) verglich (58,6% sMMP-2-positiv bei pT1+2 vs. 84,6% bei pT3+4, $p = 0,006$). Erfolgte die Stratifizierung jedoch hinsichtlich des pT-Status alleine (pT1-4) zeigten sich keine signifikanten Assoziationen ($p > 0,05$).

Die TIMP-2-Expression war ebenso signifikant mit der Infiltrationstiefe assoziiert, wenn man nicht wandüberschreitende (pT1+2) mit wandüberschreitenden Tumoren (pT3+4) verglich (27,6% TIMP-2-positiv bei pT1+2 vs. 55,4% bei pT3+4, $p = 0,013$). Erfolgte die Stratifizierung hinsichtlich des pT-Status alleine (pT1-4) zeigten sich auch hier keine signifikanten Assoziationen ($p > 0,05$).

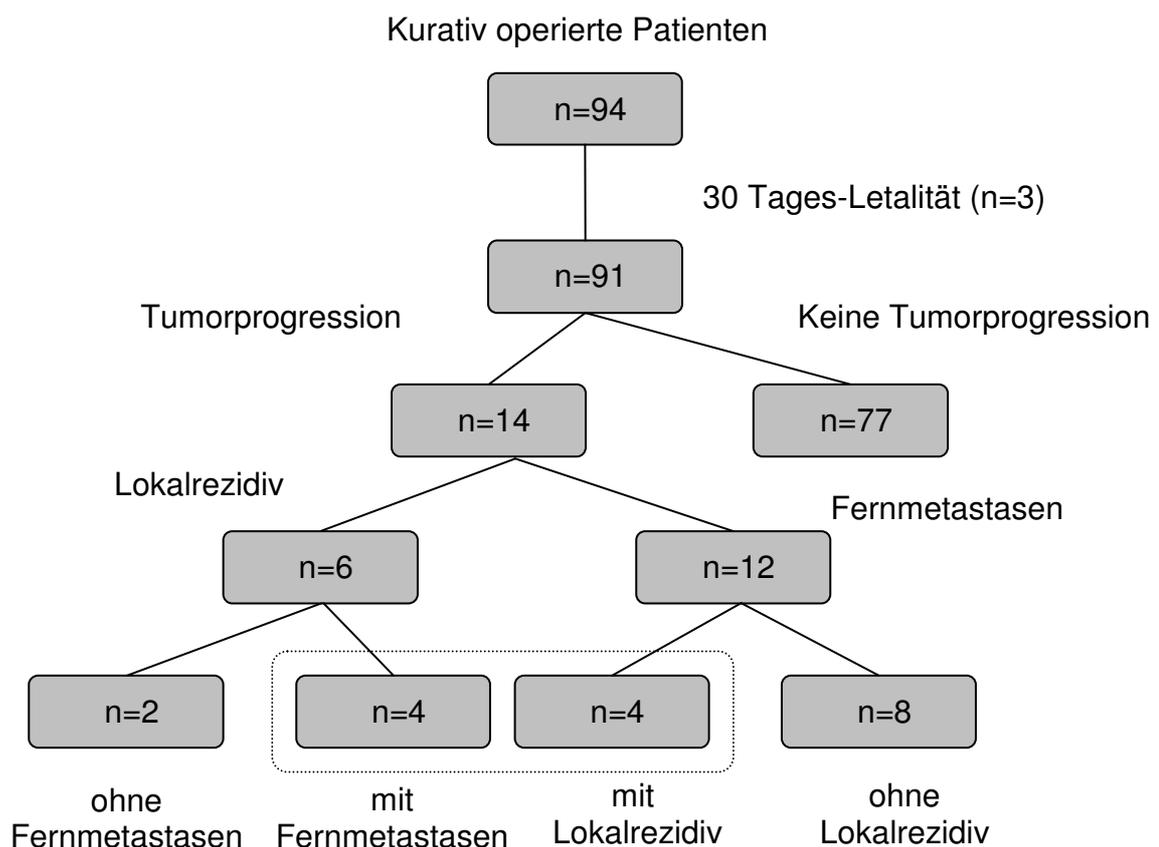
In gleicher Weise korrelierte die MMP-7-Expression mit der Infiltrationstiefe bei Unterscheidung von pT1+2 und pT3+4-Rektumkarzinomen (34,5% MMP-7-positiv bei pT1+2 vs. 63,1% bei pT3+4, $p = 0,010$). Im Gegensatz zu den anderen MMP-Expressionen war MMP-7 die einzige Variable, die signifikant mit dem pT-Status alleine (pT1-4) assoziiert war. Hierbei war die Rate MMP-7-positiver Tumoren mit steigender Infiltrationstiefe (pT-Status) erhöht (positive MMP-7-Expression: 14,3% bei pT1; 40,9% bei pT2; 61,7% bei pT3; 80,0% bei pT4; jeweils $p < 0,05$).

4.3 Prognostische Daten

4.3.1 Tumorprogression

Drei der 94 Patienten verstarben innerhalb von 30 Tagen nach der Operation (30-Tage-Letalität 3,2%), so dass eine Tumornachsorge bei 91 Patienten durchgeführt wurde. Nach einem mittleren Follow-up von 46 (range 2-101) Monaten (medianer Follow-up: 43,0 Monate) kam es bei 15,4% (14/91 Patienten) zu einer Tumorprogression: Bei 6 Patienten (6,6%) trat ein Lokalrezidiv (isoliert n=2 bzw. mit Fernmetastasen n=4) auf und bei 12 Patienten (13,2%) wurden metachrone Fernmetastasen (davon 8 isoliert bzw. mit Lokalrezidiv n=4) dokumentiert (Abbildung 18).

Abbildung 18: Übersicht über die Nachsorgedaten des Kollektivs (n=91)



Mit der Tumorprogression korrelierten das Tumorstadium (UICC-Stadium) ($p=0,05$; Chi²-Test) und der präoperative CEA-Wert ($p=0,035$; Chi²-Test). Bei weiblichen Patienten kam es häufiger zu einer Tumorprogression, dieser prozentuale Unterschied erreichte aber keine Signifikanz ($p=0,078$; Chi²). Die immunhistochemisch ermittelten MMP-Expressionen waren nicht mit der Tumorprogression assoziiert (Tabelle 14). Jedoch zeigte sich bei positiver epithelialer MMP-2 Expression und bei positiver MMP-7 Expression eine höhere Tumorprogressionsrate (25,0% bei MMP-2; 20,8% bei MMP-7) als bei negativer epithelialer MMP-2 Expression und negativer MMP-7-Expression (10,2% bei MMP-2; 9,3% bei MMP-7), wobei dies in beiden Fällen keine statistische Signifikanz zeigte ($p>0,05$).

Tabelle 14: Tumorprogression gesamt (Lokalrezidiv und/oder Fernmetastasen) (n=14 bzw. 15,4%)

Parameter	Kategorie	n	Ohne Tumorprogression n=77	Mit Tumorprogression n= 14	p-Wert (Chi ²)
Alter	< 70 Jahre	54	46 (85,2%)	8 (14,8%)	NS
	≥ 70 Jahre	37	31 (83,8%)	6 (16,2%)	
Geschlecht	männlich	52	47 (90,4%)	5 (9,6%)	(0,078)
	weiblich	39	30 (76,9%)	9 (23,1%)	
Resektionsverfahren ^a	TAR	80	70 (87,5%)	10 (12,5%)	NS
	APE	10	7 (70,0%)	3 (30,0%)	
	ExE	1	0 (0%)	1 (100,0%)	
Tumorstadium	UICC I	19	18 (94,7%)	1 (5,3%)	0,05
	UICC II	36	31 (86,1%)	5 (13,9%)	
	UICC III	33	27 (81,8%)	6 (18,2%)	
	UICC IV	3	1 (33,3%)	2 (66,7%)	
Differenzierung	negativ (G3)	21	17 (81,0%)	4 (19,0%)	NS
	positiv (G1+2)	70	60 (85,7%)	10 (14,3%)	
Invasionstiefe	pT1+2	29	27 (93,1%)	2 (6,9%)	NS
	pT3+4	62	50 (80,6%)	12 (19,4%)	

Lymphknotenstatus	negativ	55	49 (89,1%)	6 (10,9%)	NS
	positiv	36	28 (77,8%)	8 (22,2%)	
Präoperativer CEA-Wert^b	Norm	62	55 (88,7%)	7 (11,3%)	0,035
	erhöht	15	10 (66,7%)	5 (33,3%)	
MMP-2-Epithel Status	negativ	59	53 (89,8%)	6 (10,2%)	(0,061)
	positiv	32	24 (75,0%)	8 (25,0%)	
MMP-2-Stroma Status	negativ	21	18 (85,7%)	3 (14,3%)	NS
	positiv	70	59 (84,3%)	11 (15,7%)	
MMP-7 Status	negativ	43	39 (90,7%)	4 (9,3%)	NS
	positiv	48	38 (79,2%)	10 (20,8%)	
MT1-MMP Status	negativ	47	40 (85,1%)	7 (14,9%)	NS
	positiv	44	37 (84,1%)	7 (15,9%)	
TIMP-2 Status	negativ	49	41 (83,7%)	8 (16,3%)	NS
	positiv	42	36 (35,7%)	6 (14,3%)	

^a TAR = Tiefe anteriore Resektion; APE = Abdominoperineale Exstirpation; ExE = Exenteration

^b Patienten mit nicht bestimmbarer CEA (Kreuzreaktivität) nicht eingeschlossen (n=14)

Im Speziellen gab es keine signifikanten Korrelationen der MMP-Expressionen mit dem Auftreten eines Lokalrezidivs (weder isoliert noch kombiniert mit Fernmetastasen) (jeweils $p > 0,05$). Die Lokalrezidivrate war jedoch auch nicht von klinischen oder histopathologischen Faktoren beeinflusst ($p > 0,05$). Nach kurativer Resektion wegen eines pT1-Karzinoms trat kein Lokalrezidiv auf. Betrachtet man die Infiltrationstiefe generell, so wurde nur ein Lokalrezidiv (3,6%) nach pT1+2-Rektumkarzinomen beobachtet.

4.3.2 Metachrone Fernmetastasen

Patienten mit epithelialer MMP-2- und MMP-7-Expression entwickelten häufiger Fernmetastasen (inklusive Lokalrezidiv), dieser Zusammenhang erreichte aber keine Signifikanz (MMP-2: $p = 0,066$; Chi²-Test; MMP-7: $p = 0,098$; Chi²-Test) (Tabelle 15).

Die präoperativ ermittelten erhöhten CEA-Werte korrelierten mit dem Auftreten von Fernmetastasen, sowohl bei Patienten mit Fernmetastasen inklusive Lokalrezidiv ($p=0,020$; Chi^2) als auch bei Patienten ohne Lokalrezidiv ($p=0,019$, Chi^2 -Test). Auch die Invasionstiefe korrelierte signifikant mit dem Auftreten von Fernmetastasen (ohne Lokalrezidiv; $p=0,043$; Chi^2 -Test).

Patienten mit Lymphknotenbefall entwickelten ebenfalls häufiger Fernmetastasen, dieser Zusammenhang war aber nicht signifikant ($p=0,081$, Chi^2 -Test).

Fernmetastasen (inklusive Lokalrezidiv) traten häufiger bei weiblichen Patienten auf, aber auch dieser Zusammenhang erreichte aber keine Signifikanz ($p=0,071$; Chi^2 -Test).

Table 15: Metachrone Fernmetastasen (mit und ohne Lokalrezidiv)

($n=12$ bzw. 13,2%)

Parameter	Kategorie	n	Ohne Fernmetastasen N=77	Mit Fernmetastasen N=12	P-Wert (Chi^2)
Alter	< 70 Jahre	53	46 (86,8%)	7 (13,2%)	NS
	> 70 Jahre	36	31 (86,1%)	5 (13,9%)	
Geschlecht	männlich	51	47 (92,2%)	4 (7,8%)	(0,071)
	weiblich	38	30 (78,9%)	8 (21,1%)	
Resektionsverfahren^a	TAR	80	70 (87,5%)	10 (12,5%)	NS
	APE	9	7 (77,8%)	2 (22,2%)	
Tumorstadium	UICC I	19	18 (94,7%)	1 (5,3%)	NS
	UICC II	35	31 (88,6%)	4 (11,4%)	
	UICC III	32	27 (84,4%)	5 (15,6%)	
	UICC IV	3	1 (33,3%)	2 (66,7%)	
Differenzierung	negativ (G3)	20	17 (85,0%)	3 (15,0%)	NS
	positiv (G1+2)	69	60 (87,0%)	9 (13,0%)	
Invasionstiefe	pT1+2	28	27 (96,4%)	1 (3,6%)	NS
	pT3+4	61	50 (82,0%)	11 (18,0%)	
Lymphknotenstatus	negativ	54	49 (90,7%)	5 (9,3%)	NS
	positiv	35	28 (80,0%)	7 (20,0%)	

Präoperativer CEA-Wert^b	nein	13	12 (92,3%)	1 (7,7%)	0,020
	Norm	61	55 (90,2%)	6 (9,8%)	
	Erhöht	15	10 (66,7%)	5 (33,3%)	
MMP-2-Epithel Status	negativ	58	53 (91,4%)	5 (8,6%)	(0,066)
	positiv	31	24 (77,4%)	7 (22,6%)	
MMP-2-Stroma Status	negativ	20	18 (90,0%)	2 (10%)	NS
	positiv	69	59 (85,5%)	10 (14,5%)	
MMP-7 Status	negativ	42	39 (92,9%)	3 (7,1%)	NS
	positiv	47	38 (80,9%)	9 (19,5%)	
MT1-MMP Status	negativ	47	40 (85,1%)	7 (14,9%)	NS
	positiv	42	37 (88,1%)	5 (11,9%)	
TIMP-2 Status	negativ	48	41 (85,4%)	7 (14,6%)	NS
	positiv	41	36 (87,8%)	5 (11,9%)	

^a TAR = Tiefe anteriore Resektion; APE = Abdominoperineale Exstirpation

^b Patienten mit nicht bestimmbarer CEA (Kreuzreaktivität) nicht eingeschlossen

In der Analyse der isolierten metachronen Fernmetastasen, d.h. ohne Lokalrezidiv, waren univariat die Invasions- bzw. Infiltrationstiefe (pT-Status) sowie der präoperative CEA-Serum-Wert signifikant mit der Inzidenz von Fernmetastasen assoziiert (Tabelle 16).

Nach kurativer Resektion wegen eines pT1 und pT2-Rektumkarzinoms wurden keine metachronen Fernmetastasen beobachtet, die höchste Rate von Fernmetastasen für das Gesamtkollektiv wurde bei präoperativ erhöhten CEA-Werten beobachtet (28,6%).

Tabelle 16: Metachrone Fernmetastasen (ohne Lokalrezidiv)

(n=8 bzw. 8,8%)

Parameter	Kategorie	n	Ohne Fernmetastasen N=77	Mit Fernmetastasen N=8	P-Wert (Chi ²)
Alter	< 70 Jahre	51	46 (90,2%)	5 (9,8%)	NS
	> 70 Jahre	34	31 (91,2%)	3 (8,8%)	
Geschlecht	männlich	50	47 (94,0%)	3 (6,0%)	NS
	weiblich	35	30 (85,7%)	5 (14,3%)	
Resektions- verfahren^a	TAR	76	70 (92,1%)	6 (7,9%)	NS
	APE	9	7 (77,8%)	2 (22,2%)	
Tumorstadium	UICC I	18	18 (100,0%)	0 (0%)	NS
	UICC II	33	31 (93,9%)	2 (6,1%)	
	UICC III	31	27 (87,1%)	4 (12,9%)	
	UICC IV	3	1 (33,3%)	2 (66,7%)	
Differenzierung	negativ (G3)	20	17 (85,0%)	3 (15,0%)	NS
	positiv (G1+2)	65	60 (92,3%)	5 (7,7%)	
Invasionstiefe	pT1+2	27	27 (100,0%)	0 (0%)	0,043
	pT3+4	58	50 (86,2%)	8 (13,8%)	
Lymphknoten- status	negativ	51	49 (96,1%)	2 (3,9%)	(0,081)
	positiv	34	28 (82,4%)	6 (7,6%)	
Präoperativer CEA-Wert^b	nein	12	12 (100,0%)	0 (0%)	0,019
	Norm	59	55 (93,2%)	4 (6,8%)	
	erhöht	14	10 (71,4%)	4 (28,6%)	
MMP-2-Epithel Status	negativ	57	53 (93,0%)	4 (7,0%)	NS
	positiv	28	24 (85,7%)	4 (14,3%)	
MMP-2-Stroma Status	negativ	20	18 (90,0%)	2 (10,0%)	NS
	positiv	65	59 (90,8%)	6 (9,2%)	
MMP-7 Status	negativ	41	39 (95,1%)	2 (4,9%)	NS
	positiv	44	38 (86,4%)	6 (13,6%)	

MT1-MMP Status	negativ	45	40 (88,9%)	5 (11,1%)	NS
	positiv	40	37 (92,5%)	3 (7,5%)	
TIMP-2 Status	negativ	45	41 (91,1%)	4 (8,9%)	NS
	positiv	40	36 (90,0%)	4 (10,0%)	

^a TAR = Tiefe anteriore Resektion; APE = Abdominoperineale Exstirpation

^b Patienten mit nicht bestimmbar CEA (Kreuzreaktivität) nicht eingeschlossen (n=14)

Analysierte man das Kollektiv hinsichtlich der Applikation einer adjuvanten Radiochemotherapie (n=48; 52,7% der Patienten) waren keine statistischen Signifikanzen zu dokumentieren. Die Multivarianzanalyse hinsichtlich der Gesamt-Tumorprogression und der Inzidenz metachroner Fernmetastasen konnte weder das Tumorstadium, die Invasionstiefe noch den CEA-Serum-Wert als unabhängige Prognosefaktoren bestätigen ($p > 0,05$, logistische Regression).

4.3.3 Überlebensanalysen

Überlebenszeitanalysen wurden mittels der Kaplan-Meier-Methode (Kaplan und Meier, 1958) durchgeführt.

4.3.3.1 Gesamtüberleben (overall survival)

Die 5-Jahres-Überlebensraten (overall survival) unterschieden sich nicht signifikant in Abhängigkeit von den MMP-Expressionen (Tabelle 17). Mit der overall 5-Jahres-Überlebens-Rate korrelierten die Invasionstiefe ($p=0,037$, log rank), der präoperativ gemessenen CEA-Wert ($p=0,004$, log rank) und das Alter der Patienten ($p=0,05$, log rank), wobei der präoperativ ermittelte CEA-Wert den stärksten prognostischen Einfluss auf die Überlebensprognose ausübte (overall 5-JÜL-Rate 43% bei erhöhtem CEA vs. 74% bei normwertigem CEA, $p < 0,01$). Patienten im UICC-Stadium I hatten eine signifikant günstigere 5-Jahres-Überlebens-Rate als Patienten im UICC-Stadium III (5-JÜL-Rate 95% im Stadium I vs. 59% im Stadium III, $p=0,025$, log rank).

Tabelle 17: Gesamtüberleben (overall survival)

Parameter	Kategorie	5-JÜL-Rate Overall	P-Wert (log rank)
Alter	< 70 Jahre	81%	0,05
	≥ 70 Jahre	57%	
Geschlecht	männlich	73%	NS
	weiblich	71%	
Resektionsverfahren^a	TAR	76%	(0,0817)
	APE	45%	
Tumorstadium	UICC I	95%	I – III 0,0249 Gesamt (0,1222)
	UICC II	73%	
	UICC III	59%	
	UICC IV	-	
Differenzierung	(G3)	65%	NS
	(G1) + (G2)	74%	
Invasionstiefe	pT1+2	85%	0,0367
	pT3+4	66%	
Lymphknotenstatus	negativ	81%	(0,0732)
	positiv	58%	
Präoperativer CEA-Wert^b	Norm	74%	0,0041
	erhöht	43%	
MMP-2-Epithel Status	negativ	72%	NS
	positiv	76%	
MMP-2-Stroma Status	negativ	61%	NS
	positiv	76%	
MMP-7 Status	negativ	77%	NS
	positiv	68%	
MT1-MMP Status	negativ	78%	NS
	positiv	58%	

TIMP-2 Status	negativ	74%	NS
	positiv	68%	
Adjuvante Therapie	negativ	77%	NS
	positiv	69%	

^a TAR = Tiefe anteriore Resektion; APE = Abdominoperineale Exstirpation

^b Patienten mit nicht bestimmbarer CEA (Kreuzreaktivität) nicht eingeschlossen

Die ermittelten MMP-Expressionen korrelierten nicht den 5-Jahres-Überlebensraten (Abbildungen 19 - 23).

Abbildung 19: Kaplan-Meier-Kurven für die Überlebensrate in Abhängigkeit vom epithelialen MMP-2-Status

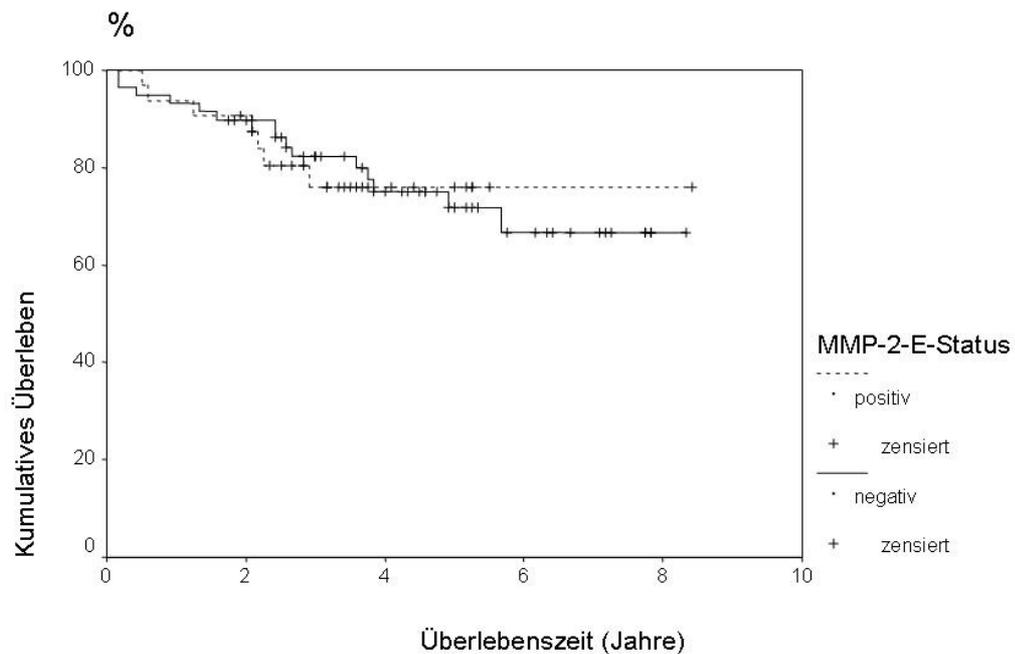


Abbildung 20: Kaplan-Meier-Kurven für die Überlebensrate in Abhängigkeit vom stromalen MMP-2-Status

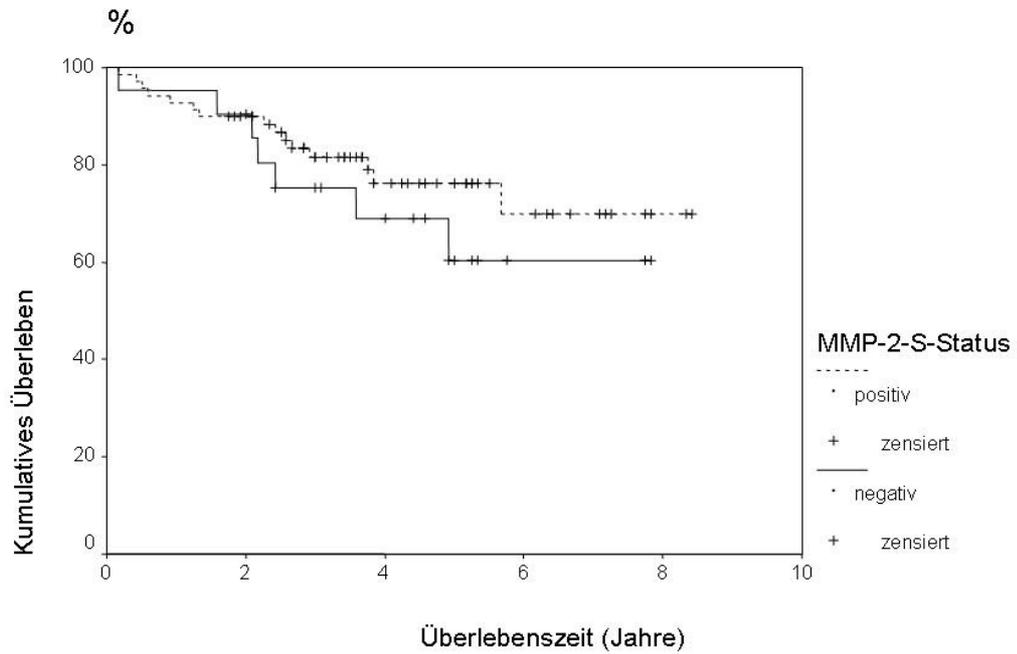


Abbildung 21: Kaplan-Meier-Kurven für die Überlebensrate in Abhängigkeit vom MMP-7-Status

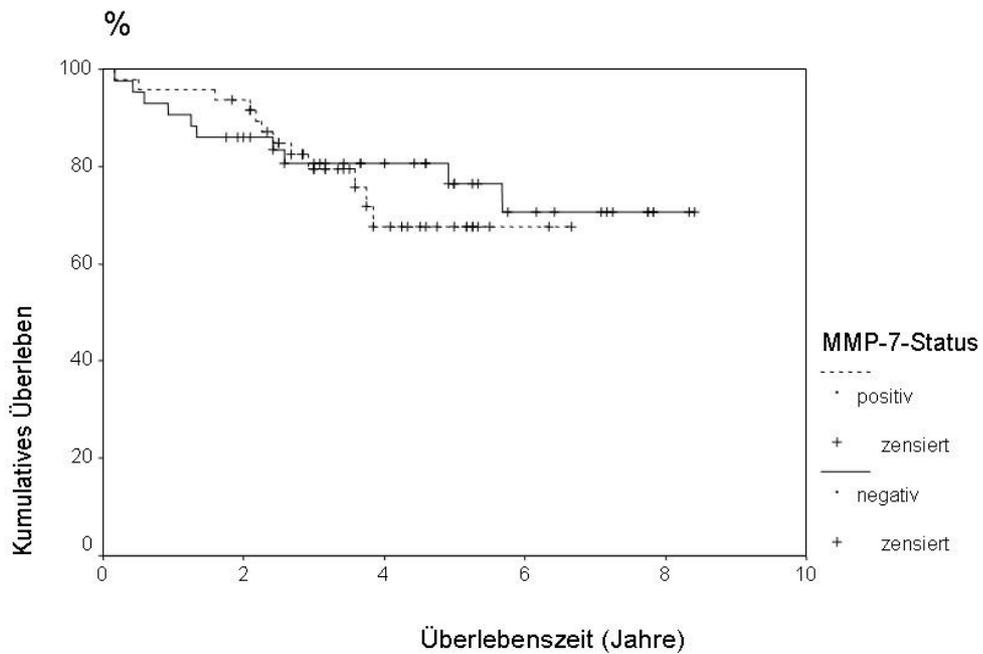


Abbildung 22: Kaplan-Meier-Kurven für die Überlebensrate in Abhängigkeit vom MT1-MMP-Status

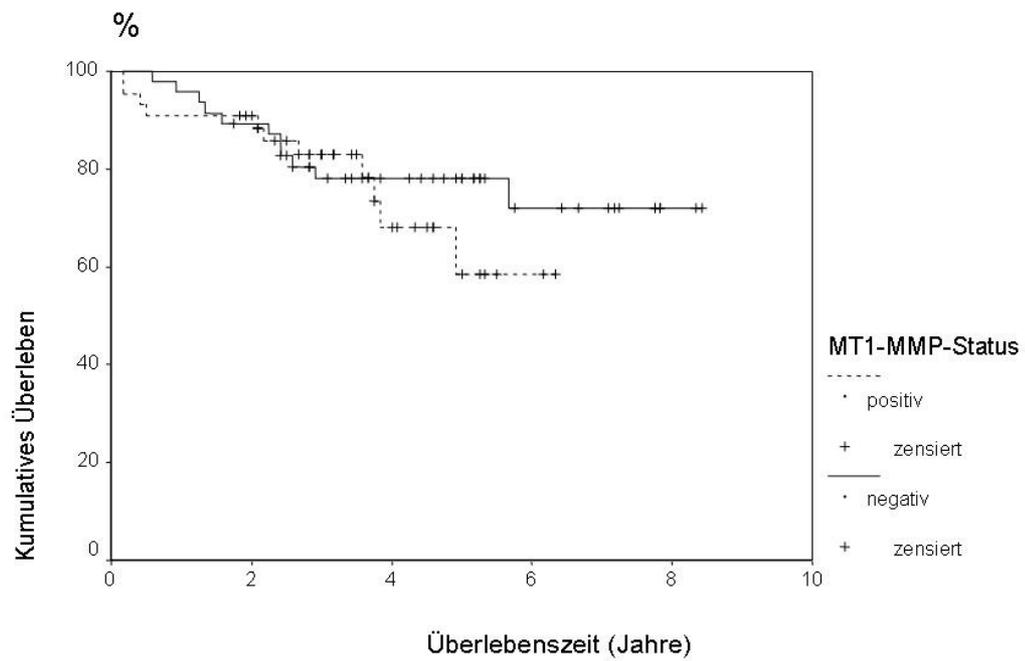
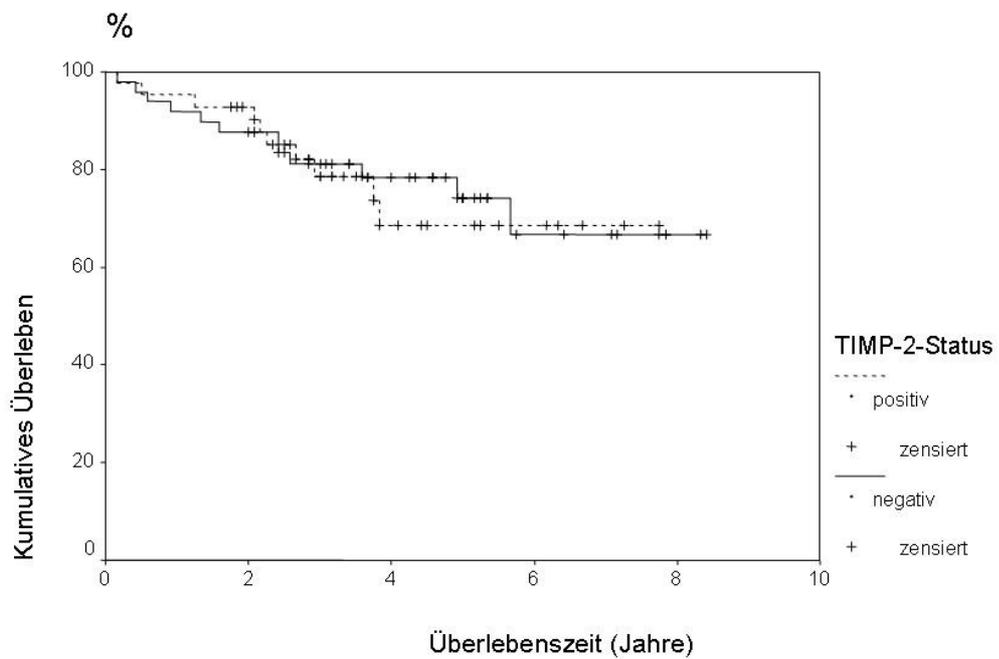
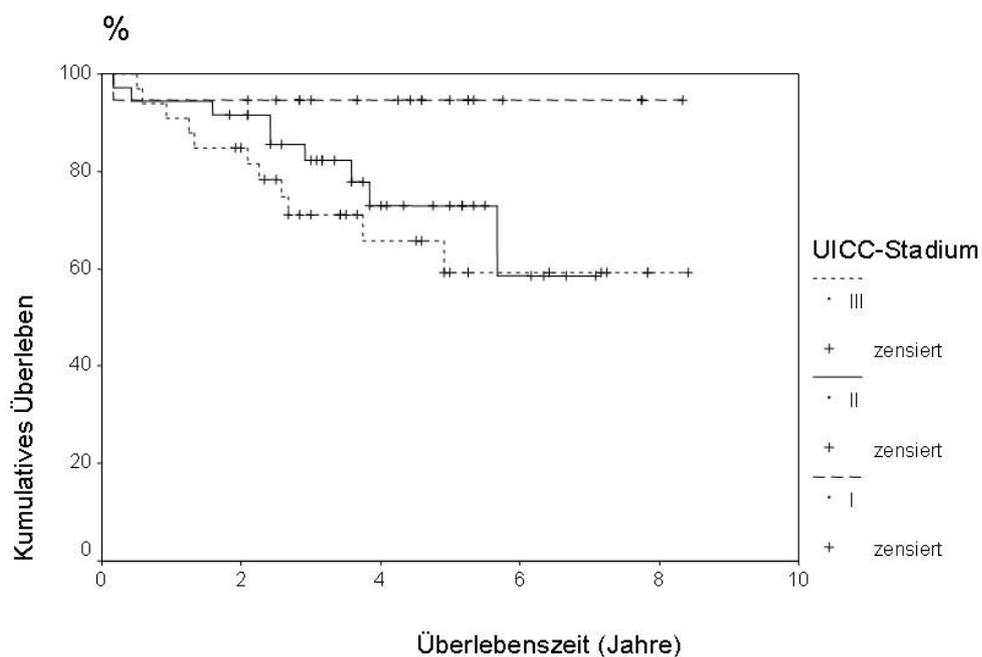


Abbildung 23: Kaplan-Meier-Kurven für die Überlebensrate in Abhängigkeit vom TIMP-2-Status



Das Tumorstadium (UICC) war univariat signifikant mit der overall 5-Jahres-Überlebensrate assoziiert (overall 5-Jahres-Überlebensrate 95% im UICC-Stadium I, 73% im UICC-Stadium II, 59% im UICC-Stadium III) (Abbildung 24). In der Multivarianzanalyse konnte das UICC-Stadium jedoch nicht als unabhängiger Prognosefaktor identifiziert werden ($p > 0,05$, proportional hazards).

Abbildung 24: Kaplan-Meier-Kurven für die Überlebensrate in Abhängigkeit vom UICC-Stadium



4.3.3.2 Rezidivfreies Überleben (disease-free survival)

Mit der rezidivfreien 5-Jahres-Überlebens-Rate korrelierten das Tumorstadium ($p=0,007$; log rank), die Invasionstiefe ($p=0,0238$; log rank) und der präoperativ ermittelte CEA-Wert (Tabelle 18), wobei der CEA-Wert den stärksten prognostischen Einfluss auf die Überlebensprognose ausübte (rezidivfreie 5-JÜL-Rate 46% bei erhöhtem CEA vs. 70% bei normwertigem CEA, $p=0,01$; overall 5-JÜL-Rate 43% vs. 74%, $p < 0,01$).

Tabelle 18: Rezidivfreies Überleben (disease-free survival)

Parameter	Kategorie	5-JÜL-Rate Rezidivfrei	P-Wert (log rank)
Alter	< 70 Jahre	69%	NS
	≥ 70 Jahre	60%	
Geschlecht	männlich	72%	NS
	weiblich	59%	
Resektionsverfahren^a	TAR	69%	NS
	APE	48%	
Tumorstadium	UICC I	89%	I – III 0,0395
	UICC II	64%	I – IV 0,0048
	UICC III	56%	II – IV 0,0059
	UICC IV	-	III – IV 0,0426
			Gesamt 0,007
Differenzierung	negativ (G3)	61%	NS
	positiv (G1+2)	68%	
Invasionstiefe	pT1+2	84%	0,0238
	pT3+4	57%	
Lymphknotenstatus	negativ	74%	NS
	positiv	53%	
Präoperativer CEA-Wert^b	Norm	70%	0,013
	erhöht	46%	
MMP-2-Epithel Status	negativ	71%	NS
	positiv	56%	
MMP-2-Stroma Status	negativ	64%	NS
	positiv	66%	
MMP-7 Status	negativ	78%	NS
	positiv	52%	
MT1-MMP Status	negativ	74%	NS
	positiv	47%	

TIMP-2 Status	negativ	71%	NS
	positiv	57%	
Adjuvante Therapie	negativ	66%	NS
	positiv	66%	

^a TAR = Tiefe anteriore Resektion; APE = Abdominoperineale Exstirpation

^b Patienten mit nicht bestimmbarer CEA (Kreuzreaktivität) nicht eingeschlossen

Die ermittelten MMP-Expressionen korrelierten nicht signifikant mit den rezidivfreien 5-Jahres-Überlebensraten (Abbildungen 25 - 29), wobei bei der rezidivfreien 5-Jahres-Überlebensrate bei positiver MMP-7-Expression ungünstiger (52%) als bei negativer MMP-7-Expression (78%) war - dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$).

Abbildung 25: Kaplan-Meier-Kurven für die rezidivfreie Überlebensrate in Abhängigkeit vom epithelialen MMP-2-Status

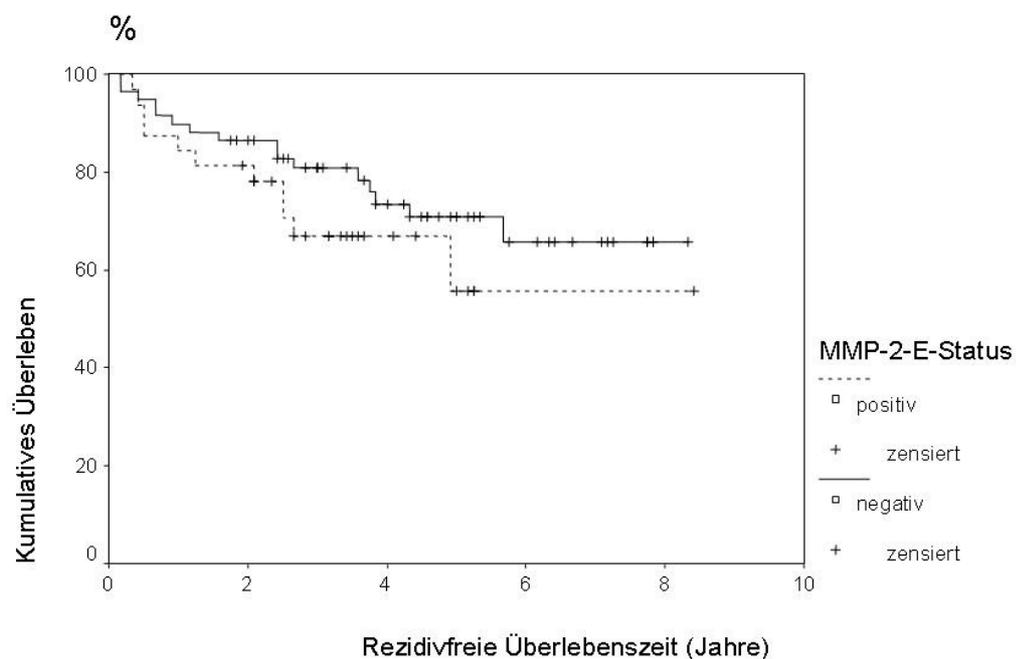


Abbildung 26: Kaplan-Meier-Kurven für die rezidivfreie Überlebensrate in Abhängigkeit vom stromalen MMP-2 Status

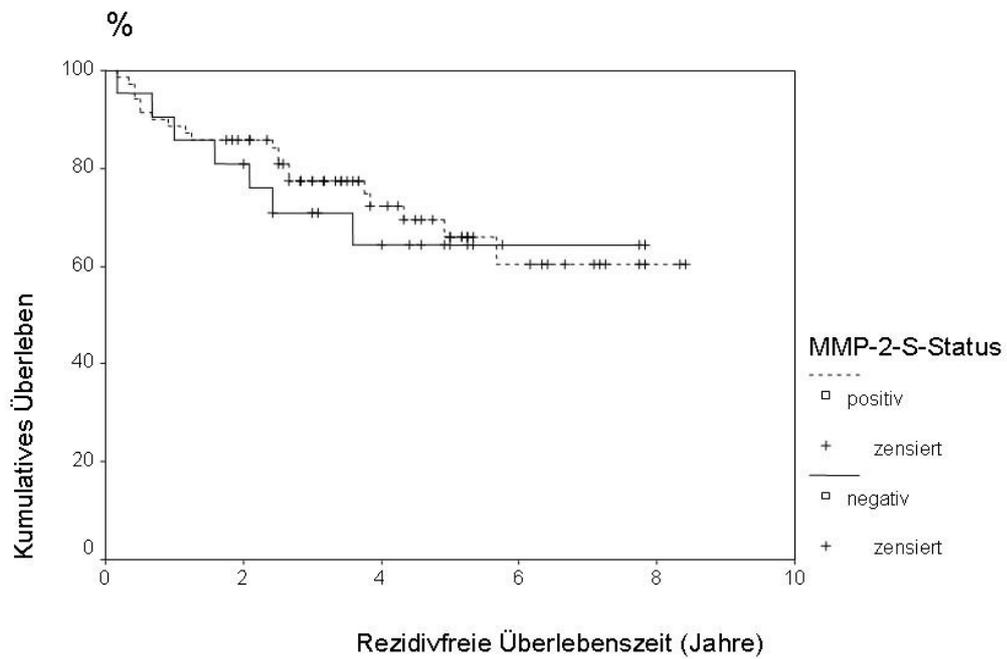


Abbildung 27: Kaplan-Meier-Kurven für die rezidivfreie Überlebensrate in Abhängigkeit vom MMP-7-Status

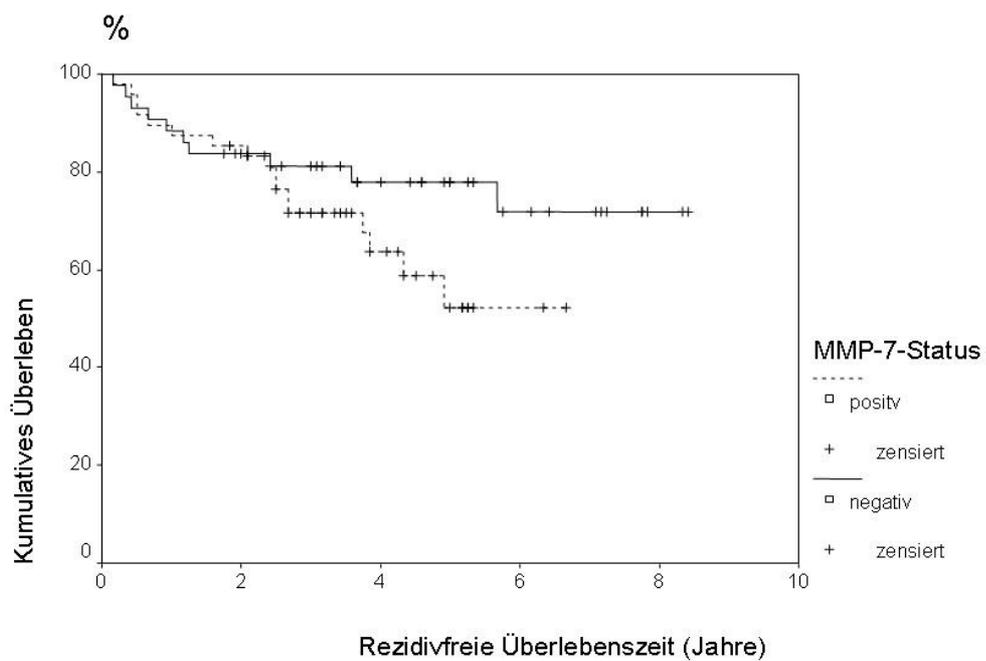


Abbildung 28: Kaplan-Meier-Kurven für die rezidivfreie Überlebensrate in Abhängigkeit vom MT1-MMP-Status

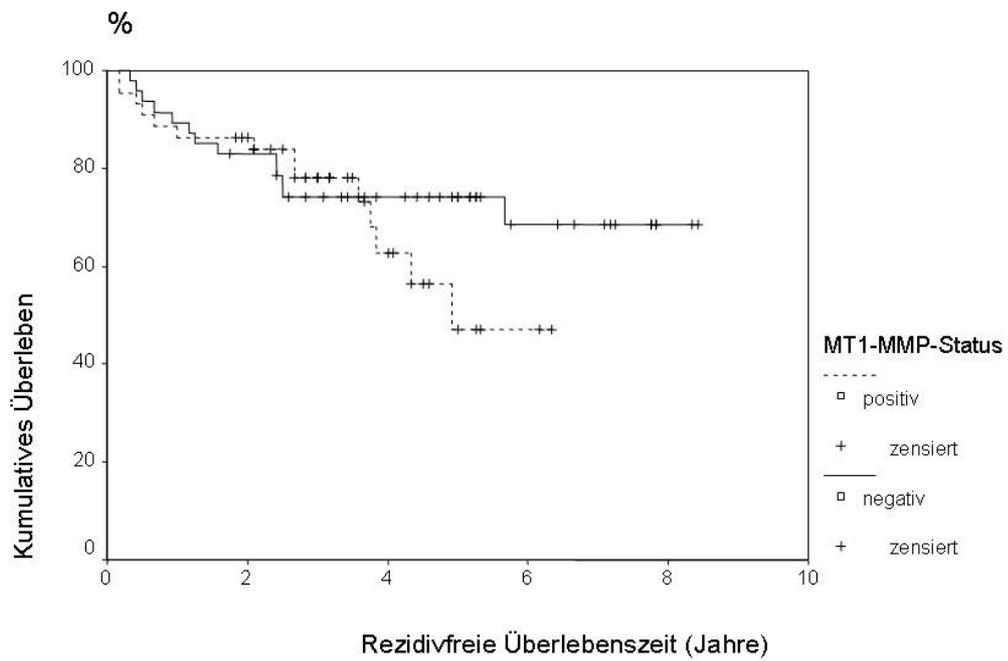
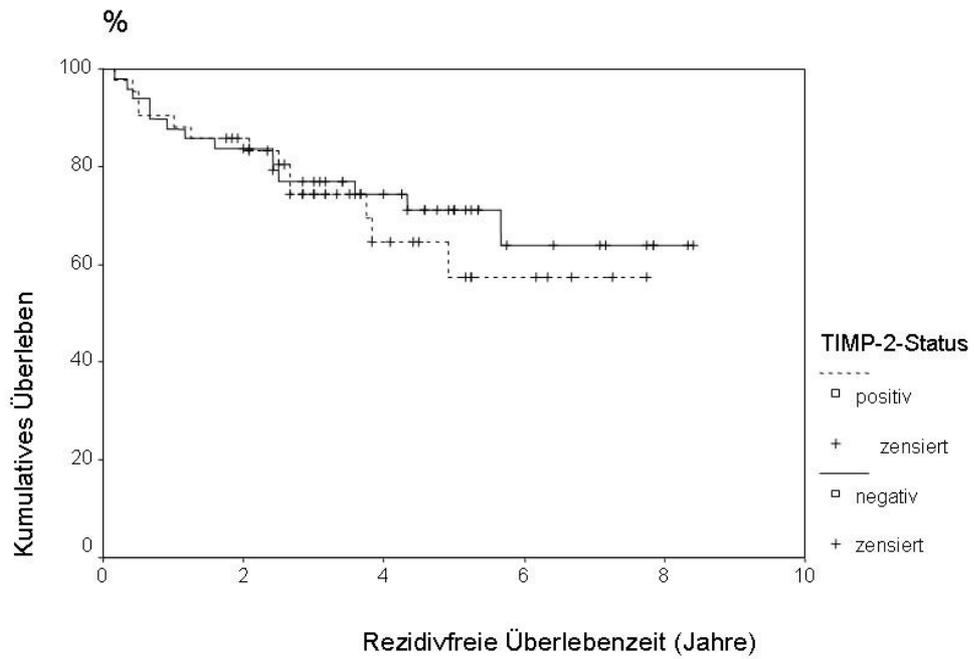


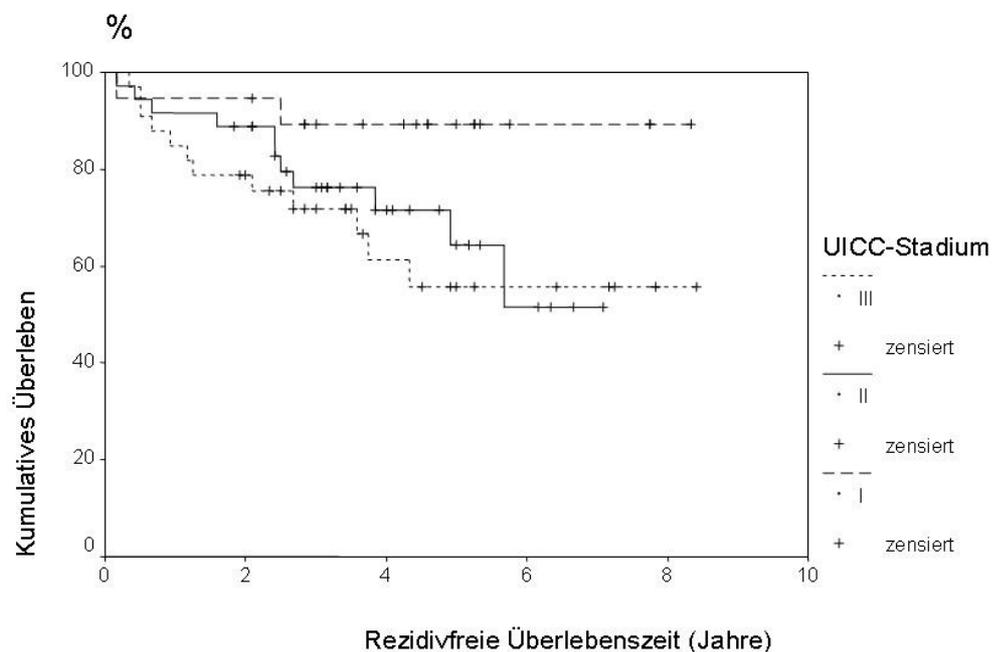
Abbildung 29: Kaplan-Meier-Kurven für die rezidivfreie Überlebensrate in Abhängigkeit vom TIMP-2-Status



Das Tumorstadium (UICC) war univariat signifikant mit der rezidivfreien 5-Jahres-Überlebensrate assoziiert (rezidivfreie 5-Jahres-Überlebensrate 89% im UICC-Stadium I, 64% im UICC-Stadium II, 56% im UICC-Stadium III) (Abbildung 30).

In der Multivarianzanalyse konnte das UICC-Stadium jedoch nicht als unabhängiger Prognosefaktor identifiziert werden ($p > 0,05$; hazard ratio 0,71; proportional hazards).

Abbildung 30: Kaplan-Meier-Kurven für die rezidivfreie Überlebensrate in Abhängigkeit vom UICC-Stadium



5. Diskussion

Die Invasion und Metastasierung von soliden Tumoren ist ein komplexer Prozess, der aus der sequentiellen Abfolge vieler Einzelschritte besteht. Dieser Prozess beinhaltet die Bindung von Tumorzellen an die Basalmembran, die Degradation des lokalen Bindegewebes, sowie die Penetration und Migration durch das proteolytisierte Stroma [24, 65, 91]. Mit Hilfe der Proteolyse kann es den Tumorzellen gelingen, sich vom Primärtumor zu lösen, in Blut- und/oder Lymphbahnen zu invadieren, zu disseminieren, aus dem Gefäßsystem zu extravadiere und entfernt vom Primärtumor Metastasen zu bilden [76]. Matrix-Metalloproteinasen sind hierbei die Schlüsselenzyme, die für den Abbau der extrazellulären Matrix verantwortlich sind.

Ring et al. [108] waren 1997 die Ersten, die in einer immunhistochemischen Studie einen Zusammenhang zwischen der Expression von TIMP-2 und der Prognose zeigen konnten. Seitdem wurden weitere Studien durchgeführt, in der Hoffnung, einen neuen prognostischen Marker für diese Erkrankung zu etablieren. Bis heute konnten allerdings keine übereinstimmenden Ergebnisse erzielt werden. Um erstmals ein homogenes Patientenkollektiv zu evaluieren, wurden in dieser Arbeit nur Rektumkarzinome, die definierte Einschlusskriterien erfüllten und standardisiert behandelt wurden, mittels Immunhistochemie untersucht.

5.1 MMP-2

Verschiedene Untersuchungen zeigten eine vermehrte Expression von MMP-2 beim kolorektalen Karzinom im Vergleich zum Adenom und zu normaler Mukosa [30, 37, 73, 101]. In der vorliegenden Studie konnte MMP-2 im Zytoplasma der Tumorzellen und im peritumorösen Stroma nachgewiesen werden. Dieses steht in Übereinstimmung mit den Studien von Masaki et al. [81], Kikuchi et al. [61], Papadopoulou et al. [100] und Sis et al. [119] (Tabelle 19).

Die MMP-2-Expression im Tumorzell-Zytoplasma war in 33 von 94 Fällen (35,1%) positiv, während die Expression im Stroma bei 72 (76,6%) der Tumore positiv war. Dabei korrelierte die stromale MMP-2-Expression mit der Invasionstiefe, es konnte jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen der MMP-2-Expression und der Überlebensprognose aufgezeigt werden. Eine Erklärung dafür könnte sein,

dass der MMP-2 Antikörper, der in der eigenen Untersuchung verwendet wurde, sowohl MMP-2 als auch proMMP-2 bindet und so nicht die Aktivität von MMP-2 exklusiv repräsentiert.

Auch Ring et al. [108] fanden bei der immunhistochemischen Untersuchung keine Korrelation zwischen der zytoplasmatischen Expression von MMP-2 und dem Tumorstadium bzw. der Prognose. In ihrer Arbeit wurden 212 Patienten mit einem kolorektalen Karzinom (124 im Kolon und 88 im Rektum lokalisiert) untersucht, von denen jedoch nur 177 kurativ behandelt wurden. In der Studie von Papadopoulou et al. [100] gab es eine Korrelation der MMP-2-Expression mit Grading, Dukes-Stadium und Lymphknotenbeteiligung. Mittels ELISA wiesen sie bei 60,9% der insgesamt 64 Karzinome (36 Rektum- und 28 Kolonkarzinome) eine erhöhte MMP-2- Antigenkonzentration im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe nach. Prognostische Korrelationen wurden jedoch nicht untersucht.

Kim und Kim [62] fanden in ihrer immunhistochemischen Studie eine positive Korrelation der MMP-2-Expression im Zytoplasma der Tumorzellen mit dem Astler-Coller-Tumorstadium und der Tumorangiogenese. Im Stroma konnten sie kein MMP-2 nachweisen. Levy et al. [72] wiesen immunhistochemisch eine Erhöhung der MMP-2-Expression und mittels Northern Blot Analyse auch einen Anstieg des MMP-2 mRNA-Spiegels beim kolorektalem Karzinom nach.

Tutton et al. [130] untersuchten in ihrer Studie die MMP-2-Protein-Expression immunhistochemisch, die MMP-2-mRNA-Expression mittels RT-PCR, die Proteinkonzentration und die MMP-2-Plasmaspiegel (präoperativ sowie nach kurativer Resektion) wurden mittels ELISA bestimmt. Die MMP-2-Expression war im Tumorgewebe im Vergleich zu adenomatösen Polypen und zum Normalgewebe signifikant erhöht. Die vermehrte Expression war in allen Tumorstadien mit oder ohne Lymphknotenbefall bzw. Fernmetastasen nachweisbar. Erhöhte präoperative Plasmaspiegel von MMP-2 korrelierten mit dem Lymphknotenbefall (N1-N3), dem Auftreten von Fernmetastasen und einer schlechteren Prognose. Nach kurativer Resektion kam es zu einer Reduktion der Mittelwerte der MMP-2-Plasmaspiegel. Eine Erhöhung der MMP-2-mRNA-Expression wurde jedoch nicht gefunden.

Dieses steht im Widerspruch zu Murashige [89] und Collins [25], in deren Studien eine vermehrte Expression von MMP-2 nachgewiesen wurde. In der Arbeit von Collins korrelierte die MMP-2 mRNA-Erhöhung mit dem Duke's- Tumorstadium. In einer Studie von Liabakk et al. [74] gab es keine Korrelation zwischen dem Tumorstadium und der MMP-2-Expression. Es fanden sich höhere Level von aktivierten MMP-2 bei Duke's A als bei Duke's C Karzinomen.

Die eigenen Ergebnisse, wie auch die von Kikuchi et al. [61] und Masaki et al. [81], zeigen eine signifikante Korrelation zwischen der zytoplasmatischen MMP-2- und der MT1-MMP-Expression. Dies könnte, ebenso wie die Korrelation von MMP-2 und TIMP-2, im Zusammenhang mit der Aktivierung von MMP-2 stehen. Dabei bindet TIMP-2 sowohl proMMP-2 als auch MT1-MMP. Dieser Komplex präsentiert dann proMMP-2 einem TIMP-2-freien MT1-MMP zur Aktivierung [53, 63, 122].

Die Expression von MMP-2 in normaler Mukosa, die wir beobachtet haben, stimmt mit den Ergebnissen anderer Studien überein, die zeigen, dass das Enzym häufig im Normalgewebe exprimiert wird. Matrisian et al. [79] bezeichnen aus diesem Grund das MMP-2-Gen als das „house-keeping“-Gen.

Tabelle 19: Zusammenfassung vorheriger immunhistochemischer Untersuchungen zur Expression von MMP-2 beim kolorektalen Karzinom

Referenz	Pat.-Anzahl	Methoden	Antikörper und Verdünnungen	Resultate
Li et al., 2005 [73]	9 Kolonkarzinome, 16 Rektumkarzinome (jeweils Normal- und Tumorgewebe)	ICH, Western Blot, Gelatin Zymography	1:200	Erhöhte Expression von MMP-2 im Tumorzellzytoplasma und im Stroma; die MMP-2 Aktivität korreliert mit der Invasionstiefe, Lymphknotenbefall und Duke's Stadium;
Sis et al., 2004 [119]	112 kolorektale Adenokarzinome	IHC	Neomarkers, vorverdünnt	MMP-2-Expression im Stroma und im Tumorzellzytoplasma korreliert mit der Lymphgefäßinvasion und dem Stadium, keine Korrelation mit der Überlebenszeit

Masaki et al., 2003 [81]	51 kolorektale Karzinome, Stadium T1	IHC	Chemicon International; 1:300	Korrelation zwischen der MMP-2- und MT1-MMP-Expression
Papadopoulou et al., 2001 [100]	64 kolorektale Karzinome (36 Rektumkarzinome, 28 Kolonkarzinome), jeweils Tumor- und Normalgewebe	IHC, ELISA	Calbiochem; 1:100	MMP-2-Expression in erster Linie in den Tumorzellen und in zweiter Linie im Stroma; Grad der Expression korreliert mit Grading, Dukes-Stadium und Lymphknotenbeteiligung
Kikuchi et al., 2000 [61]	92 Adenokarzinome des Kolons und des Rektums inkl. 11 Fernmetastasen	IHC	Clone 42-5D11, Fuji Chemicals Industries; 1:100	MMP-2-Expression korreliert mit der Gefäßinvasion
Mukai et al., 1999 [88]	36 kolorektale Karzinome mit Lebermetastasen	IHC		Erhöhte MMP-2-Expression in kolorektalen Karzinomen
Kim TS und KIM YB, 1999 [62]	72 kolorektale Adenokarzinome (43 Kolon, 13 Sigma, 16 Rektum), keine Fernmetastasen	IHC	Oncogene Science; 1:200	Zytoplasmatische MMP-2-Expression; die Intensität korreliert mit dem modifizierten Astler-Coller-Tumorstadium und der Tumorangiogenese
Ring et al., 1997 [108]	212 kolorektale Karzinome (124 Kolon und 88 Rektum)	IHC	Clone CA-4001; (in Konzentrationen von 1, 5, 10 und 20 µg ml ⁻¹)	MMP-2-Expression korreliert weder mit dem Tumorstadium noch mit der Überlebenszeit
Levy et al., 1991 [72]	40 Adenokarzinome des Kolons (30 Dukes' A und B, 10 Dukes' C), 30 Kolonadenome	IHC, Northern Blot	1:200	Erhöhte zytoplasmatische MMP-2-Expression korreliert mit Duke's Stadium

5.2 Matrilysin (MMP-7)

Von 94 Tumoren, die untersucht wurden, zeigten 51 (54,3%) eine zytoplasmatische Matrilysin-Expression. Die Expression von Matrilysin korrelierte in der eigenen Untersuchung mit der Invasionstiefe (positive MMP-7-Expression: 14,3% bei pT1; 40,9% bei pT2; 61,7% bei pT3; 80,0% bei pT4; jeweils $p < 0,05$).

Die Verstärkung der kolorektalen Kazinomzellinvasion kann auf einen direkten Effekt von MMP-7 zurückzuführen sein, da diese Proteinase viele Komponenten der Basalmembran direkt degradiert [139]. Möglich ist aber auch eine indirekte Wirkung von MMP-7, z.B. über Aktivierung von MMP-2 und MMP-9 [27, 54]. Wir konnten jedoch keinen signifikanten Zusammenhang mit der Metastasierung und der Überlebensprognose nachweisen. Dies steht im Widerspruch zu der Untersuchung von Adachi et al. [3], die eine Korrelation der MMP-7-Expression mit der lokalen Lymphknotenmetastasierung und der Fernmetastasierung beim fortgeschrittenen kolorektalen Karzinom nachweisen konnten. Untersucht wurden 83 Patienten mit einem kolorektalen Karzinom, davon 5 mit Lebermetastasen. Die Expression war in ihrer Studie, im Gegensatz zu unseren Ergebnissen, häufiger in den Dukes'-Stadien C und D als in den Stadien A und B. Die MMP-7-Expression wurde immunhistochemisch wie auch in der vorliegenden Arbeit in den Tumorzellen und der Zellmembran nachgewiesen.

Auch in der Untersuchung von Masaki et al. [80] ist die MMP-7-Expression positiv mit der Fernmetastasierung und invers mit der Überlebensrate bei früh metastasierenden Kolonkarzinomen assoziiert. Die Autoren untersuchten 38 kolorektale Karzinome, von denen 11 initial nur lokal exzidiert wurden. In der Studie von Ougolkov et al. [97] wurden 202 kurativ resezierte Kolonkarzinome untersucht. 47% der Tumore waren MMP-7 positiv, 19% der Tumore zeigten eine starke Anfärbung in der invasiven Front des Tumors. Die starke MMP-7 Expression in der invasiven Front des Tumors war signifikant häufiger bei Duke's C Tumoren und korrelierte mit dem Auftreten von Rezidiven und schlechter Prognose.

Zeng et al. [147] beschrieben eine starke MMP-7-Expression bei kolorektalen Tumoren mit Lebermetastasen und zeigten einen signifikanten Zusammenhang zwischen MMP-7-Expression und Tumorwachstum sowie der Metastasierung. Auf der anderen Seite gab es in einer Studie von Roca et al. [110] mit 60 kolorektalen

Karzinomen keinen Zusammenhang zwischen der MMP-7-Expression und der Prognose (Tabelle 20).

Tabelle 20: Zusammenfassung vorheriger immunhistochemischer Untersuchungen zur Expression von MMP-7 beim kolorektalen Karzinom

Referenz	Pat.-Anzahl	Methoden	Antikörper und Verdünnungen	Resultate
Roca et al., 2006 [110]	60 kolorektale Karzinome (33 Rektumkarzinome)	IHC	MAB 3315, Chemicon	Keine Korrelation der MMP-7-Expression mit der Metastasierung und dem Überleben
Luo et al., 2006 [77]	86 Rektumkarzinome	IHC, Real-Time RT-PCR	ZYMED, USA	MMP-7-Expression korreliert mit Dukes Stadium und Lymphknotenstatus
Ougolkov et al., 2002 [97]	202 Kolonkarzinome (nur R0-Resektionen)	IHC	Clone 141-7B2, Fuji Chemicals Industries; 1:100	starke Expression in der invasiven Front spielt eine Schlüsselrolle in Tumorinvasion und Metastasierung und korreliert mit schlechterer Prognose
Adachi et al., 2001 [2]	113 kolorektale Karzinome	IHC	Clone 141-7B2, Fuji Chemicals Industries 10 µg ml ⁻¹	MMP-7 korreliert mit der Invasionstiefe, Lymphknotenmetastasen und Lymphgefäßinvasion, fortgeschrittenem Dukes-Stadium und schlechtem Outcome
Masaki et al., 2001 [80]	38 früh-invasive kolorektale Karzinome (teilweise lokale Exzision, teilweise radikale Chirurgie)	IHC	Clone 141-7B2, Fuji Chemicals Industries; 1:50	Zytoplasmatische MMP-7-Expression mit Fernmetastasen und schlechtem Outcome assoziiert
Adachi et al., 1999 [3]	83 kolo-rektale Karzinome inkl. 5 mit Lebermetastasen	IHC	Clone 141-7B2; Fuji Chemicals Industries; 10 µg ml ⁻¹	Zytoplasmatische MMP-7-Expression korreliert mit Lymphknoten- und Fernmetastasen

5.3 MT1-MMP

MT1-MMP ist eine membranassoziierte MMP und durch ihre Funktion als Aktivator von MMP-2 von zentraler Bedeutung für die Degradation der Basalmembran. In der aktuellen Studie waren 46 von 94 Tumoren (48,9%) MT1-MMP positiv, wobei nur das Zytoplasma der Tumorzellen angefärbt wurde. Es zeigte sich dabei ein signifikanter Zusammenhang der MT1-MMP-Expression mit der Expression von zytoplasmatischem MMP-2, TIMP-2 und MMP-7. Ein Grund dafür könnte die schon erwähnte Verankerung von TIMP-2 und MMP-2 an die Zellmembran durch MT1-MMP im Rahmen der MMP-2-Aktivierung sein [53, 114, 122].

In der Untersuchung von Malhotra et al. [78] wird ein progressiver Anstieg der MT1-MMP-Expression von normaler Mukosa zum Adenom, zum Carcinoma in situ und zum invasiven Tumor postuliert. Es fand sich jedoch keine Korrelation mit der Prognose bzw. dem Auftreten eines Rezidivs. Der immunhistochemische Nachweis korrelierte in der Studie von Kikuchi [61] mit der Gefäßinvasion und der Invasionstiefe, jedoch nicht mit Fernmetastasen. Die MT1-MMP-Expression ist in der Studie von Bendardaf et al. [11] mit einer kürzeren Überlebenszeit assoziiert, wobei 31 von 49 Patienten mit einem kolorektalen Karzinom bereits bei der Diagnosestellung Fernmetastasen hatten (Tabelle 21).

Tabelle 21: Zusammenfassung vorheriger immunhistochemischer Untersuchungen zur Expression von MT1-MMP beim kolorektalen Karzinom

Referenz	Pat.-Anzahl	Methoden	Antikörper und Verdünnungen	Resultate
Bendardaf et al., 2003 [11]	49 kolorektale Karzinome	IHC	Clone 113-5B7, Calbiochem; 1:20	MT1-MMP assoziiert mit kürzerer Überlebenszeit
Malhotra et al., 2002 [78]	17 Adenome, 9 Carcinoma in situ, 8 Lymphknoten-positive Kolonkarzinome und 17 Lymphknoten-negative Karzinome ohne Rezidiv	IHC	Calbiochem 0,2 µg ml ⁻¹	erhöhte Expression vom Adenom zum Karzinom, keine Korrelation mit dem Outcome und mit dem Auftreten eines Rezidivs

Kikuchi et al., 2000 [61]	92 Adenokarzinome des Kolons und des Rektums inkl. 11 Fernmetastasen	IHC	Clone 114-6G6, Fuji Chemicals Industries; 1:25	Zytoplasmatische MT1-MMP-Expression korreliert mit der Invasionstiefe, stromale TIMP-2-Expression korreliert mit dem Lymphknotenbefall
---------------------------	--	-----	--	--

5.4 TIMP-2

Obwohl TIMPs in vitro zur starken Hemmung der MMPs in der Lage sind, bleibt ihre Rolle im Zusammenhang mit der MMP-Aktivität und Tumorprogression in vivo unklar [136]. In der eigenen Studie korrelierte die zytoplasmatische Expression von TIMP-2 mit der Invasionstiefe. Dieses Ergebnis steht im Konflikt mit der ursprünglich angenommenen Funktion von TIMP-2 als Inhibitor der MMPs, bestätigt aber die Erkenntnisse, dass TIMP-2 über die Komplexbildung mit MT1-MMP MMP-2 aktivieren kann und so zum Abbau der extrazellulären Matrix beiträgt. Es konnte jedoch in unserer Arbeit kein Zusammenhang mit der Tumorprogression und der Überlebensprognose hergestellt werden.

In der Studie von Ring et al. [108] korrelierte die immunhistochemisch ermittelte TIMP-2-Expression in der Basalmembran und im Stroma signifikant mit einer längeren Überlebenszeit. In dieser Studie mit 212 Patienten kam es zu einer vermehrten Expression von TIMP-2 im Stroma bei Patienten mit einem primären kolorektalen Karzinom ohne Metastasen im Vergleich mit Patienten mit Metastasen. In der Studie von Roca et al. [110] korrelierte eine erhöhte TIMP-2-Expression im Tumorzellzytoplasma und im Stroma mit einer kürzeren Gesamtüberlebenszeit und stellte in der multivariaten Analyse einen unabhängigen Prognosefaktor dar.

Kikuchi et al. [61] fanden eine Korrelation der TIMP-2-Expression im Zytoplasma der Tumorzellen mit der Invasionstiefe und der TIMP-2-Expression im Stroma mit dem Lymphknotenbefall, jedoch nicht mit Fernmetastasen. Murashige et al. [89] zeigten, dass erhöhte TIMP-2 mRNA-Level mit dem Dukes'-Tumorstadium korrelierten.

In der Studie von Joo et al. [57] gab es keine Korrelationen zwischen dem Grad der TIMP-2-Expression und klinisch-pathologischen Daten. Li et al. [73] wiesen in ihrer Arbeit eine verminderte Expression von TIMP-2 im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe nach. Mit dem Fortschreiten des invasiven Tumorwachstums, des Lymphknotenbefalls und des Dukes'-Tumorstadiums stieg die TIMP-2-Expression kontinuierlich an, erreichte aber nicht Werte des Normalgewebes.

In der Studie von Baker et al. [7] sind die durch ELISA ermittelte TIMP-2 Level signifikant höher im angrenzendem kolorektalen Normalgewebe als im Tumorgewebe selber. Die durch ELISA ermittelte TIMP-2 Konzentrationen im Tumorgewebe sind bei Tumoren mit Lymphknoteninvasion höher als bei Tumoren ohne Lymphknoteninvasion (Tabelle 22).

Tabelle 22: Zusammenfassung vorheriger immunhistochemischer Untersuchungen zur Expression von TIMP-2 beim kolorektalen Karzinom

Referenz	Pat.-Anzahl	Methoden	Antikörper und Verdünnungen	Resultate
Roca et al., 2006 [110]	60 kolorektale Karzinome (10 Colon ascendens, 16 Sigma, 33 Rektum)	IHC	Clone 3A4, Novo Castra	erhöhte TIMP-2-Expression korreliert mit der kürzerer Gesamtüberlebenszeit
Li et al., 2005 [73]	9 Kolonkarzinome, 16 Rektumkarzinome (jeweils Normal- und Tumorgewebe)	IHC, Western Blot, Gelatin Zymography	1:200	höhere TIMP-2-Expression im Normalgewebe als im Tumorgewebe
Jung et al., 2005 [58]	41 kolorektale Karzinome	IHC	Clone 2TMP04 Neomarkers	erhöhte TIMP-2-Expression korreliert mit Lymphknotenmetastasen
Kikuchi et al., 2000 [61]	92 Adenokarzinome des Kolons und des Rektums inkl. 11 Fernmetastasen	IHC	Clone 67-H411, Fuji Chemicals Industries; 1:100	zytoplasmatische TIMP-2-Expression korreliert mit der Invasionstiefe, stromale TIMP-2 Expression korreliert mit dem Lymphknotenbefall

Joo et al., 1999 [57]	45 kolorektale Karzinome	IHC	Neomarkers; 1:120	Es gibt keinerlei Korrelationen zwischen dem Grad der TIMP-2- Expression und klinisch- pathologischen Daten
Ring et al., 1997 [108]	212 kolorektale Karzinome (124 Kolon und 88 Rektum)	IHC	Clone T2-101; (1, 5, 10 und 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	TIMP-2-Expression in der Basalmembran und im Stroma korreliert mit einer längeren Überlebenszeit
Tomita und Iwata, 1996 [129]	29 Kolon- adenome, 25 Adeno- karzinome des Kolons	IHC, Zymo- graphie	Clone 67-4H11, Fuji Chemicals Industries; 1:100	die vermehrte zytoplasmatische Expression von TIMP-2 stimmt mit dem mehrstufigen Prozess der Tumorgenese (tubuläres Adenom → Adenokarzinom) überein

IHC = Immunhistochemie

5.5 Bewertung der eigenen Ergebnisse und Schlussfolgerung

Die chirurgische Therapie bildet die Grundlage in der kurativen Therapie des Rektumkarzinoms und ist der entscheidende Prognosefaktor. Das Ausmaß der lokalen Tumorausbreitung und der Lymphknotenbefall sind wesentliche prognostische Parameter für die lokale Tumorkontrolle und das Überleben. Entscheidend in der chirurgischen Therapie bleibt die Vermeidung eines Lokalrezidivs, da sonst die Überlebensraten signifikant absinken [21]. Hierbei hat die totale mesorektale Exzision (TME) zu Lokalrezidivraten von unter 10% geführt [21]. Vor diesem Hintergrund ist es das Ziel, „neue“, d.h. tumorbiologische und molekulare Prognosefaktoren zu identifizieren, die den individuellen Krankheitsverlauf charakterisieren.

Betrachtet man die publizierte Literatur zur Bedeutung und prognostischen Rolle der Matrix-Metallproteinase, so zeigt sich deutlich, dass die Expression der Matrix-Metalloproteinase (auf Gen- oder Proteinebene) beim kolorektalen Karzinom im Vergleich zu normaler Kolon- und Rektumschleimhaut erhöht ist – wobei die prognostische Signifikanz widersprüchlich ist. Vergleicht man die Ergebnisse unserer Untersuchung mit der aktuellen Literatur, so offenbart sich, dass die publizierten Ergebnisse sich fast ausschließlich mit der Entität

„Kolorektales Karzinom“ beschäftigen und die untersuchten Kollektive nicht homogen hinsichtlich des Therapieziels sind. Deshalb war es Ziel der vorliegenden Studie, ein homogenes Patientengut zu evaluieren, was folglich die relativ kleine Patientenzahl erklärt.

Wenn man die aktuellen Publikationen, die sich mit der Rolle der Matrix-Metalloproteinasen (sowohl auf der Gen als auch auf der Proteinebene) beim Rektumkarzinom befassen, vergleicht, scheint es, als würde Matrilysin (MMP-7) eine Schlüsselrolle bei der Tumorprogression spielen: Luo et al. [77] untersuchten die MMP-7-Expression in Rektumkarzinomgewebe und rektalem Normalgewebe sowohl immunhistochemisch als auch auf mRNA-Ebene. Ihre Ergebnisse zeigten, dass die MMP-7-Expression in Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe erhöht ist. Desweiteren korrelierte die MMP-7-Expression mit dem Tumorstadium, der histologischen Differenzierung und dem CEA-Wert, es wurden jedoch keine prognostischen Daten untersucht. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Roeb et al. überein [110], die eine erhöhte mRNA-Konzentration im Rektumkarzinomgewebe im Vergleich zum Rektumnormalgewebe nachwiesen.

In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Kurokawa et al. [68] wurden 494 Kolon- und Rektumkarzinompatienten untersucht, um Risikofaktoren für Lymphknotenmetastasen bei pT1-Tumoren zu identifizieren. Die Autoren konnten mit Hilfe einer cDNA-Array-Untersuchung demonstrieren, dass die MMP-7-Expression ein unabhängiger Risikofaktor für Lymphknotenmetastasen ist [68]. Adachi et al. [3] konnten eine Korrelation der MMP-7-Expression mit der lokalen Lymphknotenmetastasierung und der Fernmetastasierung beim fortgeschrittenen kolorektalen Karzinom nachweisen.

Fasst man die Ergebnisse der Studien, die die Rolle von MMP-7 untersucht haben zusammen, stehen die Ergebnisse unserer Arbeit im Einklang mit diesen. Dadurch, dass das eigene Patientenkollektiv relativ klein ist (n=94), ist eine generelle und konklusive Verallgemeinerung der Ergebnisse nur mit Einschränkungen möglich. Auf der anderen Seite war es unser Bestreben, ein homogenes Kollektiv von Patienten mit einem Rektumkarzinom zu gewährleisten, die alle nach den aktuell gültigen onkologischen Standards standardisiert

behandelt wurden. Übereinstimmend mit den anderen Untersuchungen, zeigen unsere Ergebnisse, dass die MMP-7 Protein-Expression mit dem pT-Status zunimmt; die niedrigste MMP-7-Expressionsrate zeigte sich beim pT1-Tumoren (14.3%), die höchste bei pT4-Tumoren (80%). Hinsichtlich der Prognose zeigten MMP-7 positive Tumoren eine höhere Rezidivrate und eine schlechtere Überlebensprognose verglichen mit MMP-7 negativen Tumoren, die Ergebnisse waren jedoch statistisch nicht signifikant.

Die eigene Studie hatte das Ziel, die MMP-Protein-Expression mit klinischen, histopathologischen und prognostischen Daten zu korrelieren. Unsere Daten zeigen, dass MMP-2, MMP-7, MT1-MMP und TIMP-2 keine prognostische Relevanz beim kurativ resezierten Rektumkarzinom besitzen. Aufgrund der geringen Patientenzahl ist, wie schon erwähnt, eine Verallgemeinerung der Ergebnisse nur mit Einschränkungen möglich. Hingegen zeigen die aktuell publizierten Studien, dass die MMPs eine wichtige Rolle bei der Progression von normaler Mukosa zum invasiven kolorektalen Adenokarzinom spielen [68, 70, 77, 105, 111]. Trotzdem ist die prognostische Bedeutung der MMPs zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht abschließend geklärt, mehrere Studien konnten keinen Beweis dafür finden, dass die MMPs ein Prognosefaktor beim kolorektalen Karzinom darstellen [78, 110, 119]. Vor dem genannten Hintergrund und als Folge der eigenen Untersuchungen ist eine abschließende Beurteilung hinsichtlich der prognostischen Relevanz nicht definitiv möglich.

Übereinstimmend mit den aktuellen Studien ist lediglich die Aussage möglich, dass sowohl die MMP-Protein-Expression, der MMP-mRNA- und der MMP-Plasmaspiegel beim kolorektalen Karzinom im Vergleich zum Normalgewebe erhöht sind [68, 70, 77, 105, 111]. Inwieweit dieses Phänomen wirklich einen Einfluss auf die Prognose hat, müssen weitere Untersuchungen an homogenen Patientenkollektiven, mit einer Differenzierung zwischen Kolon- und Rektumkarzinomen und mit einer ausreichend hoher Patientenzahl klären.

6. Zusammenfassung

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind eine Familie substratspezifischer Endopeptidasen, denen ein Zinkionen-Komplex im aktiven Zentrum gemeinsam ist. Alle Mitglieder der Familie können, neben anderen biologischen Funktionen, Bestandteile der extrazellulären Matrix abbauen. Tumorinvasion, Metastasierung, und Angiogenese sind von einer kontrollierten Degradation der extrazellulären Matrix abhängig und eine erhöhte MMP-Expression scheint mit der Invasion und Metastasierung maligner Tumoren assoziiert zu sein.

Vor diesem Hintergrund war es Ziel dieser Studie, die prognostische Relevanz der immunhistochemisch ermittelten Expression von Matrix-Metalloproteinasen mit klinischen und histopathologischen Faktoren beim Rektumkarzinom zu bestimmen.

Paraffinschnitte von 94 kurativ wegen eines Rektumkarzinoms resezierten Patienten (1996-2002) wurden immunhistochemisch auf folgende MMP-Expressionen untersucht: MMP-2 (eMMP-2: Epithel; sMMP-2: Stroma) (MAK Klon 75-7F7), MMP-7 (MAK Klon ID2), MT1-MMP (MAK Klon 114-6G6) und TIMP-2 (MAK T2-N IC3). Eine Expression wurde als positiv definiert, wenn mindestens 10% der Tumorzellen lichtmikroskopisch eine Anfärbung aufwiesen. Die MMP-Expression wurde mit klinisch-histopathologischen Daten des prospektiven Tumorregisters und der Tumornachsorge korreliert. Die kurative Resektion mit totaler mesorektaler Exzision (TME) beim Rektumkarzinom wurde standardisiert nach onkologischen Grundsätzen durchgeführt. Endpunkte der prognostischen Analyse (91 Patienten) waren Tumorprogression (Lokalrezidiv und/oder metachrone Fernmetastasen) sowie 5-Jahres-Überlebensraten nach Kaplan-Meier (Gesamtüberleben, rezidivfreies Überleben). Signifikanzberechnungen im Hinblick auf die prognostische Relevanz erfolgten uni- und multivariat ($p < 0,05$ statistisch signifikant).

35% (33/94) der Karzinome waren eMMP-2-positiv, 77% (72/94) waren sMMP-2 positiv, 54% (51/94) waren MMP-7-positiv, jeweils 47% (46/94) zeigten einen positiven MT1-MMP- bzw. TIMP-2-Status. Der MMP-7-Nachweis korrelierte signifikant mit der Invasionstiefe (pT-Status) und der TIMP-2-Expression ($p < 0,01$).

Es bestanden jedoch keine weiteren Korrelationen der MMPs mit klinisch-pathologischen Parametern wie Alter, Geschlecht, Tumorstadium (UICC), Grading, CEA, Invasionstiefe oder Lymphknotenstatus ($p > 0,05$).

Nach einem mittleren Follow-up von 46 Monaten kam es bei 15,4% (14/91 Patienten) zu einer Tumorprogression. Hierbei konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der MMP-Expression und der Inzidenz eines Lokalrezidivs und/oder von Fernmetastasen dokumentiert werden. Die 5-Jahres-Überlebensraten unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant in Abhängigkeit von den MMP-Expressionen. Den stärksten prognostischen Einfluss auf die Überlebensprognose übte der präoperativ ermittelte CEA-Wert aus. Serum-CEA und Tumorstadium waren jedoch in der Multivarianzanalyse keine unabhängigen Prognosefaktoren.

Der immunhistologische Nachweis von Matrix-Metalloproteinasen in einem homogenen Kollektiv (nur R0-Resektionen mit TME, adjuvante Radiochemotherapie in den UICC-Stadien II und III, komplette intrainstitutionelle Tumornachsorge) zeigte keine prognostische Relevanz beim kurativ resezierten Rektumkarzinom.

7. Literaturverzeichnis

1. Adachi Y, Itoh F, Yamamoto H, Matsuno K, Arimura Y, Kusano M, Endoh T, Hinoda Y, Oohara M, Hosokawa M, Imai K (1998) Matrix metalloproteinase matrilysin (MMP-7) participates in the progression of human gastric and esophageal cancers. *Int J Oncol* 13: 1031-1035
2. Adachi Y, Yamamoto H, Itoh F, Arimura Y, Nishi M, Endo T, Imai K (2001) Clinicopathologic and prognostic significance of matrilysin expression at the invasive front in human colorectal cancers. *Int J Cancer* 95: 290-294
3. Adachi Y, Yamamoto H, Itoh F, Hinoda Y, Okada Y, Imai K (1999) Contribution of matrilysin (MMP-7) to the metastatic pathway of human colorectal cancers. *Gut* 45: 252-258
4. Allgayer H, Babic R, Beyer BC, Grutzner KU, Tarabichi A, Schildberg FW, Heiss MM (1998) Prognostic relevance of MMP-2 (72-kD collagenase IV) in gastric cancer. *Oncology* 55: 152-160
5. Arenas RB, Fichera A, Mhoon D, Michelassi F (1998) Total mesenteric excision in the surgical treatment of rectal cancer: a prospective study. *Arch Surg* 133: 608-611
6. Bafetti LM, Young TN, Itoh Y (1998) Intact vitronectin induces matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 expression and enhanced cellular invasion by melanoma cells. *J Biol Chem* 273: 143-149
7. Baker EA, Bergin FG, Leaper DJ (2000) Matrix metalloproteinases, their tissue inhibitors and colorectal cancer staging. *Br J Surg* 87: 1215-1221
8. Barrier A, Martel P, Gallot D, Dugue L, Sezeur A, Malafosse M (1999) Long-term functional results of colonic J pouch versus straight coloanal anastomosis. *Br J Surg* 86: 1176-1179
9. Basset P, Okada A, Chenard MP, Kannan R, Stoll I, Anglard P, Bellocq JP, Rio MC (1997) Matrix metalloproteinases as stromal effectors of human carcinoma progression: therapeutic implications. *Matrix Biol* 15: 535-541

10. Bauer EA, Stricklin GP, Jeffrey JJ, Eisen AZ (1975) Collagenase production by human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 64: 232-240
11. Bendardaf R, Lamlum H, Vihinen P, Ristamaki R, Laine J, Pyrhonen S (2003) Low Collagenase-1 (MMP-1) and MT1-MMP Expression Levels Are Favourable Survival Markers in Advanced Colorectal Carcinoma. *Oncology* 65: 337-346
12. Bjerkeset T, Edna TH (1996) Rectal Cancer: The influence of type of operation on local recurrence and survival. *Eur J Surg* 162: 643-648
13. Bonnheim DC, Petrelli NJ, Herrera L, Walsh D, Mittelman A (1986) Osseous metastases from colorectal carcinoma. *Am J Surg* 151; 457-459
14. Bordador LC, Li X, Toole B, Chen B, Regezi J, Zardi L, Hu Y, Ramos DM (2000) Expression of emmprin by oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 85: 347-352
15. Boyle P, Zaridze DG, Smans M (1985) Descriptive epidemiology of colorectal cancer. *Int J Cancer* 36: 9-18
16. Bramhall SR, Neoptolemos JP, Gordon GH, Lemoine NR (1997) Imbalance of expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of the matrix metalloproteinases (TIMPs) in human pancreatic carcinoma. *J Pathol* 182: 347-355
17. Bruch HP, Roblick UJ, Schwandner O (1999) Rektumkarzinom. Optimierung der Therapie durch tiefe Resektion oder Exstirpation. *Zentralbl Chir* 124: 422-427
18. Bruch HP, Schwandner O, Schiedeck THK, Roblick UJ (1999) Actual standards and controversies on operative technique and lymph-node dissection in colorectal cancer. *Langenbeck's Arch Surg* 384: 167-175
19. Bruch HP, Schwandner O, Sterk P, Schiedeck THK (2001) Operative Therapie des Rektumkarzinoms: Aktuelle Entwicklungen unter besonderer Berücksichtigung sphinktererhaltender und laparoskopischer Eingriffe. *Onkologe* 7: 381-390

20. Bruch HP, Schwandner O: Chirurgische Therapie der Rektumkarzinoms: Standard und totale mesorektale Exzision. In: Büchler MW, Heald RJ, Maurer CA, Ulrich B (Hrsg.) Rektumkarzinom: Das Konzept der Totalen Mesorektalen Exzision. Basel, Karger 1998 104-111
21. Bruch HP, Schwandner O (2002) Totale mesorektale Exzision beim Rektumkarzinom: Das Dissektionsprinzip ohne kontrollierte Daten. *Viszeralchirurgie* 37: 6-11
22. Carriquiry LA, Pineyro A (1999) Should carcinoembryonic antigen be used in the management of patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 42: 979-994
23. Cecil TD, Sexton R, Moran BJ, Heald RJ (2004) Total mesorectal excision results in low local recurrence rates in lymph node-positive rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 47: 1145-1459
24. Chambers AF, Matrisian LM (1997) Changing views of the role of matrix-metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 89: 1260-1270
25. Collins HM, Morris TM, Watson SA (2001) Spectrum of matrix metalloproteinase expression in primary and metastatic colon cancer: Relationship to the tissue inhibitors of metalloproteinases and membrane type-1-matrix metalloproteinase. *Br J Cancer* 84: 1664-1670
26. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, Hammond ME, Henson DE, Hutter RV, Nagle RB, Nielsen ML, Sargent DJ, Taylor CR, Welton M, Willet C. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 124: 979-994
27. Crabbe T, Smith B, O'Connell J, Docherty A (1994) Human progelatinase A can be activated by matrilysin. *FEBS Lett* 345: 14-16
28. Dalberg K, Eriksson E, Enberg U, Kjellman M, Backdahl M (2000) Gelatinase A, membrane type 1 matrix metalloproteinase, and extracellular matrix metalloproteinase inducer mRNA expression: correlation with invasive growth of breast cancer. *World J Surg* 24: 334-340

29. Davidson B, Goldberg I, Kopolovic J, Lerner-Geva L, Gotlieb WH, Weis B, Ben-Baruch G, Reich R (1999) MMP-2 and TIMP-2 expression correlates with poor prognosis in cervical carcinoma - a clinicopathologic study using immunohistochemistry and mRNA in-situ hybridization. *Gynecol Oncol* 73: 372-382
30. D'Errico A, Garbisa S, Liotta LA, Castronovo V, Stetler-Stevenson WG, Grigioni WF (1991) Augmentation of type IV collagenase, laminin receptor, and Ki-67 proliferation antigen associated with human colon, gastric and breast carcinoma progression. *Mod Pathol* 4: 239-246
31. Deutsche Krebsgesellschaft und ihre Arbeitsgemeinschaften, Deutsche Gesellschaft für Chirurgie und Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (2000) Rektumkarzinom – Interdisziplinäre Leitlinien. *Coloproctology* 5: 182-191
32. D'Ortho MP, Will H, Atkinson S, Butler G, Messent A, Gavrilovic J, Smith B, Timpl R, Zardi L, Murphy G (1997) Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broad spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases. *Eur J Biochem* 250: 751-757
33. Egeblad M, Werb Z (2002) New Functions for the Matrix Metalloproteinases in Cancer Progression. *Nature Reviews Cancer* 2: 161-174
34. Eisenberg B, Decosse JJ, Harford F, Michalek J (1982) Carcinoma of the colon and rectum: the natural history reviewed in 1704 patients. *Cancer* 49: 1131-1134
35. Fassina G, Ferrari N, Brigati C, Benelli R, Santi L, Noonan DM, Albini A (2000) Tissue inhibitors of metalloproteinases: regulation and biological activities. *Clin Exp Metastasis* 18: 111-120

36. Fielding LP, Arsenault PA, Chapuis PH, Dent O, Gatright B, Hardcastle JD, Hermanek P, Jass JR, Newland RC (1991) Clinicopathological staging for colorectal cancer: An International Documentation System (IDS) and an International Comprehensive Anatomical Terminology (ICAT). *J Gastroenterol Hepatol* 6: 325-344
37. Garbett EA, Reed MWR, Brown NJ (1999) Proteolysis in human breast and colorectal cancer. *Br J Cancer* 81: 287-293
38. Goldberg GI, Wilhelm SM, Kronberger A, Bauer EA, Grant GA and Eisen AZ (1986) Human fibroblast collagenase. Complete primary structure and homology to an oncogene transformation-induced rat protein. *J Biol Chem* 261: 6600-6605
39. Goldberg SM, Klas JV (1998) Total mesorectal excision in the treatment of rectal cancer. A view from the USA. *Semin Surg Oncol* 15: 87-90
40. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP (1997) Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 74: 111-122
41. Grem J (1997) The prognostic importance of tumor markers in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Cur Opin Oncol* 9: 380-387
42. Grigioni WF, D'Errico A, Fortunato C, Fiorentino M, Mancini AM, Stetler-Stevenson WG, Sobel ME, Liotta LA, Onisto M, Garbisa S (1994) Prognosis of gastric carcinoma revealed by interactions between tumor cells and basement membrane. *Mod Pathol* 7: 220-225
43. Gross J, Lapiere CM (1997) Collagenolytic activity in amphibian tissue: A tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 48: 1014-1022
44. Haas TL, Davis SJ, Madri JA (1998) Three-dimensional type I collagen lattices induces coordinate expression of matrix metalloproteinases MT-MMP and MMP-2 in microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 273: 3604-3610

45. Harada T, Aii S, Mise M, Imamura T, Higashitsuji H, Furutani M, Niwano M, Ishigami S, Fukumoto M, Seiki M, Sato H, Imamura M (1998) Membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) gene is overexpressed in highly invasive hepatocellular carcinomas. *J Hepatol* 28: 231-239
46. Harrison LE, Guillem JG, Paty P, Cohen AM (1997) Preoperative carcinoembryonic antigen predicts outcome in node negative colon cancer patients: a multivariate analysis of 572 patients. *J Am Coll Surg* 185: 55-59
47. Hashimoto K, Kihira Y, Matuo Y, Usui T (1998) Expression of matrix-metalloproteinase-7 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human prostate. *J Urol* 160: 1872-1876
48. Hermanek P, Mansmann U (2001) Kriterien der Wertung von Prognosefaktoren. *Chirurg* 72: 474-480
49. Hermanek P (1999) Prognostic factor research in oncology. *J Clin Epidemiol* 52: 371-374
50. Herron GS, Banda MJ, Clark EJ, Gavrilovic J, Werb Z (1986) Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. II. Expression of collagenase and stromelysin activities is regulated by endogenous inhibitors. *J Biol Chem* 261: 2814-2818
51. Hohenberger W, Nömayr A, Merkel S (2003) Chirurgische Therapie kolorektaler Karzinome. *Internist* 44: 311-321
52. Heppner KJ, Matrisian LM, Jensen RA, Rodgers WH (1996) Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response. *Am J Pathol* 149: 273-282
53. Imai K, Ohuchi E, Aoki T, Nomura H, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y (1996) Membrane-type matrix metalloproteinase 1 is a gelatinolytic enzyme and is secreted in a complex with tissue inhibitor of metalloproteinases 2. *Cancer Res* 56: 2707-2710

54. Imai K, Yokohama Y, Nakanishi I, Ohuchi E, Fujii Y, Nakai N, Okada Y (1995) Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) from human rectal carcinoma cells. Activation of the precursor, interaction with other matrix metalloproteinases and enzymic properties. *J Biol Chem* 270: 6691-6697
55. Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, Yoshioka T, Nishimoto H, Itohara S (1998) Reduced angiogenesis and tumorprogression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res* 58: 1048-1051
56. Johnsen M, Lund LR, Romer J, Almholt K, Dano K (1998) Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation. *Curr Opin Cell Biol* 10: 667-671
57. Joo YE, Seo KS, Kim J, Kim HS, Rew JS, Park CS, Kim SJ (1999) Role of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in colorectal carcinoma. *J Korean Med Sci* 14: 417-423
58. Jung SA, Yang SK, Kim JS, Shim KN, Im SA, Myung SJ, Jung HY, Yu CS, Kim JC, Hong WS, Kim JH, Min YI (2005) The expression of matrix metalloproteinases (MMPs), tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) and angiogenesis in relation to the depth of tumor invasion and lymph node metastasis in submucosally invasive colorectal carcinoma. *Korean J Gastroenterol* 45: 401-408
59. Kähäri VM, Saarialho-Kere U (1999) Matrix-Metalloproteinases and their inhibitors in tumor growth and invasion. *Ann Med* 31: 34-45
60. Kanno N, Nonomura N, Miki T, Kojima Y, Takahara S, Nozaki M, Okuyama A (1998) Effects of epidermal growth factor on the invasion activity of the bladder cancer cell line. *J Urology* 159: 586-590
61. Kikuchi R, Noguchi T, Takeno S, Kubo N, Uchida Y (2000) Immunohistochemical detection of membrane-type-1-matrix metalloproteinase in colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 83: 215-218
62. Kim TS, Kim YB (1999) Correlation between Expression of Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2), and Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) and Angiogenesis in Colorectal Adenocarcinoma. *J Korean Med Sci* 14: 263-270

63. Kinoshita T, Sato H, Okada A, Ohuchi E, Imai K, Okada Y, Seiki M (1998) TIMP-2 Promotes Activation of Progelatinase A by Membrane-type 1 Matrix Metalloproteinase Immobilized on Agarose Beads. *J Biol Chem* 273: 16098-16103
64. Knäuper V, Will H, Lopez-Otin C, Smith B, Atkinson J, Stanton H, Hembry RM, Murphy G (1996) Cellular Mechanisms for Human Procollagenase-3 (MMP-13) Activation. *J Biol Chem* 271: 17124-17131
65. Koblinski JE, Ahram M, Sloane BF (2000) Unraveling the role of proteases in cancer. *Clin Chim Acta* 291: 113-135
66. Kullmann F (2003) Karzinogenese und hereditäre Kolonkarzinome. *Internist* 44: 254-267
67. Kune S, Kune GA, Watson L (1986) The Melbourne Colorectal Cancer Study: Incidence Findings by Age, Sex, Site, Migrants and Religion. *Int J Epidemiol* 15: 483-493
68. Kurokawa S, Arimura Y, Yamamoto H, Adachi Y, Endo T, Sato T, Suga T, Hosokawa M, Shinomura Y, Imai K (2005) Tumour matrilysin expression predicts metastatic potential of stage I (pT1) colon and rectal cancers. *Gut* 54: 1751-1758
69. Lamoreaux WJ, Fitzgerald ME, Reiner A, Hasty KA, Charles ST (1998) Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro. *Microvascular Res* 55: 29-42
70. Langenskiold M, Holmdahl L, Falk P, Ivarsson ML (2005) Increased plasma MMP-2 protein expression in lymph node-positive patients with colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 20: 245-252
71. Leeman MF (2003) New insights into the roles of Matrix Metalloproteinases in colorectal cancer development and progression. *J Pathol* 201: 528-534
72. Levy AT, Cioce V, Sobel ME, Garbisa S, Grigioni WF, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG (1991) Increased expression of the M_r 72,000 type IV collagenase in human colonic adenocarcinoma. *Cancer Research* 51: 439-444

73. Li BH, Zhao P, Liu SZ, Yu YM, Han M, Wen JK (2005) Matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in colorectal carcinoma invasion and metastasis. *World J Gastroenterol* 11: 3046-3050
74. Liabakk NB, Talbot E, Smith RA, Wilkinson K, Balkwill R (1996) Matrix Metalloproteinase 2 (MMP-2) and Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9) Type IV Collagenases in Colorectal Cancer; *Cancer Res* 56: 190-196
75. Liotta LA, Abe S, Robey PG, Martin GR (1979) Preferential digestion of basement membrane collagen by an enzyme derived from a metastatic murine tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 2268-2272
76. Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S (1980) Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 284: 67-68
77. Luo H, Zhou ZZ, Yang L, Yu YY, Tian C, Zhou B, Zheng XL, Xia QJ, Li Y and Wang R (2005) Clinicopathologic and Prognostic Significance of MMP-7 (Matrilysin) Expression in Human Rectal Cancer *Jpn J Clin Oncol* 35: 739-744
78. Malhotra S, Newman E, Eisenberg D, Scholes J, Wieczorek R, Mignatti P, Shamamian P (2002) Increased membrane type 1 matrix metalloproteinase expression from adenoma to colon cancer: a possible mechanism of neoplastic progression. *Dis Colon Rectum* 45: 537-543
79. Matrisian L (1994) Matrix metalloproteinase gene expression. *Ann NY Acad Sci* 732: 42-50
80. Masaki T, Matsuoka H, Sugiyama M, Abe N, Goto A, Sakamoto A, Atomi Y (2001) Matrilysin (MMP-7) as a significant determinant of malignant potential of early invasive colorectal carcinomas. *Br J Cancer* 84: 1317-1321
81. Masaki T, Sugiyama M, Matsuoka H, Abe N, Izumisato Y, Sakamoto A, Atomi Y (2003) Matrix metalloproteinases may contribute compensationally to tumor invasion in T1 colorectal carcinomas. *Anticancer Res* 23: 4169-4173

82. Maurer CA, Renzulli P, Meyer JD, Büchler (1999) Rektumkarzinom: Optimierung durch partielle oder totale Mesorektomentfernung. *Zentralbl Chir* 124: 428-435
83. McCawley LJ, Matrisian LM (2000) Matrix metalloproteinases: Multifunctional contributors to tumor progression. *Mol Med Today* 6: 149-156
84. McDonnell S, Navre M, Coffey RJ Jr, Matrisian LM (1991) Expression and localization of the matrix metalloproteinase pump-1 (MMP-7) in human gastric and colon cancers. *Mol Carcinog* 4: 527-533
85. Miyajima Y, Nakano R, Morimatsu M (1995) Analysis of expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 in hypopharyngeal squamous cell carcinoma by in situ hybridization. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 104: 678-684
86. Miyake H, Yoshimura K, Hara I (1997) Basic fibroblast growth factor regulates matrix metalloproteinases production and in vitro invasiveness in human bladder cancer cell lines. *J. Urology* 157: 2351-2355
87. Miyaki M, Seki M, Okamoto M, Yamanaka A, Maeda Y, Tanaka K, Kikuchi R, Iwama T, Ikeuchi T, Tonomura A (1990) Genetic changes and histopathological types of colorectal tumors from patients with familial adenomatous polyposis. *Cancer Res* 50: 7166-7173
88. Mukai M, Sadahiro S, Tokunaga N, Ishizu K, Ito I, Kameya T, Ishikawa K, Iwase H, Suzuki T, Ishida H, Tajima T, Makuuchi H (1999) The expression of MMP-2 and TIMP-2 in patients with primary colorectal adenocarcinoma: correlation with liver metastasis. *Oncol Rep* 6: 969-973
89. Murashige M, Miyahara M, Shiraishi N, Saito T, Kohno K, Kobayashi M (1996) Enhanced expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in human colorectal tumors. *Jpn J Clin Oncol* 26: 303-309
90. Nakamura H, Ueno H, Yamashita K, Shimada T, Yamamoto E, Noguchi M, Fujimoto N, Sato H, Seiki M, Okada Y (1999) Enhanced production and activation

of progelatinase A mediated by membrane-type 1 matrix metalloproteinase in human papillary thyroid carcinomas. *Cancer Res* 59: 467-473

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

92. Nesbakken A, Nygaard K, Bull-Njaa T, Carlsen E, Eri LM (2000) Bladder and sexuell dysfunction after mesorectal excision in the surgical treatment of rectal cancer. *Br J Surg* 87: 206-210

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

94. NIH consensus conference (1990) Adjuvant therapy for patients with colon rectal cancer. *JAMA* 264: 1444-1450

95. Nomura H, Sato H, Seiki M, Mai M, Okada Y (1995) Expression of membrane-type matrix metalloproteinase in human gastric carcinomas. *Cancer Res* 55: 3263-3266

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

97. Ougolkov AV, Yamashita K, Mai M, Minamoto T (2002) Oncogenic β -Catenin and MMP-7 (Matrilysin) Cosegregate in Late-Stage Clinical Colon Cancer. *Gastroenterology* 122: 60-71

98. Overall CM (1994) Regulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase expression. *Ann N Y Acad Sci* 732: 51-64

99. Pakkastie TE, Luukkonen PE, Jarvinen HJ (1995) Anterior resection controls cancer of the rectum as well as abdominoperineal excision. *Eur J Surg* 161: 833-839

100. Papadopoulou S, Scorilas A, Arnogianaki N, Papapanayiotou B, Tzimogiani A, Agnantis N, Talieri M (2001) Expression of Gelatinase-A (MMP-2) in Human Colon Cancer and Normal Colon Mucosa. *Tumor Biol* 22: 383–389
101. Parsons SL, Watson SA, Collins HM, Griffin NR, Clarke PA, Steele RJ (1998) Gelatinase (MMP-2 and MMP-9) expression in gastrointestinal malignancy, *Br J Cancer* 78: 1495-1502
102. Passlick B, Sienel W, Seen-Hibler R, Wockel W, Thetter O, Mutschler W, Pantel K (2000) Overexpression of matrix metalloproteinase 2 predicts unfavorable outcome in early-stage non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 6: 3944-3948
103. Polette M, Nawrocki B, Gilles C, Sato H, Seiki M, Tournier JM, Birembaut P (1996) MT-MMP expression and localization in human lung and breast cancers. *Virchows Arch* 428: 29-35
104. Pyke C, Ralfkiaer E, Tryggvason K, Dano K (1993) Messenger RNA for two type IV collagenases is located in stromal cells in human colon cancer. *Am J Pathol* 142: 359-365
105. Pesta M, Holubec L Jr, Topolcan O, Cerna M, Rupert K, Holubec LS, Treska V, Kormunda S, Elgrova L, Finek J, Cerny R (2005) Quantitative estimation of matrix metalloproteinases 2 and 7 (MMP-2, MMP-7) and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases 1 and 2 (TIMP-1, TIMP-2) in colorectal cancer carcinoma tissue samples. *Anticancer Res* 25: 3387-3391
106. Rhee JS, Coussens LM (2002) RECKing MMP function: implications for cancer development. *Trends Cell Biol* 12: 209-211
107. Rich T, Gunderson LL, Lew R, Galdibini JJ, Cohen AM, Donaldson G (1983) Patterns of recurrence of rectal cancer after potentially curative surgery. *Cancer* 52: 1317-1329
108. Ring P, Johansson K, Hoyhtya M, Rubin K, Lindmark G (1997) Expression of tissue inhibitor of metalloproteinase TIMP-2 in human colorectal cancer – A predictor of tumour stage. *Br J Cancer* 76: 805–811

109. Robert Koch Institut. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. Krebs in Deutschland. 5. erweiterte, aktualisierte Auflage 2006, Saarbrücken
110. Roca F, Mauro LV, Morandi A, Bonadeo F, Vaccaro C, Quintana GO, Specterman S, de Kier Joffe EB, Pallotta MG, Puricelli LI, Lastiri J (2006) Prognostic value of E-cadherin, beta-catenin, MMPs (7 and 9), and TIMPs (1 and 2) in patients with colorectal carcinoma. *J Surg Oncol* 93: 151-160
111. Roeb E, Arndt M, Jansen B, Schumpelick V, Matern (2004) S Simultaneous determination of matrix metalloproteinases (MMP)-7, MMP-1, -3, and -13 gene expression by multiplex PCR in colorectal carcinomas. *Int J Colorectal Dis* 19: 518-524
112. Roeb E, Matern S (2003) MMPs und kolorektales Karzinom. *Med Klin* 98: 763-770
113. Sang QX, Birkedal-Hansen H, Van Wart HE (1995) Proteolytic and non-proteolytic activation of human neutrophil progelatinase B. *Biochim Biophys Acta* 1251: 99-108
114. Sato H, Seiki M (1996) Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in tumor metastasis. *J Biochem* 119: 209-215
115. Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M (1994) A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 370: 61-65
116. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rodel C, Wittekind C, Fietkau R, Martus P, Tschmelitsch J, Hager E, Hess CF, Karstens JH, Liersch T, Schmidberger H, Raab R (2004) German Rectal Cancer Study Group. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med* 351: 1731-1740
117. Schmiegel W, Adler G, Frühmorgen P, Folsch U, Graeven U, Layer P, Petrasch S, Porschen R, Pox C, Sauerbruch T, Schmoll HJ, Zeitz M (2000) Kolorektales Karzinom: Prävention und Früherkennung in der asymptomatischen

Bevölkerung - Vorsorge bei Risikopatienten - Endoskopische Diagnostik, Therapie und Nachsorge von Polypen und Karzinomen. *Z Gastroenterol* 38: 49-75

118. Shapiro SD (1998) Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix. Biological consequences. *Curr Opin Cell Biol* 10: 602-608

119. Sis B, Sagol O, Kupelioglu A, Sokmen S, Terzi C, Fuzun M, Ozer E, Bishop P (2004) Prognostic significance of matrix metalloproteinase-2, cathepsin D, and tenascin-C expression in colorectal carcinoma. *Pathol Res Pract* 200: 379-387

120. Sorsa T, Salo T, Koivunen E (1997) Activation of type IV pro-collagenases by human tumor-associated trypsin-2. *J Biol Chem* 272: 21067-21074

121. Sternlicht MD, Werb Z (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behaviour. *Annu Rev Cel Dev Biol* 17: 463-516

122. Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI (1995) Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem* 270: 5331-5338

123. Sun J, Hemler ME (2001) Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD 147 / extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions. *Cancer Res* 61: 2276-2281

124. Talbot RW, Irvine B, Jass JR, Dowd GS und Northover JM (1989) Bone metastases in carcinoma of the rectum: a clinical and pathological review. *Eur J Surg Oncol* 15: 449-452

125. Talvensaari-Mattila A, Pääkkö P, Turpeenniemi-Hujanen T (2003) Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is associated with survival in breast carcinoma. *British Journal of Cancer* 89: 1270-1275

126. Tetley T (1997) Matrix metalloproteinase: a role in emphysema? *Thorax* 52: 495

127. Todesursachenstatistik. Statistisches Bundesamt, Zweigstelle Bonn, 01.02.2002. Internet: <http://www.gbe-bund.de>
128. Tokuraku M, Sato H, Murakami S, Okada Y, Watanabe Y, Seiki M (1995) Activation of the precursor of gelatinase A/72kDa type IV collagenase/MMP-2 in lung carcinomas correlates with the expression of membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) and lymph node metastasis. *Int J Cancer* 64: 355-359
129. Tomita T, Iwata K (1996) Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in Colonic Adenomas-Adenocarcinomas. *Dis Colon Rectum* 39: 1255-1264
130. Tutton MG, George ML, Eccles SA, Burton S, Swift RI, Abulafi AM (2003) Use of plasma MMP-2 and MMP-9 levels as a surrogate for tumour expression in colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 107: 541-550
131. Wagner C: CEA (Carcinoembryonales Antigen). In: Thomas L: Labor und Diagnostik. 5. erweiterte Auflage 2000, 984-987, TH Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt
132. Walther MM, Kleiner DE, Lubensky IA, Pozzatti R, Nyguen T, Gnarra JR, Hurley K, Venzon D, Linehan WM, Stetler-Stevenson WG (1997) Progelatinase A mRNA expression in cell lines derived from tumors in patients with metastatic renal cell carcinoma correlates inversely with survival. *Urology* 50: 295-301
133. Wasylyk C, Gutman A, Nicholson R, Wasylyk B (1991) The c-Ets oncoprotein activates the stromelysin promoter through the same elements as several non-nuclear oncoproteins. *EMBO* 10: 1127-1134
134. Weitz J, Herfarth CH (2001) Tumorbezogene Prognosefaktoren - Belegtes und Hypothetisches. *Chirurg* 72: 481-488
135. Westerlund A, Apaja-Sarkkinen M, Hoyhtya M, Puistola U, Turpeenniemi-Hujanen T (1999) Gelatinase A-immunoreactive protein in ovarian lesions - Prognostic value in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 75: 91-98

136. Westermarck J, Kähäri VM (1999) Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J* 13: 781-792
137. Wexner SD, Rotholtz NA (2000) Surgeon influenced variables in resectional cancer surgery. *Dis Colon Rectum* 43: 1606-1627
138. Wilson CL, Heppner KJ, Labosky PA, Hogan BL, Matrisian LM (1997) Intestinal tumorigenesis is suppressed in mice lacking the metalloproteinase matrilysin. *Proc Natl Acad Sci USA. Cancer Res* 94: 1402-1407
139. Wilson CL, Matrisian LM (1996) Matrilysin An epithelial matrix metalloproteinase with potentially novel functions. *Int J Biochem Cell Biol* 28: 123-136
140. Wittekind C, Wagner G: *UICC: TNM-Klassifikation maligner Tumoren*, 5. Auflage Springer 1997, Berlin Heidelberg New York
141. Woessner JF: The matrix metalloproteinase family. In: Parks WC, Mecham RP (Hrsg.). *Matrix Metalloproteinases*. San Diego: Academic Press 1998: 1-14
142. Woessner JF, Taplin C (1988) Purification and properties of a small latent matrix metalloproteinase of the rat uterus. *J Biol Chem* 263: 16918-16925
143. Yamamoto H, Adachi Y, Itoh F, Iku S, Matsuno K, Kusano M, Arimura Y, Endo T, Hinoda Y, Hosokawa, Imai K (1999) Association of Matrilysin expression with recurrence and poor prognosis in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 59: 3313-3316
144. Yamamoto H, Itoh F, Adachi Y, Sakamoto H, Adachi M, Hinoda Y, Imai K (1997) Relation of enhanced secretion of active matrix metalloproteinases with tumour spread in human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 112: 1271-1277
145. Yamashita K, Azumano I, Mai M, Okaa Y (1998) Expression and tissue localization of matrix metalloproteinase 7 (Matrilysin) in human gastric carcinomas. Implications for vessel invasion and metastasis. *Int J Cancer (Pre Oncol)* 79: 187-194

146. Zeng ZS, Shu WP, Cohen AM, Guillem JG (2002) Matrix metalloproteinase-7 expression in colorectal cancer liver metastases: Evidence for involvement of MMP-7 activation in human cancer metastases. *Clin Cancer Res* 8: 144-148

147. Zucker S, Vacirca J (2004) Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 23: 101-117

8. Anhang

8.1 TNM-Klassifikation

Table 23: TNM-Klassifikation und Stadiengruppierung
Rektumkarzinom (UICC 1997)

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

Table 24: Regionäre Lymphknoten (UICC 1997)

N	Regionäre Lymphknoten
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1 bis 3 regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten

Tabelle 25: Fernmetastasen (UICC 1997)

MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 26: Residualtumor (UICC 1997)

RX	Vorhandensein von Residualtumor kann nicht beurteilt werden
R0	Kein Residualtumor
R1	Mikroskopischer Residualtumor
R2	Makroskopischer Residualtumor

Tabelle 27: Grading (UICC 1997)

GX	Differenzierung kann nicht bestimmt werden
G1	Gute Differenzierung
G2	Mäßige Differenzierung
G3	Schlechte Differenzierung
G4	Undifferenziert

Tabelle 28: Stadiengruppierung

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

8.2 Daten der Patienten

Tumorbank	Alter	Geschlecht	OP-Datum	UICC 97	UICC 02	Lymphknotenstatus	Grading	CEA	30-Tages-Letalität	Adjuvante Therapie	Ende Nachbeobachtung	Überlebenszeit	Tumorprogression	eMMP-2	sMMP-2	MMP-7	MT1-MMP	TIMP-2
146	78	w	Jan. 96	1	1	0	2	1	0	0	Jun. 04	100	0	0	1	0	0	0
156	55	m	Feb. 96	3	3a	1	2	1	0	1	Aug. 04	101	0	1	1	0	0	0
157	70	m	Feb. 96	1	1	0	2	1	0	0	Dez. 03	93	0	0	0	0	0	1
163	57	m	Jun. 96	3	3c	2	2	1	0	1	Apr. 04	94	0	0	0	0	0	0
172	59	m	Aug. 96	2	2a	0	2	1	0	1	Mrz. 00	43	1	0	0	1	1	0
173	55	w	Aug. 96	1	1	0	2	2	0	0	Mai. 04	93	0	0	1	0	0	0
175	74	m	Aug. 96	3	3b	1	2	1	0	1	Okt. 03	86	0	0	1	0	0	0
176	72	m	Aug. 96	3	3c	2	2	1	0	1	Jun. 04	94	0	0	1	0	0	0
189	55	m	Nov. 96	2	2a	0	2	1	0	0	Jul. 02	68	0	0	1	0	0	0
196	76	w	Dez. 96	3	3b	1	2	2	0	1	Nov. 97	11	0	0	1	0	0	0
211	52	w	Apr. 97	3	3c	2	3	2	0	1	Okt. 99	31	1	0	1	0	0	0
214	51	w	Apr. 97	3	3c	2	2	1	0	1	Aug. 04	87	0	0	1	0	0	1
218	82	w	Mai. 97	2	2a	0	2	2	1	0	Mai. 97	0	0	1	0	1	1	1
219	81	w	Mai. 97	3	3c	2	3	2	0	1	Okt. 98	16	1	0	1	0	0	0
220	55	m	Jun. 97	2	2a	0	2	1	0	1	Aug. 04	85	0	0	1	0	0	0
221	75	w	Jun. 97	2	2a	0	2	1	0	0	Aug. 97	2	0	0	1	1	1	1
224	54	m	Jul. 97	3	3c	2	2	9	0	1	Jul. 02	60	0	1	1	0	1	0
235	72	w	Sep. 97	1	1	0	2	1	0	0	Jul. 03	69	0	0	0	0	0	0
241	77	w	Okt. 97	3	3a	1	2	1	0	1	Okt. 02	59	1	0	0	0	1	0
242	75	m	Okt. 97	2	2a	0	2	1	0	1	Sep. 00	35	1	1	1	1	0	1
246	62	m	Nov. 97	3	3b	1	2	1	0	1	Apr. 04	77	0	0	1	0	0	0
247	59	w	Nov. 97	2	2a	0	2	1	0	1	Aug. 04	80	0	0	1	1	0	1
254	92	w	Dez. 97	3	3b	1	3	2	0	0	Mrz. 99	15	0	1	1	0	0	1
256	70	m	Dez. 97	3	3b	1	2	2	0	0	Jul. 98	7	1	1	1	0	0	0
263	56	m	Mrz. 98	2	2a	0	2	2	0	1	Aug. 04	76	0	1	0	0	0	0
270	59	m	Mai. 98	2	2a	0	2	1	0	0	Jul. 04	74	0	0	1	0	1	1

286	32	w	Aug. 98	3	3b	1	2	9	0	1	Nov. 03	63	0	0	1	1	0	1
287	76	m	Aug. 98	4	4	2	3	2	0	0	Nov. 00	26	1	1	0	1	1	1
293	67	m	Sep. 98	2	2b	0	2	1	0	1	Mai. 00	19	0	0	0	0	1	0
298	69	w	Okt. 98	2	2b	0	2	9	0	0	Apr. 04	66	1	1	1	1	1	1
307	56	w	Nov. 98	1	1	0	2	1	0	0	Mrz. 04	63	0	1	0	0	0	0
326	86	w	Feb. 99	2	2a	0	2	1	0	0	Mai. 04	62	0	1	1	0	1	1
327	62	m	Feb. 99	3	3c	2	3	1	0	1	Okt. 01	32	0	0	1	1	1	1
330	66	m	Mrz. 99	1	1	0	2	1	0	0	Aug. 04	64	0	0	1	0	0	0
332	67	m	Mrz. 99	3	3b	1	2	1	0	1	Sep. 99	6	0	1	1	1	1	1
339	57	m	Apr. 99	2	2a	0	2	1	0	1	Aug. 04	64	0	0	0	1	1	0
342	60	w	Apr. 99	1	1	0	2	1	0	0	Aug. 04	63	0	1	1	1	1	1
350	88	m	Jun. 99	1	1	0	2	1	0	0	Dez. 03	55	0	0	0	0	1	0
351	77	w	Jun. 99	2	2a	0	2	1	0	1	Aug. 04	62	0	0	1	1	0	0
352	58	m	Jun. 99	1	1	0	2	1	0	0	Sep. 03	51	0	0	1	1	0	0
355	53	w	Jul. 99	1	1	0	3	1	0	0	Aug. 04	60	0	0	1	1	0	0
357	33	w	Aug. 99	2	2a	0	2	1	0	1	Nov. 03	52	0	0	1	1	1	0
358	58	m	Aug. 99	2	2a	0	2	1	0	1	Aug. 04	60	0	0	0	0	0	0
361	68	m	Aug. 99	3	3a	1	2	1	0	1	Aug. 04	59	0	0	0	0	0	0
367	66	w	Sep. 99	3	3b	1	2	1	0	1	Mai. 04	55	1	0	1	1	1	0
368	60	m	Okt. 99	2	2a	0	2	1	0	1	Aug. 03	46	0	0	1	1	1	1
371	68	m	Okt. 99	2	2a	0	3	2	0	1	Nov. 03	48	0	0	0	0	1	0
372	56	m	Okt. 99	2	2a	0	2	1	0	1	Aug. 04	57	0	0	1	1	0	0
380	55	m	Dez. 99	1	1	0	2	1	0	0	Aug. 04	55	0	0	1	0	0	0
381	69	m	Dez. 99	2	2a	0	2	2	0	1	Mai. 02	29	0	0	1	0	0	0
386	63	w	Feb. 00	3	3b	1	3	1	0	1	Aug. 04	54	0	0	1	1	1	1
388	63	w	Feb. 00	3	3b	1	2	2	0	1	Mai. 02	27	1	1	1	1	0	1
389	49	w	Feb. 00	1	1	0	2	0	0	0	Aug. 04	53	0	1	0	0	0	1
395	61	w	Mrz. 00	3	3a	1	2	1	0	0	Apr. 02	25	0	1	0	1	1	1
400	63	m	Mai. 00	1	1	0	2	1	0	0	Jan. 04	44	0	1	1	0	1	0
401	77	w	Mai. 00	3	3b	1	2	1	0	0	Feb. 04	45	0	0	1	1	1	1
402	80	m	Mai. 00	2	2a	0	2	9	1	0	Jun. 00	0	0	0	1	1	1	1
404	47	m	Jun. 00	2	2a	0	3	2	0	1	Aug. 04	49	0	1	1	1	1	1
405	87	m	Jul. 00	2	2a	0	3	0	0	0	Mai. 04	46	0	0	1	1	0	1
406	86	w	Jul. 00	2	2a	0	2	1	0	0	Aug. 03	37	0	0	0	0	0	0
407	78	m	Jul. 00	2	2a	0	2	1	0	0	Nov. 02	29	0	0	0	1	0	0
408	58	w	Jul. 00	2	2a	0	2	0	0	0	Mrz. 04	43	0	1	1	1	0	1
414	62	m	Sep. 00	2	2a	0	3	2	0	1	Feb. 03	29	0	0	0	0	0	0
417	77	m	Okt. 00	3	3a	1	3	9	0	0	Mrz. 04	41	0	0	1	1	0	0
421	68	m	Okt. 00	2	2b	0	3	0	0	0	Aug. 04	45	1	1	1	1	1	1
426	71	m	Dez. 00	3	3b	1	2	1	0	1	Aug. 04	44	0	0	1	0	0	0
432	63	m	Jan. 01	3	3b	1	2	2	0	1	Aug. 04	42	0	1	1	1	1	1
433	76	w	Feb. 01	3	3c	2	2	1	0	0	Mai. 03	28	0	1	1	1	1	1
435	51	m	Mrz. 01	3	3c	2	3	1	0	1	Aug. 04	41	0	1	1	0	1	0
437	73	w	Mrz. 01	2	2a	0	2	1	0	1	Mai. 04	38	0	1	1	0	1	1
440	60	m	Mrz. 01	2	2a	0	2	1	0	1	Aug. 04	40	0	1	1	1	0	1
442	58	w	Apr. 01	1	1	0	2	1	0	0	Okt. 03	30	1	1	1	1	0	0
444	75	m	Mai. 01	2	2a	0	2	1	0	1	Aug. 04	38	0	1	1	1	1	0
445	79	w	Mai. 01	1	1	0	2	1	0	0	Apr. 04	34	0	1	1	1	1	1
446	62	m	Mai. 01	2	2a	0	2	9	0	0	Aug. 04	38	0	1	1	1	1	1
448	85	w	Jun. 01	2	2a	0	2	1	0	0	Jun. 04	36	1	0	1	1	1	0
451	64	m	Aug. 01	3	3c	2	3	1	0	1	Apr. 04	32	0	1	1	1	1	1
452	70	w	Aug. 01	3	3b	1	2	1	0	1	Aug. 04	36	0	0	1	1	1	1

453	60	w	Aug. 01	4	4	2	2	1	0	1	Jun. 04	34	1	1	1	1	0	1
454	77	w	Aug. 01	3	3a	1	2	1	0	0	Mai. 04	34	0	0	1	1	1	1
455	70	m	Aug. 01	1	1	0	2	1	0	0	Aug. 04	36	0	0	0	0	1	1
456	73	w	Aug. 01	2	2a	0	2	1	0	0	Mrz. 04	31	0	0	1	0	0	1
457	75	m	Aug. 01	4	4	1	3	9	0	1	Mai. 03	21	0	0	1	0	0	1
460	82	m	Okt. 01	1	1	0	2	1	0	0	Dez. 01	2	0	0	0	0	1	0
461	78	w	Okt. 01	1	1	0	1	1	0	0	Aug. 04	34	0	0	1	1	0	0
468	68	m	Feb. 02	3	3b	1	3	0	0	0	Aug. 04	30	0	0	1	1	1	1
470	83	m	Jun. 02	2	2b	0	3	1	0	0	Nov. 02	5	0	0	1	0	1	0
472	61	m	Jun. 02	2	2a	0	2	1	0	1	Aug. 04	25	0	1	1	1	1	1
473	63	m	Jul. 02	2	2a	0	3	9	0	0	Aug. 04	25	0	1	1	1	1	0
474	71	w	Jul. 02	1	1	0	2	9	0	0	Aug. 04	25	0	0	1	0	1	0
475	59	m	Aug. 02	3	3a	1	2	0	0	1	Aug. 04	24	0	0	0	0	1	0
476	48	w	Aug. 02	3	3b	1	3	1	0	1	Aug. 04	23	0	1	1	0	1	1
481	76	m	Okt. 02	2	2a	0	3	9	1	0	Okt. 02	0	0	0	1	1	0	0
483	78	m	Okt. 02	2	2a	0	3	2	0	1	Aug. 04	22	0	0	1	1	1	1

8.3 Materialverzeichnis

8.3.1 Primärantikörper

Anti-MMP-2 (Ab-4) Monoclonal Antibodies; Human (Mouse); Cat.No IM51L;
Calbiochem, Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland

Anti-MMP-7 (Ab-3) Monoclonal Antibodies; Human (Mouse); Cat.No IM71L;
Calbiochem, Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland

Anti-MT1-MMP (Ab-3) Monoclonal Antibodies; Human (Mouse); Cat.No IM42L;
Calbiochem, Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland

Anti-TIMP-2 (Ab-4) Monoclonal Antibodies; Human (Mouse); Cat.No IM82;
Calbiochem, Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland

8.3.2 Sekundärantikörper

EnVision+ System-HRP Labelled Polymer; Anti-mouse
DakoCytomation, Glostrup, Dänemark

8.3.3 Negativkontrolle

Mouse IgG1; Code No. X0931, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark

8.3.4 Chemikalien und Lösungen

3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) Tabletten; Sigma-Aldrich ChemieGmbH, Steinheim, Deutschland

Aceton (für Analyse); Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland

Barbital-Puffer nach Michaelis (0,1 molar); Apotheke Universitätsklinikum S-H, Lübeck, Deutschland

ChemMate™ Antibody Diluent; DakoCytomation, Glostrup, Dänemark

Eosin G-Lösung 0,5 % wässrig (Microscopy); Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland

Ethanol 100 % (vergällt); Apotheke Universitätsklinikum S-H, Lübeck, Deutschland

Hämalaunlösung sauer nach Mayer; Dr. K. Hollborn und Söhne, Leipzig, Deutschland

Microscopy Aquatex; Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland

Natriumchlorid; Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland

N,N-Dimethylformamid; Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Deutschland

PBS-Puffer Dulbeccos (Phosphate Buffered Saline); Gibco, England

Peroxidase Blocking Reagent; DakoCytomation, Glostrup, Dänemark

Protein Block Serum-Free; DakoCytomation, Glostrup, Dänemark

Trizma® hydrochloride; Sigma-Aldrich ChemieGmbH, Steinheim, Deutschland

Trizma® base; Sigma-Aldrich ChemieGmbH, Steinheim, Deutschland

Tween®20 (for molecular biology); Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Wasserstoffperoxid (H₂O₂) 0,5%; Apotheke Universitätsklinikum S-H, Lübeck, Deutschland

Xylol (reinst/Isomeregemisch); Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Zitronensäure monohydrate; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

8.3.5 Geräte und weitere Materialien

Deckgläser; Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland

Cytoträger; Shandon Scientific, Runcorn, Cheshire, England

Faltenfilter 595 1/2; Schleicher & Schuell Microscience, Dassel, Deutschland

Mikroskop; Axioskop; Zeiss, Jena, Deutschland

Millipore-RO-System (Wasseraufbereitung); Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland

Pipetten; Eppendorf Research, Hamburg, Deutschland

Schüttler: KS 250; IKA Labortechnik, Deutschland

SuperFrost® Plus-Objektträger; Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland

Zentrifuge: Biofuge 22R, Heraeus Sepatech, Hanau, Deutschland

8.4 Abkürzungen

µg	Mikrogramm
5-FU	5-Fluoruracil
°C	Grad Celsius
CEA	karzinoembryonales Antigen
cm	Zentimeter
EGF	Epidermal Growth Factor
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis coli
FGF-2	Fibroblast Growth Factor
g	Gramm
G	Differenzierungsgrad (Grading)
h	Stunde
kDa	Kilodalton
M	Metastasierungsgrad
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
N	Lymphknotenbefall
ng	Nanogramm
NS	nicht signifikant
p	Histopathologischer Befund
s	Sekunde
T	Tumorausdehnung
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

8.5 Publikation und Preis

8.5.1 Vortrags- und Posterpräsentation

Matrix-Metallproteinasen beim Rektumkarzinom: Immunhistologie mit prognostischer Relevanz? (Posterpräsentation)

O. Schwandner, **A. Schlamp**, R. Broll, H.-P. Bruch

175. Kongress der Vereinigung Nordwestdeutscher Chirurgen, Göttingen, 2.-4. Juni 2005

Clinicopathologic and prognostic significance of matrix-metalloproteinases in rectal cancer (Posterpräsentation)

A. Schlamp, R. Broll, H.-P. Bruch, O. Schwandner

9. Chirurgische Forschungstage, Frankfurt am Main, 19.-21. September 2005

8.5.2 Publizierter Abstract

Clinicopathologic and prognostic significance of matrix-metalloproteinases in rectal cancer

A. Schlamp, R. Broll, H.-P. Bruch, O. Schwandner

Langenbeck's Arch Surg 2005; 390: 448-494

8.5.3 Publikation

Clinicopathologic and prognostic significance of matrix metalloproteinases in rectal cancer

O. Schwandner, **A. Schlamp**, R. Broll, H.-P. Bruch

Int J Colorect Dis 2007; 22: 127-136

8.5.4 Preis

Matrix-Metallproteinasen beim Rektumkarzinom: Immunhistologie mit prognostischer Relevanz? (Posterpräsentation)

O. Schwandner, **A. Schlamp**, R. Broll, H.-P. Bruch

175. Kongress der Vereinigung Nordwestdeutscher Chirurgen, Göttingen, 2.-4. Juni 2005

1. Posterpreis der Vereinigung Nordwestdeutscher Chirurgen

8.6 Poster



Matrix-Metalloproteinasen beim Rektumkarzinom: Immunhistologie mit prognostischer Relevanz?

O. Schwandner, A. Schlamp, R. Broll, H.-P. Bruch
Klinik für Chirurgie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein,
Campus Lübeck (Direktor: Prof. Dr. med. H.-P. Bruch)

Hintergrund:

Es war Ziel dieser Studie, den Zusammenhang zwischen der immunhistochemisch ermittelten Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) mit klinischen und histopathologischen Faktoren beim Rektumkarzinom zu bestimmen. Im Mittelpunkt stand die Frage, ob MMPs eine prognostische Relevanz nach kurativer Resektion darstellen.

Methodik:

Paraffinschnitte von 94 kurativ wegen eines Rektumkarzinoms resezierten Patienten (1996-2002) wurden immunhistochemisch auf folgende MMP-Expressionen untersucht: MMP-2 (eMMP-2: Epithel; sMMP-2: Stroma) (MAK Klon 75-7F7), MMP-7 (MAK Klon ID2), MT1-MMP (MAK Klon 114-6G6) und TIMP-2 (MAK T2-N IC3). Eine Expression wurde als positiv definiert, wenn mind. 10% der Tumorzellen lichtmikroskopisch eine Anfärbung aufwiesen (Auswertung geblindet durch zwei unabhängige Untersucher; Abb. 1-4). Die MMP-Expression wurde mit klinischen und histopathologischen Daten des prospektiven Tumorregisters und Follow-up korreliert. Die kurative Resektion mit TME beim Rektumkarzinom wurde nach onkologischen Grundsätzen durchgeführt.

Endpunkte der prognostischen Analyse (n=91) waren Tumorprogression (Lokalrezidiv und/oder metachrone Fernmetastasen) sowie Überlebenszeiten nach Kaplan-Meier (rezidivfrei, overall). Signifikanzberechnungen erfolgten uni- und multivariat ($p < 0,05$ statistisch signifikant).

Ergebnisse:

35% (33/94) der Karzinome waren eMMP-2-positiv, 77% (72/94) waren sMMP-2 positiv, 54% (51/94) waren MMP-7-positiv, jeweils 47% (46/94) zeigten einen positiven MT1-MMP- bzw. TIMP-2-Status.

Die stromale MMP-2-Expression korrelierte mit der Invasionstiefe ($p=0,006$), MMP-7- ($p=0,016$) und TIMP-2-Expression ($p=0,036$), die epitheliale MMP-2-Expression korrelierte mit MMP-7 ($p=0,027$), MT1-MMP ($p=0,036$) und TIMP-2 ($p < 0,0001$). Der MMP-7-Nachweis korrelierte hochsignifikant mit der Invasionstiefe (pT-Status) und der TIMP-2-Expression ($p < 0,01$). MT1-MMP korrelierte mit der Expression von eMMP-2 ($p=0,036$), MMP-7 ($p=0,004$) und TIMP-2 ($p=0,002$). Die TIMP-2-Expression korrelierte mit der Invasionstiefe ($p=0,013$), eMMP-2 ($p < 0,0001$), sMMP-2 ($p=0,036$), MMP-7 ($p < 0,0001$) und MT1-MMP ($p=0,002$). Es bestanden jedoch keine weiteren Korrelationen der MMPs mit klinisch-pathologischen Parametern wie Alter, Geschlecht, Tumorstadium (UICC), Grading, CEA oder Lymphknotenstatus ($p > 0,05$).

Nach einem mittleren Follow-up von 46 Monaten kam es bei 15,4% (14/91 Patienten) zu einer Tumorprogression: Lokalrezidiv (n=6, davon isoliert n=2 bzw. mit Fernmetastasen n=4) bzw. metachrone Fernmetastasen (n=12, davon n=8 ohne Lokalrezidiv). Hierbei konnte kein Zusammenhang zwischen der MMP-Expression und der Tumorprogression dokumentiert werden (Tabelle 1). Lediglich bei MMP-2 zeigte sich ein Trend, dieser Zusammenhang war aber nicht signifikant ($p=0,061$).

Die 5-Jahres-Überlebensraten unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant in Abhängigkeit von den MMP-Expressionen. Den stärksten prognostischen Einfluss auf die Überlebensprognose übte der präoperativ ermittelte CEA-Wert aus (rezidivfreie 5-JUL-Rate 46% bei erhöhtem CEA vs. 70% bei normwertigem CEA, $p=0,01$; overall 5-JUL-Rate 43% vs. 74%, $p < 0,01$). CEA und das Tumorstadium waren jedoch in der Multivariatanalyse keine unabhängige Prognosefaktoren.

Schlussfolgerung:

Der immunhistologische Nachweis von Matrix-Metalloproteinasen in einem homogenen Kollektiv (nur RO-Resektionen mit TME, komplette Nachsorge) zeigt, daß die Matrix-Metalloproteinasen beim Rektumkarzinom keine prognostische Relevanz aufweisen.

Abbildung 1: Stromale MMP-2-Expression (200x)

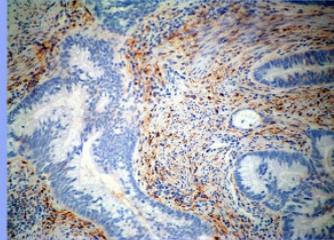


Abbildung 2: Zytoplasmatische MMP-7-Expression (400x)

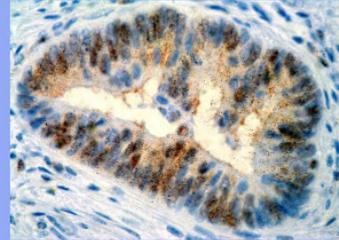


Abbildung 3: Zytoplasmatische MT1-MMP-Expression (200x)

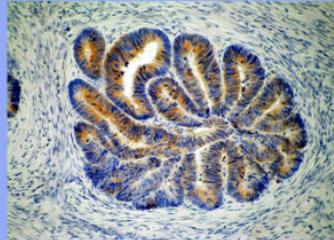


Abbildung 4: Zytoplasmatische TIMP-2-Expression (400x)

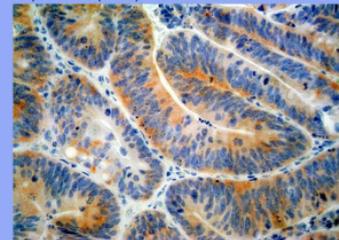


Tabelle 1: Tumorprogression und 5-Jahres-Überlebensraten

Parameter	Kategorie	n	Ohne Tumorprogression n=77	Mit Tumorprogression n=14	p-Wert (Chi ²)	5-JUL-Rate Rezidivfrei	p-Wert (log rank)	5-JUL-Rate Overall	p-Wert (log rank)
Alter	< 70 J.	54	46 (85,2%)	8 (14,8%)	NS	69%	NS	81%	0,05
	≥ 70 J.	37	31 (83,8%)	6 (16,2%)		60%		57%	
Geschlecht	männlich	52	47 (90,4%)	5 (9,6%)	(0,078)	72%	NS	73%	NS
	weiblich	39	30 (76,9%)	9 (23,1%)		59%		71%	
Resektionsverfahren ^a	TAR	80	70 (87,5%)	10 (12,5%)	NS	69%	NS	76%	(0,0817)
	APE	10	7 (70,0%)	3 (30,0%)		48%		45%	
Tumorstadium	UICC I	19	18 (94,7%)	1 (5,3%)	<0,05	89%	<0,05	95%	<0,05
	UICC II	36	31 (86,1%)	5 (13,9%)		64%		73%	
	UICC III	33	27 (81,8%)	6 (18,2%)		56%		59%	
Grading	G3	21	17 (81,0%)	4 (19,0%)	NS	61%	NS	65%	NS
	G1+2	70	60 (85,7%)	10 (14,3%)		68%		74%	
Invasionstiefe	pT1+2	29	27 (93,1%)	2 (6,9%)	NS	84%	0,0238	85%	0,0367
	pT3+4	62	50 (80,6%)	12 (19,4%)		57%		66%	
Lymphknotenstatus	negativ	55	49 (89,1%)	6 (10,9%)	NS	74%	(0,0791)	81%	(0,0732)
	positiv	36	28 (77,8%)	8 (22,2%)		53%		58%	
Präop. CEA-Wert ^b	Norm erhöht	62	55 (88,7%)	7 (11,3%)	0,035	70%	0,0129	74%	0,0041
	15	10 (66,7%)	5 (33,3%)	46%		43%			
MMP-2 Epithel Status	negativ	59	53 (89,8%)	6 (10,2%)	(0,061)	71%	NS	72%	NS
	positiv	32	24 (75,0%)	8 (25,0%)		56%		76%	
MMP-2-Stroma Status	negativ	21	18 (85,7%)	3 (14,3%)	NS	64%	NS	61%	NS
	positiv	70	59 (84,3%)	11 (15,7%)		66%		76%	
MMP-7 Status	negativ	43	39 (90,7%)	4 (9,3%)	NS	78%	NS	77%	NS
	positiv	48	38 (79,2%)	10 (20,8%)		52%		68%	
MT1-MMP Status	negativ	47	40 (85,1%)	7 (14,9%)	NS	74%	NS	78%	NS
	positiv	44	37 (84,1%)	7 (15,9%)		47%		58%	
TIMP-2 Status	negativ	49	41 (83,7%)	8 (16,3%)	NS	71%	NS	74%	NS
	positiv	42	36 (35,7%)	6 (14,3%)		57%		68%	

^a TAR = Tiefe anteriore Resektion; APE = Abdominoperineale Exstirpation
^b Patienten mit nicht bestimmtem CEA (Kreuzreaktivität) nicht eingeschlossen (n=14)

9. Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med Oliver Schwandner für die thematische Grundlage dieser Dissertation, die hervorragende Begleitung während der Ausarbeitung der Arbeit und die konstruktive Kritik bei der Durchsicht des Manuskripts.

Herrn Prof. Dr. med Bruch und Herrn Prof. Dr. med. R. Broll für die Bereitstellung der Laborräume und der Patientendaten.

Für die Hilfe bei der Planung, Einarbeitung in die wissenschaftlichen Arbeitsmethoden und die fachliche Betreuung danke ich Frau Dr. rer. nat Ute Windhövel. Mein Dank gilt auch Herrn PD Dr. rer. nat. Michael Duchrow, der mir bei methodischen Problemen immer ein zuverlässiger Ansprechpartner war.

Besonders erwähnen möchte ich auch Frau Gisela Grosser-Pape, Frau Regina Kaatz, Frau Vera Grobleben, Frau Elke Gheribi; Sie standen mir während der gesamten Arbeit mit Rat und Tat zur Seite.

Frau C. Killaitis und Frau Dr. E. Oevermann für die Erfassung und Zusammenstellung der Patientendaten sowie die statistische Auswertung.

Herrn Prof. Dr. med. Wagner für die Bereitstellung der Digitalkamera.

Zuletzt möchte ich meine Eltern danken, die mir mein Studium und diese Arbeit erst ermöglicht haben.

10. Lebenslauf

- 07.11.1974 geboren in Hamburg als 2. Kind der Eheleute Dr. Christiane Schlamp-Ahrens und Dr. Rainer Schlamp
- 1981 - 1985 Grundschule An den Teichwiesen
- 1985 - 1994 Walddörfer-Gymnasium Hamburg, Abschluss: Abitur
- 1994 - 1995 Zivildienst im Heim für behinderte Kinder und Jugendliche
Im Erlenbusch, Hamburg
- 1995 - 1997 Studium der Soziologie an der Universität Hamburg
- 1997 – 2000 Ausbildung zum staatlich anerkanntem Physiotherapeuten,
MFN Hamburg
- 2000 Studium der Medientechnik an der Fachhochschule Hamburg
- 2001 Studium der Medizin an der Medizinischen Universität zu Lübeck
- 2003 Physikum (1. ärztliche Prüfung)
- 2004 Beginn der Doktorarbeit im Forschungslabor der Klinik für
Chirurgie des Universitätsklinikums Schleswig Holstein, Campus
Lübeck bei PD Dr. Oliver Schwandner
- 2007 2. ärztliche Prüfung