Institut für Immunologie
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München
Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Brocker

Prognostische Bedeutung der EMMPRIN-Expression bei operablen nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie

an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt
von

Karimah Djamilah Elshawi
aus München

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. med. Christoph A. Klein
Mitberichterstatter:	...Prof.Dr.Dr.U.Welsch
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Bernhard Polzer
Dekan:	Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	09.07.2007

1 Einleitung 5

1.1 Das Bronchialkarzinom 5

1.1.1 Klassifikation, Ätiologie und Epidemiologie 5

1.1.2 Histopathologie 6

1.1.3 Diagnostik und Therapie 7

1.2 Tumorprogression in einem multizellulären Organismus 9

1.3 Proteinasen und Tumorprogression 10

1.4 EMMPRIN 11

1.4.1 Molekularstruktur von EMMPRIN 11

1.4.2 EMMPRIN als Aktivator der Matrixproteolyse 12

1.5 Aufgabenstellung 13

2 Material und Methoden 15

2.1 Verwendete Materialen 15

2.1.1 Geräte 15

2.1.2 Chemikalien 15

2.1.3 Puffer 16

2.1.4 Antikörper 16

2.1.5 Zellkulturen / Zelllinien 17

2.2 Kooperationspartner 17

2.3 Aufbereitung der Patientenproben 17

2.4 Methoden 18

2.4.1 Herstellung von Kontrollobjektträgern 18

2.4.2 Silanisierung von Objektträgern 18

2.4.3 Entparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeproben 19

2.4.4 Epitopdemaskierung 19

2.4.5 Färbeprotokolle 19

2.4.6 Färbung des Tumorgewebes 21

2.5 Statistische Analyse 22

3 Ergebnisse 23

3.1 Etablierung und Optimierung der EMMPRIN-Färbung 23

3.1.1 Ermittlung der Kontrollzelllinen 23

3.1.2 Antikörperauswahl 23

3.1.3 Optimierung der Temperatur 23

3.1.4 Epitopdemaskierung 24

3.1.5 Enzym-Substrat-Reaktion 24

3.1.6 EMMPRIN-Färbung der Zelllinie MCF-7 24
3.2 Patientenkollektiv 25
3.3 Auswertung der immunhistochemischen Analyse 27
3.3.1 Optimierung der immunhistochemischen Färbemethode 27
3.3.2 Bewertung der EMMPRIN-Expression im Tumorgewebe 28
3.3.3 EMMPRIN-Färbewert in verschiedenen histologischen Typen des NSCLC 30
3.3.4 Zytoplasmatische und membranständige Lokalisation von EMMPRIN 32
3.3.5 EMMPRIN-Färbewert und klinisch-pathologische Parameter 34
3.4 EMMPRIN und Matrixmetalloproteinasen 37
3.5 Einfluss einer EMMPRIN-Epression auf den Krankheitsverlauf 40
3.5.1 EMMPRIN-Expression und Metastasierung 40
3.5.2 Einfluss der EMMPRIN-Expression auf das Gesamtüberleben 40
3.5.3 Einfluss der EMMPRIN-Expression in frühen Stadien des NSCLC 42
4 Diskussion 45
5 Zusammenfassung 50
6 Literaturverzeichnis 51
7 Abkürzungsverzeichnis 55
8 Danksagung 57
9 Lebenslauf 58

1 Einleitung

1.1 Das Bronchialkarzinom

1.1.1 Klassifikation, Ätiologie und Epidemiologie

Das Bronchialkarzinom ist nach wie vor die häufigste malignombedingte Todesursache in Europa und den Vereinigten Staaten von Amerika (USA) (Janssen-Heijnen, Gatta et al. 1998; Greenlee, Murray et al. 2000; Howe, Wingo et al. 2001). In Deutschland sterben jährlich etwa 45.000 Personen an den Folgen eines Bronchialkarzinoms (Jöckel 2000). Bei Männern ist das Bronchialkarzinom der am häufigsten auftretende maligne Tumor weltweit, während er bei Frauen nach dem Mammakarzinom und dem Kolonkarzinom die dritthäufigste Tumorerkrankung ist. Durch die deutliche Zunahme des Tabakrauchkonsums ist in den USA die Inzidenz des Bronchialkarzinome in den letzten 20 Jahren vor allem bei Frauen gestiegen, so dass aufgrund der analogen Entwicklung in Deutschland in den nächsten Jahren ebenfalls mit einer Verschlimmerung der Situation zu rechnen ist (Levi, Lucchini et al. 1999). Die Inzidenz stieg von 10 Todesfällen pro 100.000 Einwohner während der achtziger Jahre auf 14,3 Todesfälle pro 100.000 Einwohner in den neunziger Jahren des letzten Jahrhunderts (Häußlinger 2003).

Die Ätiologie des Bronchialkarzinoms wird durch vier Faktoren beeinflusst. Tabakrauch ist dabei mit Abstand der bedeutendste Risikofaktor (siehe Abbildung 1), wobei auch Passivrauchen als Risikoerhöhung betrachtet wird (Boffetta, Pershagen et al. 1999). 70% der Bronchialkarzinome bei Frauen und 90% der Bronchialkarzinome bei Männern sind auf aktives Rauchen zurückzuführen (Müller-Höcker 2003). Das Risiko, im Verlauf eines Lebens an einem Bronchialkarzinom zu erkranken, erhöht sich bei Nichtrauchern, die in Familie, Freizeit oder Beruf permanentem starken Tabakrauch ausgesetzt sind, um das 1,5-fache (Boffetta, Pershagen et al. 1999). Die Zahl der durch Passivrauchen pro Jahr zu Tode gekommenen Personen wurde in Deutschland auf 400 und in den USA auf 3.000 geschätzt (Wiebel, Schulz et al. 1997). Eine Studie von Shopland et al. aus dem Jahr 1990 demonstrierte, dass das Risiko an Lungenkrebs zu erkranken, für männliche Raucher im Vergleich zu Nichtrauchern um den Faktor 22 und bei rauchenden Frauen um den Faktor 12 erhöht ist (Shopland 1990). Das Risiko, an einem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (*engl.* non-small-cell lung carcinoma, NSCLC) zu erkranken, steht dabei in einem direkt proportionalen Verhältnis mit den so genannten „pack years“. Ein „pack year“ umfasst das Produkt der Anzahl der gerauchten Zigarettenschachteln pro Tag und die Zahl der Raucherjahre. Weitere verursachende Faktoren sind u. a. Vernarbungen im Lungengewebe, Röntgenstrahlen, genetische Faktoren und Ernährungsgewohnheiten sowie chronische interstitielle Lungenerkrankungen. Angehörige von Patienten mit einem Bronchialkarzinom hatten unabhängig von allen anderen Risikofaktoren ein bis zu 2,5-fach erhöhtes Erkrankungsrisiko (Müller-Höcker 2003).

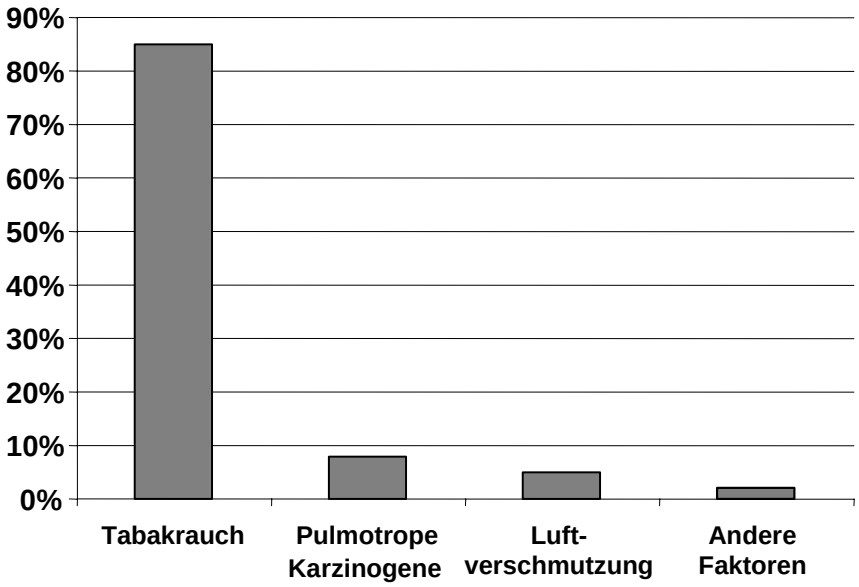

Abbildung 1. Risikofaktoren für die Entstehung eines Bronchialkarzinoms. Tabakrauch ist an der Entstehung von 85% aller Bronchialkarzinome beteiligt und damit der wichtigste ätiologische Faktor. Weitere Karzinogene und die Luftverschmutzung sind bei der Entstehung der restlichen Tumore maßgeblich beteiligt (Müller-Höcker 2003).

Bei Bronchialkarzinomen gibt es einen Kausalzusammenhang zwischen der Tumorentstehung und der Exposition mit den pulmotropen Stoffen der A1-Klasse. Asbest wurde hier als der wichtigste Risikofaktor eingestuft (Häußlinger 2003). Es wurde gezeigt, dass die Tumorgefahr bei langjährigem Rauchen und gleichzeitiger Asbestexposition im Vergleich zu Nichtrauchern um den Faktor 90 ansteigt. Bei der Arbeit mit ionisierender Strahlung stellten sich Radon und Uran als die wichtigsten Ursachen der Karzinogenese dar. Durch besseren Arbeitsschutz konnte ein deutlicher Rückgang von Bronchialkarzinomen erzielt werden, die durch pulmotrope Stoffe induziert wurden, so dass diese bei der Entstehung von Lungenkrebs insgesamt nur noch eine untergeordnete Rolle spielen (Häußlinger 2003).

1.1.2 Histopathologie

Etwa 90% aller Bronchialkarzinome gehen aus den Oberflächenepithelien der Bronchial- oder der Bronchiolenwand hervor (Riede, Werner et al. 2001). Lungenkarzinome leiten sich aber auch von Zellen des bronchialen APUD-Systems ab: Das kleinzellige Bronchialkarzinom (*engl.* small-cell lung carcinoma, SCLC) zeichnet sich durch eine besonders rasche Progression aus. Die hochmalignen Tumoren metastasieren früh, zudem sind kleinzellige Bronchialkarzinome häufig schon aufgrund ihrer zentralen Lage inoperabel. Im Gegensatz dazu befinden sich die nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome (NSCLC) meist

in einem operablen Stadium. Es handelt sich bei diesem Begriff um eine Sammelbezeichnung für bronchiale Plattenepithel-, Adeno- und großzellige Karzinome und deren Mischformen.

Plattenepithelkarzinome entstehen in den basalen Zellschichten des respiratorischen Epithels der Bronchialschleichhaut. Unter den unregelmäßigen hyperchromatischen Zellkernen sind regelhaft atypische Mitosen anzutreffen. Das Stroma zeigt häufig eine ausgeprägte desmoplastische Reaktion und weist in der Regel eine starke lymphozytäre Infiltration auf. Klassische Merkmale des Plattenepithelkarzinoms sind interzelluläre Brücken, Zellnester und Hornperlen. Diese Verhornungen bestehen aus einer Spirale verhornter Tumorzellen, in denen ein Zytokeratin-Zytoskellett nachgewiesen werden kann (Doerr 1983). Eine weitere charakteristische Struktur in Plattenepithelkarzinomen der Lunge sind die sogenannten Psammomkörper. Es handelt sich dabei um verkalkte runde Gebilde, die aus Hyalin umwandeten Stromazellen und abgestorbenen Tumorzellen bestehen.

Beim Adenokarzinom enthält das Zytoplasma reichlich mukosekretorische Granula, Sekretvakuolen sowie raues endoplasmatisches Retikulum. Diese Tumorzellen können tubuläre, azinäre und papilläre Formationen bilden. Während hochdifferenzierte Karzinome noch gewebstypische Tumorstrukturen zeigen, bestehen undifferenzierte Tumore aus undifferenzierten Tumorzellen, die keine spezifischen Merkmale aufweisen.

1.1.3 Diagnostik und Therapie

Die wichtigsten Maßnahmen bei der Bekämpfung des Tumors sind dessen frühzeitige Erkennung und eine zugleich umfangreiche Charakterisierung des Tumors, die zur Wahl der bestmögliche Therapie führt (Hauck 2003). Hinsichtlich der Prognose und der Therapie des NSCLC ist eine exakte Diagnose entscheidend, wobei die histologische Klassifizierung des Tumors und seine Ausdehnung die Richtung der Therapie vorgeben (Mountain 2002). Grundsätzlich wird bei der Operation von Patienten mit Bronchialkarzinom zwischen einem kurativen und einem palliativen Ansatz unterschieden, wobei für beide eine funktionelle Operabilität Vorraussetzung ist. Ein kurativer Ansatz mittels Operation ist beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom nur in ca. 15–30% der Fälle möglich ist (Mountain 1997).

Zum Erstellen eines Therapieplanes dient das von Denoix 1946 eingeführte TNM Staging-System (siehe Tabelle 1). Das Konzept der Stadieneinteilung bei der Diagnosestellung von malignen Tumoren ist erst später eingeführt und seither mehrmals revidiert worden (Mountain 1997; Sobin 2003). Seit zehn Jahren bietet das Staging System der UICC (Union

Tabelle 1. TNM-Klassifikation des Bronchialkarzinoms

Primärtumor (T/pT)	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor 3 cm oder weniger in größter Ausdehnung, umgeben von Lungengewebe oder viszeraler Pleura, kein bronchoskopischer Nachweis einer Infiltration proximal eines Lappenbronchus (Hauptbronchus frei)
T2	Tumor mit wenigstens einem der folgenden Kennzeichen hinsichtlich Größe oder Ausbreitung: - Tumor mehr als 3 cm in größter Ausdehnung - Tumor befällt Hauptbronchus, 2 cm oder weiter distal der Carina - Tumor infiltriert viszerale Pleura - assoziierte Atelektase oder obstruktive Entzündung bis zum Hilus, aber nicht der ganzen Lunge
T3	Tumor jeder Größe mit direkter Infiltration einer der folgenden Strukturen: Brustwand, Zwerchfell, mediastinale Pleura, parietales Perikard; *oder* Tumor im Hauptbronchus weniger als 2 cm distal der Carina, aber Carina selbst nicht befallen) *oder* Tumor mit Atelektase bzw. obstruktiver Entzündung der gesamten Lunge
T4	Tumor jeder Größe mit Infiltration wenigstens einer der folgenden Strukturen: Mediastinum, Herz, große Gefäße, Trachea, Ösophagus, Wirbelkörper, Carina; vom Primärtumor getrennte Tumorherde im gleichen Lappen; oder Tumor mit malignem Pleuraerguss
Regionäre Lymphknotenmetastasen (N/pN)	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in ipsilateralen peribronchialen und/oder in ipsilateralen Hilus- oder intrapulmonalen Lymphknoten (einschließlich eines Befalls durch direkte Ausbreitung des Primärtumors)
N2	Metastase(n) in ipsilateralen mediastinalen und/oder subkarinalen Lymphknoten
N3	Metastase(n) in kontralateralen mediastinalen, kontralateralen Hilus-, ipsi- oder kontralateralen Skalenus- oder supraklavikulären Lymphknoten
Fernmetastasen (M/pM)	
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen, einschließlich vom Primärtumor getrennter Tumorherde in einem anderen Lungenlappen (ipsilateral oder kontralateral)

Tabelle 2. Stadiengruppierung der UICC

UICC-Tumorstadien			
Okkultes Karzinom	TX	N0	M0
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1	N0	M0
Stadium IB	T2	N0	M0
Stadium IIA	T1	N1	M0
Stadium IIB	T2 T3	N1 N0	M0 M0
Stadium IIIA	T1,T2 T3	N2 N1, N2	M0 M0
Stadium IIIB	Jedes T T4	N3 Jedes N	M0 M0

Stadium IVB	Jedes T	Jedes N	M1

Internationale Contre Cancer) eine einheitliche Einteilung hinsichtlich der Eigenschaften verschiedener Bronchialkarzinome (Mountain 1997; Mountain 2002) (siehe Tabelle 2).

Aufgrund des Fehlens von Frühsymptomen und der insgesamt schlechten Prognose des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms sollte ein interdisziplinärer Therapieansatz verfolgt werden (Häußlinger 2003). Allerdings ist selbst bei stadiengerechter Anwendung der verschiedenen Einzeltherapien bislang kein befriedigendes Langzeitergebnis zu erwarten. Die Prognose korreliert dabei mit dem UICC-Stadium und dem histologischen Typ der Tumoren. Negativ beeinflusst wird sie darüber hinaus durch eine Gefäßinvasion der Tumoren, eine hohe Kapillardichte und einen geringen Differenzierungsgrad.

Angesichts der sehr unbefriedigenden Situation im Hinblick auf das Gesamtüberleben der Patienten besteht weiterhin die Notwendigkeit, die bestehenden Diagnose- und Therapieansätze weiterzuentwickeln. So unterscheiden sich die Krankheitsverläufe von Patienten mit gleichem Tumorstadium häufig sehr deutlich voneinander. Es ist daher erforderlich, geeignete prognostische Parameter für nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome zu finden. Ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen und der biochemischen Hintergründe könnte neue prognostische Marker aufzeigen und Patientengruppen definieren, die beispielsweise von einer adjuvanten Therapie nach der Resektion profitieren.

1.2 Tumorprogression in einem multizellulären Organismus

Die frühe Diagnose einer malignen Erkrankung ist eine Voraussetzung für die Verbesserung der Therapiemöglichkeiten. Die Erforschung der komplexen Biologie von malignen Tumoren hat sich bislang vornehmlich auf Untersuchungen des Tumorparenchyms konzentriert. Tumoren werden jedoch nicht als einzelne Tumorzellen im Körper gefunden, sondern als gewebeartige Struktur, die aus Tumorparenchym und nicht-tumorösem gefäßführendem Bindegewebe (Tumorstroma) besteht. Bei der Bekämpfung von Tumoren muss man den infiltrierenden Komplex aus Tumorgewebe und Tumorparenchym als Ganzes betrachten.

Die Karzinogenese, d.h. die Entstehung eines malignen Tumors, ist als ein mehrstufiger Prozess zu verstehen, der von der initialen Transformation über eine epitheliale Dysplasie zum invasiven Karzinom führt. Es wird vermutet, dass sich zum Ende der Entwicklung eines malignen Tumors der komplexe Vorgang von Disseminierung und Metastasierung anschließt. Die Metastasierung eines bösartigen Tumors, mit welcher eine zunächst auf das Ursprungsgewebe begrenzte Neoplasie zu einer Erkrankung des gesamten Organismus wird, führt meist zum Tod des Patienten. Einzelne disseminierte Tumorzellen, die sich vom Primärtumor lösen und über die Lymph- und Blutgefäße in tumorfernem Gewebe niederlassen, sind Vorboten der Ausbildung von Metastasen. Mithilfe der Analyse der geno-

und phänotypischen Veränderungen in diesen Zellen kann die unbemerkte Ausbreitung des Tumors im gesamten Organismus erforscht werden (Klein 2003).

Auf molekularer Ebene konnte eine Reihe von Faktoren identifiziert werden, die Tumorentwicklung und Metastasierung beeinflussen. Die Interaktion zwischen Tumorzellen, Stromazellen und der extrazellulären Matrix (ECM) ist ein wichtiger Aspekt der Tumorentwicklung, da sich diese Wechselbeziehungen auf die Proliferation, Integrität und Invasivität der Tumorzellen des Primärtumors auswirken. Für die Entwicklung eines invasiven Tumors ist die Degradation und Modulation der extrazellulären Matrix einer der wichtigsten Prozesse. Transformierte Tumorzellen produzieren während der Tumorprogression u. a. Proteasen, Protease-Inhibitoren und weitere Faktoren, die an der Infiltration des umliegenden Gewebes beteiligt sind (Werb, Vu et al. 1999).

1.3 Proteinasen und Tumorprogression

Die Proteinasen sind an mehreren Prozessen der Tumorentwicklung beteiligt. Bei der Invasion von epithelialen Neoplasien und der darauf folgenden Metastasierung spielen drei verschiedene Proteinase-Systeme eine Rolle: das uPA/uPAR/Plasminogen- und PAI-System, das MT-MMP/MMP/ADAMs- und TIMP-System und das Cystein/Cathepsin- und Cystatin-System (Levicar, Nuttall et al. 2003).

Die Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) wurde mit einer erhöhten Mobilität von Tumorzellen und ihrer Fähigkeit zur Hydrolysierung der ECM assoziiert. Im Vergleich zu normalen Zellverbänden wird bei epithelialen Tumoren häufig ein Aufbrechen der Zell-Zell-Verbindungen beobachtet. Es wird vermutet, dass die maligne Transformation eine besondere Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion hervorruft, die es den Tumorzellen ermöglicht, Gewebegrenzen zu überschreiten, zu proliferieren und eine erhebliche Größe zu erreichen (Leeman, Curran et al. 2003; Seiki, Mori et al. 2003). MMP beeinflussen das Wachstumsverhalten, die Dissoziation, die Signaltransduktion, die Motilität und den Zelltod von Tumorzellen (Hojilla, Mohammed et al. 2003).

Die Matrix-Metalloproteinasen (MMP) umfassen eine Gruppe freier oder membranständiger Enzyme, die die Bestandteile des interstitiellen Bindegewebes und der Basalmembran abbauen können. Unter physiologischen Bedingungen sind die Enzyme am Umbau des Bindegewebes beteiligt. Eine Dysregulation des normalerweise ausbalancierten MMP-Systems wurde in Patienten mit bösartigen Tumorerkrankungen wie auch beim Lungenemphysem, bei Arthritiden und bei kardiovaskulären Erkrankungen beobachtet (Hojilla, Mohammed et al. 2003).

1.4 EMMPRIN

1.4.1 Molekularstruktur von EMMPRIN

Das MMP-modulierende Molekül EMMPRIN (**E**xtracellular **M**atrix **M**etallo**P**roteinase **IN**ducer) wird auch als Tumor Collagenase Stimulatory Factor (TCSF) (Biswas, Zhang et al. 1995), M6 (Kasinrerk, Fiebiger et al. 1992), Hab 18G, OX-47, Neurothelin, Basigin (Miyauchi, Masuzawa et al. 1991) und als CD 147 bezeichnet.

EMMPRIN ist ein hydrophobes Molekül der Immunglobulin-Superfamilie (Biswas, Zhang et al. 1995; Guo, Zucker et al. 1997) und besteht aus 185 Aminosäuren (Nabeshima, Iwasaki et al. 2006). Das Oligomannose-bindende Lektin besitzt ein Molekulargewicht von 58 kDa und enthält zwei extrazelluläre Domänen, eine transmembranäre und eine zytoplasmatische Domäne. Die einzelnen Domänen von EMMPRIN ähneln den variablen Domänen von Immunglobulinen oder der β-Domäne des MHC-II Moleküls (siehe Abbildung 2). EMMPRIN ist auf der Oberfläche von Tumorzellen als integriertes Plasmamembran-Glykoprotein nachweisbar. Ohne Glykosylierung ist EMMPRIN (32 kDa) in normalen Zellen wie auch Tumorzellen nicht funktionsfähig (DeCastro, Zhang et al. 1996). Es wurde gezeigt, dass EMMPRIN neben der Form mit zwei extrazellulären Domänen auch mit drei Domänen exprimiert werden kann. Diese Variante von EMMPRIN interagiert mit EMMPRIN-Molekülen auf anderen Zellen.

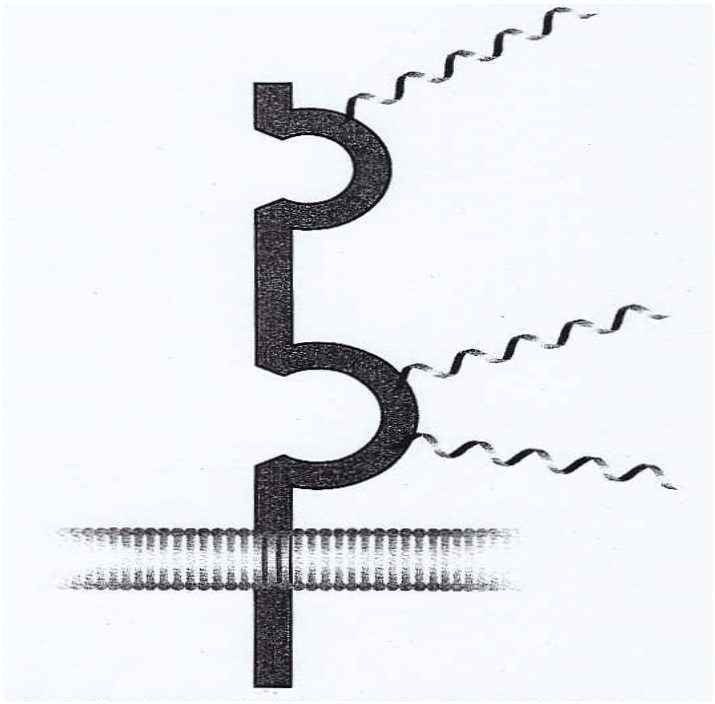

Abbildung 2. Struktur des EMMPRIN-Moleküls
Das EMMPRIN-Molekül gehört zur Familie der Immunglobuline und besteht aus zwei glykosylierten extrazellulären, einer transmembranären und einer zytoplasmatischen Domäne (Muramatsu and Miyauchi 2003).

1.4.2 EMMPRIN als Aktivator der Matrixproteolyse

Die am häufigsten untersuchte Eigenschaft dieses multifunktionellen Moleküls ist seine Rolle als Aktivator der Matrixproteolyse durch die Regulierung der Produktion von verschiedenen MMP in Fibroblasten (MMP-1, MMP-2, MMP-3) (Kataoka, Itoh et al. 1993), Endothelzellen (MMP-1, MMP-2, MMP-3) (Caudroy, Polette et al. 2002) sowie Tumorzellen (MT1-MMP, MT2-MMP) (Sameshima, Nabeshima et al. 2000). Es wurde gezeigt, dass die Synthese von MMP-1 in Fibroblasten durch die Phosphorylierung von MAP-Kinase p38 (Lim, Martinez et al. 1998) eingeleitet wird, wobei eine N-Glykosylierung von EMMPRIN essentiell ist. Die Zellen interagieren durch EMMPRIN entweder heterotypisch zwischen verschiedenen Zelltypen (Tumorzellen-Stromazellen) (Biswas, Zhang et al. 1995) oder homotypisch zwischen gleichen Zelltypen (Tumorzellen-Tumorzellen) (Li, Huang et al. 2001; Caudroy, Polette et al. 2002). Es wurde weiterhin gezeigt, dass EMMPRIN die Expression seines eigenen Gens induziert (Tang, Chang et al. 2004), welches auf Chromosom 19q13.3 lokalisiert ist. Im Lungengewebe wird EMMPRIN durch die mechanische Dehnung der pulmonalen Zellen aktiviert; gleichsam werden MMP-1, MMP-2 und MT1-MMP exprimiert (Haseneen, Vaday et al. 2003).

Membranständiges EMMPRIN kann auf zellulärer Ebene nur durch Zell-Zell-Kontakt mit einem anderen Rezeptor aktiviert werden, möglicherweise durch ein anderes membranständiges EMMPRIN-Molekül (Lim, Martinez et al. 1998). Außerdem wurde beobachtet, dass EMMPRIN-Moleküle, welche frei in der ECM vorliegen, die Freisetzung von MMP aus Fibroblasten induzieren können. Über den Mechanismus der Freisetzung von EMMPRIN wird noch spekuliert. Es wurde gezeigt, dass EMMPRIN aus den Tumorzellen mittels „microvesicle shedding“ in die nähere Umgebung freigesetzt wird, wobei Tumorzellen spontan Mikrovesikel ausschütten können. Dabei tragen die Membranen, welche die Vesikel umschließen, membranständig gebundene EMMPRIN-Moleküle, die über einen noch nicht vollständig erforschten Mechanismus nach Auflösung der Membranen in die Umgebung abgegeben werden (Sidhu, Mengistab et al. 2004). Des Weiteren wird EMMPRIN auch durch das Protein Amphiregulin induziert, welches an den Rezeptor des epidermalen Wachtstumsfaktors EGF bindet und eine Tyrosinkinase-Kaskade aktiviert (Menashi, Serova et al. 2003).

Die Interaktion mit anderen Molekülen neben den MMP ist wichtig für weitere Funktionen von EMMPRIN, die in der Tumorentwicklung eine wichtige Rolle spielen könnten. So interagiert die Transmembrandomäne von EMMPRIN mit den Integrinen α3β1 und α6β1 (cis-Interaktion) (Berditchevski, Chang et al. 1997). EMMPRIN ist darüber hinaus ein Chaperon für Lactat-Transporter, das für den Transport, die Lokalisation und die funktionelle Expression von Monocarboxylat-Transportern wichtig ist (Bradley, Gibbs et al. 2003).

Der Einfluss von EMMPRIN auf die Stroma-Tumorzell-Interaktion ist einerseits auf die Wirkung der MMP zurückzuführen, andererseits spielt dabei auch die Produktion von anderen Molekülen wie VEGF eine wichtige Rolle. Die erhöhte Expression von EMMPRIN scheint sich auf das Wachstum und die Invasivität von malignen Tumoren wie auch auf die Angiogenese in der umittelbaren Umgebung der Tumoren auszuwirken. Die EMMPRIN-induzierte Produktion von Hyaluronan stimuliert das Wachstum von Tumorzellen und wirkt sich damit ebenfalls auf die Tumorentwicklung aus (Marieb, Zoltan-Jones et al. 2004; Tang, Chang et al. 2004). Hyaluronan stimuliert die PI3-Kinase- und MAP-Kinase-Signalwege, die der Apoptose entgegenwirken (Misra, Ghatak et al. 2003). Dies zeigt, dass die interzellulare Aktivität des multifunktionellen Moleküls EMMPRIN für viele pathologische und physiologische Prozesse wichtig ist (Nabeshima, Iwasaki et al. 2006). Eine erhöhte Expression von EMMPRIN wurde in verschiedenen Neoplasien beobachtet, u.a. in malignen Tumoren von Lunge (Polette, Gilles et al. 1997), Brust (Yang, O'Neill et al. 2006), Harnblase (Muraoka, Nabeshima et al. 1993), Eierstöcken (Davidson, Goldberg et al. 2003), Gehirn (Sameshima, Nabeshima et al. 2000), Mundhöhle (Vigneswaran, Beckers et al. 2006) und Lymphomen (Nabeshima, Suzumiya et al. 2004). Im normalen Bronchialepithel beobachtet man bei Gesunden nur eine geringe EMMPRIN-Basalexpression. Erhöht exprimiert wird EMMPRIN hingegen im respiratorischen Epithel von Rauchern, in den Alveolarmakrophagen und postoperativ im Pleuraerguss.

1.5 Aufgabenstellung

Im Zusammenhang mit der Entstehung von malignen Tumoren wird die Bedeutung der extrazellulären Matrix und des zellulären Mikromilieus für deren Progression intensiv erforscht, wobei die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion von Tumorzellen einen Schwerpunkt darstellt. Von besonderem Interesse dabei ist die Erforschung des proteolytischen Systems, welches Proteasen (MMP), deren Inhibitoren (TIMPs) sowie induzierenden Moleküle (u. a. EMMPRIN) umfasst. EMMPRIN erwies sich dabei als ein Molekül mit vielen Funktionen, die über die Induktion von MMP hinausgehen. EMMPRIN ist ein extrazellulärer Rezeptor für Cyclophiline, ein Chaperon der Monocarboxylat-Transporter-Proteine, ein Bindepartner mehrerer Integrine und reguliert die Produktion von Hyaluronan. Als membranständiger Rezeptor unterstützt EMMPRIN die Interaktion von Tumorzellen mit der extrazellulären Matrix und gewebeständigen Zellen in der Umgebung, indem es die Adhäsivität der Zellen beeinflusst, die Differenzierung von Tumorzellen reguliert und den Ab- bzw. Umbau der ECM fördert.

Das für EMMPRIN codierende Gen BSG liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 19, welcher bei Tumoren besonders häufig Aberrationen aufweist. Im Gegensatz zu anderen Molekülen zeigte EMMPRIN in mehreren Array-Analysen und Immundoppelfärbungen von disseminierten Tumorzellen eine starke mRNA- und Proteinexpression (Christoph A. Klein,

unveröffentlichte Daten). Diese Beobachtungen legen weitere Untersuchungen nahe, welche die Bedeutung der Expression von EMMPRIN für die Disseminierung von Tumorzellen erforschen.

Die Untersuchung des Protease-Aktivierungs-Profil bei Primärtumoren hat bereits zu einem besseren Verständnis der Invasion und Disseminierung von Karzinomen der Lunge geführt. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Expression von EMMPRIN in den Primärtumoren nicht-kleinzelliger Bronchialkarzinome untersucht. Dabei wurde die EMMPRIN-Expression in den Tumoren mit klinischen Parametern korreliert, um die Bedeutung der Expression von EMMPRIN für den Krankheitsverlauf und das postoperative Überleben der Patienten zu überprüfen. Um den Einfluss von EMMPRIN auf die Wirkung der Matrix-Metalloproteinasen zu untersuchen, wurde die Expression von MMP-2 und MMP-9 mit der EMMPRIN-Expression in den Primärtumoren verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialen

2.1.1 Geräte

Mikroskope	Leica
Mikrotom	Leica
Mikrowelle	Daewood
Heizplatte	Bachofer
Ofen	Shaken Stak Hybaid
Wasserbad	Lauda
Objektträger	Langenbrinck
Deckgläschen	Langenbrinck
Küvetten	Roth
Röhrchen 50 ml	Sarstedt
Pipetten	Gilson
Präzisionswaage	Sartorius Laboratory
pH-Meter	WTW
Zytospin-Zentrifuge	Hettich

2.1.2 Chemikalien

AB-Serum	Biotest
Azeton	JT Baker
AEC Aminoethycarbazol	Dako
Dako LSAB-KIT	Dako
DMF Dimethylformamid	Merck
Ethanol unvergällt	JT Baker
Ethanol vergällt	Roth
Fast-Blue Salz	Sigma
Formalin	Merck
Glyzeringelatine (Kaiser)	Merck
Hämatoxylin Lösung (Mayer)	Sigma
HCl (37% rauchend)	Sigma
Kaliumchlorid	Sigma
Kaliumhydrogenphosphat	Sigma
Levamisol	Sigma
Natriumchlorid	Merck
Natriumnitrit	Sigma
NaOH	Sigma

Naphthol AS-BI-phosphat	Sigma
Naphthol AS-Mx	Sigma
Neufuchsin	Sigma
Paraffin	Sigma
PFA (Paraformaldehyde)	Merck
Tri-Na-Citrat-Dihydrate	Coulter-Immunotech Diagnostics
TrisHCl	Sigma
Triton X	Sigma
3-Triethoxysilylpropylamin	Merck
Wasserstoffperoxid	Sigma
Xylol	Merck

2.1.3 Puffer

PBS (Phosphate Buffered Saline)	150 mM NaCl 3 mM KCl 8 mM Na_2HPO_4 $2H_2O$ 1,5 mM KH_2PO4 pH 7,4
Citrat Puffer	10 mM Tri-Na-Citrat-Dihydrat 1L Aqua dest pH 6,0
Acetat Puffer	0,1 M Essigsäure 13,61g Natriumacetattrihydrat NaOH pH 5,2
TBS (Tris Buffered Saline)	87,66g NaCl 60,57g Tris 1000 ml Aqua dest. pH 7,6

2.1.4 Antikörper

MEM6/1-11 anti-EMMPRIN Maus Antikörper	Labor Dr. Horejsi
HIM6 monoklonaler anti-EMMPRIN Maus IgG1 Antikörper	BD Pharmingen
MOPC-21 Maus IgG1 Antikörper (Isotypkontrolle)	Sigma

Z259 biotinylierter polyklonaler Kaninchen anti-Maus DakoCytomation Brückenantikörper (Z259)

2.1.5 Zellkulturen / Zelllinien

A-431

(humanes Epidermoidkarzinom)

A-549

(humanes Bronchialkarzinom)

H460

(humanes großzelliges Bronchialkarzinom)

MCF-7

(humanes Mamma-Adenokarzinom)

SK-BR-3

(humanes Mamma-Adenokarzinom)

2.2 Kooperationspartner

Das Patientenmaterial wurde von unseren klinischen Kooperationspartnern der Abteilung von Prof. Dr. Bernward Passlick am Klinikum Gauting zur Verfügung gestellt. Räume für die Durchführung der Experimente wurden vom Labor Dr. Peter Neth an der chirurgischen Klinik Innenstadt der LMU München bereitgestellt.

2.3 Aufbereitung der Patientenproben

Die OP-Präparate wurden am Institut für Pathologie der Asklepios Fachklinik München-Gauting (Zentrum für Pneumologie und Thoraxchirurgie, Leiterin Dr. med. Alicia Morresi-Hauf) aufgearbeitet, in Paraffin eingebettet und klassifiziert. Die Tumore der Patienten wurden entsprechend den Richtlinien der UICC mit dem TNM-System klassifiziert (Mountain 2002; Sobin 2003). Im Staging nach dem oben beschriebenen Schema ergab sich kein Anhalt für einen Befall der kontralateralen oder supraklavikulären Lymphknoten oder für Fernmetastasen (T1-4, N0-2, M0, R0). Einen Überblick hinsichtlich der verschiedenen pathologischen Klassifikationen geben die Tabellen 1 und 2 in der Einleitung.

Bei den Operationen wurden Lobektomien oder komplette Pneumonektomien durchgeführt, wobei nur Patienten mit einer R0-Resektion in die Studie aufgenommen wurden. Es wurde die seit 1988 von der Deutschen Gesellschaft für Thoraxchirurgie (DGT) und der Gesellschaft für Pneumologie und Tuberkulose (DGPT) empfohlene standardisierte Lymphadenektomie und Lymphknotendokumentation durchgeführt, womit der unmittelbare Vergleich der Patienten und der Behandlungsergebnisse ermöglicht wurde (Passlick and Thetter 1997). Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren (klassifiziert als pT3-pT4) erhielten

postoperativ im Bereich des Tumorbettes eine adjuvante transkutane Strahlentherapie. Patienten mit mediastinalem Lymphknotenbefall (pN2) wurden im Anschluss an die operative Therapie ebenfalls bestrahlt. Alle Patienten wurden über einen mittleren Zeitraum von 72 Monaten postoperativ beobachtet (Beobachtungszeitraum 10 bis 130 Monate).

2.4 Methoden

2.4.1 Herstellung von Kontrollobjektträgern

Zellen aus Kulturen der Tumorzelllinien H460, HTB177, A431, A549, SKBR3 und MCF-7 wurden mit Trypsin-EDTA direkt aus der Kultur abgelöst und für die Herstellung der Präparate verwendet. Die Zellsuspension wurde bis zu einer Konzentration von 30.000 Zellen/100 µl verdünnt und mit einer Zytospin-Zentrifuge auf Objektträger (OT) zentrifugiert. Nach Trocknung der Präparate über Nacht bei Raumtemperatur wurden diese bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Zunächst wurden die kultivierten Zellen durch Zentrifugation (5 Minuten bei 1.500 Upm, 4°C) vom Medium abgetrennt. Danach wurden die Zellen mit Paraformaldehyd (4%) für eine halbe Stunde fixiert und anschließend für 15 Minuten in PBS Puffer gewaschen. Die Entwässerung wurde mit einer Alkoholreihe Ethanol 50% für 20 Minuten, 70% für 20 Minuten, 90% für 20 Minuten und 100% für 1 x 20 Minuten und 1 x 40 Minuten durchgeführt. Danach wurden die Zellen 2 x 5 Minuten in Xylol zentrifugiert (800 Upm, 4°C). Abschließend wurden die Zellen 3 x 30 Minuten in flüssigem Paraffin im Brutschrank inkubiert. Die in Paraffin eingebetteten Zellen konnten danach in Blockförmchen gegeben werden, um Paraffinblöcke zu erhalten, die kompatibel zu den Patientenproben sind. Diese konnten zu einem späteren Zeitpunkt mit einem Mikrotom in 5 µm dicke Schnitte geschnitten und auf silanisierte Objektträger aufgebracht werden.

2.4.2 Silanisierung von Objektträgern

Die Silanisierung der Objektträger wurde durchgeführt, um das Ablösen der Schnitte vom OT während der Färbung zu verhindern (Klein, Blankenstein et al. 2002). Die OT wurden 10 Minuten in Aceton getaucht und danach für weitere 10 Minuten in 4% 3-Triethoxylsilylpropylaminin-Aceton (144 ml Aceton und 6 ml 3-Triethoxylsilylpropylaminin) gegeben. Die OT wurden anschließend für 5 Minuten bei 50°C zum Trocknen im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die OT für 1 Minute in Aceton und eine weitere Minute in destilliertes Wasser getaucht. Am Ende wurden die OT noch über Nacht zum Trocknen bei 42°C in den Brutschrank gestellt.

2.4.3 Entparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeproben

Die in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte der Primärtumoren wurden für 6 Minuten in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe von 100% über 96%, 80% und 70% für jeweils 2 Minuten rehydriert. Am Ende der Alkoholreihe wurden die OT kurz in destilliertem Wasser gewaschen.

2.4.4 Epitopdemaskierung

Die Tumorschnitte wurden nach der Entparaffinierung 4 x 5 Minuten in Citratpuffer (Tri-Na-Citrat-dihydrat, Merck Darmstadt) in der Mikrowelle bei 150 Watt auf 90°C erhitzt und dann für 30 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach einem Waschgang mit Tris-Puffer (0,05 M TrisHCl; 0,15 M NaCl, pH 7,6) für 3 x 3 Minuten erfolgte eine Blockade der zelleigenen endogenen Peroxidase mit einer Wasserstoffperoxidlösung (25ml 30%iges H_2O_2 gemischt mit 75ml dest. H_2O) für 10 Minuten. Danach wurden die Gewebeschnitte kurz in Aqua dest. und im Anschluss für 3 x 3 Minuten in Tris-HCl-Lösung gewaschen.

2.4.5 EMMPRIN-Färbeprotokolle

Färbeprotokoll mit AB-Komplex

Die Präparate wurden für 20 Minuten in PBS mit 10% AB-Serum inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Danach wurden die OT für 60 Minuten mit dem Primärantikörper HIM6 (1 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden die Gewebeschnitte 3 x 5 Minuten in PBS gewaschen, bevor der biotinylierte Brückenantikörper (3,5µg/ml) für 30 Minuten auf die Schnitte aufgetragen wurde.

Detektionssystem: Nach erneutem Waschen in 1x PBS wurden die Schnitte für 30 Minuten mit einem Avidin-Biotin-Komplex und biotinylierter Meerretich-Peroxidase (Sigma) nach Angaben des Herstellers behandelt.

Entwickungssystem: Nach einem weiteren Waschschritt wurden die OT mit dem Farbsubstrat Fast Blue inkubiert. Für eine Küvette mit 150 ml Färbelösung müssen folgende Lösungen angesetzt werden:

Lösung A: Zu 150 ml 0,01 M Trispuffer wurden 100 mg Fast-Blue Salz und 24 mg Levamisol zugegeben. Der pH-Wert dieser Lösung wurde auf 8,24 eingestellt. Levamisol blockiert die im Gewebe vorkommenden endogenen alkalischen Phosphatasen.

Lösung B: 20 mg Naphthol AS-Mx (Sigma) wurden in 2 ml N,N-Dimethylformamid gelöst.

Lösung A wurde mit Lösung B gemischt. Die entstandene Färbelösung wurde gefiltert und in eine Küvette (150 ml) gegeben. Anschließend wurde der OT für 30 Minuten in der Färbelösung entwickelt. Danach wurde die Kernfärbung für 30 Sekunden mit Mayer's Hämatoxylin (1:10 verdünnt mit Tris-HCl-Puffer) durchgeführt. Durch Waschen der OT im

leicht alkalische Leitungswasser für 5 Minuten wurden diese gebläut. Die gefärbten OT wurden abschließend mit Kaiser's Glyzerolgelatine (Merck Darmstadt) eingedeckelt. So konnten die Schnitte unter dem Lichtmikroskop zu einem späteren Zeitpunkt beurteilt werden. Als Isotypkontrolle wurde bei jeder Färbung ein Zytospin-Präperat mit dem Primärantikörper MOPC-21 (Mineral Oil induced PlasmaCytoma-21) verwendet.

Färbeprotokoll nach der Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische–Phosphatase (APAAP) Methode

Zu Beginn wurde eine Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen mit 10% AB-Serum in PBS für 20 Minuten durchgeführt. Danach wurden die OT für 60 Minuten mit dem Primärantikörper gegen EMMPRIN (HIM6, 1 µg/ml) inkubiert. Nachdem die Schnitte für 3 x 5 Minuten in PBS gewaschen worden waren, wurde der biotinylierte Brückenantikörper Z259 (3,5µg/ml; in TBS verdünnt) aufgetragen und für 30 Minuten inkubiert.

Detektionssystem: Es folgte ein erneutes Waschen für 3 x 5 Minuten in PBS, bevor die Schnitte für 30 Minuten mit dem Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase Komplex (APAAP) (DakoCytomation; 0,1µg/ml ; in TBS verdünnt) inkubiert wurden.

Entwickungssystem: Nach erneutem Waschen der OT für 3 x 5 Minuten in PBS erfolgte die Färbung mit Neufuchsin für 30 Minuten. Hierbei hydrolysiert das Enzym Alkalische Phosphatase (AP) das Substrat Naphtholphosphatester zu Phenolkomponenten und Phosphaten. Die Phenole reagieren mit Diazoniumsalzen und bilden so unlösliche Azofarbstoffe. Das Chromogen Neufuchsin bildet ein intensiv rotes Reaktionsprodukt. Für eine Küvette mit 150 ml Färbelösung wurden folgende Lösungen angesetzt:

Lösung A: Zu 150 ml 0,05 M Trispuffer wurden 1,7 g NaCl und 60 mg Levamisol zugegeben. Der pH-Wert dieser Lösung wurde auf 8,24 eingestellt.

Lösung B: 30 mg Naphthol-AS-Bi-Phosphat (Sigma N 2250) wurden in 0,75 ml N,N-Dimethylformamid gelöst.

Lösung C: Unter einem Laborabzug wurden 0,3 ml 5% Neufuchsin (Sigma N 0638; 5 g in 100 ml 2 M HCl) mit 7,5 ml frisch zubereitetem 4% Natriumnitrit (Sigma S 2252, 40 mg Natriumnitrit in 1 ml Aqua dest.) gemischt und für 60 Sekunden gerührt.

Lösung A wurde mit Lösung B gemischt, anschließend wurde Lösung C hinzugefügt. Die entstandene Färbelösung wurde gefiltert und in eine Küvette (150 ml) gegeben. Die OT wurden für 30 Minuten in der Färbelösung im Dunkeln entwickelt, da diese lichtempfindlich ist. Anschließend wurde die Reaktion mit Aqua dest. gestoppt. Zuletzt wurden die

histologischen Präparate mit Mayer's Hämatoxylin gegengefärbt und mit Kaiser's Glyzerolgelatine eingedeckelt.

Färbung mit dem Labeled Streptavidin-Biotin Kit

Die etablierte immunohistochemische Methode wurde mit Hilfe des patentierten DAKO®LSAB-KIT (System 500, DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg) optimiert. Hierbei handelte es sich um die **L**abeled-**S**trept**A**vidin-**B**iotin-(**LSAB**)-Methode, die mit biotinylierten Brückenantikörpern beliebige Primärantikörper der Maus binden und einen Farbstoff enzymatisch in ein sichtbares Produkt umwandeln kann. Die in Paraffin eingebetteten Primärtumorschnitte der Lunge wurden entparaffiniert, anschließend wurde eine Epitopdemaskierung durchgeführt (siehe 2.4.3 und 2.4.4). Danach wurden die OT mit dem im Kit enthaltenen Blockierungsreagenz für 30 Minuten bei 25°C in der Feuchtkammer inkubiert, um eine unspezifische Antikörperbindung zu verhindern. Die OT wurden im Anschluss 3 x 5 Minuten in Tris-HCl gewaschen und über Nacht in einer Feuchtkammer bei 4°C) mit dem Anti-EMMPRIN Primärantikörper HIM6 inkubiert.

Detektionssystem: Nach 3 x 5 Minuten Waschen in Tris-HCl wurde der Sekundäranmtikörper des Kits für 30 Minuten auf die Gewebeschnitte aufgetragen. Anschließend wurden die OT für weitere 30 Minuten mit der Labeled-StreptAvidin-Biotin-Lösung inkubiert Nach erneutem Waschen für 3 x 5 Minuten in Tris-HCl wurden die OT mit der nachfolgend beschriebenen Färbelösung behandelt.

Entwickungssystem: Das Färbereagenz bestand aus 32 mg Aminoethycarbazol (AEC; Sigma, Taufkirchen) gelöst in 8 ml Dimethylformamid (DMF) und 92 ml 0,1 M Natriumacetat-Puffer (pH 5,2). Nach Zugabe von 120 µl 30%igem H_2O_2 und anschließendem Filtrieren der rotbraunen Lösung wurden die Schnitte für 20–40 Minuten unter Beobachtung gefärbt. Sobald sich eine Färbung zeigte, wurden die Gewebeschnitte 3 x 5 Minuten in Tris-HCl gewaschen. Schließlich wurden die histologischen Präparate mit Mayer's Hämatoxylin (1:10 verdünnt in Tris-Puffer; Sigma) gegengefärbt und mit Kaiser's Glyzerolgelatine (Merck, Darmstadt) eingebettet. Als Isotypkontrolle diente bei jeder Färbung ein Präparat, welches mit dem Antikörper MOPC 21 gefärbt wurde.

2.4.6 EMMPRIN-Färbung des Tumorgewebe

In Abbildung 3 ist das verwendete Färbepotokoll schematisch dargestellt. Die gefärbten Tumorschnitte wurden unter 100facher und 400facher Vergrößerung lichtmikroskopisch ausgewertet wie folgt ausgewertet: Ein Areal von 100 Zellen mit intaktem Nukleus und Zytoplasma, welches das untersuchte Tumorgewebe repräsentierte, wurde ausgewählt. Anschließend wurde die Zahl der spezifisch gefärbten Zellen ermittelt. Die Auszählung wurde von einem zusätzlichen Beobachter wiederholt. Bei diskrepanten Ergebnissen (n=6) wurde

ein Konsens hergestellt. Beiden Untersuchern waren zum Zeitpunkt der Auswertung die klinischen Daten der Patienten nicht bekannt.

2.5 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung wurde mit dem SPSS Software Paket, Version 13 (SPSS Inc., München) durchgeführt gemeinsam mit Dr. med. Bernhard Polzer durchgeführt. Mit Pearson's Chi-Quadrat-Test wurde der Zusammenhang zwischen EMMPRIN-Expression und EMMPRIN-Färbemuster mit den vorhandenen klinisch-pathologischen Parametern untersucht. Für die Analyse der Daten aus den Nachsorgeuntersuchungen wurden mit der Kaplan-Meier-Methode Überlebenskurven berechnet. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Log-Rank Test berechnet. Als primären Endpunkt bei den Überlebensanalysen wurde das tumorbedingte Überleben der Patienten herangezogen. Gemessen wurde der Zeitraum zwischen der Operation und den letzten verfügbaren Überlebensdaten oder dem tumorbedingten Tod eines Patienten. Für einen Teil der Patienten wurde abschließend eine multivariate Überlebensanalyse durchgeführt (Cox-Regression).

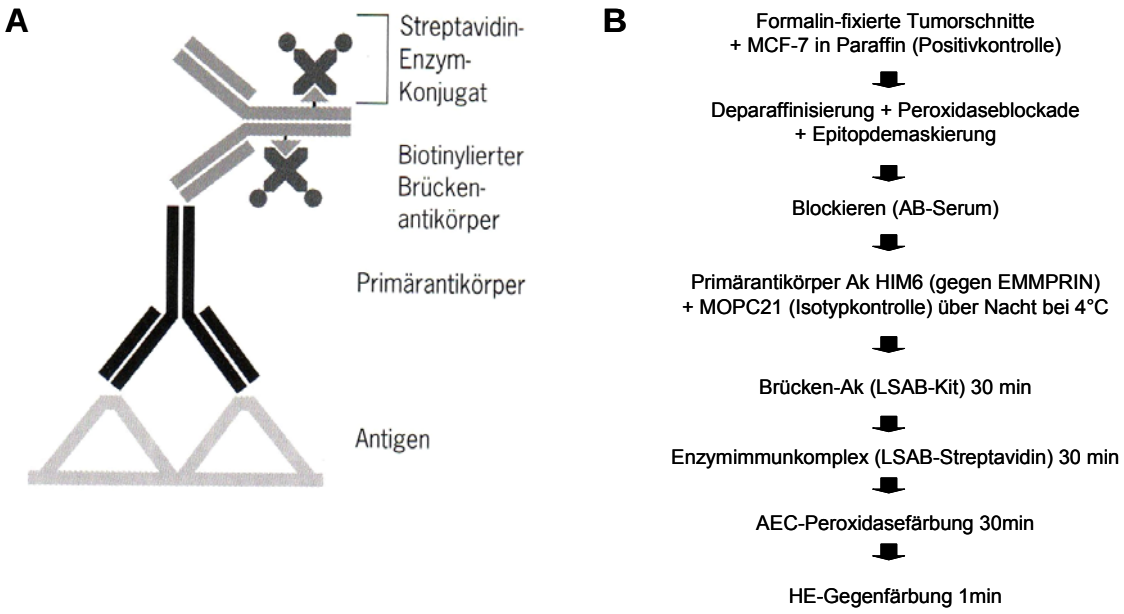

Abbildung 3. Schema der optimalen EMMPRIN-Peroxidase Färbung
(A) Die schematische Darstellung des Antigennachweises. Diese zeigt den Antikörper in hellgrau, das mit dem schwarzen Primär Antikörper, der wiederum mit dem dunkelgrauen Biotinylierter Brückenantikörper, an dessen Biotin bindet sich das schwarze Streptavidin-Emzym-Konjugat. **(B)** Ablauf der etablierten Färbung mit Demaskierung der Epitope, und Peroxidasefärbung über einen Steptavidin-gekoppelten Brückenantikörper.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung und Optimierung der EMMPRIN-Färbung

3.1.1 Ermittlung der Kontrollzelllinen

Zunächst sollte eine geeignete Positivkontrolle für die Färbung gegen EMMPRIN bestimmt werden. Hierfür wurden verschiedene Tumorzelllinen verglichen: H460, HTB177, A43, A549, SBR3 und MCF-7. Die Zytospin-Präparate der Zelllinien wurden mit dem Antikörper HIM 6 gegen EMMPRIN gefärbt (siehe 2.4.1.). Dabei zeigte sich, dass die MCF-7 Zelllinie am besten für die Färbung geeignet war, da die Zellen am stärksten gefärbt waren.

3.1.2 Antikörperauswahl

Um den geeigneten Antikörper für die EMMPRIN-Färbung von Paraffinschnitten zu bestimmen, wurde das Fast-Blue Färbeprotokoll angewendet (siehe Methoden Teil 2.4.5). Die erste Gruppe von Antikörpern, die verwendet wurden, waren die von Dr. Horejsi zur Verfügung gestellten monoklonalen EMMPRIN-Antikörper MEM 6/1-11. Die Spezifität dieser Antikörper wurde von mehreren Gruppen beschrieben. Das Labor von Dr. Horejsi (Koch, Staffler et al. 1999) hat EMMPRIN an aktiven T-Zellen untersucht. Die Arbeitsgruppe von Dr. Pantel arbeitete mit Micro-Tissue-Arrays und Zellen aus den Primärtumoren von Patienten mit Mammakarzinom (Reimers, Zafrakas et al. 2004), während die Gruppe von Dr. Klein die mRNA von disseminierten Tumorzellen aus Knochenmark und Lymphknoten von verschiedenen epithelialen Tumoren untersuchte (Klein, Seidl et al. 2002). Leider zeigte sich bei der Färbung von Paraffinschnitten, dass mit diesen Antikörpern keine spezifische EMMPRIN-Färbung etabliert werden konnte. Der Einsatz verschiedener Modifikationen des Färbeprotokolls, wie zum Beispiel das Einsetzen von Triton-X, eine Antigen-Demaskierung, und das Austauschen verschiedener Färbekomponenten, führte zu keiner Verbesserung der Färbung. Aus diesem Grund wurde der kommerzielle Antikörper HIM6 gegen EMMPRIN (BD PharMingen) eingesetzt, der sich in der Vergangenheit bereits als paraffingängig erwiesen hatte (Major, Liang et al. 2002). Nachdem der HIM6-Antikörper für die Färbung eingesetzt wurde, musste die Färbemethode erneut angepasst werden, um eine spezifische Färbung ohne Farbschleier und eine ausreichend intensive Färbung zu erhalten.

3.1.3 Optimierung der Temperatur

Zur Optimierung der Färbung wurden drei verschiedene Temperaturen (4°C, 25°C und 37°C) während der Inkubationsphase des Primärantikörpers getestet. Es zeigte sich, dass die Schnitte am intensivsten gefärbt wurden, wenn die Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C in der Feuchtkammer durchgeführt wurde, die weiteren Schritte der Färbung wurden bei Raumtemperatur (25°C) durchgeführt.

3.1.4 Epitopdemaskierung

Ein erster Optimierungsschritt im Protokoll war eine Epitopdemaskierung (siehe 2.4.2). Die verwendete Methode basiert auf der Einwirkung von Hitze auf die Methyl-Brücken, die bei der Formalinfixierung entstehen. Die Hitze führt dann zum Aufbrechen dieser Brücken, der Quervernetzungen und der Veränderung der Proteinstruktur, die die Antigene verschleiern (Klein, Blankenstein et al. 2002). Diese Behandlung und die Benutzung des „Labeled Streptavidin-Biotin Kit“ von Dako brachten gute Ergebnisse für die EMMPRIN-Färbung. Tabelle 3 stellt die unterschiedlichen Färbeprotokolle einander noch einmal gegenüber.

Tabelle 3. Verschiedene Protokolle der EMMPRIN-Färbung

Detektionsystem	ABC-Komplex	APAAP	LSAB Peroxidase
Entparaffinierung	Alkohol Reihe	Alkohol Reihe	Alkohol Reihe
Antigen-Demaskierung	Keine Demaskierung	Keine Demaskierung	Zitrat (Mikrowellenbehandung)
Blockieren	10% AB-PBS	10% AB-PBS	10% AB-PBS
Primärantikörper	HIM 6	HIM 6	HIM 6
Brückenantikörper	Biotinylierter rabbit Anti-mouse Ak	Biotinylierter rabbit Anti- mouse Ak	Biotinylierter rabbit Anti-mouse Ak
Enzym	Alkalische Phosphatase	Alkalische Phosphatase	Meerrettich- Peroxidase
Immunkomplex	AB-Komplex	APAAP Komplex	Streptavidin (LSAB) DAKO Kit
Färbung	Fast Blue	Neufuchsin	AEC
Gegenfärbung	Hematoxylin	Hematoxylin	Hematoxylin
Färberesultat	Sehr schwach	Schwach	Gute Färbung

3.1.5 Enzym-Substratreaktion

Die Antigen-Antikörper-Reaktion wurde durch eine Enzym-Substratreaktion sichtbar gemacht. Das daraus gebildete farbige Präzipitat, das im Lichtmikroskop sichtbar war, wies die Lokalisation des Antigens nach. Die beiden Enzym-Systeme wurden mit verschiedenen Färbesalzen getestet. Die Alkalische Phosphatase wurde mit Neufuchsin und Fast Blue, die Meerrettich-Peroxidase wurde mit dem AEC-Substrat getestet. Die Protokolle wurden ausführlich im Methodenteil dargestellt (siehe Methoden Teil 2.4.5). Die Anwendung der Peroxidase-Färbung führte zu einer gut beurteilbaren Färbung, diese musste aber noch weiter optimiert werden, um eine bessere Auswertung der Tumorgewebe zu ermöglichen.

3.1.6 EMMPRIN-Färbung der Zelllinie MCF-7

Von kultivierten Zellen der Tumorzelllinie MCF-7, die fixiert und in Paraffin eingebettet worden waren, wurden Schnittpräparate zur Positivkontrolle der Färbung hergestellt. Die aus einem humanen Mammakarzinom generierte Tumorzelllinie MCF-7 weist regelmäßig eine membranständige EMMPRIN-Expression auf. Bei der Verwendung des EMMPRIN-

Antikörpers und optimalen Färbebedingungen war eine intensive spezifische Anfärbung der Zellmembranen klar vom Hintergrund abzugrenzen. Nach der Auswahl des Antikörpers konnte die optimale Färbekonzentration von 1 µg/ml ermittelt werden (siehe Abbildung 4A). Auf den Objektträgern füllte die rote EMMPRIN Färbung in den positiven Kontrollen das Zellzytoplasma aus und war außerdem auf der Zellmembran sehr ausgeprägt. Danach war es möglich, diese Färbung auf den Tumorschnitten anzuwenden (siehe Abbildung 5A).
Bei Verwendung der Isotypkontrolle MOPC-21 zeigte sich keine Anfärbung der kultivierten Zellen. Die Zellen zeigten lediglich dunkelblaue Nuklei und ein azurblaues Zytoplasma durch die Kerngegenfärbung (siehe Abbildung 4B).

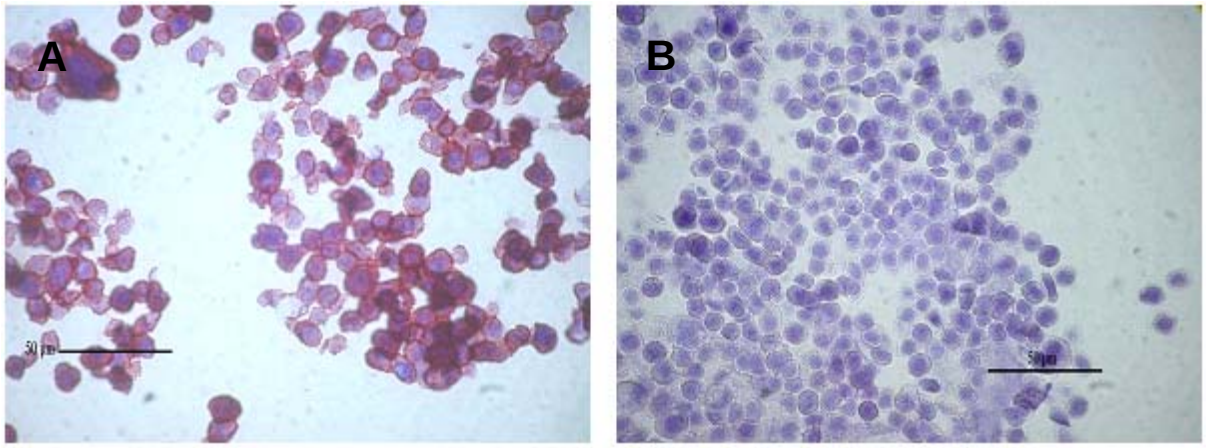

Abbildung 4. Expression von EMMPRIN auf kultivierten Tumorzellen der Mammakarzinom Zelllinie MCF-7.
(A) Intensive Anfärbung der Zellen nach immunhistochemischer Markierung von EMMPRIN mit dem monoklonalen Antikörper (mAk) HIM6. **(B)** Fehlende Anfärbung der Zellen bei Verwendung der Isotypkontrolle MOPC-21 (400-fache Vergrößerung, Farbsubstrat AEC).

3.2 Patientenkollektiv

Das von uns untersuchte Patientenkollektiv setzt sich aus 153 Patienten mit operablen, nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen zusammen, die sich im Zeitraum von 10 Jahren postoperativen Nachuntersuchungen unterzogen haben. Ein Teil der Nachuntersuchungsergebnisse, die vor dieser Studie ausgewertet worden waren, wurden ebenfalls für die vorliegende Studie herangezogen. Aufgrund einer unspezifischen Färbung, mussten drei Negativkontrollen als “falsch positiv“ bewertet werden und die Patienten von einer weiteren Teilnahme an dieser Studie ausgeschlossen werden. So konnten letztlich 150 Patienten in die statistische Auswertung aufgenommen werden.

Tabelle 4. NSCLC Patientenkollektiv

Variable	Patientenzahl (n=150)
Geschlecht	

Männlich	115 (76,6%)
Weiblich	35 (23,3%)
Alter (37-80 Jahre)	
< 60 Jahre	74 (49,3%)
> 60 Jahre	76 (50,7%)
Tumorausdehnung	
pT1	28 (18,6%)
pT2	91 (60,7%)
pT3	17 (11,3%)
pT4	14 (9,3%)
Lymphknotenbefall	
pN0	73 (48,7%)
pN1	30 (20,0%)
pN2	43 (28,7%)
pN3	4 (2,7%)
Tumorhistologie [a]	
Adenokarzinom	65 (43,3%)
Plattenepithelkarzinom	58 (38,7%)
Sonstige	27 (18,0%)
Grading (n=122) [b]	
G1	7 (5,7%)
G2	59 (48,4%)
G3	56 (45,9%)

[a] "Sonstige" steht für 12 gemischtzellige und 15 großzellige Karzinome.

[b] Von gemischtzelligen und großzelligen Karzinomen, sowie von einem Plattenepithelkarzinom wurde kein Grading bestimmt (n=28).

Das Patientenkollektiv bestand aus 115 Männern (76,6%) und 35 Frauen (23,3%). Der Altersmedian betrug 60 Jahre (37-80 Jahre) davon waren 74 (49,3%) jünger als 60 Jahre und 76 (50,7%) waren älter als 60 Jahre. Gemäß TNM-Klassifikation wurden die Primärtumorstadien von 119 Tumoren (79,3%) als pT1-pT2, eingestuft. Hinsichtlich des Lymphknotenbefalls verteilte sich das Kollektiv mit 103 Patienten (68,7%) auf das Stadium pN0-pN1. Die Aufteilung des Kollektiv gemäß des Differenzierungsgrades (Grading) stufte 66 Tumoren (54,1%) als G1-2. In allen Fällen konnte eine Tumorresektion mit tumorfreien Resektionsrändern (R0) erreicht werden und es war keine Metastasierung festzustellen (M0). Die Primärtumore gehörten unterschiedlichen Typen von malignen Neoplasien der Lunge an: 65 Adenokarzinome (43,3%), 58 Plattenepithelkarzinome (38,6%), 15 großzellige Karzinome (10,0%) und 12 andere Tumore (8,0%). Der größte Teil der Tumore waren Adenokarzinome mit einer Einstufung von T2, M0, R0 und G2 nach dem UICC TNM-System (siehe

Einleitung). Die vollständigen klinischen Daten aller Patienten sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

3.3 Auswertung der immunhistochemischen Analyse

3.3.1 Optimierung der immunhistochemischen Färbemethode

Zur Optimierung des EMMPRIN Färbeprotokolls auf den Tumorschnitten wurden in Paraffin eingebettete Primärtumoren von 10 Patienten, sowie in Paraffin eingebettete MCF-7 Zellen als Positivkontrolle der Färbung in Form von Schnittpräparaten benutzt. Zu den MCF-7-Schnittpräparaten wurden konsekutive Schnitte jeder Gewebeprobe jeweils mit dem Primärantikörper HIM6 gegen EMMPRIN und der Isotypkontrolle MOPC-21 inkubiert (siehe Abbildung 5B). In dieser Testreihe zeigten 9 von 10 Gewebepräparaten eine deutliche Anfärbung, die sich gut vom Stroma abgrenzen ließ (siehe Abbildung 5A).

Die Färbung der Tumorzellen konnte innerhalb eines Schnittpräparats in ihrer Intensität wie auch im Färbemuster variieren. In manchen Tumorschnitten waren die gefärbten Tumorzellen in Nestern oder Inseln angeordnet, während ungefärbte Tumorzellen das restliche Gewebe umrandeten. Im Gegensatz dazu gab es auch homogen gefärbte Tumorschnitte. Das Tumorstroma und nekrotische Anteile wurden nicht in die Auswertung von repräsentativen Tumorschnittarealen der Studie miteinbezogen (siehe Abbildung 5A). Die bewerteten Areale bestanden aus 100 Tumorzellen, die ausgezählt wurden, um so den prozentualen Wert gefärbter Tumorzellen zu ermitteln. Die Färbeintensität wurde schließlich in vier Intensitätsgrade aufgeteilt.

Zuerst wurden die Färbeintensität und die Anzahl der gefärbten Tumorzellen separat in allen Tumorschnitten untersucht. Die Granulozyten sowie das Tumorstroma wurden ebenfalls auf Färbung und Färbeintensität untersucht, um eine unspezifische Färbung auszuschließen. Eine seltene schwache Färbung des tumornahen Stroma war offenkundig keine unspezifische Antikörperreaktion und wurde deshalb nicht als „falsch positiv“ gewertet. Die Färbeintensität, wurde im Vergleich zur Färbeintensität und Reaktion der Granulozyten und des normalen Lungengewebe bewertet. Die Spezifität des Antikörpers zeigte sich bei den Schnitten durch eine saubere Negativkontrolle.

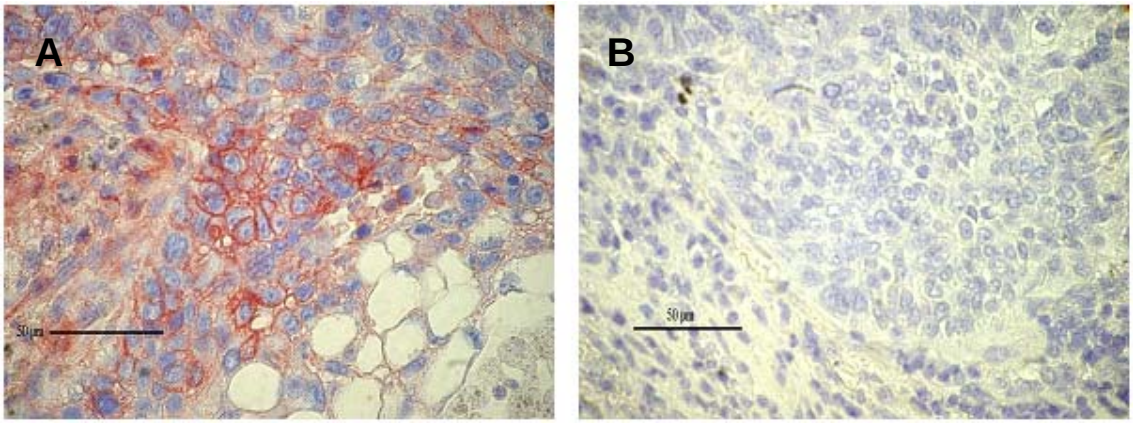

Abbildung 5. Expression von EMMPRIN auf Tumorschnitten
(A) Intensive, überwiegend membranbetonte EMMPRIN-Expression der Tumorzellen nach immunhistochemischer Markierung von EMMPRIN mit dem mAk HIM6. **(B)** Fehlende Anfärbung bei Verwendung des mAk MOPC-21 als Isotypkontrolle (400-fache Vergrößerung, Farbsubstrat AEC).

3.3.2 Bewertung der EMMPRIN-Expression im Tumorgewebe

In den Gewebeschnitten fanden sich neben den Tumorzellen auch Tumorstroma, gesundes Lungengewebe und infiltrierende Immunzellen. Die Färbeintensität der Tumorzellen variierte im einzelnen Schnitt. Deshalb wurden 100 Tumorzellen im Schnittzentrum für die Bewertung ausgezählt. Die Auswahl des Zellareals erfolgte nach morphologischen Kriterien, nekrotische Areale wurden ausgeschlossen. Das Stromagewebe in den Schnitten war ungefärbt, während das nekrotische Gewebe eine sehr starke falsch positive Färbung aufwies. Die Isotypkontrolle mit MOPC-21 zeigte, dass die EMMPRIN-Färbung in den Gewebeschnitten spezifisch war, da keine Anzeichen einer roten Farbreaktion zu finden waren.

Die artefaktfreien Areale der untersuchten Tumorschnitte wurden mittels Lichtmikroskop ausgewertet (siehe 3.3.1). Die Invasionsfront war gegenüber gesundem Lungengewebe unterschiedlich gut abgrenzbar, jedoch immer erkennbar. EMMPRIN war häufig membranständig, leuchtend rot angefärbt und umgab die einzelnen Tumorzellen. Zudem ließ sich EMMPRIN auch im Zytoplasma der Tumorzellen nachweisen. Je nach Schnitt stellt sich das Färbemuster abhängig von der Proteindichte der einzelnen Zelle und der Anzahl intakter Tumorzellen, sowohl heterogen als auch homogen dar. Dabei war kein Unterschied zwischen peripheren oder zentral gelegenen Tumorzellen festzustellen. Bei fortgeschrittenen Tumoren sah man in den Zellnestern meist zentral gelegene Nekrosegebiete. Bei Betrachtung der Gewebeschnitte mit 400-facher Vergrößerung bestätigte sich das beschriebene Färbeverhalten. Allein das Tumorgewebe wies eine vom Stroma scharf abgrenzbare EMMPRIN-Färbung auf (siehe Abbildung 5A).

Die Färbeintensität der einzelnen Schnitte wurde nicht als alleiniger Parameter für die EMMPRIN-Expression gewertet, da sie durch geringste Abweichungen im Färbeablauf variieren und somit schwächer oder stärker ausfallen kann. Die semi-quantitative

Auswertung erfolgte durch die Anwendung des „immunreactive score“ (IR-Score). Dieser im folgenden auch als Färbewert bezeichnete IR-Score errechnet sich durch Multiplikation des Prozentsatzes der gefärbten Zellen und der Intensität der Färbung und erlaubt so einen Vergleich der verschiedenen Tumorschnitte (siehe Abbildung 6). Die EMMPRIN-Expression wurde nach dem IR-Score aufgeteilt um eine graduelle Einteilung in vier Gruppen zu ermöglichen (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5. Auswertung der EMMPRIN Expression nach dem IR-Score

EMMPRIN-Färbewert (Intensität + 1) x gefärbte Zellen (in %)	**Gruppe**	**Erklärung der Gruppenfärbung**
0 bis 100	0	Keine bis sehr geringe Färbung
101 bis 200	1	Färbung geringer als Positivkontrolle
201 bis 300	2	Färbung gleicht der Positivkontrolle
301 bis 400	3	Färbung stärker als Positivkontrolle

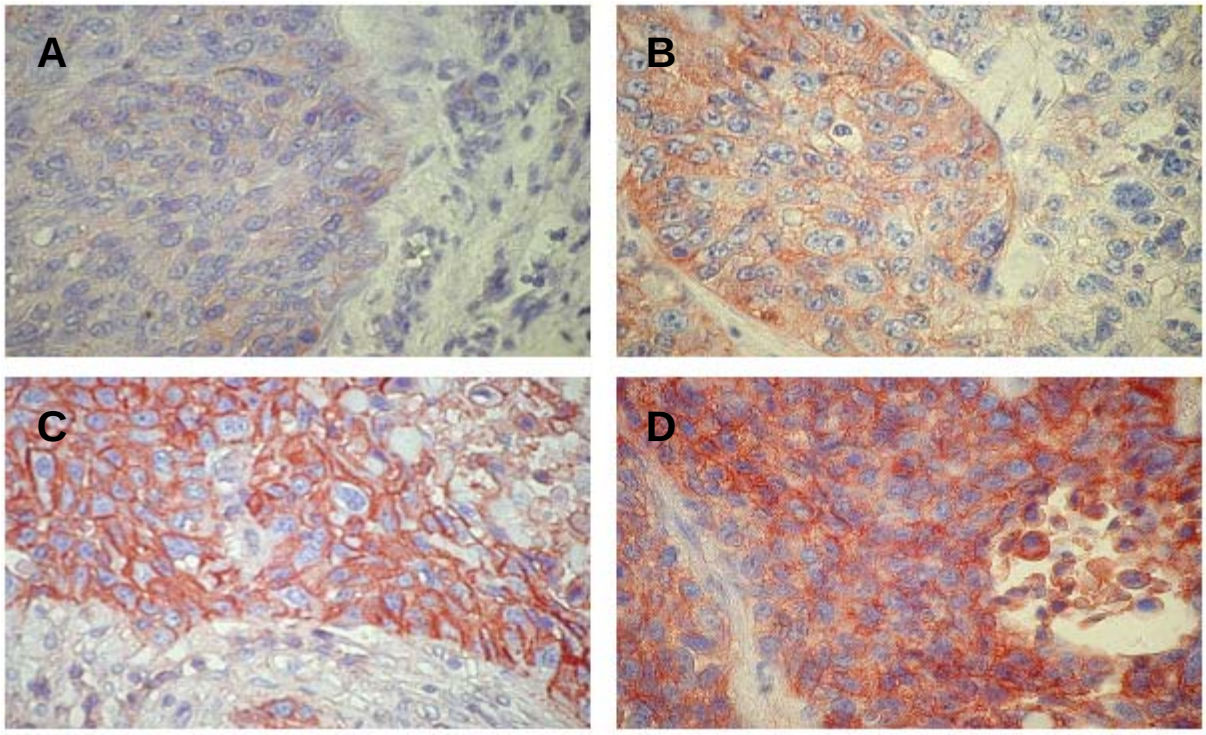

Abbildung 6. Expression von EMMPRIN auf Tumorschnitten
Unterschiedliche EMMPRIN-Färbewerte nach dem IR Score. **(A)** Niedrigste EMMPRIN-Expression (Score 0 [0-100]), **(B)** mittlere EMMPRIN-Expression (Score 1 [100-200]), **(C)** starke EMMPRIN-Expression (Score 2 [200-300]), **(D)** sehr starke EMMPRIN-Expression (Score 3 [300-400], 400-fache Vergrößerung, Farbsubstrat AEC).

3.3.3 EMMPRIN-Färbewert in den histologischen Typen des NSCLC

Durch die Auswertung der immunhistologischen Daten konnten Tumore hinsichtlich ihres EMMPRIN-Färbewert miteinander verglichen werden. Dabei fiel auf, dass sich die Expression in den unterschiedlichen Tumortypen voneinander unterschied. Die in dieser Arbeit untersuchten 150 Tumore wurden in der Abteilung für Pathologie der Asklepios-Fachklinik in Gauting histopathologisch beurteilt (siehe Tabelle 3).

In unserem Patientenkollektiv waren 58 Primärtumore als Plattenepithelkarzinome beschrieben worden (38,7%). Die Hornperlen als charakteristische Struktur in differenzierten Plattenepithelkarzinomen wiesen im Gegensatz zu nicht keratinhaltigen nekrotischen Regionen keine EMMPRIN-Expression auf. Die umliegenden Tumorzellen zeigten eine deutliche EMMPRIN-Expression, die meist an den Membranen aber auch im Zytoplasma deutlich zu sehen war. In weniger differenzierten Karzinomen war ein überwiegend diffuses Wachstumsmuster erkennbar (siehe Abbildungen 7A+B). Unter den unregelmäßigen hyperchromatischen Zellkernen sind nicht selten atypische Mitosen anzutreffen. Das Stroma ist gut entwickelt und lässt in der Regel eine starke lymphozytäre Infiltration erkennen. 65 Tumore wurden aufgrund ihres Aufbaus in glanduläre Strukturen und wegen der Muzinproduktion als Adenokarzinom charakterisiert (43,3%). Die EMMPRIN Färbung in diesen Tumoren befindet sich meistens in der Basalregion der Zellen, neben dem basalen Zellkern (siehe Abbildungen 7C+D). Fünfzehn Tumore (10,0%) wurden als großzellige Bronchialkarzinome beschrieben, die keine sichtbare Differenzierung der Zellen vorwiesen. Die Tumorzellen waren meist größer als Leukozyten, mit großen dunkel gefärbten Kernen und auffälligen Nukleolen (multinukleäre Zellen, siehe Abbildungen 7E+F). In den untersuchten Tumorschnitten war die EMMPRIN-Expression meist membranständig. Zwölf Tumore (8,0%) konnten keiner der drei oben genannten Tumorgruppen zugeordnet werden.

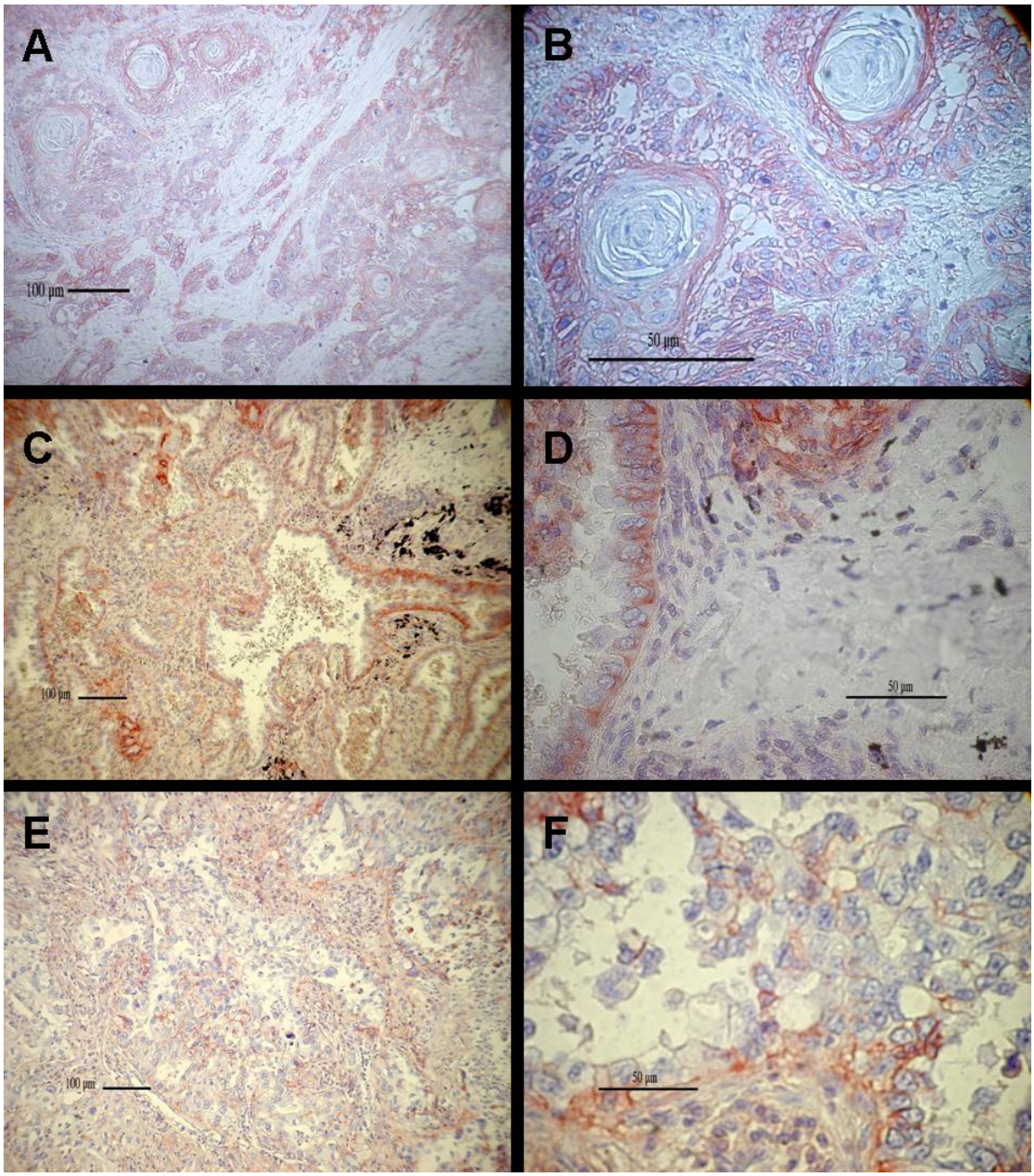

Abbildung 7. Expression von EMMPRIN in verschiedenen Bronchialkarzinomen
Plattenepithelkarzinom (A+B) Die Tumorzellen zeigten eine spezifische EMMPRIN-Expression nach immunhistochemischer Markierung von EMMPRIN mit dem mAk HIM6. (A) 100-fache Vergrößerung. (B) 400-fache Vergrößerung. Die Tumorzellen zeigen im Gegensatz zum Stroma und den charakteristischen Hornperlen eine spezifische Anfärbung (Farbsubstrat AEC).
Adenokarzinom (C+D) Eine mittelstarke Färbung der Tumorzellen (Score 1) nach der immunhistochemischer Markierung von EMMPRIN (C) 100-fache Vergrößerung .(D) 400-facher Vergrößerung. Der basale Teil der Tumorzellen zeigt eine stärkere Färbung (Farbsubstrat AEC).
Großzelliges Karzinom (E+F) EMMPRIN-Expression der Zellen nach immunhistochemischer Markierung von EMMPRIN mit dem mAk HIM6. (E) 100-fache Vergrößerung. (F) 400-fache Vergrößerung. Man sieht eine klare EMMPRIN-Färbung der Tumorzellen (Farbsubstrat AEC).

3.3.4 Zytoplasmatische und membranständige Lokalisation von EMMPRIN

Eine biologische Relevanz der EMMPRIN-Lokalisation in der Tumorzelle konnte in einer Studie an einem Patientenkollektiv mit Kehlkopfkarzinom beobachtet werden (Rosenthal, Shreenivas et al. 2003). Es wurde gezeigt, dass EMMPRIN erst an der Zelloberfläche biologisch aktiv wird, weshalb eine immunhistochemische Untersuchung der EMMPRIN-Lokalisation wichtig wäre. Auch bei den hier untersuchten NSCLC konnte EMMPRIN in verschiedenen Kompartimenten der Zelle nachgewiesen werden.

Um die Lokalisation des aktiven EMMPRIN zu ermitteln, wurden die Tumorschnitte in zwei Gruppen aufgeteilt: membranständige EMMPRIN-Lokalisation und zytoplasmatische EMMPRIN-Lokalisation. Es gab auch Zellen, in denen beide Lokalisationen erkennbar waren, dabei war EMMPRIN aber immer überwiegend membranständig lokalisiert. In der 400-fachen Vergrößerung konnte man die Position der EMMPRIN-Färbung in den Tumorzellen klar erkennen. Abbildung 8 veranschaulicht die Einteilung nach dem Färbemuster. Der erste Tumorschnitt zeigt eine sehr starke EMMPRIN-Expression. Das Zytoplasma, sowie die Zellmembran waren gefärbt (siehe Abbildung 8A+B). Das Adenokarzinom mit einer differenzierten membranständigen EMMPRIN-Expression zeigt eine schwächere Färbung als der vorherige Tumorschnitt in der 100-fachen Vergrößerung. Es war nicht erkennbar, wo die Färbung in der Zelle lokalisiert war. In der 400-fachen Vergrößerung war zu sehen, dass die Färbung nur auf den Membranen der Tumorzellen und nicht im Zytoplasma nachzuweisen war (siehe Abbildung 8C+D). Die Färbung von Adenokarzinomen mit einer zytoplasmatischen EMMPRIN-Expression ähnelte den Tumoren mit membranständiger Lokalisation in der 100-fachen Vergrößerung. Doch bei der 400-fachen Vergrößerung war die Färbung eindeutig im Zytoplasma zu finden (siehe Abbildung 8E+F).

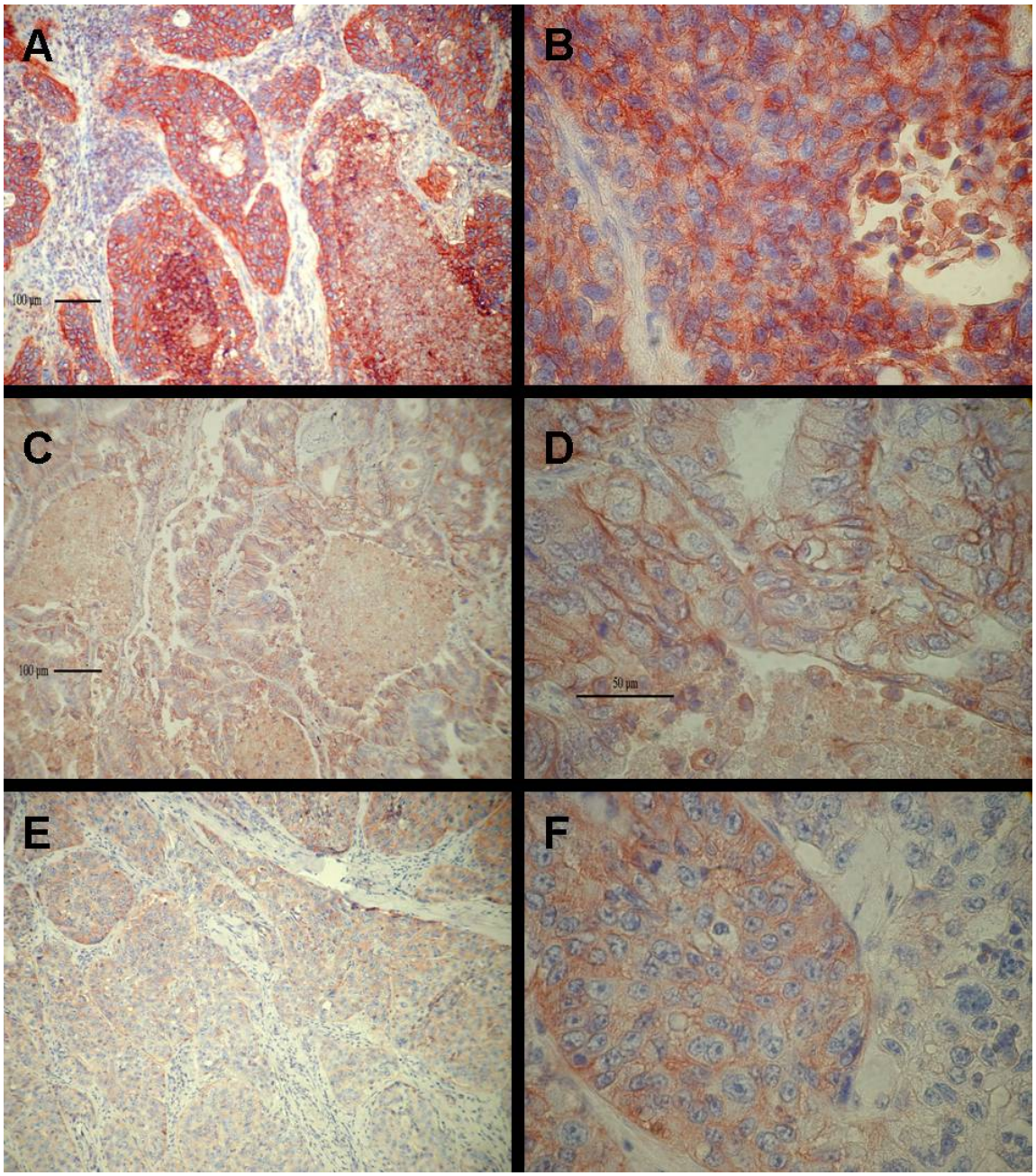

Abbildung 8. Zelluläre Lokalisation von EMMPRIN
(A) Intensive Färbung (Färbewert 3) der Tumorzellen bei ungefärbtem Tumorstroma (Färbewert 3, 100-fache Vergrößerung). **(B)** Tumorzytoplasma und die Tumorzellmembran sind rot gefärbt (400-fache Vergrößerung, Farbsubstrat AEC). **(C)** Schwache EMMPRIN-Expression (Färbewert 1, 100-fache Vergrößerung). **(D)** Die Tumorzellmembran ist rot gefärbt, während das Zytoplasma ungefärbt ist (400-fache Vergrößerung, Farbsubstrat AEC). **(E)** Schwache EMMPRIN-Expression auf den malignen Epithelzellen bei ungefärbtem Tumorstroma (Färbewert 1, 100-fache Vergrößerung). **(F)** Klare zytoplasmatische Färbung ohne Anfärbung der Membran der Tumorzellen (400-fache Vergrößerung, Farbsubstrat AEC).

3.3.5 EMMPRIN-Färbewert und klinisch-pathologische Parameter

Als nächstes sollten die Ergebnisse der EMMPRIN-Expression mit den klinischen Daten verglichen werden. Da mehr als 90 Prozent der Tumore eine EMMPRIN-Expression zeigten und die Färbeintensität alleine aufgrund Schwankungen zwischen den Experimenten schwer objektivierbar war, wurde der IR-Score zur Bewertung der Gewebefärbung benutzt. In ihn gehen Intensität und Prozentsatz der gefärbten Zellen ein. Auf diese Weise wurden die Tumore in vier Gruppen eingeteilt (siehe Abbildung 9).

Um die EMMPRIN-Expression in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen zu ermitteln, wurde zuerst die Gruppenhäufigkeit ermittelt. Die meisten Tumore (34,0%) zeigten eine Expression mit Färbewert 1, gefolgt von 44 Tumoren (29,3%) mit Färbewert 2. Der Mittelwert des genannten Kollektivs war 1,26 und die Standardabweichung betrug 0,96. Um einen Vergleich zu ermöglichen, wurde das Kollektiv über den EMMPRIN-Färbewert in zwei Gruppen aufgeteilt: niedrige Expression (IR-Score ≤ 200) und hohe Expression (IR-Score > 200). Diese Aufteilung wurde ausgesucht da die niedrige Expressionsgruppe Tumore enthält, die eine geringere EMMPRIN-Färbung als die MCF7-Kontrolle aufweisen, während die hohe Expressionsgruppe Tumore enthält, die eine stärkere EMMPRIN-Färbung als die Positivkontrolle aufweisen. Durch diese Einteilung ergaben sich zwei in etwa gleich große Gruppen mit 89 Tumoren (59,3 %) in Gruppe 1 (0-200 IR-Score) und 61 Tumoren (40,7 %) in Gruppe 2 (200-400 IR-Score).

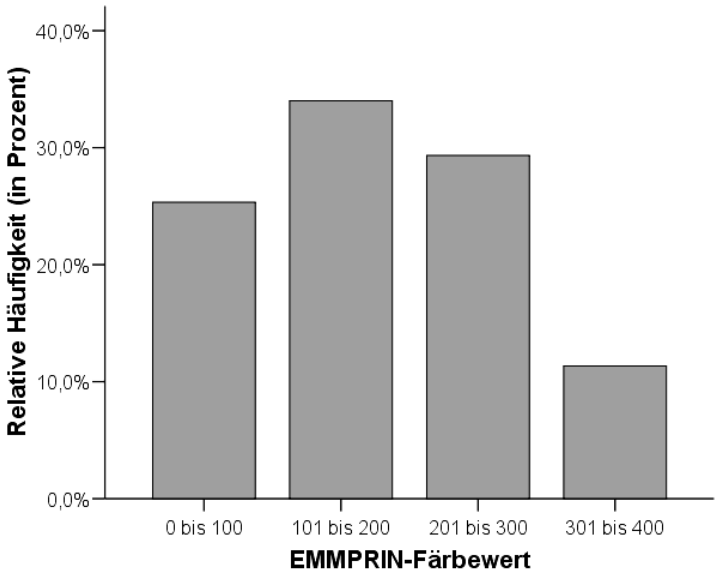

Abbildung 9. EMMPRIN-Färbewert nach dem IR-Score
Einteilung der EMMPRIN-Expression nach dem Färbewert (IR-Score).Schwache Färbung (IR-Score 0 bis 100), mittelstarke Färbung (IR-Score 101 bis 200), starke Färbung (IR-Score 201 bis 300) und sehr starke Färbung (IR-Score 301 bis 400).

Tabelle 6. Patientencharakteristika und Tumorvariablen im Vergleich zur EMMPRIN-Expression in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen

Variable	Patienten	EMMPRIN-Expression	
		Niedrige Expression [a]	Hohe Expression [a]
Summe	150	89 (59, 3%)	61 (40, 7%[f])
Tumor Ausdehnung (*p*-Wert[b])			**0, 80**
pT1-pT2	119	70 (58, 8%)	49 (41, 2%)
pT3-pT4	31	19 (61, 3%)	12 (38, 7%)
Lymphknotenbefall (*p-Wert*[c])			**0, 14**
pN0-pN1	103	57 (55, 3%)	46 (44, 7%)
pN2	47	32 (69, 1%)	15 (31, 9%)
Tumorhistologie (*p*-Wert[b])			**0, 061**
Adenokarzinom	65	45 (69, 2%)	20 (30, 8%)
Plattenepithelkarzinom	58	28 (48, 3%)	30 (51, 7%)
Sonstige [c]	27	16 (59, 3%)	11 (40, 7%)
Tumorgradierung [d] (*p*-Wert[b])			**0, 85**
G1-2	66	40 (60, 6%)	26 (39, 4%)
G3-4	56	33 (58, 9%)	23 (41, 1%)
Alter (*p*-Wert[b])			**0, 49**
< 60 years	74	46 (66, 2%)	28 (37, 8%)
≥ 60 years	76	43(56, 6%)	33 (43, 4%)

[a] Ein IR-Score <200 wurde als niedrige Expression ein IR-Score ≥200 als hohe Expression bezeichnet.
[b] Die p-Werte wurden mit dem Pearson's Chi-Quadrat Test erstellt, die unterstrichenen Werte waren signifikant.
[c] "Sonstige Tumoren" bezeichnet 12 gemischtzellige Tumore und 15 großzellige Karzinome.
[d] Großzelligen Karzinomen und gemischtzelligen Tumoren, sowie einem Plattenepithelkarzinom wurde kein Malignitätsgrad zugeordnet (28 Fälle).

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen einem einzelnen klinischen Parameter und dem EMMPRIN IR-Score gefunden werden. Anschließend wurde die EMMPRIN-Expression mit der Tumorausdehnung, dem Lymphknotenbefall, der Tumorhistologie, dem Grading und dem Patientenalter verglichen (siehe Tabelle 6). Dabei fiel auf, dass eine Tendenz zu einer möglichen Beziehung zwischen Tumorhistologie und EMMPRIN-Expression ermittelt werden konnte (Chi-Quadrat, p=0,06). Es scheint, dass Plattenepithelkarzinomen eine eher hohe EMMPRIN-Expression aufweisen (30 Tumore, 51,7%), während Adenokarzinome und andere Tumoren eine eher schwächere EMMPRIN-Expression zeigen (Tabelle 6).

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die Lokalisation der EMMPRIN-Expression in den gefärbten Zellen eine Assoziation mit den verschiedenen Patientenparametern zeigte. Für diese Analysen wurde das Färbemuster in zwei Gruppen eingeteilt: membranständig und zytoplasmatisch. Die Untersuchung ergab, dass mehr Tumoren eine membranständige

EMMPRIN-Färbung als eine zytoplasmatische Färbung aufwiesen. Bei Schnitten von 150 Tumoren fanden sich in 102 Tumoren (68,0%) überwiegend membranständig gefärbte Zellen und in 48 Tumoren (32,0%) hauptsächlich zytoplasmatisch gefärbte Zellen (Tabelle 7).
Der Vergleich zwischen EMMPRIN-Färbewert und EMMPRIN-Färbemuster zeigte, dass die meisten Tumore mit einer niedrigen EMMPRIN-Expression ein zytoplasmatisches Färbemuster aufwiesen (Abbildung 10A). Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen dem EMMPRIN-Färbemuster und der Tumorausdehnung (p=0,21), dem Lymphknotenbefall (p=0,73), dem Grading (p=0,89) oder dem Alter der Patienten (p=0,20) gefunden werden. Eine leichte Tendenz zeigte sich am ehesten bei den verschiedenen Tumortypen (p=0,18), da Adenokarzinome eher ein zytoplasmatisches Färbemuster aufwiesen (Tabelle 7).

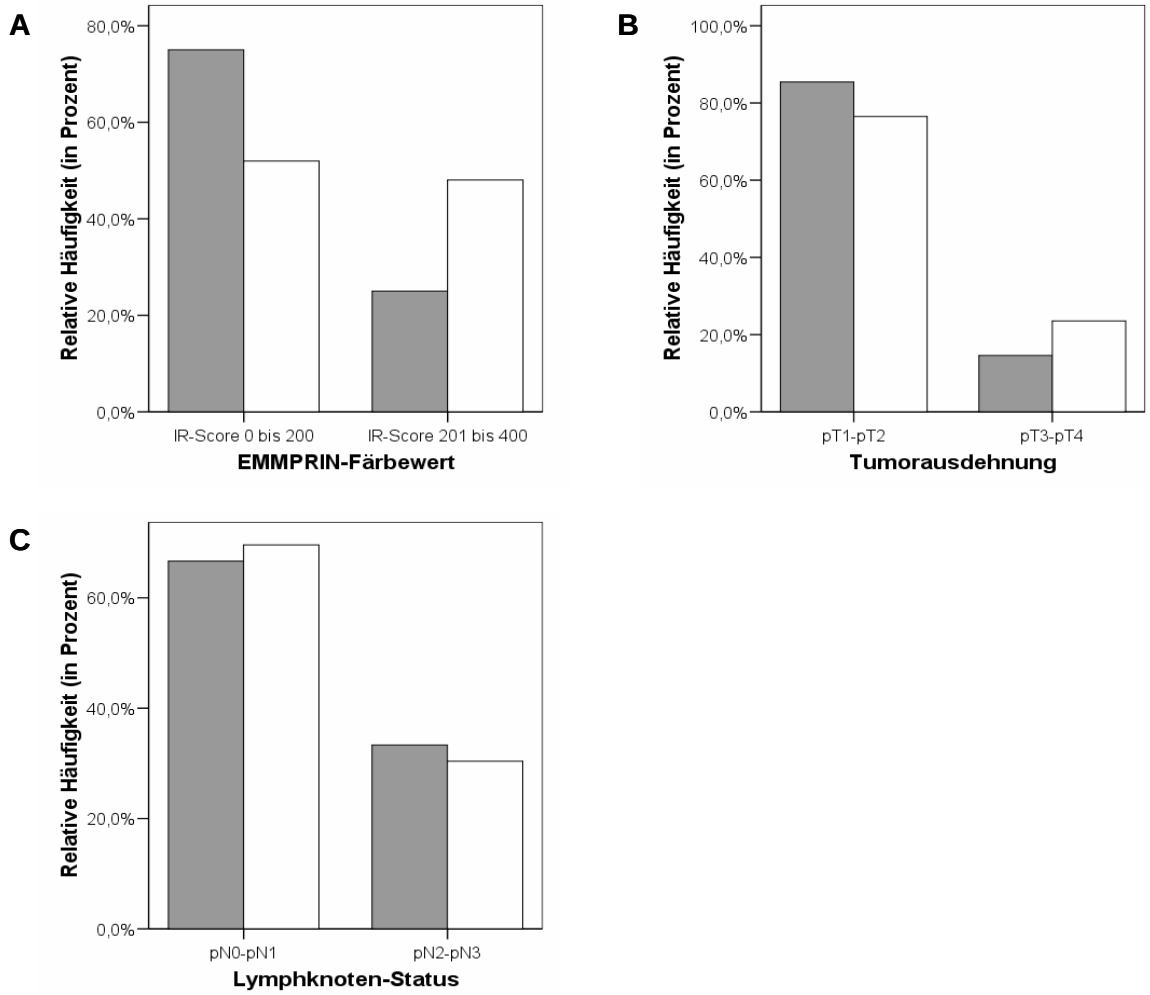

Abbildung 10. Zusammenhang zwischen EMMPRIN-Färbemuster und anderen Patientendaten
Die Lokalisation von EMMPRIN in der Zelle (grau zytoplasmatisch, weiß membranständig) wurde mit **(A)** dem EMMPRIN-Färbewert, **(B)** der Tumorausdehnung und **(C)** dem Lymphknotenstatus verglichen.

Tabelle 7. Patientencharakteristika und Tumorvariablen im Vergleich zum EMMPRIN-Färbemuster in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen

Variable	Patienten	EMMPRIN-Färbemuster [a]		*p*-Wert
		zytoplasmatisch	membranständig	
Total	150	48 (32,0%)	102 (68,0%)	
Tumor Ausdehnung				
pT1-pT2	119	41 (34,5%)	78 (65,5%)	
pT3-pT4	31	7 (22,6%)	24 (77,4%)	0,21
Lymphknotenbefall				
pN0 -pN1	103	32 (31,7%)	71 (69,0%)	
pN2-pN3	47	16 (34,0%)	31 (66,0%)	0,72
Tumorhistologie [c]				
Adenokarzinom	65	26 (40,0%)	39 (60,0%)	
Plattenepithelkarzinom	58	15 (25,9%)	43 (74,1%)	
Sonstige Tumoren	27	7 (25,9%)	20 (74,1%)	0,19
Grading [d]				
G1-2	66	22 (33,3%)	44 (66,7%)	
G3	56	18 (32,1%)	38 (67,9%)	0,89
Alter				
< 60 Jahre	74	20 (27,0%)	54 (73,0%)	
≥ 60 Jahre	76	28 (37,0%)	48 (63,0%)	0,20

[a] Das EMMPRIN Färbemuster wurde in zytoplasmatisch und membranständig aufgeteilt.
[b] Die p-Werte wurden mit dem Pearson's Chi-Quadrat Test erstellt, die unterstrichenen Werte waren signifikant.
[c] "Sonstige Tumoren" bezeichnet 12 gemischtzellige Tumore und 15 großzellige Karzinome.
[d] Großzelligen Karzinomen und gemischtzelligen Tumoren, sowie einem Plattenepithelkarzinom wurde kein Malignitätsgrad zugeordnet (28 Fälle).

3.4 EMMPRIN und Matrixmetalloproteinasen

Da EMMPRIN als Aktivator von Matrix-Metalloproteasen gilt, wurden die Daten der jetzigen Arbeit mit den bereits veröffentlichten Daten derselben Patienten zur Expression von MMP-2 und MMP-9 verglichen (Sienel, Hellers et al. 2003). Diese Analysen sollten zeigen, inwiefern eine Koexpression der Moleküle im Tumorgewebe zu finden ist. Für diese Anaslyse wurden die MMP-Daten neu ausgewertet, um sie vergleichbar mit den EMMPRIN-Daten zu machen. Um diesen Vergleich zu ermöglichen, wurde die MMP-Expression wie EMMPRIN in dieser Arbeit nach dem IR-Score in zwei Gruppen aufgeteilt: niedrige Expression (< 200 IR-Score) und hohe Expression (> 200 IR-Score, siehe Abbildung 11A für MMP-2 und 11B für MMP-9). Diese Färbungen zeigten, dass 57 Tumore (40,4%) eine hohe MMP-2 Expression (> 200 IR-Score) und 54 Tumore (43,9%) eine hohe MMP-9 Expression (> 200 IR-Score) aufwiesen. Die Beziehung zwischen der EMMPRIN-Expression (IR-Score) und der MMP-Expression wurde durch den Chi-Quadrat-Test ermittelt. Eine signifikante Ko-Expression von EMMPRIN

und einer der beiden MMP konnte nicht gezeigt werden. (siehe Abbildung 11C und 11D und Tabelle 8). Nachdem keine Korrelation zwischen der EMMPRIN-Expression und der MMP-Expression zu finden war, wurde das EMMPRIN-Färbmuster mit der Expression von den MMP verglichen. Die Analyse des EMMPRIN-Färbemuster zeigte, dass auf den Zellen mit membranständigem EMMPRIN häufiger MMP-2 und MMP-9 zu sehen war (siehe Abbildung 11 E+F). Es wurden jedoch keine signifikanten Zusammenhänge zwischen dem EMMPRIN-Färbemuster und der MMP-2 Expression (p=0,21), sowie der MMP-9 Expression (p=0,64), mit dem Chi-Quadrat Test ermittelt. (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8. EMMPRIN und die Koexpression von MMP-2 und MMP-9

Variable	Hohe MMP-2 Expression [b]	Hohe MMP-9 Expression [b]
Summe [a]	141 57 (40, 4%)	123 54 (43,9%)
Hohe EMMPRIN-Expression[b] (p-Wert[d])	0,63	0,15
Niedrige	33 (38,8%)	30 (39,0%)
Hohe	24 (42,9%)	24 (52,2%)
EMMPRIN-Färbemuster (p-Wert[d])	0,21	0,64
Zytoplasmatisch [c]	22 (47,8%)	21 (46,7%)
Membranständig [c]	35 (36,8%)	33 (42,3%)

[a] Die MMP-2 Expression wurde in 141 Tumoren untersucht, die MMP-9 Expression wurde in 123 Tumoren untersucht.

[b] Die Expression von EMMPRIN, MMP-2 and MMP-9 wurde nach dem IR-Score klassifiziert (niedrige Expression <200, hohe Expression ≥200).

[c] Das EMMPRIN-Färbemuster wurde in zytoplasmatische (bzw. überwiegend zytoplasmatische) und membranständige Färbung (bzw. überwiegend membranständige) eingeteilt.

[d] p-Werte wurde mit dem Pearson's Chi Quadrat Test errechnet.

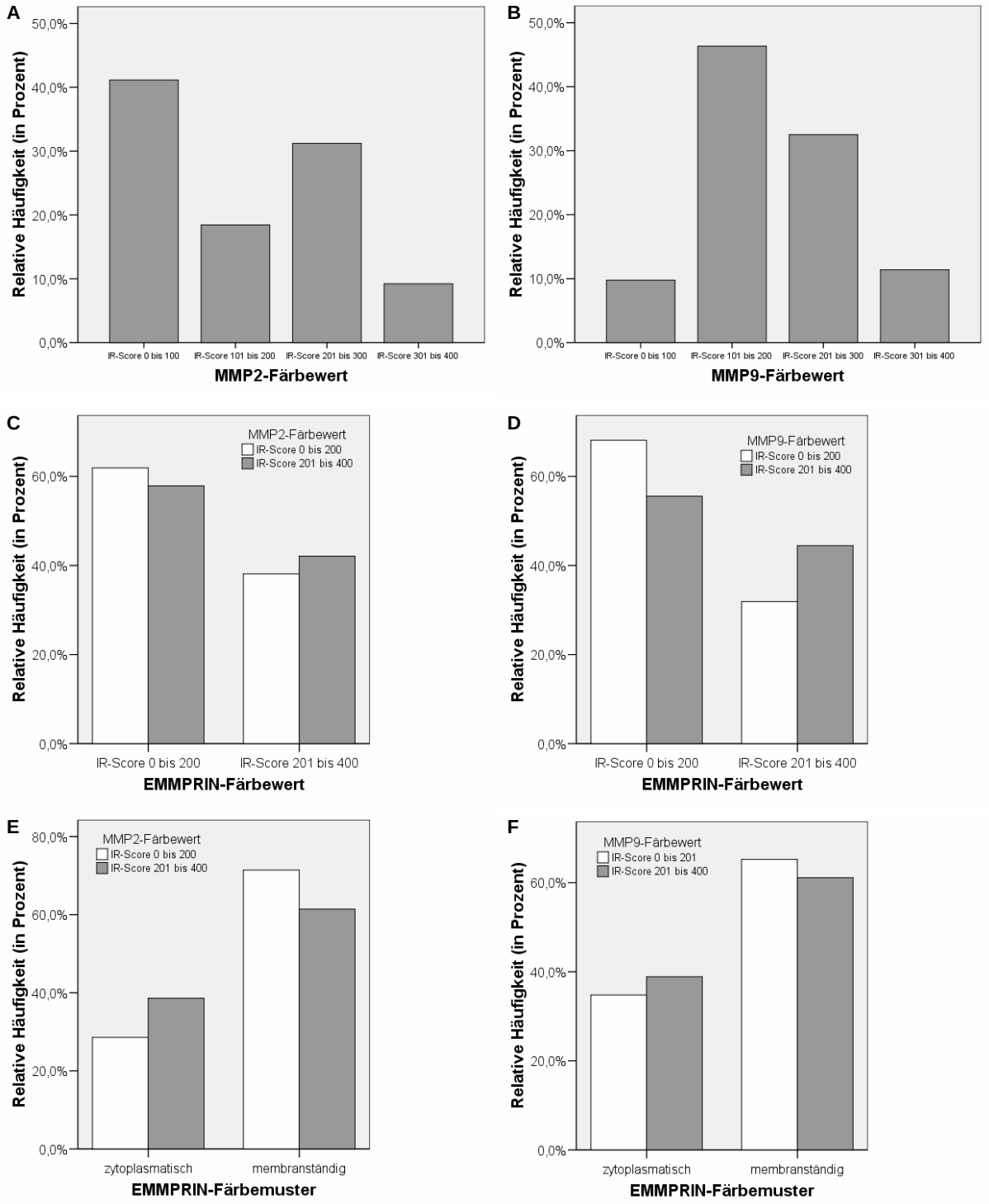

Abbildung 11. EMMPRIN und die Koexpression von MMP-2 und MMP-9
(A) IR-Score der MMP-2-Färbung des Patientenkollektivs. **(B)** IR-Score der MMP-9-Färbung des Patientenkollektivs. **(C)** Korrelation des EMMPRIN-Färbewertes mit der Expression von MMP-2. **(D)** Korrelation des EMMPRIN-Färbewertes mit der Expression von MMP-9. **(E)** Korrelation des EMMPRIN–Färbemusters mit der Expression von MMP-2 **(F)** Korrelation des EMMPRIN–Färbemusters mit der Expression von MMP-2 Koexpression von EMMPRIN mit MMP-2 und MMP-9.

3.5 Einfluss einer EMMPRIN-Epression auf den Krankheitsverlauf

3.5.1 EMMPRIN und Metastasierung

Der Einfluss von EMMPRIN auf den Verlauf der Krebserkrankung war der nächste Aspekt unserer Untersuchung. Der Vergleich zwischen dem EMMPRIN-Färbewert und einer Metastasierung des Tumors zeigte keine signifikante Korrelation. Die membranständige Lokalisation von EMMPRIN korreliert allerdings mit einem erneuten Tumorbefall (p=0,05, siehe Tabelle 9).

Tabelle 9. Assoziation zwischen EMMPRIN-Expression und klinischem Rezidiv

	Patienten	Patienten mit Lokalrezidiv oder Fernmetastasen im Verlauf [e]
Summe [a]	137	87 (63,0%)
EMMPRIN-Färbewert[b] (*p*-Wert[d])		0,73
Niedrige Expression	83	54 (63, 9%)
Hohe Expression	54	33 (61,1%)
EMMPRIN-Färbemuster (p-Wert[d])		0,05
Zytoplasmatisch [c]	44	23 (52,3%)
Membranständig [c]	93	63 (67,7%)

[a] Nicht-tumorassozierter Tod oder inkomplette Nachuntersuchung führten zum Ausschluss von 12 Patienten, so dass insgesamt 137 Patienten für die Analyse herangezogen wurden.
[b] Die Expression von EMMPRIN, MMP-2 and MMP-9 wurde nach dem IR-Score klassifiziert (niedrige Expression <200, hohe Expression ≥200).
[c] Das EMMPRIN-Färbemuster wurde in zytoplasmatische (bzw. überwiegend zytoplasmatische) und membranständige Färbung (bzw. überwiegend membranständige) eingeteilt.
[d] p-Werte wurden mit dem Logrank-Test ermittelt.
[e] Der Prozentsatz bezieht sich auf die Patientenanzahl in der zweiten Spalte.

3.5.2 Einfluss der EMMPRIN-Expression auf das Gesamtüberleben

Zur Ermittlung des prognostischen Einfluss von EMMPRIN auf das rezidivfreie Überleben der Patienten wurden sowohl der EMMPRIN-Färbewert, als auch das EMMPRIN-Färbemuster mit dem Überleben der Patienten verglichen. Die mediane Nachbeobachtungszeit nach dem operativen Eingriff der Patienten betrug 72 Monate (Spannweite zwischen 10 und 130 Monaten). Nicht-tumorassozierter Tod oder inkomplette Nachuntersuchung führte zum Ausschluss von 12 Patienten, so dass insgesamt 137 Patienten für die Analyse herangezogen wurden.

Zuerst wurde der Einfluss der EMMPRIN-Expression im Primärtumor (aufgeteilt nach dem IR-Score) und seine Beziehung zum Überleben der Patienten untersucht. Diese Auswertungen ergaben keine signifikanten Daten, wobei der Logrank-Test einen P-Wert von 0,86 ergab (siehe Abbildung 12A). In der univariaten Analyse der gesamten 137 Patienten

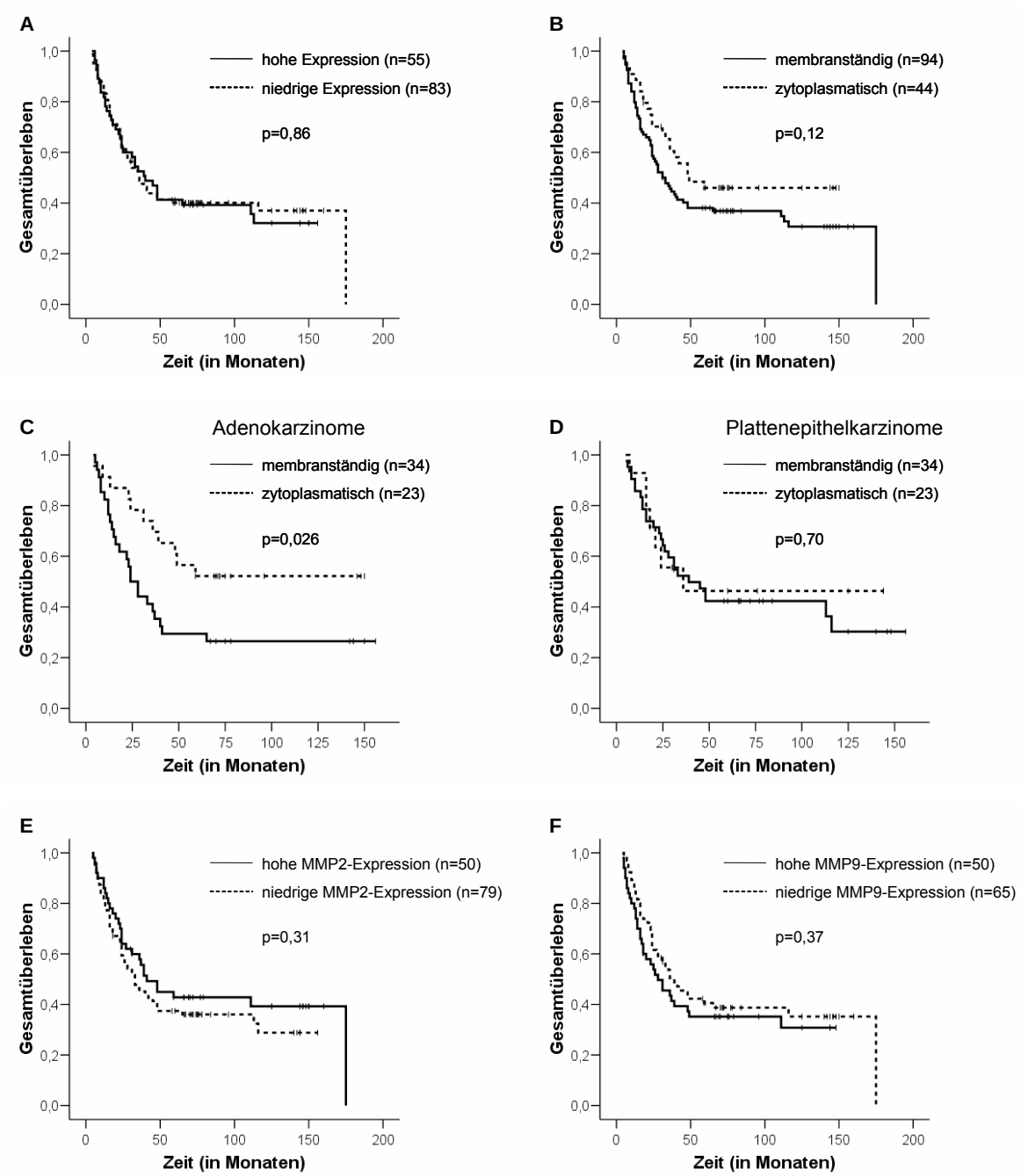

Abbildung 12. Univariate Überlebensanalyse des Gesamtkollektivs (n=137)
(A) Der EMMPRIN-Färbewert hatte keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten (p=0,86, logrank-Test), genauso wie **(B)** die Lokalisation von EMMPRIN in der Zelle (p=0,12, logrank-Test). **(C)** Bei der Überlebensanalyse der Patienten mit Adenokarzinom wurde eine Zusammenhang zwischen dem EMMPRIN-Färbemuster und dem Überleben sichtbar (p=0,026, logrank-Test), im Gegensatz zu Patienten mit **(D)** Plattenepithelkarzinomen (p=0,70, logrank-Test) oder anderen NSCLC (p=0,80, logrank-Test, Daten nicht gezeigt). Die Expression von **(E)** MMP-2 (p=0,31, logrank-Test) und **(F)** MMP-9 (p=0,37, logrank-Test) hatte keinen Einfluss auf das Überleben der Patienten.

zeigte sich ein tendenzieller Zusammenhang zwischen einer membranständigen EMMPRIN-Lokalisation und einem ungünstigen Verlauf der Tumorerkrankung (siehe Abbildung 12B). Bei Patienten mit membranständiger EMMPRIN Lokalisation zeigte sich eine Tendenz hin zu einem reduzierten Überleben (p=0,12; Logrank-Test, siehe Abbildung 12B). Bei der Analyse der Überlebensdaten der einzelnen Tumortypen ergaben sich relevante Zusammenhänge (siehe Tabelle 10). Adenokarzinom-Patienten mit einer membranständigen Expression von EMMPRIN zeigten ein schlechteres Gesamtüberleben (p=0,026, siehe Abbildung 12C) im Vergleich zu den anderen Tumortypen (Plattenepithelkarzinome p=0,70, Abbildung 12D, sonstige Tumoren p=0,80). Die Expression von MMP-2 und MMP-9 hatte keinen signifikanten Effekt auf das Überleben der Patienten (siehe Abbildung 12E+F).

3.5.3 Einfluss der EMMPRIN-Expression in frühen Stadien des NSCLC

Als nächstes wurde untersucht, ob EMMPRIN bei Patienten mit einem frühen Krankenstadium (keine oder nur lokale Lymphknoten-Metastasierung) prognostischen Wert besitzt. Bei Patienten der Stadien pN0 und pN1 war das EMMPRIN-Färbemuster signifikant mit einem schlechteren Überleben korreliert (p=0,037, Abbildung 13B und Tabelle 10). Auch für das Patientenalter war ein signifikanter Wert von 0,03 zu sehen (siehe Tabelle 10). Die Auswertung der anderen Werte ergab keinen Einfluss auf das Überleben der Patienten (siehe Tabelle 10).

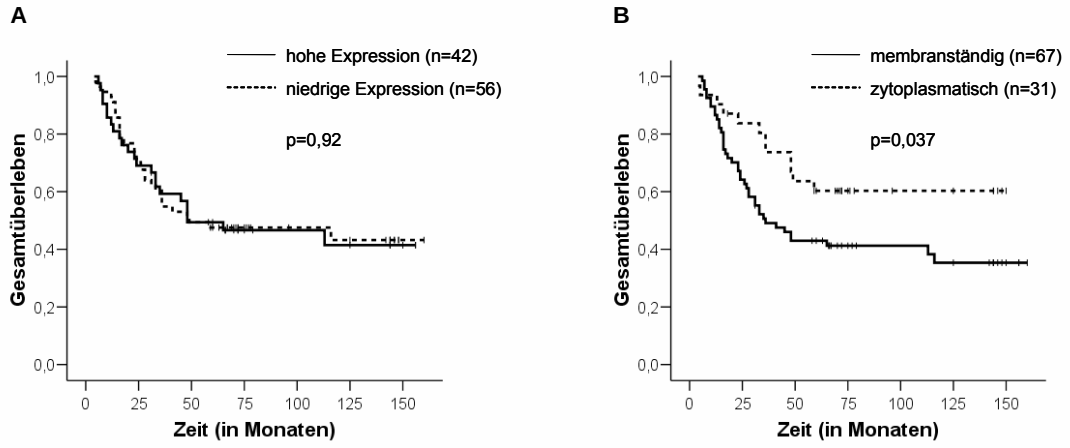

Abbildung 13. Korrelation der EMMPRIN-Expression und EMMPRIN-Färbmuster mit dem Überleben des pN0-pN1 Kollektiv (n=98)
(A) Der EMMPRIN-Färbewert hatte keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten mit frühen Tumorstadien (N0-N1, p=0,92, logrank-Test). **(B)** Dagegen war eine membranständige Expression von EMMPRIN mit einem deutlich schlechteren Überleben assoziiert (p=0,037, logrank-Test)

Tabelle 10. Univariate Analysen zu den pN0-pN1 Patienten

Risikofaktor	Univariate Analyse

	eingeschlossene Patienten[a]	P-Wert [b]
Membranständiges EMMPRIN	98	0,04
Hoher EMMPRIN-Färbewert [c]	98	0,92
pT3-pT4	98	0,13
G3-4	83	0,58
Tumorhistologie	98	0,86
Alter ≥ 60 Jahre	98	0,03
Hohe MMP-2 Expression [c]	92	0,29
Hohe MMP-9 Expression [c]	80	0,76

[a] Nicht-tumorassozierter Tod oder inkomplette Nachuntersuchung führten zum Ausschluss von 5 Patienten, so dass je nach Parameter bis zu 98 Patienten für die Analyse herangezogen wurden.
[b] P-Werte wurde mit dem Logrank-Test ermittelt.
[c] Die Expression von EMMPRIN, MMP-2 and MMP-9 wurde nach dem IR-Score klassifiziert (niedrige Expression <200, hohe Expression ≥200).

Danach wurde der Einfluss der EMMPRIN-Lokalisation durch eine multivariate Analyse (Cox-Regression) und das relative Risiko weiter untersucht. Mit Hilfe dieses Verfahrens konnte man bestimmen, ob die getesteten Variablen, die die Überlebenswahrscheinlichkeit beeinflussen unabhängig voneinander waren. Nur 63 Patienten konnten bei der multivariaten Analyse eingeschlossen werden, da sowohl Grading, als auch Daten aus der MMP-9 Färbung bei einigen Patienten fehlten. Die Analyse zeigte, dass eine membranständige Expression von EMMPRIN einen unabhängigen Risikofaktor für das untersuchte Kollektiv darstellt (p=0,01, relatives Risiko 3,0). Auch ein Alter über 60 Jahre hatte einen unabhängigen Einfluss auf das Überleben (p=0,01, relatives Risiko 2,2). Überraschenderweise war in diesem Teilkollektiv eine hohe Expression von MMP-2 protektiv und verlängerte das Überleben der Patienten (p=0,04, relatives Risiko 0,46). Unter Ausschluss von Grading und MMP-9 Expression wurde die multivariate Analyse an einem größeren Teil des Kollektivs von 92 Patienten erneut durchgeführt. Auch hier waren EMMPRIN-Färbemuster und Alter die einzig unabhängigen Risikofaktoren im multivariaten Modell (p=0,02, relatives Risiko 2,2, siehe Tabelle 11).

Tabelle 11. Multivariate Analyse von pN0-pN1 Patienten

Risikofaktor	Multivariate Analyse (n=63) [a]		Multivariate Analyse (n=92) [b]	
	Relatives Risiko	*p* Wert [c]	Relatives Risiko	*p* Wert [c]

	(95% KI)		(95% KI)	
Membranständiges EMMPRIN	3,0 (1,3 – 6,9)	0,01	2,2 (1,1 – 4,4)	0,02
Hoher EMMPRIN-Färbewert [d]	---[e]	0,84	---[e]	0,76
pT3-pT4	---[e]	0,74	---[e]	0,44
G3-4[c]	---[e]	0,90	nicht durchgeführt	
Tumorhistologie	---[e]	0,40	---[e]	0,86
Alter. ≥ 60 Jahre	2,6 (1,3 – 5,4)	0,01	1,8 (1,0 – 3,2)	0,04
Hohe MMP-2 Expression [d]	0,46 (0,22 – 0,92)	0,03	---[e]	0,61
Hohe MMP-9 Expression [d]	---[e]	0,83	nicht durchgeführt	

[a] Die schrittweise multivariate Analyse wurde mit dem Cox-Regressionsmodell berechnet. Aufgrund von fehlenden Daten zu Grading, MMP-2 und MMP-9 Expression wurde die Analyse nur mit 63 Patienten durchgeführt.

[b] Die schrittweise multivariate Analyse wurde mit dem Cox-Regressionsmodell berechnet. Aufgrund von fehlenden Daten zur MMP-2 Expression wurde die Analyse nur mit 92 Patienten durchgeführt. Grading und MMP-9 Expression wurden nicht in das Modell integriert.

[c] Signifikante p-Werte wurden unterstrichen.

[d] Die Expression von EMMPRIN, MMP-2 and MMP-9 wurde nach dem IR-Score klassifiziert (niedrige Expression <200, hohe Expression ≥200).

[e] Es wurde kein Wert für das relative Risiko angegeben, wenn die Variabel nicht signifikant in der multivariaten Analyse war.

4 Diskussion

In dieser Studie konnten wir zeigen, dass die membranständige Expression von EMMPRIN einen unabhängigen Risikofaktor in frühen Stadien des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms darstellt. Im Gegensatz zu unseren Erwartungen scheint diese prognostische Aussagekraft im untersuchten Kollektiv von 150 Patienten unabhängig von der Rolle als induzierendes Molekül von Matrix-Metalloproteinasen zu sein. Die Stärke der EMMPRIN-Expression zeigte keine Korrelation mit der Expression von MMP-2 und MMP-9 oder anderen Patientendaten. Stattdessen zeigte sich, dass Patienten in frühen Stadien der Erkrankung (d. h. kein Nachweis von LK-Metastasen oder lediglich ein Nachweis von lokalen LK-Metastasen, N0-N1) mit einer membranständigen EMMPRIN-Expression ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben aufweisen als Patienten mit zytoplasmatischer Lokalisation der EMMPRIN-Expression. In der multivariaten Analyse war das EMMPRIN-Färbemuster der stärkste Indikator für eine schlechte Überlebensprognose bei Patienten mit den LK-Stadien N0 und N1 – unabhängig von Tumorgröße, Grading, Tumorsubtyp, Patientenalter und MMP-Expression.

Viele Studien der letzten Jahre zielten darauf ab, die Prognose eines Patienten über die Aussagekraft des TNM-Stagings hinaus mithilfe molekularer Untersuchungsmethoden besser abschätzen zu können. Diese Analysen könnten dabei helfen, jene Patienten mit NSCLC zu selektieren, die von einer weitergehenden Therapie profitieren (Jones, Daniel et al. 2006; Molina, Nikcevich et al. 2006). Außerdem könnten die auf diese Weise erlangten Erkenntnisse zur Entwicklung neuer Behandlungsmethoden beitragen. Immer wieder wurde die Rolle von Proteasen bei der Entstehung von Tumoren und Metastasen untersucht. Die daraus resultierenden Ansatzpunkte für neue adjuvante Therapien rückten dabei in den letzten 30 Jahren verstärkt in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses. Aufgrund starker Nebenwirkungen in klinischen Studien erzielten synthetische MMP-Inhibitoren allerdings keinen großen Durchbruch (van der Jagt, Sweep et al. 2006). So wurde unter anderem versucht, die Überproduktion der MMP in Tumoren durch EMMPRIN zu beeinflussen (Sun and Hemler 2001; Yan, Zucker et al. 2005).

In einzelnen disseminierten Tumorzellen aus Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom und Prostatakarzinom konnte mit einer Genexpressionsanalyse gezeigt werden, dass EMMPRIN mRNA zu 60% in den Arrayanalysen und in 80% der Patientenzellen exprimiert wird und somit EMMPRIN das am häufigsten exprimierte Genprodukt dieser Zellen darstellt (Klein, Seidl et al. 2002). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von EMMPRIN in den Primärtumoren von nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen untersucht.

Die Ergebnisse unserer Studie basieren auf der Proteinexpression von EMMPRIN in Paraffin-eingebetteten primären Tumorschnitten. Da sich die Bedingungen bei der Färbung

von Paraffinschnitten von denen bei der Färbung von frischem Gewebe unterscheiden, konnte die in der Arbeitsgruppe von Dr. Horejsi etablierte Färbung mit den monoklonalen EMMPRIN-Antikörpern M6/1-11 nicht für die vorliegende Arbeit verwendet werden (Koch, Staffler et al. 1999; Klein, Seidl et al. 2002). Aus diesem Grund verwendeten wir den monoklonalen Antikörper HIM6, welcher sich in Studien der Arbeitsgruppe um T. C. Major zur Differenzierung von Monozyten und der EMMPRIN-Expression bei Atherompatienten als paraffingängig erwiesen hatte (Major, Liang et al. 2002).

In unserem Kollektiv von Bronchialkarzinomen zeigte sich eine spezifische EMMPRIN-Färbung in 95% aller Primärtumoren und eine angedeutete Abhängigkeit der EMMPRIN-Expression vom Tumortyp. Die meisten Plattenepithelkarzinome (hohe Expression 51,7%) zeigten eine starke EMMPRIN-Expression. Hingegen wiesen Adenokarzinome (hohe Expression 30,8%) und sonstige Tumore (hohe Expression 40,7%) häufiger eine schwache EMMPRIN-Expression auf. Andere Faktoren zeigten keine Assoziation mit der EMMPRIN-Expression.

Die EMMPRIN-Expression in primärem Lungenkarzinomgewebe wurde in der Literatur von Kataoka dargestellt (Kataoka, Itoh et al. 1993). In darauf folgenden Arbeiten wurde die Interaktion von EMMPRIN mit dem umliegenden Gewebe für verschiedene Tumortypen intensiver untersucht. Daraus ergab sich, dass EMMPRIN nicht nur die Produktion von interstitieller Kollagenase (MMP-1) stimuliert, sondern auch einen Komplex mit MMP-1 bildet (Guo, Li et al. 2000). Die klinische Bedeutung von EMMPRIN bei der Tumorprogression wurde erst in den letzten Jahren näher betrachtet. Eine der ersten Studien dazu untersuchte die Expression von EMMPRIN-mRNA in Lungen- und Brustkrebs. Dabei konnte in 18 von 22 Lungenkarzinomen mRNA von EMMPRIN nachgewiesen werden (Polette, Gilles et al. 1997). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass EMMPRIN als Aktivator von MMP eine zentrale Bedeutung während der Tumorprogression in Bronchialkarzinomen zukommen könnte. Die EMMPRIN-Expression wurde auch von Caudroy in Bronchialkarzinom und Mammakarzinom gezeigt (Caudroy, Polette et al. 1999). In einer Tissue-Microarray-Studie wurden Plattenepithelkarzinome verschiedener Tumoren untersucht; in der Lunge zeigten über 50% (58,1%) der Tumorzellen eine EMMPRIN-Expression auf (Riethdorf, Reimers et al. 2006). Die folgende Tabelle gibt einen Überblick zur Expression von EMMPRIN in anderen Tumorarten.

Tabelle 12. EMMPRIN-Expression in unterschiedlichen Tumoren

Studie	Tumortyp	EMMPRIN-Färbung	Kommentar
Davidson et al., 2003	Mammakarzinom	Erhöhte EMMPRIN-Expression (1) im Primärtumor 27/ 68 (40%) und (2) bei Tumorzellen aus Pleuraergüssen 29/49 (59%)	Assoziation der erhöhten EMMPRIN-Expression mit einer schlechten Prognose
Reimers et al., 2004	Mammakarzinom	Positive Färbung in 57% der Tumoren (439/774); IR-Score positiv bei 49,8% der untersuchten Zellen	Assoziation der erhöhten EMMPRIN-Expression mit einer schlechten Prognose
Li et al., 2005	Hepatozelluläres Karzinom (HCC)	Positive Färbung in 55% (28/51) der Tumoren	EMMPRIN-Expression in 50% der nicht-tumorösen Gewebe
Rosenthal et al., 2003	Kehlkopfkarzinom	Intensive Tumorfärbung in 37% (13/35) der Tumoren	EMMPRIN-Expression ist mit dem Lymphknotenbefall und einem schlechten Überleben der Patienten assoziiert
Vigneswaran et al., 2006	Karzinome der Mundhöhle	Über 90% der Tumorzellen waren EMMPRIN-positiv	EMMPRIN-Expression in frühe Stadien der Tumoren

Trotz der vielen Arbeiten über EMMPRIN konnte die Funktion des Moleküls noch nicht vollständig geklärt werden. Die bisherigen Studien von Rosenthal und seiner Gruppe zeigten jedoch, dass EMMPRIN erst an der Zelloberfläche biologisch aktiv wird, weshalb immunhistochemische Färbungen gegen EMMPRIN nach der Lokalisation des Moleküls in membranständige Färbung und zytoplasmatische Färbung eingeteilt werden können. Die biologische Relevanz dieser Einteilung konnte an einem Patientenkollektiv mit Kehlkopfkarzinom gezeigt werden. Patienten mit membranständigem EMMPRIN wiesen eine höhere Mortalität auf als Patienten mit zytoplasmatischem EMMPRIN (Rosenthal, Shreenivas et al. 2003). Mehr als zwei Drittel der NSCLC-Tumoren hatten ein membranständiges EMMPRIN-Färbemuster. Beim weiteren Vergleich von EMMPRIN-Färbemuster und klinischen Daten des Gesamtkollektivs, konnten keine signifikanten Zusammenhänge gesehen werden. Allerdings zeigte sich eine Tendenz zwischen dem EMMPRIN-Färbemuster und der Histologie der untersuchten Tumoren. Die Plattenepithelkarzinome und sonstige Tumore zeigten ein membranständiges Färbemuster in 74,1% der Tumoren, während bei Adenokarzinomen nur 60% ein membranständiges Färbemuster aufwiesen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die EMMPRIN-Expression der Primärtumoren von nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen mit den verschiedenen klinischen und pathologischen Parametern des gesamten Patientenkollektivs verglichen. So fanden wir, dass die

membranständige Expression von EMMPRIN die Abschätzung der Prognose von Patienten mit NSCLC ermöglicht. Dies wurde schon für Plattenepithelialkarzinome des Ösophagus gezeigt, bei denen eine membranständige EMMPRIN-Expression mit einer höhern Mortalität korreliert ist (Ishibashi, Matsumoto et al. 2004). Dies deutet darauf hin, dass sich die Progression von unterschiedlichen Karzinomen in einer veränderten Expression von EMMPRIN widerspiegeln kann (Riethdorf, Reimers et al. 2006).

In einer früheren Arbeit der Arbeitsgruppe von Zucker und Toole konnte gezeigt werden, dass es in Patienten mit Bronchial- und Mammakarzinomen einen Zusammenhang zwischen der Expression von EMMPRIN und der von MMP-2 gibt (Caudroy, Polette et al. 2002), was als Anzeichen für Tumorinitiierung und Neoangiogenese gedeutet wurde. Da EMMPRIN als Aktivator der Matrixmetalloproteinasen gilt, lag die Fragestellung nahe, ob sich auch im hier untersuchten Kollektiv eine Korrelation zwischen der EMMPRIN-Expression und der MMP-Expression beobachten lässt. In früheren Studien wurde ein Teil der von uns untersuchten Tumore auf ihre Expression von MMP-2 und MMP-9 hin untersucht. In diesen Studien wurde eine Assoziation zwischen den Tumorparametern und der Expression der beiden MMP beobachete (Passlick, Sienel et al. 2000; Sienel, Hellers et al. 2003). In der vorliegenden Studie zeigte sich jedoch keine signifikante Korrelation zwischen der Expression von EMMPRIN oder der Lokalisation von EMMPRIN in der Tumorzelle mit der Expression von MMP-2 und MMP-9. Möglicherweise ist dies darauf zurückzuführen, dass lediglich eine Subgruppe der ursprünglich auf die Expression der MMP hin untersuchten Patienten in die vorliegende Studie einbezogen werden konnte.

Während die Expressionsstärke von EMMPRIN im Primärtumor nicht mit einem Rezidiv der Tumorerkrankung (lokal oder als Fernmetastasen) assoziiert war, konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen membranständiger Lokalisation von EMMPRIN und einem Rezidiv beobachtet werden. Univariate Analysen zeigten, dass für das Gesamtkollektiv der Patienten ein Zusammenhang zwischen guter Prognose und geringem Lymphknotenbefall (pN0-pN1), kleinem Primärtumor (pT1-pT2) und hohem Alter (über 60 Jahre) bestand. Diese Beobachtungen wurden auch von der Arbeitsgruppe von Klaus Pantel an einem Kollektiv von Mammakarzinom-Patienten gezeigt, in dem ein Zusammenhang zwischen der EMMPRIN-Expression und dem Progress der Krebserkrankung festgestellt werden konnte (Reimers, Zafrakas et al. 2004), sowie für ein Kollektiv von Patienten mit Ösophaguskarzinom (Ishibashi, Matsumoto et al. 2004). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, das EMMPRIN vor allem in aggressiven Tumoren bereits früh eine Rolle bei der Tumorprogression spielen könnte. In Ösophaguskarzinomen wurde separat von EMMPRIN auch der prognostische Wert von MMP-2 untersucht, der keine Korrelation aufzeigte (Ishibashi, Matsumoto et al. 2004). Somit unterstützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für nicht-kleinzellige

Bronchialkarzinome die Hypothese von Ishibashi, dass EMMPRIN neben anderen Parametern einen zusätzlichen Marker zur Abschätzung der Prognose darstellen könnte.
Um die Ergebnisse der univariaten Analysen zu bekräftigen, wurde abschließend eine multivariate Cox-Regressionsanalyse durchgeführt. Hier bestätigte sich die Bedeutung der Lokalisation von EMMPRIN (p=0,02) und des Alters (p=0,04) als unabhängige Prognoseparameter. Eine membranständige Lokalisation von EMMPRIN ist im untersuchten Kollektiv mit einem erhöhten relativen Risiko von 2,2 für den Patienten verbunden, während dem Alter ein relatives Risiko von 1,8 zugeschrieben wurde. Das bedeutet, dass die Patienten mit geringem Lymphknotenbefall, einem Alter über 60 Jahre, mit einer membranständigen EMMPRIN-Expression ein mehr als doppelt so hohes Mortalitätsrisiko haben wie Patienten mit zytoplasmatisch angefärbten Tumoren.
Die erwartete Koexpression von EMMPRIN mit Matrix-Metalloproteinasen (Passlick, Sienel et al. 2000; Sienel, Hellers et al. 2003) und eine damit verbundene Aktivierung der MMP im untersuchten Gewebe konnten von uns nicht bestätigt werden. Eine Lokalisation an der Membran weist auf eine Interaktion der extrazellulären Domäne von EMMPRIN mit Rezeptoren des umliegenden Gewebes hin (Guo, Li et al. 2000; Nabeshima, Suzumiya et al. 2004). Außer der MMP-Induktion gibt es noch eine Reihe anderer Funktionen von EMMPRIN, die an der Tumorentwicklung beteiligt sein könnten. Diese Resultate könnte man durch die Interaktion von EMMPRIN mit anderen Molekülen, wie zum Beispiel Hyaluronan (Misra, Ghatak et al. 2003; Marieb, Zoltan-Jones et al. 2004; Yang, O'Neill et al. 2006), VEGF (Tang, Kesavan et al. 2004), Cyclophiline A (Yurchenko, Zybarth et al. 2002) oder dem Monocarboxylat-Transporter (MCT) (Deora, Philp et al. 2005) erklären. Diese und andere Mechanismen wie erhöhte Zellmotilität, die im Zuge der Tumorprogression auftreten, sind mit einem erhöhten Glucosetransport über die Zellmembran und einer aeroben und/oder anaeroben zellulären Ausscheidung von Lactat assoziiert (Walenta, Schroeder et al. 2004). EMMPRIN scheint dabei für den polarisierten Transport von MCT an die Zellmembran benötigt zu werden und für die Funktionsfähigkeit von MCT essentiell zu sein (Ladanyi, Antonescu et al. 2002). Die Interaktion von EMMPRIN und MCT könnte somit eine Voraussetzung für die metabolische Homöostase von Tumorzellen in sauerstoffarmem, saurem Gewebe sein (Enerson and Drewes 2003; Deora, Philp et al. 2005).

5 Zusammenfassung

Das komplexe Wechselspiel von Krebszellen und anderen Zellen des Körpers ist weitgehend unverstanden. Erste Einsichten brachte die Erforschung der Tumorangiogenese und der Tumorinvasion. Hier zeigte sich, dass Tumorzellen selbst einerseits proteolytische Systeme wie die Matrix-Metalloproteasen (MMP) aktivieren, um die Extrazelluläre Matrix (ECM) abzubauen und zu migrieren, sich andererseits aber auch andere Zellen des Körpers bei diesen Prozessen zunutze machen. So wurde gefunden, dass sie durch das Protein EMMPRIN in der Lage sind, die Expression von MMP in Stromazellen zu induzieren. EMMPRIN erwies sich in der Folge als ein Molekül mit weiteren Funktionen über die Induktion von MMP hinaus. Ziel der vorliegenden Arbeit war zu untersuchen, ob die Expression von EMMPRIN in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC) einen Einfluss auf das Überleben der Patienten hat.

Zu diesem Zweck wurden in Paraffin-eingebetteten Gewebeproben von 150 Patienten mit einem Anti-EMMPRIN Antikörper (HIM6) immunhistologisch gefärbt. Bei der Auswertung wurde für jeden Tumor zunächst ein Färbewert ermittelt, der aus dem Produkt der Färbeintensität und dem Anteil der gefärbten Tumorzellen generiert wurde. Ebenso wurde festgehalten, ob die EMMPRIN-Färbung überwiegend membranständig oder zytoplasmatisch lokalisiert war. Die Färbeergebnisse wurden mit klinischen Parametern korreliert, um die Bedeutung von EMMPRIN auf den Verlauf der Erkrankung und das Überleben der Patienten zu überprüfen. Um den Einfluss von EMMPRIN auf MMP zu untersuchen, wurde zusätzlich die Expression von MMP-2 und MMP-9 mit der EMMPRIN-Expression in den Primärtumoren verglichen.

Im untersuchten Kollektiv zeigte sich eine spezifische EMMPRIN-Färbung in 95% aller Primärtumoren. Die ermittelten Färbewerte konnten mit keinem klinischen Faktor und auch nicht mit der Expression von MMP-2 oder MMP-9 in Zusammenhang gebracht werden. Allerdings fand sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen membranständiger Lokalisation von EMMPRIN und der Entwicklung eines Rezidivs. In univariaten Analysen der Subgruppe der Patienten mit geringem Lymphknotenbefall (pN0-pN1) ergab sich, dass Patienten über 60 Jahren und mit einem membranständigen EMMPRIN-Färbemuster ein schlechteres Überleben hatten. Die multivariate Cox-Regressionsanalyse zeigte, dass Patienten mit geringem Lymphknotenbefall mit einer membranständigen EMMPRIN-Expression ein mehr als doppelt so hohes Mortalitätsrisiko hatten als Patienten mit zytoplasmatisch gefärbten Tumoren.

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals, dass eine membranständige EMMPRIN-Lokalisation einen unabhängigen Vorhersagewert für ungünstige Krankheitsverläufe bei frühen nicht–kleinzelligen Bronchialkarzinomen darstellt. Da sich kein Zusammenhang zwischen der membranständigen EMMPRIN Expression und der Expression von MMP-2 oder MMP-9 fand, ist momentan offen, durch welche Funktion von EMMPRIN dieser Effekt ausgelöst wird.

6 Literaturverzeichnis

Berditchevski, F., S. Chang, et al. (1997). "Generation of monoclonal antibodies to integrin-associated proteins. Evidence that alpha3beta1 complexes with EMMPRIN/basigin/OX47/M6." J Biol Chem **272**(46): 29174-80.

Biswas, C., Y. Zhang, et al. (1995). "The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily." Cancer Res **55**(2): 434-9.

Boffetta, P., G. Pershagen, et al. (1999). "Cigar and pipe smoking and lung cancer risk: a multicenter study from Europe." J Natl Cancer Inst **91**(8): 697-701.

Bradley, J. A., P. Gibbs, et al. (2003). "Update in transplantation--2003." Clin Transpl: 307-36.

Caudroy, S., M. Polette, et al. (2002). "EMMPRIN-mediated MMP regulation in tumor and endothelial cells." Clin Exp Metastasis **19**(8): 697-702.

Caudroy, S., M. Polette, et al. (1999). "Expression of the extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and the matrix metalloproteinase-2 in bronchopulmonary and breast lesions." J Histochem Cytochem **47**(12): 1575-80.

Davidson, B., I. Goldberg, et al. (2003). "EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) is a novel marker of poor outcome in serous ovarian carcinoma." Clin Exp Metastasis **20**(2): 161-9.

DeCastro, R., Y. Zhang, et al. (1996). "Human keratinocytes express EMMPRIN, an extracellular matrix metalloproteinase inducer." J Invest Dermatol **106**(6): 1260-5.

Deora, A. A., N. Philp, et al. (2005). "Mechanisms regulating tissue-specific polarity of monocarboxylate transporters and their chaperone CD147 in kidney and retinal epithelia." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(45): 16245-50.

Doerr, S. (1983). Pathologie der Lunge, Uehlinger,Springer.

Enerson, B. E. and L. R. Drewes (2003). "Molecular features, regulation, and function of monocarboxylate transporters: implications for drug delivery." J Pharm Sci **92**(8): 1531-44.

Greenlee, R. T., T. Murray, et al. (2000). "Cancer statistics, 2000." CA Cancer J Clin **50**(1): 7-33.

Guo, H., R. Li, et al. (2000). "EMMPRIN (CD147), an inducer of matrix metalloproteinase synthesis, also binds interstitial collagenase to the tumor cell surface." Cancer Res **60**(4): 888-91.

Guo, H., S. Zucker, et al. (1997). "Stimulation of matrix metalloproteinase production by recombinant extracellular matrix metalloproteinase inducer from transfected Chinese hamster ovary cells." J Biol Chem **272**(1): 24-7.

Haseneen, N. A., G. G. Vaday, et al. (2003). "Mechanical stretch induces MMP-2 release and activation in lung endothelium: role of EMMPRIN." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **284**(3): L541-7.

Hauck (2003). Manual: Tumoren der Lunge und des Mediastinums. T. München. München, W. Zuckschwerdt Verlag.

Häußlinger (2003). Manual: Tumoren der Lunge und des Mediastinums. T. München. München, W. Zuckschwerdt Verlag.

Hojilla, C. V., F. F. Mohammed, et al. (2003). "Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors direct cell fate during cancer development." Br J Cancer **89**(10): 1817-21.

Howe, H. L., P. A. Wingo, et al. (2001). "Annual report to the nation on the status of cancer (1973 through 1998), featuring cancers with recent increasing trends." J Natl Cancer Inst **93**(11): 824-42.

Ishibashi, Y., T. Matsumoto, et al. (2004). "CD147 and matrix metalloproteinase-2 protein expression as significant prognostic factors in esophageal squamous cell carcinoma." Cancer **101**(9): 1994-2000.

Janssen-Heijnen, M. L., G. Gatta, et al. (1998). "Variation in survival of patients with lung cancer in Europe, 1985-1989." Eur J Cancer **34**(14): 2191-2196.

Jöckel, K. H. (2000). "Gesundheitsrisiken durch Passivrauchen." Dtsch Ärztebl **43**: 2417-2422.

Jones, D. R., T. M. Daniel, et al. (2006). "Stage IB nonsmall cell lung cancers: are they all the same?" Ann Thorac Surg **81**(6): 1958-62; discussion 1962.

Kasinrerk, W., E. Fiebiger, et al. (1992). "Human leukocyte activation antigen M6, a member of the Ig superfamily, is the species homologue of rat OX-47, mouse basigin, and chicken HT7 molecule." J Immunol **149**(3): 847-54.

Kataoka, H., H. Itoh, et al. (1993). "Establishment and characterization of a human lung adenocarcinoma cell line (LC-2/ad) producing alpha 1-antitrypsin in vitro." Acta Pathol Jpn **43**(10): 566-73.

Klein, C. A. (2003). "The systemic progression of human cancer: a focus on the individual disseminated cancer cell--the unit of selection." Adv Cancer Res **89**: 35-67.

Klein, C. A., T. J. Blankenstein, et al. (2002). "Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer." Lancet **360**(9334): 683-9.

Klein, C. A., S. Seidl, et al. (2002). "Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells." Nat Biotechnol **20**(4): 387-92.

Koch, C., G. Staffler, et al. (1999). "T cell activation-associated epitopes of CD147 in regulation of the T cell response, and their definition by antibody affinity and antigen density." Int Immunol **11**(5): 777-86.

Ladanyi, M., C. R. Antonescu, et al. (2002). "The precrystalline cytoplasmic granules of alveolar soft part sarcoma contain monocarboxylate transporter 1 and CD147." Am J Pathol **160**(4): 1215-21.

Leeman, M. F., S. Curran, et al. (2003). "New insights into the roles of matrix metalloproteinases in colorectal cancer development and progression." J Pathol **201**(4): 528-34.

Levi, F., F. Lucchini, et al. (1999). "Worldwide patterns of cancer mortality, 1990-1994." Eur J Cancer Prev **8**(5): 381-400.

Levicar, N., R. K. Nuttall, et al. (2003). "Proteases in brain tumour progression." Acta Neurochir (Wien) **145**(9): 825-38.

Li, R., L. Huang, et al. (2001). "Basigin (murine EMMPRIN) stimulates matrix metalloproteinase production by fibroblasts." J Cell Physiol **186**(3): 371-9.

Lim, M., T. Martinez, et al. (1998). "Tumor-derived EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) stimulates collagenase transcription through MAPK p38." FEBS Lett **441**(1): 88-92.

Major, T. C., L. Liang, et al. (2002). "Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) is induced upon monocyte differentiation and is expressed in human atheroma." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(7): 1200-7.

Marieb, E. A., A. Zoltan-Jones, et al. (2004). "Emmprin promotes anchorage-independent growth in human mammary carcinoma cells by stimulating hyaluronan production." Cancer Res **64**(4): 1229-32.

Menashi, S., M. Serova, et al. (2003). "Regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer and matrix metalloproteinase expression by amphiregulin in transformed human breast epithelial cells." Cancer Res **63**(22): 7575-80.

Misra, S., S. Ghatak, et al. (2003). "Regulation of multidrug resistance in cancer cells by hyaluronan." J Biol Chem **278**(28): 25285-8.

Miyauchi, T., Y. Masuzawa, et al. (1991). "The basigin group of the immunoglobulin superfamily: complete conservation of a segment in and around transmembrane domains of human and mouse basigin and chicken HT7 antigen." J Biochem (Tokyo) **110**(5): 770-4.

Molina, J. R., D. Nikcevich, et al. (2006). "A Phase II NCCTG study of irinotecan and docetaxel in previously treated patients with non-small cell lung cancer." Cancer Invest **24**(4): 382-9.

Mountain, C. F. (1997). "Revisions in the International System for Staging Lung Cancer." Chest **111**(6): 1710-7.

Mountain, C. F. (2002). "Staging classification of lung cancer. A critical evaluation." Clin Chest Med **23**(1): 103-21.

Müller-Höcker, G. (2003). Manual: Tumoren der Lunge und des Mediastinums. T. München. München, W. Zuckschwerdt Verlag.

Muramatsu, T. and T. Miyauchi (2003). "Basigin (CD147): a multifunctional transmembrane protein involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion." Histol Histopathol **18**(3): 981-7.

Muraoka, K., K. Nabeshima, et al. (1993). "Enhanced expression of a tumor-cell-derived collagenase-stimulatory factor in urothelial carcinoma: its usefulness as a tumor marker for bladder cancers." Int J Cancer **55**(1): 19-26.

Nabeshima, K., H. Iwasaki, et al. (2006). "Emmprin (basigin/CD147): Matrix metalloproteinase modulator and multifunctional cell recognition molecule that plays a critical role in cancer progression." Pathol Int **56**(7): 359-67.

Nabeshima, K., J. Suzumiya, et al. (2004). "Emmprin, a cell surface inducer of matrix metalloproteinases (MMP), is expressed in T-cell lymphomas." J Pathol **202**(3): 341-51.

Passlick, B., W. Sienel, et al. (2000). Overexpression of matrix metalloproteinase 2 predicts unfavorable outcome in early-stage non-small cell lung cancer.

Passlick, B. and O. Thetter (1997). "[Lymph node documentation and lymphadenectomy in bronchial carcinomas. Results of a survey in Germany]." Chirurg **68**(6): 601-5.

Polette, M., C. Gilles, et al. (1997). "Tumor collagenase stimulatory factor (TCSF) expression and localization in human lung and breast cancers." J Histochem Cytochem **45**(5): 703-9.

Reimers, N., K. Zafrakas, et al. (2004). "Expression of extracellular matrix metalloproteases inducer on micrometastatic and primary mammary carcinoma cells." Clin Cancer Res **10**(10): 3422-8.

Riede, U.-N., M. Werner, et al. (2001). Allgemeine und spezielle Pathologie. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.

Riethdorf, S., N. Reimers, et al. (2006). "High incidence of EMMPRIN expression in human tumors." Int J Cancer **119**(8): 1800-10.

Rosenthal, E. L., S. Shreenivas, et al. (2003). "Expression of extracellular matrix metalloprotease inducer in laryngeal squamous cell carcinoma." Laryngoscope **113**(8): 1406-10.

Sameshima, T., K. Nabeshima, et al. (2000). "Glioma cell extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) (CD147) stimulates production of membrane-type matrix metalloproteinases and activated gelatinase A in co-cultures with brain-derived fibroblasts." Cancer Lett **157**(2): 177-84.

Seiki, M., H. Mori, et al. (2003). "Membrane-type 1 matrix metalloproteinase and cell migration." Biochem Soc Symp(70): 253-62.

Shopland, D. R. (1990). "Changes in tobacco consumption and lung cancer risk: evidence from studies of individuals." IARC Sci Publ(103): 77-91.

Sidhu, S. S., A. T. Mengistab, et al. (2004). "The microvesicle as a vehicle for EMMPRIN in tumor-stromal interactions." Oncogene **23**(4): 956-63.

Sienel, W., J. Hellers, et al. (2003). "Prognostic impact of matrix metalloproteinase-9 in operable non-small cell lung cancer." Int J Cancer **103**(5): 647-51.

Sobin, L. H. (2003). "TNM, sixth edition: new developments in general concepts and rules." Semin Surg Oncol **21**(1): 19-22.

Sun, J. and M. E. Hemler (2001). "Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions." Cancer Res **61**(5): 2276-81.

Tang, W., S. B. Chang, et al. (2004). "Links between CD147 function, glycosylation, and caveolin-1." Mol Biol Cell **15**(9): 4043-50.

Tang, Y., P. Kesavan, et al. (2004). "Tumor-stroma interaction: positive feedback regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) expression and matrix metalloproteinase-dependent generation of soluble EMMPRIN." Mol Cancer Res **2**(2): 73-80.

van der Jagt, M. F., F. C. Sweep, et al. (2006). "Correlation of reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs (RECK) and extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN), with MMP-2, MMP-9, and survival in colorectal cancer." Cancer Lett **237**(2): 289-97.

Vigneswaran, N., S. Beckers, et al. (2006). "Increased EMMPRIN (CD 147) expression during oral carcinogenesis." Exp Mol Pathol **80**(2): 147-59.

Walenta, S., T. Schroeder, et al. (2004). "Lactate in solid malignant tumors: potential basis of a metabolic classification in clinical oncology." Curr Med Chem **11**(16): 2195-204.

Werb, Z., T. H. Vu, et al. (1999). "Matrix-degrading proteases and angiogenesis during development and tumor formation." Apmis **107**(1): 11-8.

Wiebel, M., M. Schulz, et al. (1997). "[Follow-up of intermittent self-ventilation (ISB). Mortality and causes]." Med Klin (Munich) **92 Suppl 1**: 63-7.

Yan, L., S. Zucker, et al. (2005). "Roles of the multifunctional glycoprotein, emmprin (basigin; CD147), in tumour progression." Thromb Haemost **93**(2): 199-204.

Yang, J. M., P. O'Neill, et al. (2006). "Extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) confers resistance of breast cancer cells to Anoikis through inhibition of Bim." J Biol Chem **281**(14): 9719-27.

Yurchenko, V., G. Zybarth, et al. (2002). "Active site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activity via CD147." J Biol Chem **277**(25): 22959-65.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AB-Komplex	Avidin-Biotin-Komplex mit biotinylierter Peroxidase
ADAM	1 Disintegrin+Metalloproteinasen
AEC-Färbung	Aminoethylcarbazol-Färbung
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Komplex
APUD-System	Amin-Precursor-Uptake-and-Decarboxylation-System
Ca	Calcium
CD147	Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN)
CEA	Carcino-embryonales Antigen
CYFRA21-1	Cytokeratin-19-Fragment
DAG	Diacylglycerol
DGT	Deutsche Gesellschaft für Thoraxchirurgie
DMF	Dimethylformamid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachtstumsfaktor
EMMPRIN	Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer
HCl	Salzsäure
HIM6	Monoklonaler Antikörper IgG1 gegen EMMPRIN
HIV	Human immunodeficiency virus
IR-Score	Immunoreactive score
kD	Kilo-Dalton (biochemische Masseneinheit)
LK	Lymphknoten
LSAB-Kit	Labeled-Streptavidin-Biotin kit
M/pM	Fernmetastasen
mAk	Monoklonaler Antikörper
MAP-Kinase p38	Mitogen activated protein kinase
MCF-7	Humane Mamma-Adenokarzinom-Zelllinie
MCT	Monocarboxylat Transporter
MEK1/2	Mitogen-aktiviertes Protein Kinase Kinase
MEM6	Antikörper gegen EMMPRIN
MHC	Major histocompability complex
MOPC-21	(Mineral Oil induced PlasmaCytoma-21) Maus IgG1 Antikörper
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure

MT-MMP	Membrane-type Matrix-Metalloproteinasen
N/pN	Regionale Lymphknotenmetastasierung
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinomen
OT	Objektträger
OX-47	Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer
PAI	Plasminogen activator inhibitors
PBS	Phosphate buffered saline
PI3-KInase	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Protein Kinase C
PMA	Analog von Diacylglycerol
SCLC	Kleinzelligen Bronchialkarzinomen
T/pT	Primärtumor
TBS	Tris buffered saline
TCSF	Tumor collagenase stimulatory factor (EMMPRIN)
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinases
UICC	Union Internationale Contre Cancer
uPA	Urokinase-type plasminogen activator
uPAR	Urokinase-type plasminogen activator receptor
Upm	Umdrehungen pro Minute
VEGF	Vascular endothelial growth factor

8 Danksagung

An dieser Stelle danke ich Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Christoph. A. Klein für die Betreuung dieser Doktorarbeit, für seine wertvollen Anregungen und die persönliche Förderung, mit der er das Entstehen dieser Arbeit begleitete. Meinen Mitbetreuern Dr.med. Wulf Sienel und Dr.med. Bernhard Polzer danke ich für die Anleitung im Labor und die entgegenkommende Unterstützung bei der Dateninterpretation. Darüber hinaus möchte ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Dr. Klein am Institut für Immunologie und der Arbeitsgruppe von Dr. P. Nett für ihre Hilfsbereitschaft danken.

Weiterer Dank gilt meiner Familie und dabei speziell meinen Kindern Nada, Hosam und Luay, deren Unterstützung mir die Zeit für diese Arbeit gab.

9 Lebenslauf

Name:	Karimah Djamilah Elshawi
Geburtsdatum:	07. 04. 1969
Geburtsort:	München
Nationalität:	Deutsch
Familienstand:	verheiratet mit 3 Kindern
Wohnort:	Josef Wirth Weg 7a 80939 München
Telefon:	089 / 322 69 25
Fax:	089 / 324 59 68
Mobilfunk:	0171 / 482 24 32
Telefon (Ägypten):	0020 / 2 / 202 34 99
Mobilfunk (Ägypten):	0020 / 12 / 231 55 07
E-mail:	elkamashawi@t-online.de

Grundschule:	Grundschule Unterhaching bis 1979
Schulabschluss:	Englische Privatschule (Manarat school) in Dschidda, Saudi-Arabien, bis 1984
Undergraduate Studies (BSc):	Wissenschaftliche Fakultät der King Abdul Aziz Universität in Dschidda, Saudi-Arabien, bis 1989
Post-graduate studies (MSc):	Wissenschaftliche Fakultät der Universität Kairo, Ägypten, bis 1997
Doktorarbeit (Dr. human. biol.):	Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München bis 2006

<u>Wissenschaftliche Tätigkeit:</u>

Immunhistochemische Doppelfärbungen von Tumorzellen in Knochenmark
Institut für Immunologie, LMU, München, 1990

Immunologische Untersuchung zur Tumorabwehr
Akbar Clinic, Panama City, Florida, USA, 1991

Histologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen (MSc)
Dept. of Immunology, Universität Kairo, Ägypten, 1992–97

Immunhistochemische Färbungen und ELISA
Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie, LMU, München, 1999–2000

Immunhistochemische Färbungen von Tumorzellen (Doktorarbeit)
Institut für Immunologie, LMU, München, 2001

Immunhistochemische Färbungen von Tumorgewebe (Doktorarbeit)
Chirurgische Klinik und Poliklinik Innenstadt, LMU, München, 2002–2004

Sonstige Kenntnisse:

Sehr gute Sprachkenntnisse in Englisch und Deutsch
Gute Sprachkenntnisse in Arabisch

Sicherer Umgang mit den EDV-Programmen Microsoft Office Word, Excel und PowerPoint, sowie mit der Statistik-Software SPSS