

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Allgemeinchirurgie  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Direktor: Prof. Dr. H. Dralle



**Expression der Matrixmetalloproteasen (MMP-2 und MMP-9) und ihrer Inhibitoren  
(TIMP-1 und TIMP-2) in humanen Schilddrüsengeweben**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Antje Spens, geb. Dornheim  
geboren am 10.09.1970 in Halle (Saale)

Gutachter:

- 1.
- 2.
- 3.

## **Referat und bibliographische Beschreibung**

Der Prozeß des Tumorwachstums und der Metastasierung ist eine komplexe Kaskade von Ereignissen, wobei der essentielle Schritt die Basalmembrandestruktion durch proteolytischen Abbau der Extrazellulärmatrix (ECM) ist. Verantwortlich für den ECM-Abbau sind die Matrixmetalloproteasen (MMP), deren proteolytische Aktivität durch spezifische Inhibitoren (Tissue inhibitor of matrixmetalloproteinases TIMP) reguliert wird. Die Expression der Proteasen und ihrer Inhibitoren ist mit Tumorzellinvasion und Metastasierung in einer Vielzahl von humanen Tumoren assoziiert. In dieser Arbeit wurde die mRNA- und Proteinexpression der Proteasen MMP-2 und MMP-9 und deren Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 untersucht. In einem ersten Schritt wurden die Transkriptionslevel von MMP-2, MMP-9, TIMP-1 und TIMP-2 mittels RT-PCR in jeweils 5 malignen Schilddrüsengeweben ermittelt. Dabei wurden die Transkripte von MMP-2 in 68%, MMP-9 in 72%, TIMP-1 in 84% und von TIMP-2 in 88% der Tumoren nachgewiesen.

Anschließend erfolgte die immunhistochemische Untersuchung nach der Avidin/Biotin Komplex-Methode in Gefrierschnitten von 80 malignen Schilddrüsengeweben: 10 follikuläre (FTC), 17 papilläre (PTC), 7 schlecht differenzierte (pdTC), 16 undifferenzierte Schilddrüsenkarzinome (UTC), 30 medulläre Schilddrüsenkarzinome (MTC) und 15 benigne Schilddrüsengewebe (Struma colloidales et nodosa). In den malignen Geweben war eine signifikant erhöhte Expression sowohl von MMP-2 und MMP-9 als auch von TIMP-1 und TIMP-2 zu beobachten. MMP-2 war in den FTC, PTC und pdTC hoch exprimiert, während in den UTC und MTC nur in 56% bzw. 40% der Karzinome eine erhöhte Expression feststellbar war. MMP-9 zeigte in allen malignen Schilddrüsengeweben eine starke Expression, im besonderen Maße in den pdTC und in den UTC. TIMP-1 konnte in allen Tumoren beobachtet werden, wobei eine starke Expression in den pdTC auffiel. Ein ähnliches Ergebnis wies TIMP-2 auf, auch hier zeigte sich in allen Schilddrüsenneoplasien eine deutliche Expression, wobei auch hier die pdTC eine starke Immunreaktivität aufwies. In den nicht-malignen Schilddrüsengeweben konnte keine oder nur eine geringe Expression der beiden Proteasen und auch der Inhibitoren festgestellt werden.

Die Immunreaktivität der untersuchten MMP und TIMP wurde im Zytoplasma der Tumorzellen und in den Fibroblasten des umgebenden Stromas detektiert. Zwischen den Primärtumoren und den Rezidiven der einzelnen Tumorarten konnten keine signifikanten Unterschiede aufgezeigt werden. In Bezug auf die Tumorgroße, die Lymphknotenbeteiligung und die hämatogene Metastasierung war keine Korrelation mit dem Expressionsgrad von MMP-2, MMP-9, TIMP-1 und TIMP-2 feststellbar. Die Ergebnisse zeigen, daß die Proteasen und auch die Inhibitoren mit dem malignen Verhalten der untersuchten Schilddrüsenneoplasien assoziiert sind. Beim Übergang vom differenzierten zum undifferenzierten Karzinom war eine verstärkte Expression von Proteasen und Inhibitoren zu beobachten.

*Spens Antje: Expression von Matrixmetalloproteasen (MMP-2 und MMP-9) und ihrer Inhibitoren (TIMP-1 und TIMP-2) in humanen Schilddrüsengeweben.  
Halle, Martin-Luther-Universität, Med. Fak., Diss., 76 Seiten, 2000*

## Inhaltsverzeichnis

<b>Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen .....</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Allgemeine Grundlagen zur Krebsentstehung .....	1
1.2 Die Familie der Matrixmetalloproteasen .....	2
1.3 Die Inhibitoren der Matrixmetalloproteasen .....	5
1.4 Maligne Schilddrüsenerkrankungen .....	7
1.5 Tumorartige benigne Schilddrüsenerkrankungen .....	11
1.6 Postoperative histopathologische Klassifikation (pTNM) .....	12
<b>2 Zielstellung der Arbeit .....</b>	<b>13</b>
<b>3 Material und Methodik .....</b>	<b>13</b>
3.1 Patientenmaterial .....	13
3.2 Histologische Klassifikation .....	14
3.3 RT-PCR .....	18
3.4 Immunhistochemie .....	19
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>21</b>
4.1 MMP-2 und MMP-9 .....	21
4.1.1 RT-PCR .....	21
4.1.2 Immunhistochemischer Nachweis .....	24
4.2 TIMP-1 und TIMP-2 .....	37
4.2.1 RT-PCR .....	37
4.2.2 Immunhistochemischer Nachweis .....	40
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>54</b>
5.1 MMP-2 .....	54
5.2 MMP-9 .....	56
5.3 TIMP-1 .....	58
5.4 TIMP-2.....	60
5.5 Klinische Bedeutung der gewonnenen Ergebnisse .....	62

<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>Thesen .....</b>	<b>75</b>

**Lebenslauf**

**Selbständigkeitserklärung**

**Publikationen**

**Danksagung**

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AG	Antigen
AK	Antikörper
BM	Basalmembran
cDNA	complementary Desoxyribonucleic Acid
DAB	3,3-Diaminobenzidin
ECM	Extracellulärmatrix
EGF	Epidermal Growth Factor
FGF	Fibroblast Growth Factor
FTC	Follicular Thyroid Carcinoma
IGF	Insulin like Growth Factor
IgG	Immunglobulin G
kDa	kiloDalton
LK	Lymphknoten
MEN	Multiple Endokrine Neoplasie
MMP	Matrixmetalloprotease
MTC	Medullary Thyroid Carcinoma
NTP	Nucleosidtriphosphat
PBS	Phosphate-buffered-Saline
pdTC	Poorly differentiated Thyroid Carcinoma
PTC	Papillary Thyroid Carcinoma
RNA	Ribonucleic Acid
RT-PCR	Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction
TBE	TRIS-Borsäure-EDTA
TGF $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
TIMP	Tissue Inhibitor Matrixmetalloproteinase
TNM	Tumor Node Metastasis (Tumorklassifikation)
TSH	Thyreoid Stimulating Hormon
UTC	Undifferentiated Thyroid Carcinoma
UICC	Union Internationale contre le Cancer

## **1 Einleitung**

### **1.1 Allgemeine Grundlagen zur Krebsentstehung**

Die Morbidität und Letalität von Krebspatienten wird in erster Linie durch Tumorzellinvasion in umgebende Gewebe und Metastasierung der Krebszellen in entfernte Organe beeinflusst.

Der Begriff Tumorzellinvasion beschreibt dabei die Fähigkeit der Zellen zur Überquerung anatomischer Barrieren wie z.B. Basalmembranen, interstitielles Stroma und Interzellularbrücken (Mignatti et al., 1993). Diese Interaktion der Tumorzellen mit der Basalmembran setzt sich aus mehreren Schritten zusammen: der Veränderung der Zell-Zellkontakte und der Bildung neuer Zell-Matrixkontakte, der proteolytischen Veränderung der Extrazellulärmatrix (ECM) und der Migration durch die proteolytisch modifizierte Matrix zur Bildung neuer Matrixkontakte (Stetler-Stevenson et al., 1997; Corcoran et al., 1997). Die weitere Progression von einem invasiven zu einem metastasierenden Karzinom ist durch die Intravasation in und die Extravasation aus einem Blut- oder Lymphgefäß charakterisiert, gefolgt vom Abbau anderer Basalmembranen und der Invasion in ein sekundäres Gewebe (Crawford et al., 1996; Matrisian et al., 1996).

Bei der Erhaltung der strukturellen Integrität der einzelnen Gewebe spielt die Extrazellulärmatrix eine zentrale Rolle. Die Matrix beeinflusst die grundlegenden zellulären Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Migration und Adhäsion (Alberts et al., 1997). Für die Matrixerhaltung ist ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau der Matrixkomponenten erforderlich (Matrisian et al., 1992).

Die ECM besteht aus verschiedenen Komponenten wie Kollagenen, Glykoproteinen (wie Laminin, Fibronectin und Entactin), Proteoglykanen und Glukosaminoglykanen. Der Abbau dieser verschiedenen Moleküle erfordert eine komplexe Reihe von proteolytischen Enzymen (Proteasen) (Mignatti et al., 1993), welche eine Schlüsselrolle in vielen physiologischen Prozessen wie der Blutkoagulation und Fibrinolyse, der Komplement- und Zytokinaktivierung, der Zellmigration, der Organogenese, der Trophoblastenimplantation oder dem Gewebsumbau spielen. Sie wurden zunehmend als bedeutende Faktoren in der Pathophysiologie einer großen Zahl menschlicher Krankheiten identifiziert.

Verschiedene pathologische Zustände eingeschlossen Krebs, aber auch thrombotische Störungen, Hypertension, Osteoarthritis und chronisch degenerative Erkrankungen werden durch eine Veränderung der Proteasenaktivität verursacht (DeClerck et al., 1994).

In den letzten Jahren konnte mit Hilfe molekularbiologischer Methoden eine ständig wachsende Zahl von ECM-abbauenden Proteasen charakterisiert werden. Die 3 Hauptklassen werden gebildet von den Serinproteasen, den Cysteinproteasen und den Matrixmetalloproteasen:

- Zu den Serinproteasen gehören Plasminogenaktivatoren, Cathepsin G und Leukozytenelastase. Die Plasminogenaktivatoren wandeln das Zymogen Plasminogen zu Plasmin um, einem Plasmaprotein, welches ubiquitär im Körper vorkommt. Plasmin hat eine breite Trypsin-ähnliche Substratspezifität und kann verschiedene ECM-Komponenten abbauen, eingeschlossen Fibronectin, Laminin und den Proteinkern der Proteoglykane. Zusätzlich kann Plasmin verschiedene Vorstufen (Zymogene) der MMP aktivieren.
- Die Cysteinproteasen sind intrazelluläre Enzyme, welche gewöhnlich im Zytosol oder in den Lysosomen vorkommen. Bei der Metastasierung spielen vor allem Cathepsin B und Cathepsin L eine wichtige Rolle (Rooprai et al., 1997).
- Matrixmetalloproteasen

## 1.2 Die Familie der Matrixmetalloproteasen

Die Familie der Matrixmetalloproteasen umfaßt strukturell verwandte Enzyme von denen 14 Mitglieder beim Menschen identifiziert werden konnten (Tab. 1).

Jedes Mitglied der MMP-Familie ist aus 4 Domänen aufgebaut:

1. der Signalpeptidsequenz, welche das Translationsprodukt auf dem endoplasmatischen Retikulum lokalisiert,
2. der Propeptidomäne, diese geht während der Enzymaktivierung verloren,
3. der katalytischen Domäne, diese bindet das für die Aktivität der Proteasen benötigte Zinkatom
4. der C-terminalen Domäne, hier erfolgt die Komplexbildung der Proenzymform mit dem spezifischen Inhibitor.

Die Gelatinasen besitzen eine fünfte Domäne, diese bindet Gelatine.

Die Produktion der MMP wird durch inflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone, zelluläre Transformation und Interaktion mit ECM-Komponenten reguliert, welche die Transkription der Proteasen erhöhen können, während Glukokortikoide und Retinsäure einen suppressiven Effekt auf die MMP aufweisen (Nagase et al., 1998).

Die Sekretion der Matrixmetalloproteasen erfolgt in einer latenten Proenzymform (Zymogen), dieses Zymogen wird extrazellulär durch Entfernung der Propeptid-Domäne aktiviert (Yu et al., 1996, 1997; Cockett et al., 1998).

Die meisten dieser Enzyme werden durch unterschiedliche Zellen des Bindegewebes, eingeschlossen Fibroblasten, Osteoblasten, Chondrozyten, Endothelzellen, aber auch durch Entzündungszellen wie Makrophagen, Neutrophile, Lymphozyten und wahrscheinlich auch durch Tumorzellen sezerniert.

Enzym	MMP Nr.	Molekulare Masse latent in kDa	Molekulare Masse aktiv in kDa	Substratspezifität
Interstitielle Kollagenase	MMP-1	55	43	Kollagen Typ I, II, III, VII u. X, Gelatine, Proteoglykan Kernprotein
Neutrophile Kollagenase	MMP-8	75	58	Kollagen Typ I, II, u. III, Gelatine, Proteoglykan Kernprotein
Kollagenase 3	MMP-13	65	55	Kollagen Typ I u. IV, Gelatine, Proteoglykan, Fibronektin, Tenascin
Gelatinase A	MMP-2	72	66	Gelatine, Kollagen Typ IV, V, VII u. XI
Gelatinase B	MMP-9	92	86	Gelatine, Kollagen Typ IV u. V, Elastin
Stromelysin 1	MMP-3	57	46	Proteoglykan Kernprotein, Kollagen Typ II, IV, IX, X u. XI, Prokollagen, Fibronektin, Laminin, Elastin
Stromelysin 2	MMP-10	57	46	Proteoglykan Kernprotein, Kollagen Typ II, IV, IX, X u. XI, Prokollagen, Fibronektin, Laminin, Elastin
Matrilysin	MMP-7	28	20	Proteoglykan, Kollagen Typ IV, Elastin, Fibronektin, Gelatine
Makrophagen-Elastase	MMP-12	54	45	Elastin
Stromelysin 3	MMP-11	51	44	$\alpha$ 1 Proteasenhemmer
MT1-MMP	MMP-14	64	54	Progelatinase A, Prokollagenase 3, Kollagen, Proteoglykan, Fibronektin, Tenascin
MT2-MMP	MMP-15	72	61	wie MT1-MMP
MT3-MMP	MMP-16	66	55	Progelatinase A
MT4-MMP	MMP-17	Unbekannt	54	Unbekannt

**Tab. 1:** MMP-Klassifikation (Cockett et al., 1998; Yu et al., 1996)

### **MMP-2 (Gelatinase A)**

MMP-2 ist eine Typ IV Kollagenase, welche die Helix-Domäne des Typ IV Kollagens abbaut. Da Typ IV Kollagen eines der Hauptkomponenten der Basalmembranen ist, scheint MMP-2 eines der Schlüsselmoleküle bei Invasion und Metastasierung zu sein.

Sowohl die MMP-2 Aktivierung als auch die MMP-2-Aktivität sind abhängig von einem speziellen Inhibitor, dem TIMP-2. Des weiteren konnte nachgewiesen werden, daß MT1-MMP (Membrane Type 1 Matrixmetalloprotease) auf der Zelloberfläche als Gelatinase A-Aktivator agieren kann. Im Gegensatz zu anderen MMP, können die Gelatinasen durch TIMP-1 und TIMP-2 auch als latente Form gebunden werden und einen festen Komplex bilden. Dabei bindet die Progelatinase A mit ihrer C-terminalen Domäne spezifisch an die C-terminale Domäne des TIMP-2. Der Gelatinase A/TIMP-2-Komplex kann durch Entfernung des Profragmentes aktiviert werden und besitzt dadurch nur noch 10% der proteolytischen Aktivität des TIMP-2 freien Enzyms. Während der Enzymaktivierung wird eine zweite Bindungsseite durch die Abspaltung des Profragmentes verfügbar, welche nicht spezifisch

für TIMP-2 ist. Die aktive Gelatinase A kann mittels dieser zweiten Bindungsseite auch durch TIMP-1 und TIMP-3 gehemmt werden (Yu et al., 1997 und Cockett et al., 1998).

In zahlreichen experimentellen Studien konnte eine Korrelation zwischen Krebserkrankungen und einer erhöhten enzymatischen Aktivität von MMP-2 festgestellt werden. So z.B. zeigte sich eine erhöhte MMP-2-Expression bei immunhistochemischen-, immunzytochemischen- und in situ Hybridisationsstudien in zahlreichen menschlichen Tumoren wie Karzinomen des Kolons (Poulsom et al., 1992, Gallegos et al., 1995, Tomita et al., 1996, Mukai et al., 1997), des Pankreas (Gress et al., 1995, Koshiba et al., 1998) des Magens (Nomura et al., 1996, Murray et al., 1998), der Blase (Davies et al., 1993, Grignon et al., 1996) der Prostata (Stearns et al., 1996) und der Schilddrüse (Campo et al., 1992). Dabei war die Gelatinase A sowohl in den Tumorzellen selbst, als auch in den angrenzenden Stromagebieten lokalisiert. In einigen Studien konnten Korrelationen zwischen der Höhe der MMP-2-Expression und dem TNM-Stadium, der Aggressivität des Tumors und der Überlebensrate nachgewiesen werden (Levy et al., 1991; Nomura et al. 1996, Koshiba et al., 1998, Talvensaaari-Mattila et al., 1998).

### **MMP-9 (Gelatinase B)**

MMP-9 ist ebenfalls eine Typ IV Kollagenase, welche erstmalig im Sekretionsprodukt von alveolaren Makrophagen und Granulozyten nachgewiesen werden konnte (Hibbs et al., 1987 und 1995). Die Gelatinase B Aktivierung und die Aktivität werden ebenfalls durch einen speziellen Inhibitor dem TIMP-1 reguliert (Komplexbildung mit der latenten Enzymform, siehe MMP-2). Zu den Aktivatoren dieser Protease gehören außerdem Stromelysin-1 (MMP-3), Matrilysin (MMP-7), interstitielle Kollagenase (MMP-1), Plasmin und Gelatinase A (MMP-2) (Ogata et al., 1992; Sang et al., 1995, Fridman et al., 1995). Die Gelatinase B konnte in zahlreichen humanen Krebserkrankungen sowohl im neoplastischen Gewebe als auch im umgebenden Stromagewebe und in inflammatorischen Zellen nachgewiesen werden. Sie wird überwiegend in Makrophagen in der Nähe der invasiven Front synthetisiert.

So konnte die MMP-9 mRNA im Stroma von Brust-, Blasen-, Dickdarm- und Hautkrebs nachgewiesen werden (Davies et al., 1993; Pyke et al., 1992; Zeng et al., 1996a).

Zeng et al. konnten eine Kolo-kalisation von MMP-9 mRNA und Protein in peritumoralen Makrophagen von Kolonkarzinomen aufzeigen (Zeng et al., 1996b). In immunhistochemischen Studien zeigte sich ebenfalls eine erhöhte MMP-9-Expression in Neuroblastomen, Magenkarzinomen und Karzinomen des Kolons und des Rektums (Sugiura et al., 1998; Ara et al., 1998; Murray et al., 1998; Gallegos et al., 1995, Tomita et al., 1996). Dabei konnte eine Korrelation zwischen zunehmender MMP-9-Expression und Tumorprogression und Metastasierung nachgewiesen werden (Ara et al., 1998; Sugiura et al., 1998; Tomita et al., 1996).

### 1.3 Die Inhibitoren der Matrixmetalloproteasen

Die proteolytischen Aktivitäten der Matrixmetalloproteasen werden von einer Familie natürlich vorkommender Proteine, genannt TIMP (Tissue inhibitors of metalloproteinases), kontrolliert. Diese Inhibitoren tragen folglich zur Bewahrung der Balance zwischen Matrixdestruktion und -formation bei. Eine Imbalance zwischen MMP und den assoziierten TIMP kann eine signifikante Rolle im invasiven Phänotyp eines malignen Tumors spielen. Sie sind multifunktionelle Proteine, welche außer der obengenannten Funktion auch zellwachstumsfördernde Aktivitäten besitzen. Sie sind fähig zur Regulation der Endothelzellproliferation, der Migration und der Kapillargefäßentwicklung (Sang et al., 1998; Zeng et al., 1995). Die Inhibitoren bestehen aus zwei verschiedenen strukturellen und funktionellen Domänen. Die N-terminale Domäne ist der effiziente Inhibitor aller MMP durch Interaktion mit der katalytischen Domäne dieser Enzyme. Die C-terminale Domäne bindet die latenten Formen der Gelatinasen A und B (Wojtowicz-Praga et al., 1997; Yu et al., 1997). Bisher konnten 4 Inhibitoren identifiziert werden (Tab. 2).

Inhibitor	Molekulare Masse in kDa	Glykosylation	Komplexbildung	MMP-Hemmung
TIMP-1	28	+	Progelatinase B	Alle
TIMP-2	21	-	Progelatinase A	Alle
TIMP-3	29-24	+	Progelatinase A, ECM	Alle
TIMP-4	22	-	noch ungeklärt	noch ungeklärt

**Tab. 2:** TIMP-Klassifikation (Yu et al., 1997)

#### TIMP-1

TIMP-1 ist der am meisten verbreitete Inhibitor. Er konnte erstmalig in Kaninchenknochen isoliert werden und wird von zahlreichen menschlichen Geweben und Tumorzelllinien produziert (Sellers et al., 1979; Sato et al., 1992; Zeng et al. 1995b).

TIMP-1 trägt durch die spezifische Proteasenhemmung mit zur Regulation des Umsatzes der Extrazellulärmatrix und der Umgestaltung des Gewebes bei, die Balance Protease-Inhibitor ist somit eine bedeutende Determinante für das metastatische Potential der Tumorzellen. So zeigten Stetler-Stevenson et al., daß eine Überexpression von TIMP-1 die Invasion und Metastasierung von Tumorzelllinien supprimiert (Stetler-Stevenson et al., 1993). Khokha et al. konnten nachweisen, daß die Überexpression von TIMP-1 das tumoröse und auch das metastatische Potential der B 16-F10 Zellen in Mäusen direkt hemmt und dies wahrscheinlich auf eine Rolle von TIMP-1 in der Tumorkontrolle deutet (Khokha et al., 1994). Des weiteren hemmt TIMP-1 die vom Tumor induzierte Angiogenese im experimentellen System und blockiert die endotheliale Zellantwort auf angiogenetische Faktoren (Johnson et al., 1994).

In zahlreichen Studien zeigte TIMP-1 außer der Hemmung der MMP weitere interessante Funktionen. Der Inhibitor stimuliert das Wachstum und die Differenzierung verschiedener Zelltypen unabhängig von der Fähigkeit zur Hemmung der MMP-Aktivität. So zeigten Hayakawa et al., daß TIMP-1 das Wachstum eines breiten Spektrums von humanen Zelllinien stimuliert (Hayakawa et al., 1992).

In den verschiedensten malignen Neoplasien konnten erhöhte TIMP-1-Expressionen nachgewiesen werden: in Kolonkarzinomen (Lu et al., 1991), kolorektalen Karzinomen (Tomita et al., 1996, Zeng et al., 1995a und b), Karzinomen der Brustdrüse (Lindsay et al., 1996; Yoshiji et al., 1996), Magenkarzinomen (Murray et al., 1998) und Pankreaskarzinomen (Gress et al., 1995). Kossakowska et al. beobachteten in humanen Lymphomen eine Assoziation zwischen einer Überexpression von TIMP-1 und einem verstärkten aggressiven Verhalten (Kossakowska et al., 1993).

### **TIMP-2**

TIMP-2 teilt 40 % Sequenzidentität mit TIMP-1, ist aber nicht glykosiliert. TIMP-2 ist ebenfalls ein potenter Matrixmetalloproteaseninhibitor und kann sowohl die latente als auch die aktive Form der Gelatinase A durch Komplexbindung hemmen (siehe MMP-2).

Auch TIMP-2 hat unabhängig von der Funktion der Proteasenhemmung weitere in zahlreichen Studien untersuchte zusätzliche Funktionen.

So zeigt der Inhibitor wachstumsbeeinflussende und antiangiogenetische Aktivitäten (Corcoran et al., 1995; Sang et al., 1998). Hayakawa et al. demonstrierten eine Zunahme des Wachstums von Raji Zellen durch TIMP-2 (Hayakawa et al., 1994).

Murphy et al. wiesen nach, daß TIMP-2 die bFGF induzierte humane mikrovaskuläre Endothelzellproliferation hemmen kann (Murphy et al., 1993).

Ebenso wie TIMP-1, konnte in vielen malignen Neoplasien ein Überexpression von TIMP-2 im Tumor- aber überwiegend im angrenzenden Stromagewebe nachgewiesen werden: in Karzinomen der Blase (Grignon et al., 1996; Kanayama et al., 1998), Karzinomen des Pankreas (Gress et al., 1995), Karzinomen der Lunge (Kawano et al 1997) und Karzinomen der Brustdrüse (Visscher et al., 1994). Durch eine zusätzliche Basalmembranfärbung konnten Grignon et al. den Nachweis erbringen, daß in invasiven Tumorzellnestern ein Basalmembranverlust mit einer starken TIMP-2-Expression einhergeht (Grignon et al., 1996). Erhöhte TIMP-2-Expressionen scheinen also eine Stromaantwort bei Tumorinvasion und deshalb ein Indikator für aggressives Verhalten in Karzinomen zu sein.

## 1.4 Maligne Schilddrüsenerkrankungen

Erkrankungen der Schilddrüse sind weltweit die häufigste Erkrankung eines endokrinen Organs. Die Inzidenz der Schilddrüsenmalignome liegt in Deutschland bei etwa 1,4 pro 100.000 Einwohner und macht damit knapp 1% aller Krebserkrankungen aus.

Die Karzinogenese der Schilddrüse ist die Konsequenz einer noch unvollständig charakterisierten, sequenziellen Abfolge genetisch determinierter Abnormalitäten, welche in der neoplastischen Transformation der Schilddrüsenzelle resultiert (Zielke et al., 1997).

Bis auf wenige Ausnahmen ist unklar wie sich diese Abnormitäten im Einzelfall auswirken, jedoch werden in zunehmenden Maße Prinzipien ihrer Wirkung erkennbar. TSH (Thyreoid Stimulating Hormon) stimuliert zusammen mit anderen Wachstumsfaktoren (Epidermal Growth Factor, Insulin like Growth Factor) die Proliferation und differenzierte Funktion der Schilddrüsenzelle. Es konnte festgestellt werden, daß entdifferenzierte Zellen weniger dem regulierenden Einfluß von TSH unterliegen als differenzierte Zellen, d.h. daß transformierte Zellen sich der kontrollierenden Wirkung ihres trophischen Hormons entziehen (Derwahl et al., 1992). Auch wird mit zunehmender Dedifferenzierung der Tumoren eine verminderte Transkription des TSH-Rezeptorgens nachweisbar (Hoang-Vu et al., 1992).

Ein wichtiger Wachstumssuppressor ist das TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ), mit zunehmender Entdifferenzierung der Schilddrüsenzelle kommt es zur Abschwächung der direkten Inhibition durch TGF $\beta$  (Hölting et al., 1994a und b).

Weitere Prinzipien umfassen die Veränderung der Signaltransduktion, die Veränderung nukleärer Onkogene sowie die Veränderung zentraler Regulatoren.

Als gesicherter kausaler Faktor bei der Entstehung von Schilddrüsenkarzinomen gilt die radioaktive Strahlenexposition. Dabei kommt es überwiegend zur Entwicklung von papillären Karzinomen, wie der Reaktorunfall von Tschernobyl aufzeigen konnte.

Einen weiteren Faktor bildet die Jodaufnahme, wobei sich in Jodmangelgebieten eine erhöhte Prävalenz von follikulären Karzinomen nachweisen läßt.

Trotz zahlreicher neuer Erkenntnisse über die Entstehung der Schilddrüsenneoplasien läßt sich jedoch noch kein lineares Modell der Karzinogenese der Schilddrüse erkennen (Zielke et al., 1997). Eine Ausnahme bildet das familiäre, autosomal-dominant vererbte MTC, hier spielen Keimbahnmutationen des ret Protoonkogens, welches auf dem Chromosom 10q11.2 lokalisiert ist, eine Schlüsselrolle in der Karzinogenese des medullären Schilddrüsenkarzinoms (Eng und Mulligan et al., 1997).

Eine Besonderheit, durch die die Neoplasien der Schilddrüse charakterisiert sind, ist das Vorhandensein von extremen prognostischen Unterschieden. So zeichnen sich bestimmte Formen der differenzierten (follikulären und papillären) Karzinome durch eine sehr niedrige Malignität und eine ausgezeichnete Prognose mit nahezu normaler Lebenserwartung aus.

Demgegenüber gehört das Malignitätspotential der anaplastischen Karzinome zu den höchsten unter den bösartigen Neoplasien des Menschen.

### **Differenzierte Schilddrüsenkarzinome**

Die unter den Oberbegriff „differenziert“ zusammengefaßten papillären und follikulären Karzinome stellen Neoplasien des Follikel­epithels dar. Der Zelltyp dieser Karzinome zeigt eine hohe organspezifische zytoplasmatische Ausreifung und ist zur Thyreoglobulinsynthese befähigt (Dralle et al., 1985).

### **Follikuläres Karzinom**

Das follikuläre Karzinom ist ein maligner, epithelialer Tumor mit Zeichen einer follikulären Differenzierung ohne histologische (Papillen) und/oder zytologische Merkmale (Milchglaskerne) des papillären Karzinoms.

Das follikuläre Karzinom ist nach dem papillären Karzinom der zweithäufigste maligne Tumor der Schilddrüse.

Das morphologische Bild kann einen regelmäßigen follikulären Aufbau, ein solid-trabekuläres, ein cribriformes oder ein mikrofollikuläres Muster zeigen. Die Pleomorphie ist meist gering, Mitosen lassen sich nur in geringer Zahl nachweisen.

Malignitätskriterien des FTC sind (Schmid und Böker et al., 1997):

- Durchbruch durch eine eventuell vorhandene Kapsel bzw. die Infiltration des umgebenden nicht-neoplastischen Schilddrüsengewebes,
- einzelne Einbrüche in Gefäße innerhalb oder jenseits der Tumorkapsel (Tumorthrombus im Gefäß mit oder ohne Bezug zum Endothel; der Thrombus kann, muß aber nicht endothelialisiert sein).

Die Metastasierung erfolgt beim follikulären Karzinom in typischer Weise auf hämatogenem Wege. Eine lymphogene Metastasierung ist eher ungewöhnlich.

Auf Grund des Wachstumsmodus teilt man die follikulären Schilddrüsenkarzinome in zwei Subtypen ein (Schmid und Böker et al., 1997):

#### **a) *minimal invasives (gekapseltes) follikuläres Karzinom***

Für die Diagnosefindung sind das Verhalten des Tumors zu seiner Kapsel und zu den Blutgefäßen im Kapselbereich von großer Bedeutung. Suspekt hinsichtlich einer möglichen Invasion sind Unregelmäßigkeiten im Kapselverlauf, kleine knospenartige Tumorausläufer sowie Kapselverdickungen.

#### **b) *grob invasives follikuläres Karzinom***

Diese Tumoren zeigen keine oder nur eine unvollständige Bekapselung. Es findet sich eine ausgedehnte Invasion des umgebenden Schilddrüsengewebes und/oder zahlreicher Blutgefäße.

Zytologische Varianten des follikulären Karzinoms sind:

- oxyphile Variante
- hellzellige Variante.

### **Papilläres Karzinom**

Ein maligner epithelialer Tumor, der aus papillären und oft auch follikulären Strukturen aufgebaut ist, zeigt typische Kernveränderungen und eine meist ausgeprägte fibröse Stromareaktion. Die Papillen sind in typischer Weise schlank und fingerartig verzweigt sowie zentrifugal ausgerichtet. Im Gegensatz zu nicht-neoplastischen Papillen wird ein dichtes fibrovaskuläres Stroma von einer meist einreihigen Zelllage überkleidet.

Die Zellkerne sind auffallend chromatinarm („Milchglaskerne“) und überlagern einander oft dachziegelartig. Sie können Chromatinleisten aufweisen, welche ihnen einen kaffeebohnenartiges Aussehen verleihen. Weiterhin charakteristisch für papilläre Schilddrüsenkarzinome ist die geringe Mitosezahl und die Psammomkörper (kleine Verkalkungsherde), die in 50% der papillären, nie in anderen Schilddrüsentumoren gefunden werden.

Papilläre Schilddrüsenkarzinome neigen zur lymphogenen Ausbreitung, hämatogene Metastasierung ist selten.

Für die papillären Karzinome gilt folgende Subklassifizierung (Schmid und Böker et al., 1997):

#### **a) papilläres Mikrokarzinom**

Tumoren unter 1cm Durchmesser

#### **b) gekapseltes papilläres Karzinom**

Tumoren mit vollständiger Bekapselung, Metastasierung ist möglich

#### **c) follikuläre Variante des papillären Karzinoms (Lindsay-Tumor)**

Tumoren mit ausschließlich follikulären Aufbau, jedoch mit den zytologischen Eigenschaften des papillären Karzinoms

#### **d) diffus sklerosierendes Karzinom**

Meist nicht gekapseltes papilläres Karzinom mit diffuser Ausbreitung in einem oder beiden Schilddrüsenlappen, häufig assoziiert mit Plattenepithelmetaplasien und ausgedehnten lymphozytären Infiltraten

#### **e) oxyphile Variante**

Tumoren mit vollständig papillärem Aufbau, jedoch ohne die typischen Kernveränderungen der papillären Karzinome

#### **f) großzellige Variante**

Große Tumorzellen mit breitem azidophilen Zytoplasma, die typischen zytologischen Eigenschaften des papillären Karzinoms können fehlen.

**g) kolumnäre Variante**

Hochprismatische Tumorzellen, die Kerne weisen eine auffallende Stratifikation auf.

**Gering differenziertes (insuläres) Karzinom**

Dieser aggressive und häufig letale Tumortyp steht morphologisch und biologisch zwischen den differenzierten und den anaplastischen Schilddrüsenkarzinomen. Der Tumor besteht aus unterschiedlich großen Zellnestern und Zellverbänden. In unterschiedlichem Ausmaß findet man follikuläre und/oder papilläre Strukturmuster. Zum Teil finden sich trabekuläre oder spindelige Tumorabschnitte (Schmid und Böker et al., 1997; Larsen et al., 1998).

**Anaplastisches Karzinom**

Ein hochmaligner Tumor, der teilweise oder ganz aus einem undifferenzierten malignen Tumorgewebe besteht. Er entwickelt sich meist in einer länger bestehenden Knotenstruma. Das anaplastische Karzinom ist aus spindeligen, großzellig-polygonalen oder riesenzelligen Elementen aufgebaut. Es finden sich in großer Anzahl Mitosen sowie ausgedehnte Nekrosen und Einblutungen (Schmid und Böker et al., 1997).

Metastasen treten in kurzer Zeit in den Lungen, Nebennieren, im Skelettsystem, Gehirn und Herz auf.

Die anaplastischen Schilddrüsenkarzinome gehören durch ihr biologisch aggressives Verhalten zu den prognostisch ungünstigsten der menschlichen Neoplasien.

**Medulläres Karzinom**

Ein maligner Tumor, mit Zeichen der C-Zelldifferenzierung. Der überwiegende Teil der medullären Karzinome geht von den neuroektodermalen Kalzitonin-produzierenden C-Zellen aus.

Mikroskopisch zeigt sich ein solider Tumor mit monomorphen, polygonalen und spindeligen Zellen, der in 60-80% der Tumoren Amyloid enthält. Daneben können sich aber auch follikuläre oder pseudoglanduläre bzw. papilläre Strukturen finden.

Die Tumorzellen sind meist mittelgroß und polygonal mit feingranuliertem Zytoplasma, welches Kalzitonin enthält.

Man unterscheidet zwei Formen (Schmid und Böker et al., 1997):

**a) sporadisches MTC**

**b) familiäres MTC mit autosomal-dominanten Erbgang**

Bei der familiären Form existieren folgende Varianten, zum einen das familiäre MTC ohne weitere Endokrinopathien (only MTC). Zum anderen das MTC im Rahmen der multiplen endokrinen Neoplasie MEN Typ II mit den beiden Untergruppen MEN IIa (Sipple-Syndrom) und MEN IIb (Gorlin-Syndrom). Beim MEN IIa besteht eine Kombination eines MTC mit einem Phäochromozytom und einem Adenom der Parathyreoidea.

Beim MEN IIb finden sich außer einem MTC und einem Phäochromozytom ein marfanoider Habitus, Schleimhautneurome und eine intestinale Ganglioneuromatose.

Alle C-Zell-Karzinome sind durch den lokalen Infiltrationsmodus, die lymphogene Metastasierung und/oder die hämatogene Ausbreitung in die Lungen, Leber und Knochen gekennzeichnet.

## 1.5 Tumorartige benigne Schilddrüsenerkrankungen

### Struma

Angeborene und erworbene Funktionsstörungen der Schilddrüse mit ungenügender Hormonsynthese gehen meistens infolge der vermehrten hypophysär-thyreotropen Stimulierung mit einer nicht-entzündlichen, benignen Vergrößerung der Schilddrüse einher. Als Strumen gelten Drüsen mit einem Gewicht über 60 g. Die häufigsten Ursachen der Struma sind exogener Jodmangel, Jodfehlverwertung, strumigene Substanzen und Hormonsynthesedefekte.

Nach der Morphologie lassen sich vereinfacht folgende Formen unterscheiden:

#### **a) *Struma parenchymatosa***

Durch thyreotrope Stimulierung kommt es zu einer diffusen epithelialen Hyperplasie, mit kleinen bis mittelgroßen Follikeln sowie kubischem bis prismatischem Epithel.

#### **b) *Struma colloides diffusa***

Sie entsteht aus der Parenchymstruma durch eine verminderte thyreotrope Stimulierung und/oder herabgesetzte TSH-Empfindlichkeit. Es besteht eine vermehrte Kolloidbildung mit Abflachung des Epithels.

#### **c) *Struma colloides et nodosa***

Diese entwickelt sich aus einer Parenchymstruma oder über eine Kolloidstruma. Morphologisch findet sich ein Nebeneinander von Kolloidstruma, gekapselten Knoten, Adenomen, Einblutungen sowie Zysten- und Narbenbildungen. (Altenähr et al., 1981; Schmid und Böker et al., 1997).

## **1.6 Postoperative histopathologische Klassifikation (pTNM)**

(UICC 1993)

### **pT - Primärtumor**

- Tis- Carcinoma in situ
- T0- keine Evidenz für einen Primärtumor
- T1- Tumor von 1 cm oder weniger im Durchmesser, überschreitet die Schilddrüsenkapsel nicht
- T2- Tumor von 4 cm oder weniger und von mehr als 1 cm im Durchmesser, überschreitet die Schilddrüsenkapsel nicht
- T3- Tumor von mehr als 4 cm im Durchmesser, überschreitet die Schilddrüsenkapsel nicht
- T4- Tumor durchbricht die Schilddrüsenkapsel
- Tx- das Ausmaß der Tumorausbreitung kann nicht beurteilt werden

### **pN - Regionäre Lymphknoten**

- Nx- die Minimalerfordernisse zur Beurteilung der regionären Lymphknoten sind nicht erfüllt
- N0- keine Evidenz für den Befall der regionären Lymphknoten
- N1- regionäre Lymphknotenmetastasen
- N1a- Metastasen in ipsilateralen zervikalen Lymphknoten
- N1b- Metastasen in bilateralen medianen oder kontralateralen zervikalen oder in mediastinalen Lymphknoten

### **pM- Fernmetastasen**

- M0- keine Evidenz für Fernmetastasen
- M1- Fernmetastasen vorhanden
- Mx- keine oder unvollständige Metastasensuche

## 2 Zielstellung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist der Nachweis der Matrixmetalloproteasen MMP-2 und MMP-9 und deren Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 mittels RT-PCR und Immunhistochemie in malignen Neoplasien der Schilddrüse. Zum Vergleich werden benigne Gewebe der Schilddrüse mituntersucht.

Es sollen folgende Aspekte näher betrachtet werden:

- Zeigen die Inhibitoren im Vergleich zu den Proteasen ähnliche Expressionsraten ?
- Welche Unterschiede bestehen zwischen den verschiedenen Schilddrüsenkarzinomen ?
- Welche Unterschiede bestehen zwischen benignen und malignen Schilddrüsengeweben ?
- Gibt es Expressionsunterschiede bei Primärtumoren und Rezidiven ?
- Gibt es eine Korrelation zwischen Expressionsgrad und pTNM-Stadium der einzelnen Karzinome ?
- Sind die Proteasen und/oder deren Inhibitoren prognostische Marker für das metastatische Potential der Schilddrüsenkarzinome ?

## 3 Material und Methodik

### 3.1 Patientenmaterial

Die Untersuchungen wurden durch die Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg genehmigt.

Die untersuchten Schilddrüsengewebe stammen von Patienten, die zur Operation ihres Tumors aus klinischer Indikation im Zeitraum von 5/96 bis 2/99 in die Klinik für Allgemein Chirurgie der MLU Halle kamen. Alle Patienten gaben ihr Einverständnis zur Verwendung ihres Gewebes für wissenschaftliche Untersuchungen.

Das Gewebe wurde im Rahmen der Operation entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert.

Es wurden folgende Gewebe untersucht:

Struma nodosa	(15 Patienten im Alter von 35 bis 74 Jahren, Ø 51,8 Jahre)
FTC	(10 Patienten im Alter von 36 bis 68 Jahren, Ø 52,5 Jahre)
PTC	(17 Patienten im Alter von 17 bis 75 Jahren, Ø 47,8 Jahre)
pdTC	(7 Patienten im Alter von 28 bis 86 Jahren, Ø 64,7 Jahre)
UTC	(16 Patienten im Alter von 42 bis 87 Jahren, Ø 66,2 Jahre)
MTC	(28 Patienten im Alter von 11 bis 71 Jahren, Ø 45,0 Jahre).

Die Zusammensetzung des Patientenkollektivs entsprach den internationalen Daten. Es erkrankten insgesamt mehr Frauen als Männer. Von den 15 an Struma nodosa et diffusa erkrankten Patienten waren 13 weiblich. In der Gruppe der differenzierten Karzinome (FTC/PTC) betrug der Anteil der Frauen 19 von 27, in der Gruppe der schlecht differenzierten und anaplastischen Karzinome 14 von 23 und in der MTC-Gruppe 13 von 28.

### 3.2 Histologische Klassifikation

Anhand histopathologischer Befunde des Pathologischen Instituts der Universität Halle (Direktor: Prof. Dr. Rath) wurde eine histologische Klassifikation vorgenommen:

#### Benigne Schilddrüsengewebe (Tab. 3)

Fall	Geschlecht	Alter	Gewebeart
1	w	51	Struma colloides et nodosa
2	w	42	Struma colloides et nodosa
3	w	57	Struma colloides et nodosa
4	w	35	Struma colloides et nodosa
5	w	42	Struma colloides et nodosa
6	w	61	Struma colloides et nodosa
7	w	51	Struma colloides et nodosa
8	m	73	Struma colloides et nodosa
9	m	65	Struma colloides et nodosa
10	w	41	Struma colloides et nodosa
11	w	47	Struma colloides et nodosa
12	w	43	Struma colloides et nodosa
13	w	60	Struma colloides et nodosa
14	w	74	Struma colloides et nodosa
15	w	35	Struma colloides et nodosa

**Tab. 3:** Benigne Schilddrüsengewebe

**Maligne Schilddrüsengewebe (Tab. 4-9)**

Fall	Geschlecht	Alter	Tumorart	pTNM
16	w	41	FTC minimal invasiv	T2 N0 Mx
17	w	68	FTC oxyphile Variante	T2 N1 Mx
18	w	35	FTC grob invasiv	T3 Nx M1
19	w	68	FTC grob invasiv	T3 Nx Mx
20	w	53	FTC grob invasiv	T4 N0 M0
21	w	36	FTC grob invasiv	T4 N0 M0
22	m	68	FTC grob invasiv	T4 N0 Mx
23	m	43	FTC-Rez. grob invasiv	T4 N1a Mx*
24	w	52	FTC-Rez. grob invasiv	T4 N1b Mx*
25	w	61	FTC-Rez. grob invasiv	T4 N1b M1*

**Tab. 4: FTC**

Fall	Geschlecht	Alter	Tumorart	pTNM
26	m	55	PTC Mikrokarzinom	T1 N0 M0
27	w	17	PTC grob invasiv	T2 N0 Mx
28	w	47	PTC invasiv	T2 N0 Mx
29a	m	36	PTC überwiegend follikulär	T2 N1 Mx
29b	m	36	PTC LK-Metastase	T2 N1 Mx
30	w	61	PTC foll. Variante Lindsay	T4 N0 Mx
31	w	68	PTC überwiegend follikulär	T4 N0 Mx
32	w	41	PTC invasiv	T4 N0 Mx
33	w	74	PTC diffus sklerosierend	T4 N1 Mx
34	w	32	PTC LK – Rezidiv	T2 N1b M0*
35	m	72	PTC LK – Rezidiv	T4 N1a M1*
36	w	10	PTC LK – Rezidiv	T4 N1b M0*
37	m	26	PTC LK – Rezidiv	T4 N1b M1*
38	w	28	PTC LK – Rezidiv	T4 N1b Mx*
39	m	66	PTC LK – Rezidiv	T4 Nx Mx*
40	w	75	PTC LK – Rezidiv	T4 Nx Mx*
41	w	47	PTC Lokalrezidiv	T2 N0 M1*
42	w	57	PTC Lokalrezidiv	T4 N0 M0*

**Tab. 5: PTC**

\* Tumorrezidive: TNM Stadium des Primärtumors

Fall	Geschlecht	Alter	Tumorart	pTNM
43	m	72	pdTC (PTC)	T3 N0 M1
44	m	28	pdTC (FTC)	T3 N0 M1
45	w	86	pdTC (FTC)	T3 N1a Mx
46	m	57	pdTC (FTC)	T3 N1b Mx
47	m	67	pdTC (FTC)	T4 N0 M0
48	w	66	pdTC (FTC)	T4 N0 Mx
49	w	77	pdTC (FTC)	T4 N1b Mx

**Tab. 6:** gering differenzierte (insuläre) Karzinome

Fall	Geschlecht	Alter	Tumorart	pTNM
50	m	52	UTC	T3 N1b M0
51	m	63	UTC	T3 N1b M1
52	m	54	UTC	T3 N1b Mx
53	w	76	UTC	T4 N1a M1
54	w	59	UTC	T4 N1a M1
55	w	74	UTC	T4 N1a Mx
56	w	71	UTC	T4 N1a Mx
57	m	69	UTC	T4 N1b M1
58	m	65	UTC	T4 N1b M1
59	w	72	UTC	T4 N1b M1
60	w	76	UTC	T4 N1b M1
61	w	87	UTC	T4 N1b M1
62	w	42	UTC	T4 N1b Mx
63	w	79	UTC	T4 N1b Mx
64	w	53	UTC – Rezidiv	T4 N1a Mx*
65	w	68	UTC - Rezidiv	T4 N1a Mx*

**Tab. 7:** UTC

\* Tumorrezidive: TNM Stadium des Primärtumors

Fall	Geschlecht	Alter	Tumorart	pTNM
66	m	56	MTC	T2 N0 Mx
67	m	34	MTC	T2 N0 Mx
68	w	57	MTC	T2 N1a M0
69	w	53	MTC	T2 N1a Mx
70	m	35	MTC	T2 N0 Mx
71	w	47	MTC	T3 N0 Mx
72	m	57	MTC	T3 N1a Mx
73	m	42	MTC	T4 N1a M1
74	m	20	MTC	T4 N1b M1
75	m	71	MTC	T4 N1b M1
76	w	40	MTC LK – Rezidiv	T2 N1a M0*
77	m	48	MTC LK – Rezidiv	T2 N1a Mx*
78	m	56	MTC LK – Rezidiv	T2 N1a Mx*
79	m	49	MTC LK – Rezidiv	T3 Nx Mx*
80	m	53	MTC Lokalrezidiv	T1 N1a M0*
81	w	62	MTC Lokalrezidiv	T2 N1a M0*
82a	w	65	MTC 4. Lokalrezidiv	T4 N1a M0*
82b	w	65	MTC 5. Lokalrezidiv	T4 N1a M0*
82c	w	65	MTC 6. Lokalrezidiv	T4 N1a M0*
85	m	61	MTC Lokalrezidiv	T4 N1a M1*
86	w	71	MTC Lokalrezidiv	T4 N1b M0*
87	w	49	MTC Lokalrezidiv	T4 N1b M1*
88	m	57	MTC Lokalrezidiv	T4 N1b Mx*

**Tab. 8:** Sporadische MTC

Fall	Geschlecht	Alter	Tumorart	pTNM
89	w	24	MTC MEN IIa	T1 N0 M0
90	m	27	MTC MEN IIa	T2 N0 Mx
91	w	47	MTC MEN IIa	T2 N0 Mx
92	w	17	MTC MEN IIa	T2 N1a M0
93	w	29	MTC MEN IIb	T3 N1b Mx
94	m	23	MTC MEN IIb	T4 N1a M1
95	w	11	MTC MEN IIb	T4 N1b M1

**Tab. 9:** Familiäre MTC

\* Tumorrezidive: TNM Stadium des Primärtumors

### 3.3 RT-PCR

Insgesamt wurden 4 Primer für die zu untersuchenden Gene angewendet und 1 Primer (18 S) als interne Kontrolle genutzt.

Primer	Amplifikatgröße	Annealing Temperatur	Zyklenzahl
18S	346 bp	62°	28
MMP 2	523 bp	59°	30
MMP 9	530 bp	64°	35
TIMP 1	405 bp	56°	30
TIMP 2	371 bp	59°	30

**Tab. 10:** Größe der Amplifikate, Annealing Temperatur und Anzahl der Zyklen der verwendeten Primer

Die für PCR benötigte cDNA wurde mittels Superscript II-Kit (Gibco, München) hergestellt. Für die PCR wurden 16.3 µl Aqua bidest, 2.5 µl 10x PCR-Puffer, 3.0 µl nNTP-Mix, jeweils 0.25 µl 10µM Primer sense und antisense (Tab. 10 und 11), 0.2 µl Taq-DNA-Polymerase (Perkin Elmer) und 2.0 µl cDNA in ein PCR Tube pipettiert. Die PCR wurde mittels eines Thermozyklers (TRIO, Biometra, Göttingen) durchgeführt. Größe der Amplifikate, Annealing Temperatur sowie optimale Zyklenzahl sind in Tab. 10 dargestellt. Die elektrophoretische Trennung erfolgte auf einem 1%igen Agarosegel bei 70 mA in TBE-Puffer und dauerte etwa 2 Stunden. mRNA von Ovarialfibroblasten wurde als Positivkontrolle für die MMP-2-, MMP-9-, TIMP-1- und TIMP-2-Transkripte genutzt.

Primer		Sequenz
18 S	S	5' GTT GGT GGA GCG ATT TGT CTG G 3'
	AS	5' AGG GCA GGG ACT TAA TCA ACG C 3'
MMP 2	S	5' GCA GAT GCC TGG AAT GCC AT 3'
	AS	5' AGG GTT CTG TGA GCC ACA GA 3'
MMP 9	S	5' GCT ATG GTT ACA CTC GGG TG 3'
	AS	5' GCC ATC TGC GTT TCC AAA CC 3'
TIMP 1	S	5' ATT CCG ACC TCG TCA TCA G 3'
	AS	5' CGT CCA CAA GCA ATG AGT G 3'
TIMP 2	S	5' GAC GTT GGA GGA AAG AAG GA 3'
	AS	5' CGT TGG AGG CCT GCT TAT GG 3'

**Tab. 11:** Liste der verwendeten Primer und deren Sequenzen.  
S: Sense, AS: Antisense

## **Auswertung**

Als Bezugsgröße für die Auswertung der mRNA-Expression auf den Gelen diente die Bande der Ovarialfibroblasten. Diese Bande wurde als starke Expression (++) definiert.

- negativ, keine Bande
- + schwach positiv, schwächere Bande als Vergleichsbande
- ++ stark positiv, äquivalent der Vergleichsbande

## **3.4 Immunhistochemie**

Aus den tiefgefrorenen Geweben wurden mit Hilfe eines Cryostat-Mikrotom 6-7 µm Schnitte angefertigt. Die Schnitte trockneten bei Raumtemperatur und wurden bis zur immunhistochemischen Färbung bei -80 °C gelagert.

Die Immunhistochemie wurde nach der Avidin-Biotin-Komplex-Methode durchgeführt. Der LSAB+Kit Peroxidase und der Chromogen-Substrat-Kit der Firma Dako dienen als Detektionssystem. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase in Granulozyten und Erythrozyten wurden sämtliche Präparate 20 min mit Methanol-Wasserstoffperoxid-Lösung (4 Teile Methanol und 1 Teil Wasserstoffperoxid) behandelt. Nach Spülung mit Phosphate-buffered-Saline-Puffer (PBS) wurden die Gefrierschnitte zur Verminderung der Hintergrundfärbung für 10 min mit normalem Schweineserum inkubiert. Anschließend wurde jeweils für 24 h bei 4°C in der feuchten Kammer mit dem monoklonalen Antikörper der Maus (verwendete Antikörper Tab. 12 und 13) inkubiert. Nach dreifachem Waschen in PBS wurde mit dem biotinyliertem Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen, Anti-Maus, Anti-Ziege Immunglobulin DAKO, USA) 15 min inkubiert. Nach der PBS-Waschung erfolgte nun die Inkubation mit Avidin-Biotin-Meerrettich-Peroxidase-Komplex (DAKO, USA) für 15 min.

Die Antigen-Antikörper-Bindungsstellen wurden sichtbar nach Inkubation mit 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAKO, USA) für 5 min. Markierte Stellen im Präparat erschienen rotbraun. Die Präparate wurden dreimal in PBS gewaschen mit Hämatoxylin gegengefärbt und dann mit Aquatex eingedeckt. Die Spezifität der Immunhistochemie wurde durch Auslassen einzelner Schritte im Protokoll, bzw. durch Ersetzen des Antikörpers durch ein nicht immunes Serum überprüft (Van Noorden et al., 1990).

Als Positivkontrolle wurde ein Adenokarzinom des Rektums genutzt.

## Antikörper

Für den immunhistochemischen Nachweis von MMP-Antigenen und TIMP-Antigenen wurden folgende Antikörper verwendet (Tab. 12 und 13):

Anti-körper	Ursprung	Ig – Subklasse	Verdünnung	Firma	Referenzen
MMP-2	Maus-monoclonaler Antikörper Clone 42-5D11 (5)	IgG1	10 µg/ml	Calbiochem Cambridge	Stetler-Stevenson et al. 1993 Woessner et al. 1991
MMP-9	Maus-monoclonaler Antikörper Clone 6-6B (5,7)	IgG1	10 µg/ml	Calbiochem Cambridge	Stetler-Stevenson et al. 1993 Woessner et al. 1991

**Tab. 12:** Verzeichnis der verwendeten MMP-Antikörper

Der MMP-2 Antikörper erkennt sowohl die latente (72 kDa) als auch die aktive (66 kDa) Form der humanen Matrixmetalloprotease-2.

Der MMP-9 Antikörper erkennt sowohl die latente (92 kDa) als auch die aktive (83 kDa) Form der humanen Matrixmetalloprotease-9.

Anti-körper	Ursprung	Ig – Subklasse	Verdünnung	Firma	Referenzen
TIMP-1	Maus-monoclonaler Antikörper Clone 7-6C1 (5)	IgG1	10 µg/ml	Calbiochem Cambridge	Stetler-Stevenson et al. 1993 Woessner et al. 1991
TIMP-2	Maus-monoclonaler Antikörper Clone T2-101 (5)	IgG1	10 µg/ml	Calbiochem Cambridge	Stetler-Stevenson et al. 1993 Woessner et al. 1991

**Tab. 13:** Verzeichnis der verwendeten TIMP-Antikörper

## Auswertung

Die histologischen Schnitte wurden lichtmikroskopisch von zwei unabhängigen Untersuchern ausgewertet, die die klinische und histologische Diagnose nicht kannten.

Die Färbungen wurden subjektiv semiquantitativ und semiquantitativ bewertet:

- quantitativ - Prozentsatz der Tumorzellen oder des Stromas mit Immunreaktivität
- qualitativ - Qualitative Intensität der Färbung (- negativ, -schwach, -stark)

Die Immunreaktivität wurde in folgende drei Gruppen klassifiziert (Ara et al., 1998):

- keine oder fokal schwache Färbung (< 50% positive Zellen)
- + fokal starke Färbung (< 50% positive Zellen) oder diffus schwache Färbung (> 50% positive Zellen)
- ++ diffus starke Färbung (> 50% stark positive Zellen)

## 4 Ergebnisse

### 4.1 MMP-2 und MMP-9

#### 4.1.1 RT-PCR

Die RT-PCR Untersuchungen wurden mit je 5 FTC, PTC, pdTC, UTC und MTC durchgeführt.

Fall	Gewebeart	MMP-2	MMP-9
18	FTC	+	-
21	FTC	+	+
22	FTC	+	+
24	FTC	++	+
25	FTC	++	++
26	PTC	-	-
29	PTC	+	++
31	PTC	++	++
33	PTC	+	+
37	PTC	-	-
43	pdTC	+	++
45	pdTC	+	++
46	pdTC	+	-
47	pdTC	-	-
49	pdTC	++	++
50	UTC	-	-
53	UTC	++	++
60	UTC	-	++
64	UTC	++	++
65	UTC	+	++
66	MTC	-	+
87	MTC	-	++
89	MTC	-	+
92	MTC	+	++
93	MTC	+	+

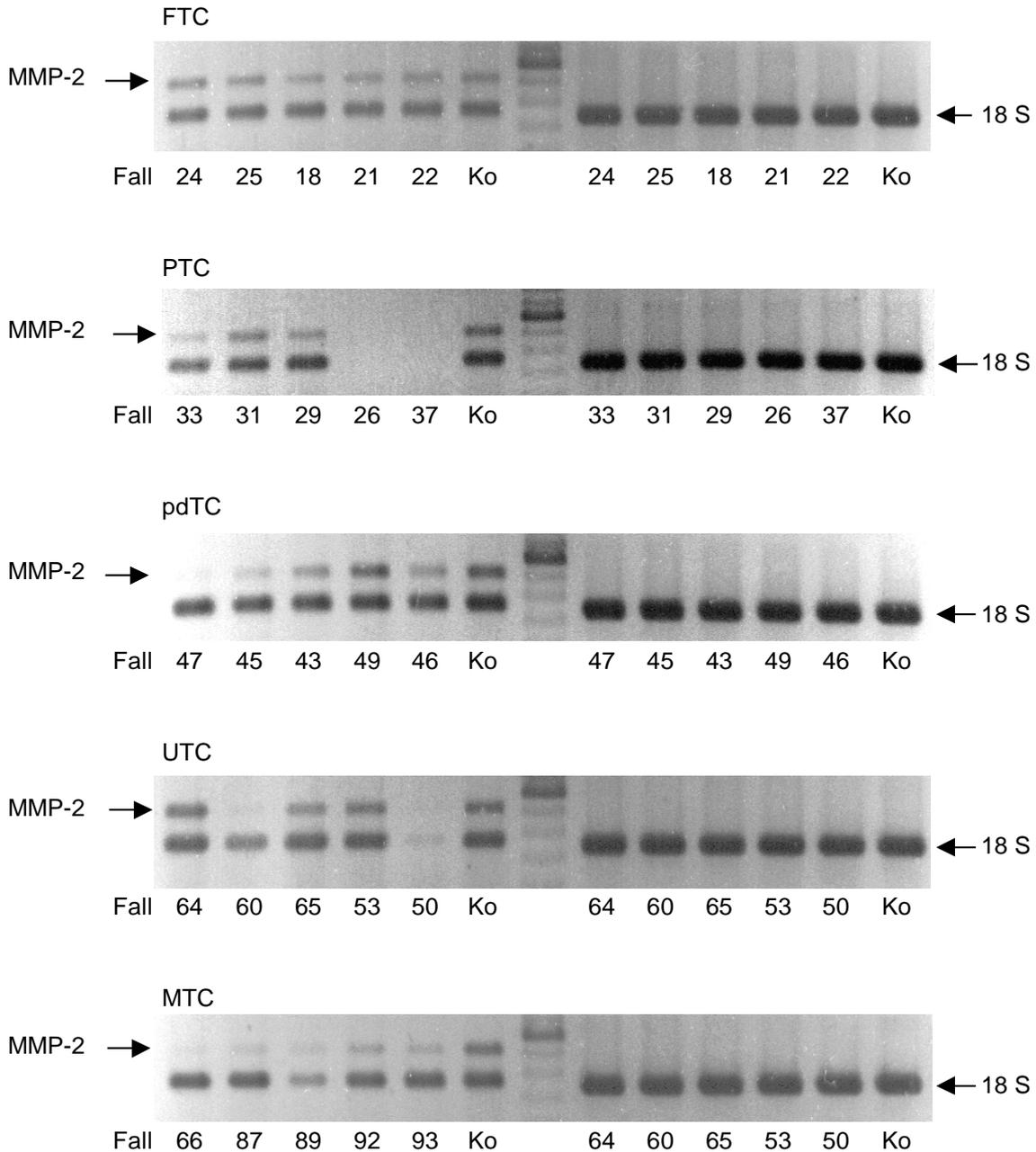
**Tab. 14:** mRNA-Expression von MMP-2 und MMP-9 in folliculären (FTC), papillären (PTC), schlecht differenzierten (pdTC), undifferenzierten (UTC) und medullären Schilddrüsenkarzinomen (MTC). Als Bezugsgröße für die Auswertung der mRNA-Expression diente die Bande der Ovarialfibroblasten. Diese Bande wurde als starke Expression definiert. - negativ, keine Bande, + schwach positiv, schwächere Bande als Vergleichsbande, ++ stark positiv, äquivalent der Vergleichsbande.

#### MMP-2

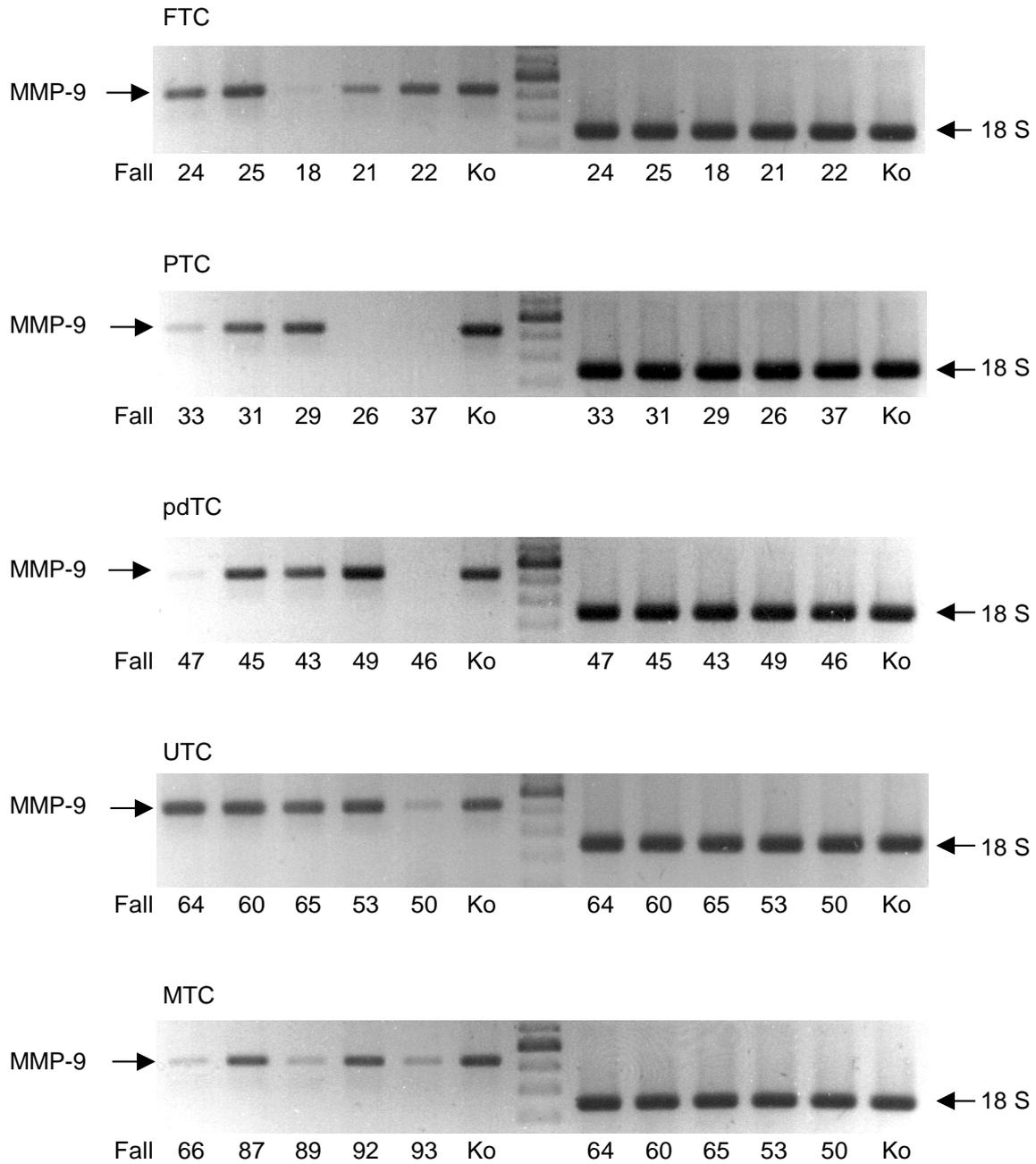
In 17 von 25 Geweben war mRNA von MMP-2 nachweisbar, wobei 6 Tumoren eine starke Expression zeigten (Tab. 14, Abb.1).

### MMP-9

Die mRNA von MMP-9 konnte in 19 von 25 Tumoren detektiert werden. Davon zeigten 12 Tumoren eine starke Expression (Tab. 14, Abb.2).



**Abb. 1:** mRNA-Expression von MMP-2 und 18S in follikulären (FTC), papillären (PTC), schlecht differenzierten (pdTC), undifferenzierten (UTC) und medullären Schilddrüsenkarzinomen (MTC). Die 346 bp-Bande von 18S zeigt, daß die Probe gleichmäßig aufgetragen wurde. Als Bezugsgröße für die Auswertung der mRNA-Expression auf den Gelen diente die Bande der Ovarialfibroblasten (=Ko). Diese Bande wurde als starke Expression (++) definiert. Im Vergleich dazu wurden schwächere Banden als schwach positiv (+) bzw. keine Banden mit negativ (-) bewertet.



**Abb. 2:** mRNA-Expression von MMP-9 und 18S in follikulären (FTC), papillären (PTC), schlecht differenzierten (pdTC), undifferenzierten (UTC) und medullären Schilddrüsenkarzinomen (MTC). Die 346 bp-Bande von 18S zeigt, daß die Probe gleichmäßig aufgetragen wurde. Als Bezugsgröße für die Auswertung der mRNA-Expression auf den Gelen diente die Bande der Ovarialfibroblasten (=Ko). Diese Bande wurde als starke Expression (++) definiert. Im Vergleich dazu wurden schwächere Banden als schwach positiv (+) bzw. keine Banden mit negativ (-) bewertet.

#### 4.1.2 Immunhistochemie

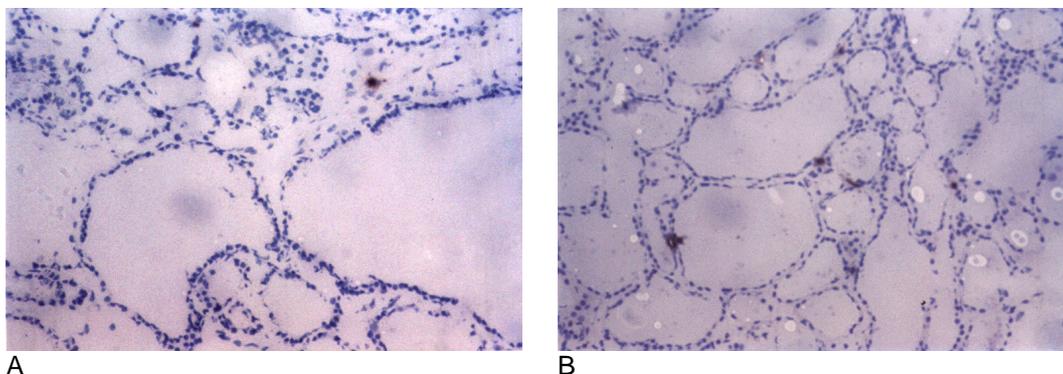
##### Benigne Schilddrüsengewebe (Tab. 15)

Die 15 untersuchten Schilddrüsengewebe zeigten zum größten Teil keine oder nur eine fokal schwache Expression von MMP-2 und MMP-9. Meist waren nur vereinzelte Zellen mit fokal schwacher Färbung nachweisbar (Abb.3A-B). An fibrotische und atrophische Gebiete angrenzende Follikelzellen zeigten in einigen Fällen eine fokal starke Färbung.

Fall	Gewebeart	MMP-2	MMP-9
1	Struma colloides et nodosa	-	-
2	Struma colloides et nodosa	-	-
3	Struma colloides et nodosa	+	-
4	Struma colloides et nodosa	-	-
5	Struma colloides et nodosa	-	+
6	Struma colloides et nodosa	-	+
7	Struma colloides et nodosa	-	-
8	Struma colloides et nodosa	-	-
9	Struma colloides et nodosa	-	+
10	Struma colloides et nodosa	-	-
11	Struma colloides et nodosa	-	-
12	Struma colloides et nodosa	-	-
13	Struma colloides et nodosa	-	-
14	Struma colloides et nodosa	-	-
15	Struma colloides et nodosa	-	+

**Tab. 15:** Immunreaktivität von MMP-2 und MMP-9 in benignen Strumen

- keine oder fokal schwache Färbung (< 50% positive Zellen), + fokal starke Färbung (< 50% positive Zellen) oder diffus schwache Färbung (> 50% positive Zellen), ++ diffus starke Färbung (> 50% stark positive Zellen)



**Abb. 3:** Immunhistochemischer Nachweis von MMP-2 und MMP-9 in benignen Strumen x20

A: MMP-2-Immunreaktivität in einer Struma colloides et nodosa, nur vereinzelte Zellen zeigen eine Immunreaktivität (Fall 2).

B: MMP-9-Immunreaktivität in einer Struma colloides et nodosa, nur vereinzelte Zellen zeigen eine Immunreaktivität (Fall 8).

## Follikuläre Schilddrüsenkarzinome (Tab. 16)

### MMP-2

Im minimal invasiven follikulären Karzinom (Fall 16) konnten nur einige vereinzelte fokal schwach gefärbte Gebiete nachgewiesen werden. Das oxyphile Karzinom (Fall 17) zeigte eine fokal starke bis diffus starke MMP-2-Expression (Abb. 4B). Von den 5 grob invasiven Primärtumoren war 1 Tumor (Fall 22) nur fokal schwach, die anderen 4 fokal bis diffus stark (Abb. 4A). 2 von 3 FTC-Rezidiven zeigten eine moderate Expression.

In der Mehrzahl der FTC konnte sowohl eine Färbung des Zytoplasmas der Tumorzellen als auch der Fibroblasten des umgebenden Stromas detektiert werden.

### MMP-9

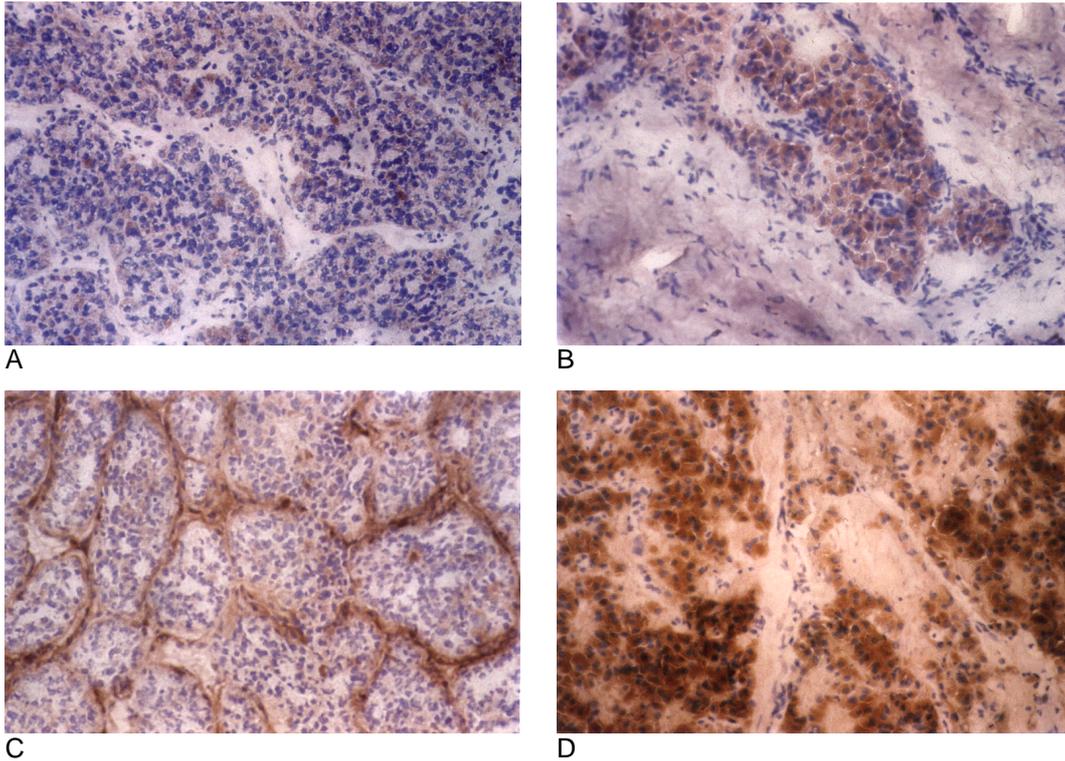
Das minimal invasive follikuläre Karzinom (Fall 16) zeigte nur eine fokal schwache Immunreaktivität. Das oxyphile Karzinom (Fall 17) war diffus stark gefärbt (Abb. 4D). Von den 5 grob invasiven Primärtumoren zeigten 4 eine fokal bis diffus starke MMP-9-Expression (Abb. 4C).

Bei den FTC-Rezidiven konnte überwiegend eine fokal starke Stromafärbung in der Umgebung des Tumors beobachtet werden.

Fall	Tumorart	MMP-2	MMP-9
16	FTC minimal invasiv	-	-
17	FTC oxyphile Variante	++	++
18	FTC grob invasiv	+	+
19	FTC grob invasiv	++	+
20	FTC grob invasiv	+	++
21	FTC grob invasiv	+	+
22	FTC grob invasiv	-	-
23	FTC-Rezidiv grob invasiv	+	+
24	FTC-Rezidiv grob invasiv	-	+
25	FTC-Rezidiv grob invasiv	+	+

**Tab. 16:** Immunreaktivität von MMP-2 und MMP-9 in follikulären Schilddrüsenkarzinomen (FTC)

- keine oder fokal schwache Färbung (< 50% positive Zellen), + fokal starke Färbung (< 50% positive Zellen) oder diffus schwache Färbung (> 50% positive Zellen), ++ diffus starke Färbung (> 50% stark positive Zellen)



**Abb. 4:** Immunhistochemischer Nachweis von MMP-2 und MMP-9 in folliculären Schilddrüsenkarzinomen (FTC) x20

- A: MMP-2-Immunreaktivität in einem grob invasiven FTC, diffus schwache Färbung des Tumorzellzytoplasmas (Fall 20).
- B: MMP-2-Immunreaktivität in einem oxyphilen FTC, starke Färbung des Tumorzellzytoplasmas und diffus schwache Stromafärbung (Fall 17).
- C: MMP-9-Immunreaktivität in einem grob invasiven FTC, diffus schwache Färbung des Tumorzellzytoplasmas und fokale starke Färbung der Stromazellen (Fall 20).
- D: MMP-9-Immunreaktivität in einem oxyphilen FTC, starke Färbung des Tumorzellzytoplasmas (Fall 17).

## Papilläre Schilddrüsenkarzinome (Tab. 17)

### MMP-2

Bei den papillären Schilddrüsenkarzinomen war in 6 von 8 Primärtumoren eine positive Reaktion zu beobachten, wobei das diffus sklerosierende PTC (Fall 33) eine diffus starke Immunreaktivität aufwies (Abb. 5A), die anderen 5 Tumoren, eingeschlossen das Mikrokarzinom (Fall 26), zeigten eine diffus schwache bzw. eine fokale starke Immunreaktivität.

Bei einem PTC (Fall 29a) wurde eine dazu gehörige Lymphknotenmetastase (Fall 29b) mit untersucht, beide Gewebe wiesen eine fokale starke Immunreaktivität auf.

Die 7 Lymphknotenrezidive und die 2 Lokalrezidive waren, bis auf eine Ausnahme (Fall 39), positiv für MMP-2.

Die papillären Schilddrüsenkarzinome zeigten überwiegend eine zytoplasmatische Färbung der Tumorzellen und auch der den Tumor umgebenden Fibroblasten. Eine besonders intensive Färbung wiesen die invasiven Ränder der Tumoren auf.

Fall	Tumorart	MMP-2	MMP-9
26	PTC Mikrokarzinom	+	+
27	PTC grob invasiv	+	+
28	PTC invasiv	+	+
29a	PTC überwiegend follikulär	-	+
29b	PTC LK-Metastase	-	+
30	PTC foll. Variante Lindsay	-	++
31	PTC überwiegend follikulär	+	+
32	PTC invasiv	+	+
33	PTC diffus sklerosierend	++	+
34	PTC LK – Rezidiv	+	+
35	PTC LK – Rezidiv	+	+
36	PTC LK – Rezidiv	+	+
37	PTC LK – Rezidiv	+	+
38	PTC LK – Rezidiv	+	+
39	PTC LK – Rezidiv	-	+
40	PTC LK – Rezidiv	+	+
41	PTC Lokalrezidiv	+	+
42	PTC Lokalrezidiv	+	+

**Tab. 17:** Immunreaktivität von MMP-2 und MMP-9 in papillären Schilddrüsenkarzinomen (PTC)

- keine oder fokal schwache Färbung (< 50% positive Zellen), + fokal starke Färbung (< 50% positive Zellen) oder diffus schwache Färbung (> 50% positive Zellen), ++ diffus starke Färbung (> 50% stark positive Zellen)

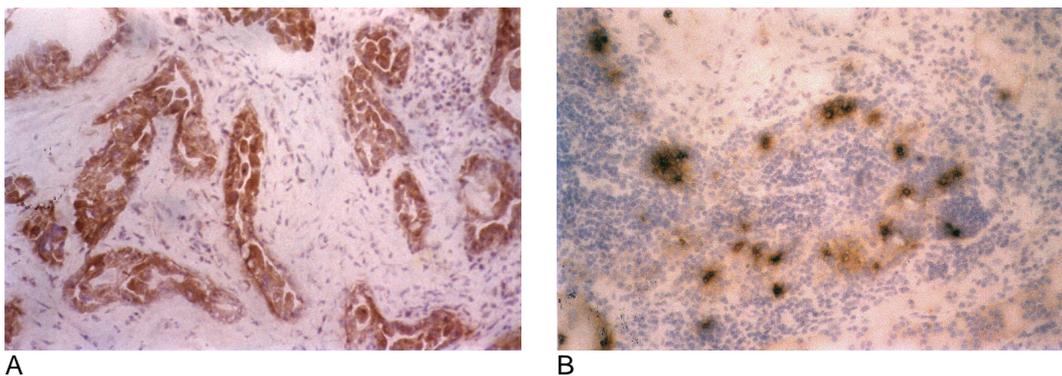
### MMP-9

Hier waren bei allen Primärtumoren eine fokal starke bzw. diffus schwache Expression zu beobachten. Ein PTC vom Lindsay-Typ (Fall 30) zeigte eine diffus starke Färbung.

Das PTC (Fall 29a) und die dazu gehörige Lymphknotenmetastase (Fall 29b) exprimierten in ähnlicher Weise MMP-9 (Abb. 5B).

Bei allen 7 Lymphknotenrezidiven und den 2 Lokalrezidive konnte eine diffus schwache bis fokal starke Immunreaktivität nachgewiesen werden.

Auch bei der Protease MMP-9 war eine überwiegend zytoplasmatische Färbung der Tumorzellen und der den Tumor umgebenden Fibroblasten auffallend.



**Abb. 5:** Immunhistochemischer Nachweis von MMP-2 und MMP-9 in papillären Schilddrüsenkarzinomen (PTC) x20

- A: MMP-2-Immunreaktivität in einem diffus sklerosierenden PTC, starke Färbung des Tumorzellzytoplasmas, das Stroma zeigt eine diffus schwache Färbung (Fall 33).  
 B: MMP-9-Immunreaktivität in einer PTC-Lymphknotenmetastase MMP-9 exprimierende Zellen am Übergang Tumor-Lymphknoten (Fall 29b).

### Gering differenzierte (insuläre) Schilddrüsenkarzinome (Tab. 18)

#### MMP-2

Die pdTC exprimierten in 6 von 7 untersuchten Tumoren MMP-2, wobei ein Tumor (Fall 49) stark positiv reagierte, die anderen 5 zeigten eine fokal starke bzw. diffus schwache Immunreaktivität (Abb. 6A). Es war eine ausgeprägte Färbung der Tumor- und Stromazellen, aber auch der Gefäßendothelien zu beobachten.

#### MMP-9

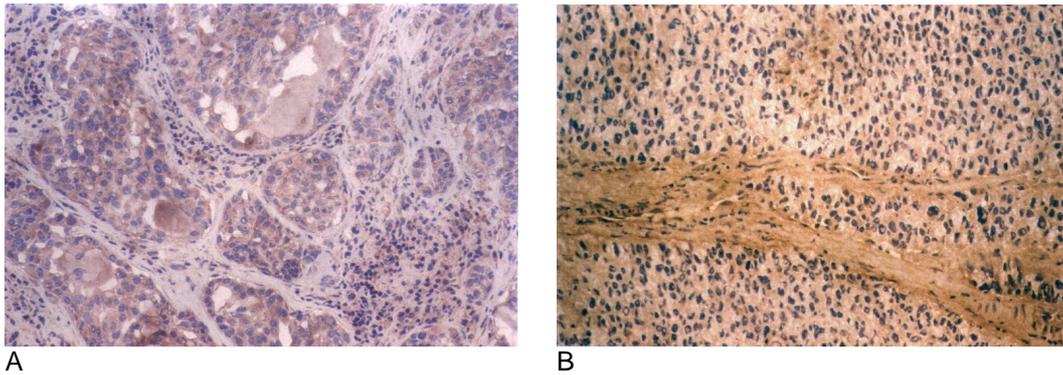
In allen gering differenzierten Karzinomen war eine Expression von MMP-9 nachweisbar. Die Immunreaktivität variierte von diffus schwach bzw. fokal stark bis diffus stark (Abb. 6B).

Auch hier war das Immunreaktionsprodukt vor allem im Zytoplasma der Tumor- und Stromazellen, aber auch besonders in den Gefäßendothelien zu detektieren.

Fall	Tumorart	MMP-2	MMP-9
43	pdTC (PTC)	+	++
44	pdTC (FTC)	-	+
45	pdTC (FTC)	+	++
46	pdTC (FTC)	+	+
47	pdTC (FTC)	+	+
48	pdTC (FTC)	+	+
49	pdTC (FTC)	++	++

**Tab. 18:** Immunreaktivität von MMP-2 und MMP-9 in gering differenzierten Karzinomen(pdTC)

- keine oder fokal schwache Färbung (< 50% positive Zellen), + fokal starke Färbung (< 50% positive Zellen) oder diffus schwache Färbung (> 50% positive Zellen), ++ diffus starke Färbung (> 50% stark positive Zellen)



**Abb. 6:** Immunhistochemischer Nachweis von MMP-2 und MMP-9 in gering differenzierten Karzinomen (pdTC) x20

- A: MMP-2-Immunreaktivität in einem pdTC, diffus schwache Färbung des Tumorzellzytoplasmas und des Stromas (Fall 46).
- B: MMP-9-Immunreaktivität in einem pdTC, diffus starke Färbung des Tumorzellzytoplasmas und des Stromas (Fall 45).

### Undifferenzierte Schilddrüsenkarzinome (Tab. 19)

Fall	Tumorart	MMP-2	MMP-9
50	UTC	-	-
51	UTC	+	+
52	UTC	-	++
53	UTC	++	++
54	UTC	+	+
55	UTC	+	+
56	UTC	-	-
57	UTC	+	++
58	UTC	+	++
59	UTC	-	+
60	UTC	-	+
61	UTC	-	+
62	UTC	-	+
63	UTC	+	++
64	UTC – Rezidiv	+	+
65	UTC – Rezidiv	+	+

**Tab. 19:** Immunreaktivität von MMP-2 und MMP-9 in undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen (UTC)

- keine oder fokal schwache Färbung (< 50% positive Zellen), + fokal starke Färbung (< 50% positive Zellen) oder diffus schwache Färbung (> 50% positive Zellen), ++ diffus starke Färbung (> 50% stark positive Zellen)

#### MMP-2

Von den 14 untersuchten Primärtumoren erwiesen sich 7 als negativ. Die übrigen 7 von 14 undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen zeigten überwiegend eine diffus schwache

Expression, zum Teil waren auch fokal starke Gebiete (Abb. 7A) vorhanden. Ein Tumor (Fall 53) zeigte mehr als 50% stark positive Zellen.

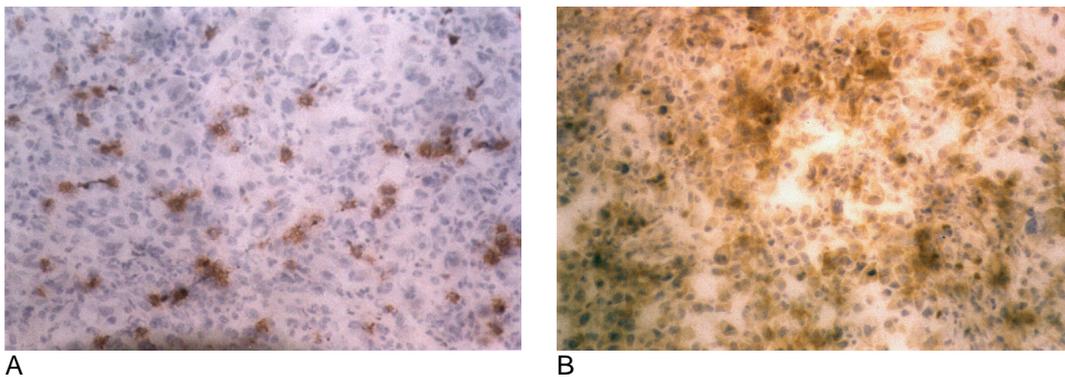
Bei den 2 undifferenzierten Rezidivtumoren war eine fokal starke Reaktion zu beobachten.

#### *MMP-9*

Hier konnte in 12 von 14 undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen eine positive Immunreaktivität nachgewiesen werden. 5 UTC zeigten mehr als 50% stark positive Zellen (Abb. 7B), bei den restlichen 7 UTC variierte die MMP-9-Expression von diffus schwach bis fokal stark.

Bei den 2 undifferenzierten Rezidivtumoren war eine fokal starke Reaktion zu beobachten.

In den undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen wurde das Immunreaktionsprodukt vor allem im Tumorzellzytoplasma vorgefunden.



**Abb. 7:** Immunhistochemischer Nachweis von MMP-2 und MMP-9 in undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen (UTC) x20

A: MMP-2-Immunreaktivität in einem UTC, fokal starke Färbung einzelner Tumorzellen (Fall 57).

B: MMP-9-Immunreaktivität in einem UTC, diffus starke Färbung der Tumorzellen (Fall 57).

### **Medulläre Schilddrüsenkarzinome (Tab. 20)**

#### *MMP-2*

Bei den sporadischen medullären Schilddrüsenkarzinomen exprimierten 7 von 10 Primärtumoren MMP-2 diffus schwach bzw. fokal stark. 3 Primärtumoren waren negativ.

Die 4 untersuchten Lymphknotenrezidive zeigten eine fokal schwache bzw. keine MMP-2-Expression. Die 9 Lokalrezidive exprimierten in 3 Fällen fokal stark MMP-2, 6 Lokalrezidive waren fokal schwach oder negativ (Abb. 8A).

Die Fälle 82a-82c sind das 4.-6. Lokalrezidiv eines sporadischen MTC einer Patientin. Diese 3 Lokalrezidive zeigten keine MMP-2-Expression.

Von den 4 familiären MTC MEN IIa erwies sich nur 1 Tumor als fokal stark, während die anderen 3 negativ waren. Ebenso bei den 3 familiären MTC MEN IIb, hier exprimierte nur ein Tumor MMP-2 fokal stark.

Fall	Tumorart	MMP-2	MMP-9
66	MTC	+	+
67	MTC	+	++
68	MTC	-	+
69	MTC	-	-
70	MTC	+	-
71	MTC	+	+
72	MTC	+	++
73	MTC	-	-
74	MTC	+	+
75	MTC	+	+
76	MTC LK – Rezidiv	-	+
77	MTC LK – Rezidiv	-	+
78	MTC LK – Rezidiv	-	+
79	MTC LK – Rezidiv	-	+
80	MTC Lokalrezidiv	-	++
81	MTC Lokalrezidiv	-	+
82a	MTC 4. Lokalrezidiv	-	-
82b	MTC 5. Lokalrezidiv	-	+
82c	MTC 6. Lokalrezidiv	-	+
83	MTC Lokalrezidiv	+	++
84	MTC Lokalrezidiv	+	+
85	MTC Lokalrezidiv	-	+
86	MTC Lokalrezidiv	+	+
87	MTC MEN IIa	+	+
88	MTC MEN IIa	-	+
89	MTC MEN IIa	-	-
90	MTC MEN IIa	-	+
91	MTC MEN IIb	-	+
92	MTC MEN IIb	+	+
93	MTC MEN IIb	-	+

**Tab. 20:** Immunreaktivität von MMP-2 und MMP-9 in medullären Schilddrüsenkarzinomen (MTC)

- keine oder fokal schwache Färbung (< 50% positive Zellen), + fokal starke Färbung (< 50% positive Zellen) oder diffus schwache Färbung (> 50% positive Zellen), ++ diffus starke Färbung (> 50% stark positive Zellen)

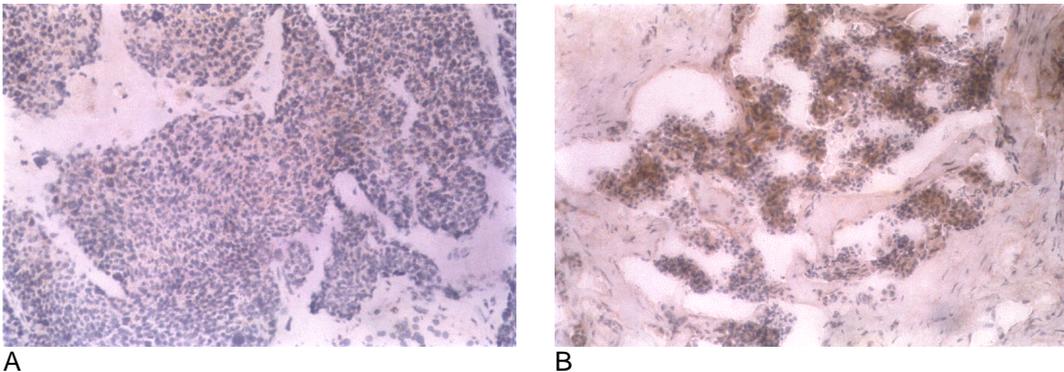
### *MMP-9*

Von den 10 sporadischen primären medullären Schilddrüsenkarzinomen zeigten 2 eine diffus starke Immunreaktion, 5 eine diffus schwache bzw. fokal starke Reaktion, 3 waren negativ.

Alle 4 untersuchten Lymphknotenrezidive exprimierten MMP-9 diffus schwach bzw. fokal stark. In 8 der 9 Lokalrezidive konnte eine positive Reaktion nachgewiesen werden (Abb. 8B). Zwei Tumoren wiesen eine diffus starke Immunreaktion auf. Bei den Fällen 82a-82c zeigte das 4. Lokalrezidiv eine negative Reaktion, während das 5. und 6. Lokalrezidiv diffus schwach MMP-9 exprimierten.

3 der 4 familiären MTC MEN IIa waren fokal stark, 1 Tumor war negativ. Alle 3 familiären MTC MEN IIb exprimierten MMP-9 diffus schwach bzw. fokal stark.

Sowohl für MMP-2 als auch für MMP-9 war eine überwiegend zytoplasmatische Färbung der Tumorzellen und der den Tumor umgebenden Fibroblasten zu beobachten.



**Abb. 8:** Immunhistochemischer Nachweis von MMP-2 und MMP-9 in medullären Schilddrüsenkarzinomen (MTC) x20

A: MMP-2-Immunreaktivität in einem MTC Lokalrezidiv, sehr schwache Immunreaktivität der Tumorzellen (Fall 80).

B: MMP-9-Immunreaktivität in einem MTC Lokalrezidiv, fokal starke Färbung des Tumorzellzytoplasmas (Fall 84).

## **Gesamtübersicht**

### *MMP-2*

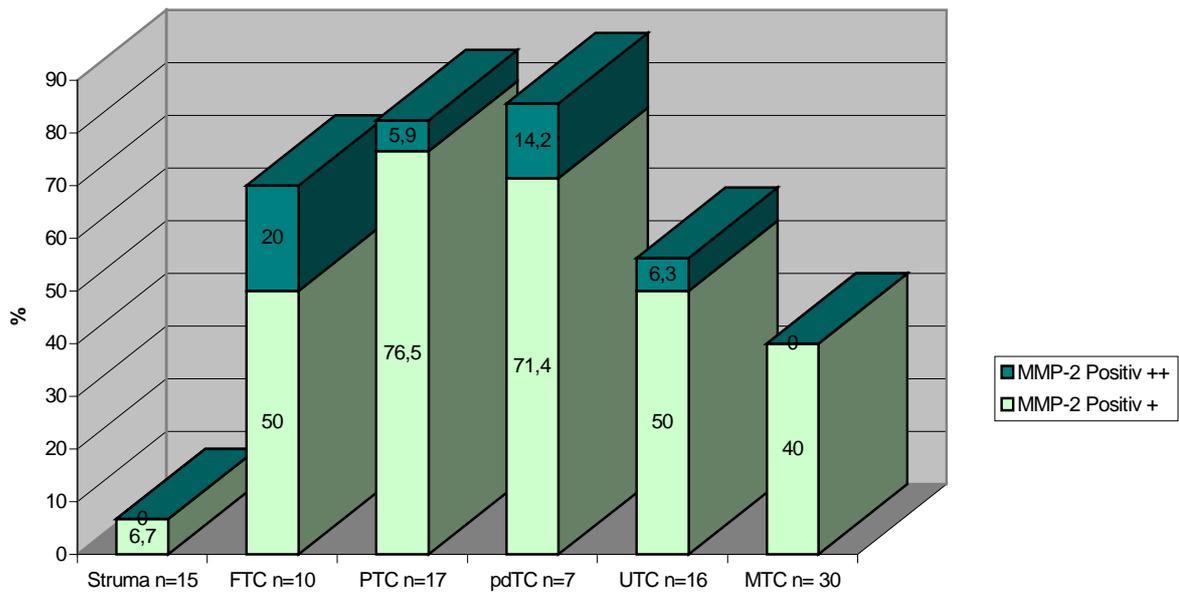
In den nicht-malignen Geweben konnte in 1 von 15 (7%) MMP-2 detektiert werden. Dagegen konnte in 47 von 80 (59%) Schilddrüsenneoplasien eine positive Immunreaktion nachgewiesen werden.

Eine zusammenfassende Übersicht der Ergebnisse zeigt Abb. 9A.

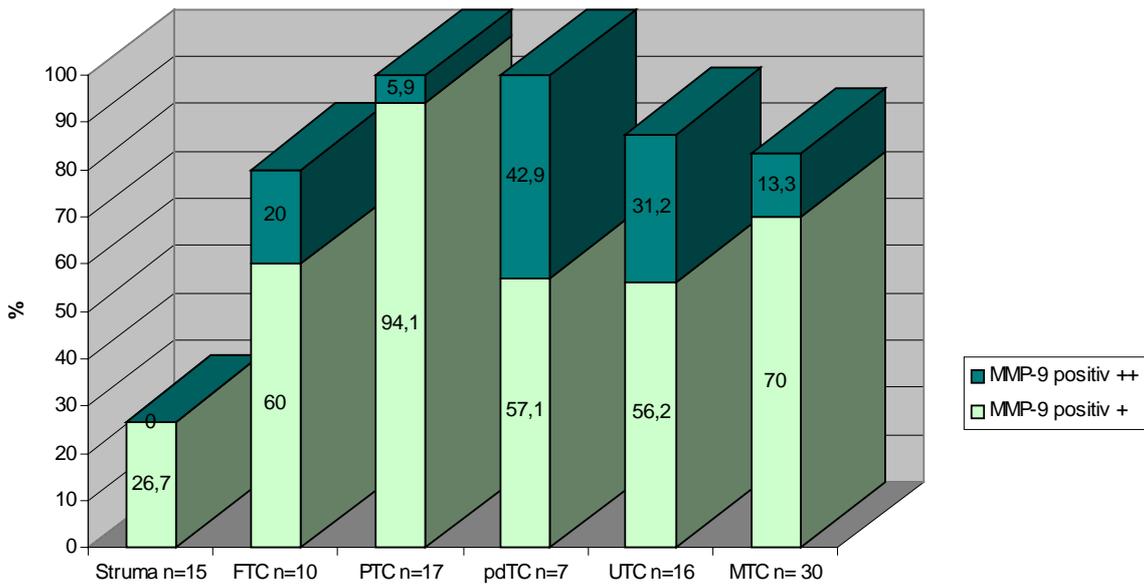
### *MMP-9*

MMP-9 konnte in 4 von 15 (27%) nicht-malignen Geweben beobachtet werden. 71 von 80 (89%) der Schilddrüsenneoplasien zeigten eine positive Immunreaktion.

Eine zusammenfassende Übersicht der Ergebnisse zeigt Abb. 9B.



A



B

**Abb. 9:** Prozentuale Anteile der MMP-2 (A) und MMP-9 (B) immunhistochemisch positiven Schilddrüsengewebe in benignen Strumen, follikulären (FTC), papillären (PTC), schlecht differenzierten (pdTC), undifferenzierten (UTC) und medullären Schilddrüsenkarzinomen (MTC).

Die Höhe des Balkens entspricht der Anzahl der Gewebe mit positiver Antigenexpression. Der obere Anteil des Balkens ergibt die Anzahl der 2fach (++) und der untere Anteil die Anzahl 1fach (+) positiven Befunde.

+ fokal stark < 50% stark positive Zellen und diffus schwach > 50% schwach positive Zellen  
 ++ diffus stark > 50% stark positive Zellen

## **Untersuchung der Proteasenexpression der Primärtumoren in Bezug auf das pTNM-Stadium**

(Auf Grund zahlreicher als Mx deklarerter Karzinome konnten nur 24 von 54 Primärtumoren in die Auswertung aufgenommen werden).

### *MMP-2:*

Zwischen der MMP-2-Expression und der Tumorgröße konnte keine Korrelation ermittelt werden. Sowohl im pT1-Karzinomen als auch in pT3- und pT4-Karzinomen war ein höherer Anteil immunhistochemisch positiver Gewebe nachweisbar. Der Lymphknotenstatus der Primärtumoren zeigte ebenfalls keine Korrelation zur MMP-2-Expression, hier konnte im pN1b Stadium ein Überwiegen der MMP-2 negativen Tumoren beobachtet werden. Auch bei den Fernmetastasen konnte kein Zusammenhang zwischen der Metastasierungsrate und der MMP-2-Expression festgestellt werden. Hier zeigten jeweils 60% der Karzinome einen positiven Antigennachweis (Abb. 10).

### *MMP-9:*

Keine Korrelation war zwischen der MMP-9-Expression und der Tumorgröße der Primärtumoren bzw. dem Lymphknotenstatus zu ermitteln. Karzinome mit hämatogener Metastasierung zeigten keinen Unterschied hinsichtlich der MMP-9-Expression zu M0 - Karzinomen. Hier zeigten in beiden Gruppen 86% der Karzinome einen positiven Antigennachweis (Abb.11).

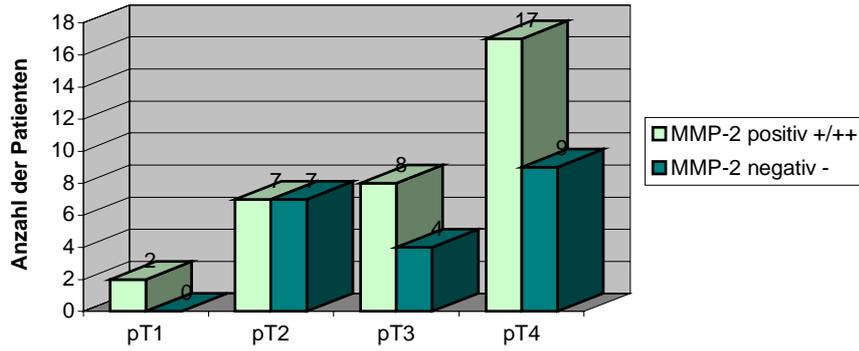
## **Untersuchung der Proteasenexpression der Lokal- und Lymphknotenrezidive in Bezug auf das pTNM-Stadium der Primärtumoren**

### *MMP-2:*

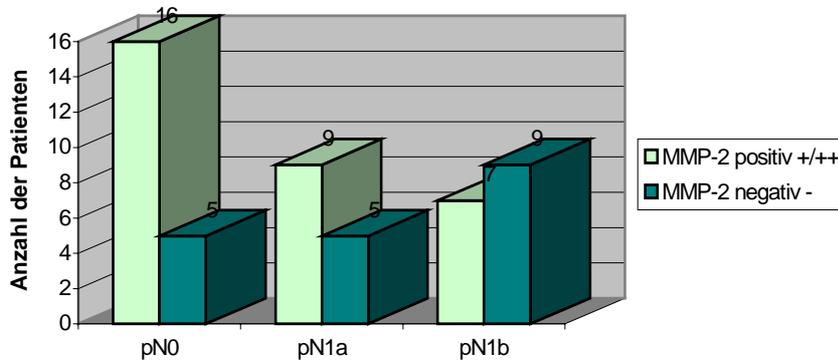
Bei den Rezidivtumoren konnte eine Korrelation zwischen der Tumorgröße und der MMP-2-Expression ermittelt werden, 29% der T1- und T2-Karzinome gegenüber 82% der T4-Karzinome zeigten einen positiven Antigennachweis. Die Lymphknotenbeteiligung und die hämatogene Metastasierung ergaben keine Korrelation zur MMP-2-Expression.

### *MMP-9:*

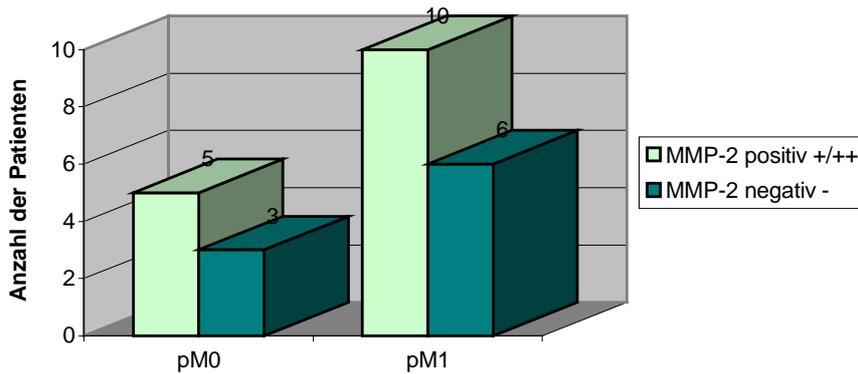
Hier konnte weder für die Tumorgröße, den Lymphknotenstatus noch für die hämatogene Metastasierung ein Zusammenhang mit der MMP-9-Expression ermittelt werden.



A



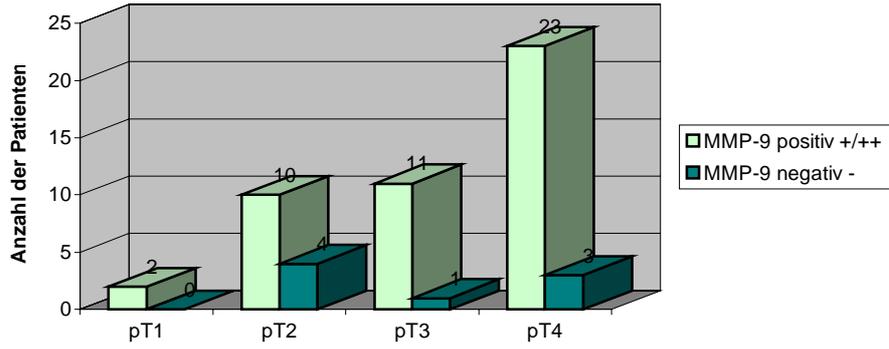
B



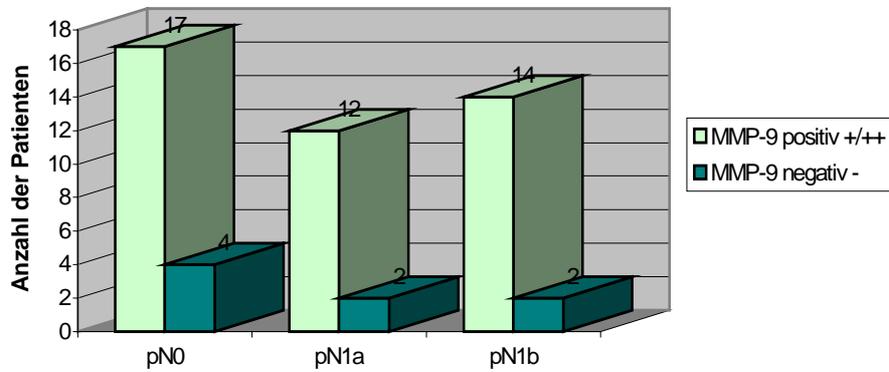
C

**Abb. 10:** MMP-2 Immunreaktivität der Primärtumoren in Korrelation zur Tumorgroße pT1-pT4 (A), zur Lymphknotenbeteiligung pN0-pN1b (B) und zur Fernmetastasierung pM0-pM1 (C). (Postoperative histopathologische Klassifikation pTNM siehe S. 12)

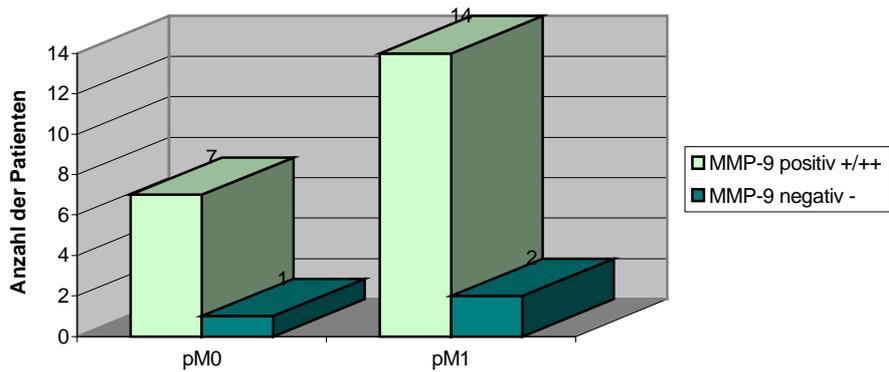
- negativ, keine oder fokal schwache Färbung < 50% schwach positive Zellen
- + fokal stark < 50% stark positive Zellen und diffus schwach > 50% schwach positive Zellen
- ++ diffus stark >50% stark positive Zellen



A



B



C

**Abb. 11:** MMP-9 Immunreaktivität der Primärtumoren in Korrelation zur Tumorgroße pT1-pT4 (A), zur Lymphknotenbeteiligung pN0-pN1b (B) und zur Fernmetastasierung pM0-pM1 (C). (Postoperative histopathologische Klassifikation pTNM siehe S.12)

- negativ, keine oder fokal schwache Färbung < 50% schwach positive Zellen
- + fokal stark < 50% stark positive Zellen und diffus schwach > 50% schwach positive Zellen
- ++ diffus stark >50% stark positive Zellen

## 4.2 TIMP-1 und TIMP-2

### 4.2.1 RT-PCR

Die RT-PCR Untersuchungen wurden mit je 5 FTC, PTC, pdTC, UTC und MTC durchgeführt.

Fall	Gewebeart	TIMP-1	TIMP-2
18	FTC	++	++
21	FTC	++	++
22	FTC	++	++
24	FTC	++	++
25	FTC	++	++
26	PTC	+	-
29	PTC	++	++
31	PTC	++	++
33	PTC	++	++
37	PTC	+	-
43	pdTC	++	++
45	pdTC	++	++
46	pdTC	++	++
47	pdTC	++	++
49	pdTC	++	++
50	UTC	+	-
53	UTC	++	++
60	UTC	+	+
64	UTC	++	++
65	UTC	++	++
66	MTC	++	++
87	MTC	++	++
89	MTC	++	+
92	MTC	++	++
93	MTC	++	++

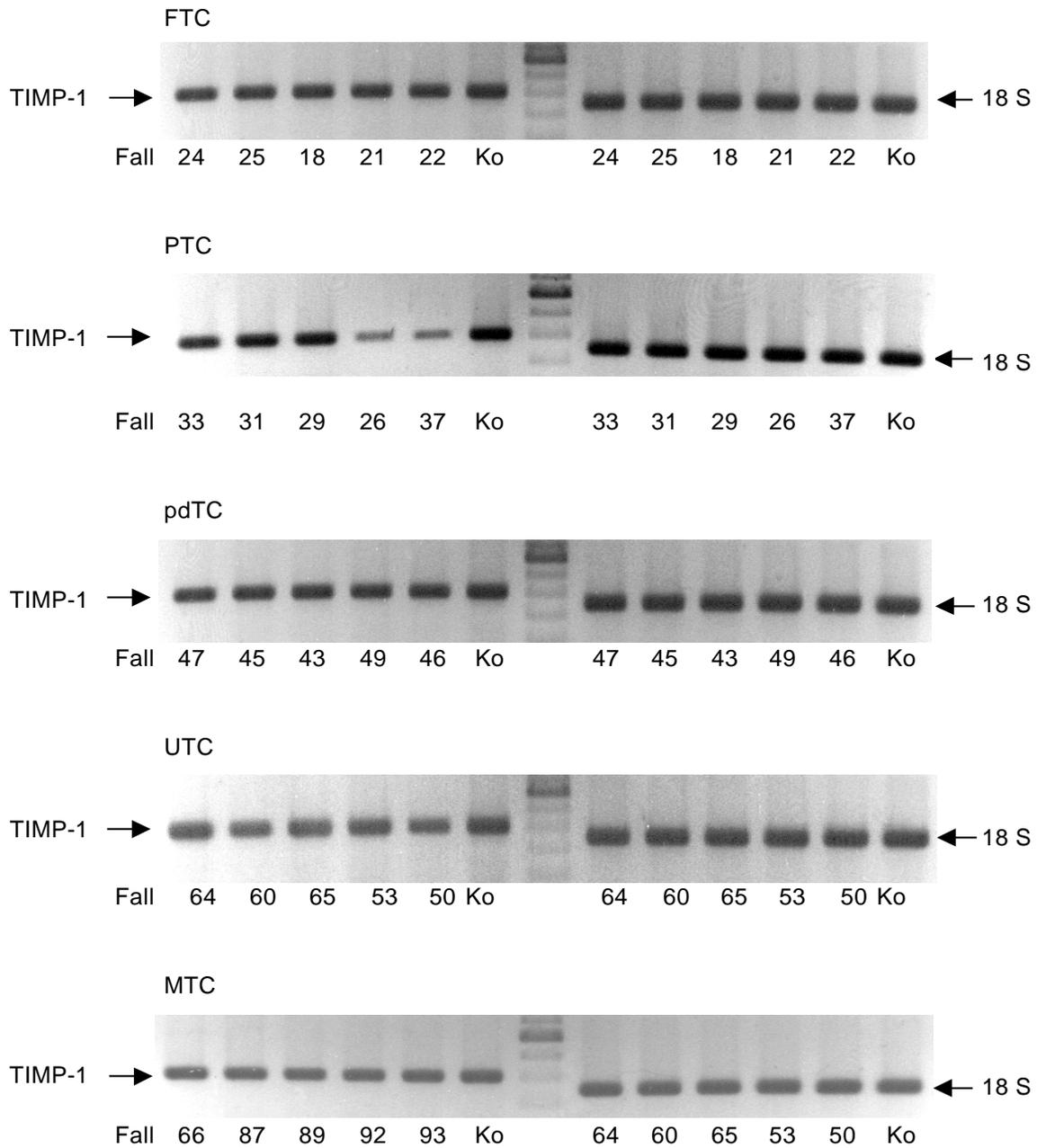
**Tab. 21:** mRNA-Expression von TIMP-1 und TIMP-2 in folliculären (FTC), papillären (PTC), schlecht differenzierten (pdTC), undifferenzierten (UTC) und medullären Schilddrüsenkarzinomen (MTC). Als Bezugsgröße für die Auswertung der mRNA Expression diente die Bande der Ovarialfibroblasten. Diese Bande wurde als starke Expression definiert. - negativ, keine Bande, + schwach positiv, schwächere Bande als Vergleichsbande, ++ stark positiv, äquivalent der Vergleichsbande.

#### TIMP-1

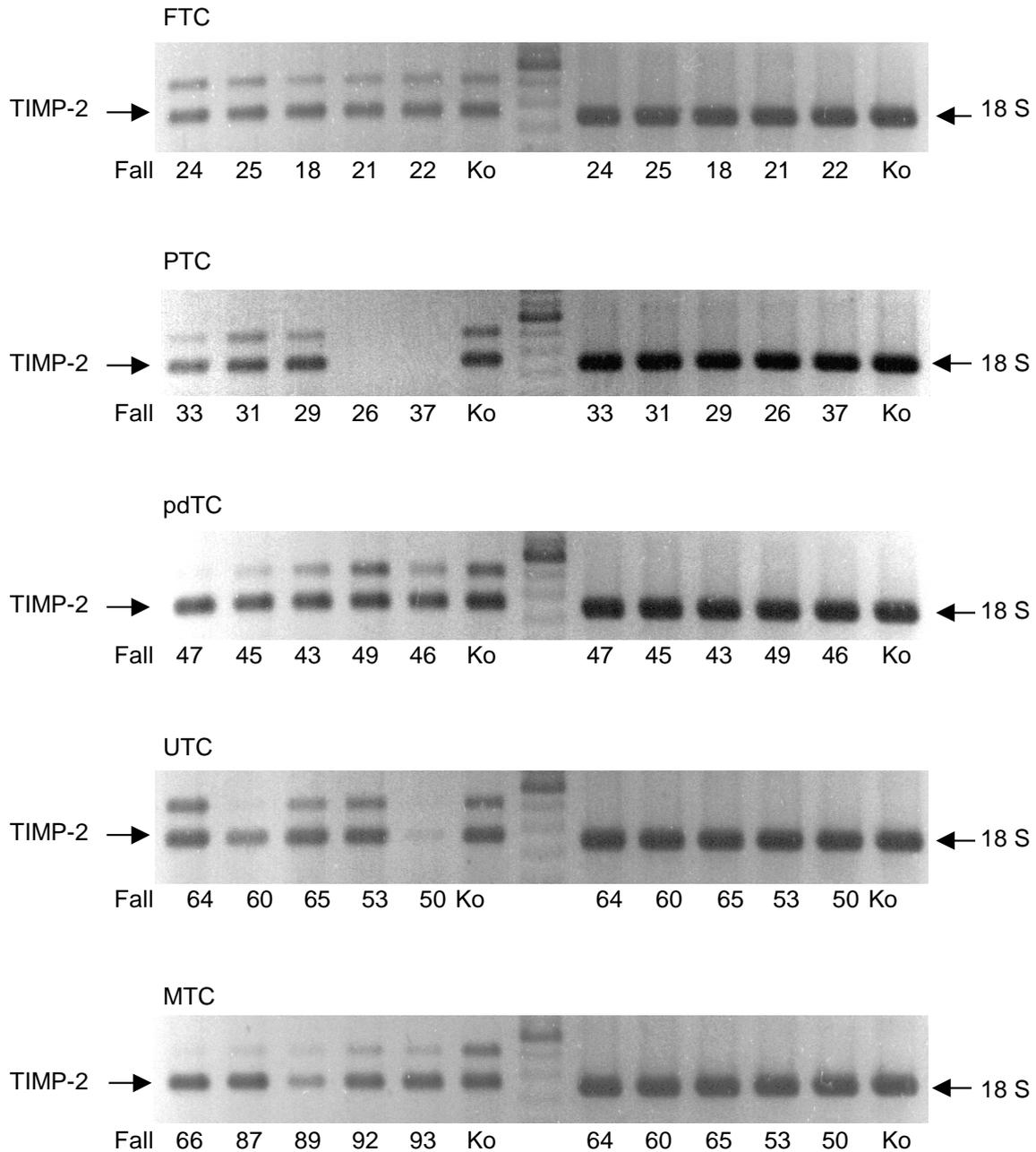
In allen 25 Geweben war mRNA von TIMP-1 nachweisbar, wobei 21 Tumoren eine starke Expression zeigten (Tab. 21, Abb.12).

### TIMP-2

Die mRNA von TIMP-2 konnte in 22 von 25 Tumoren detektiert werden. Davon zeigten 20 Tumoren eine starke Expression (Tab. 21, Abb.13).



**Abb. 12:** mRNA-Expression von TIMP-1 und 18S in follikulären (FTC), papillären (PTC), schlecht differenzierten (pdTC), undifferenzierten (UTC) und medullären Schilddrüsenkarzinomen (MTC). Die 346 bp-Bande von 18S zeigt, daß die Probe gleichmäßig aufgetragen wurde. Als Bezugsgröße für die Auswertung der mRNA-Expression auf den Gelen diente die Bande der Ovarialfibroblasten (=Ko). Diese Bande wurde als starke Expression (++) definiert. Im Vergleich dazu wurden schwächere Banden als schwach positiv (+) bzw. keine Banden mit negativ (-) bewertet.



**Abb. 13:** mRNA-Expression von TIMP-2 und 18S in follikulären (FTC), papillären (PTC), schlecht differenzierten (pdTC), undifferenzierten (UTC) und medullären Schilddrüsenkarzinomen (MTC). Die 346 bp-Bande von 18S zeigt, daß die Probe gleichmäßig aufgetragen wurde. Als Bezugsgröße für die Auswertung der mRNA-Expression auf den Gelen diente die Bande der Ovarialfibroblasten (=Ko). Diese Bande wurde als starke Expression (++) definiert. Im Vergleich dazu wurden schwächere Banden als schwach positiv (+) bzw. keine Banden mit negativ (-) bewertet.

## 4.2.2 Immunhistochemie

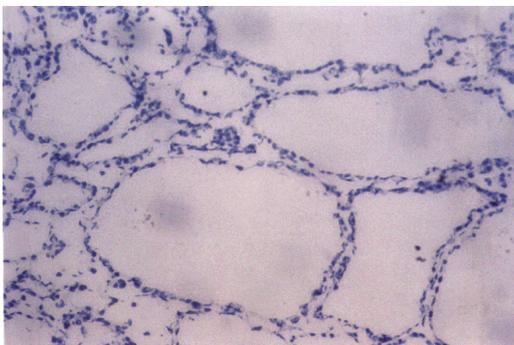
### Benigne Schilddrüsengewebe (Tab. 22)

Die 15 Strumen zeigten in der Mehrzahl der Fälle keine oder nur eine fokal schwache Expression von TIMP-1 und TIMP-2 (Abb. 14A). TIMP-2 war in 6 von 15 Geweben mit einer diffus schwachen Immunreaktivität zu beobachten (Abb. 14B). Eine fokal starke Färbung zeigte sich in fibrotischen Gebieten sowie in den daran angrenzenden Follikelzellen.

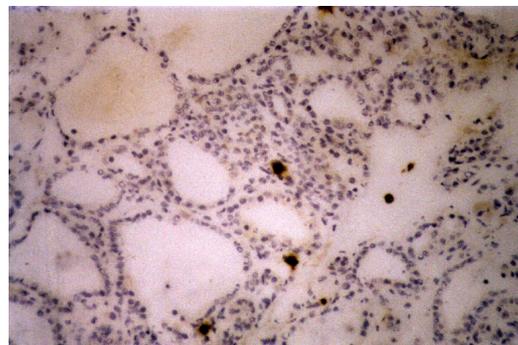
Fall	Gewebeart	TIMP-1	TIMP-2
1	Struma colloidosa et nodosa	-	+
2	Struma colloidosa et nodosa	-	-
3	Struma colloidosa et nodosa	-	+
4	Struma colloidosa et nodosa	-	-
5	Struma colloidosa et nodosa	+	-
6	Struma colloidosa et nodosa	+	+
7	Struma colloidosa et nodosa	+	-
8	Struma colloidosa et nodosa	-	-
9	Struma colloidosa et nodosa	-	+
10	Struma colloidosa et nodosa	-	-
11	Struma colloidosa et nodosa	-	-
12	Struma colloidosa et nodosa	-	+
13	Struma colloidosa et nodosa	-	+
14	Struma colloidosa et nodosa	-	-
15	Struma colloidosa et nodosa	-	-

**Tab. 22:** Benigne Schilddrüsengewebe

- keine oder fokal schwache Färbung (< 50% positive Zellen), + fokal starke Färbung (< 50% positive Zellen) oder diffus schwache Färbung (> 50% positive Zellen), ++ diffus starke Färbung (> 50% stark positive Zellen)



A



B

**Abb. 14:** Immunhistochemischer Nachweis von TIMP-1 und TIMP-2 in benignen Strumen x20

A: TIMP-1-Immunreaktivität in einer Struma colloidosa et nodosa, nur vereinzelte Zellen zeigen eine Immunreaktivität (Fall 2).

B: TIMP-2-Immunreaktivität in einer Struma colloidosa et nodosa, diffus schwache Färbung der Thyreozyten (Fall 9).

## Follikuläre Schilddrüsenkarzinome (Tab. 23)

### TIMP-1

Das minimal invasive follikuläre Karzinom (Fall 16) zeigte auch bei den Inhibitoren nur einige vereinzelte fokal schwach gefärbte Gebiete.

Fokal stark bis diffus stark reagierte das oxyphile Karzinom (Fall 17). 2 der 5 grob invasiven Primärtumoren zeigten ein diffus starke Färbung (Abb. 15A), 2 Tumoren zeigten eine fokal starke Färbung, 1 Tumor war negativ (Fall 22). Die Rezidive waren fokal stark gefärbt.

Beim TIMP-1 fiel in einigen Geweben eine stärkere Immunreaktivität der Tumorzellen gegenüber den schwach gefärbten Stromazellen auf.

### TIMP-2

Das minimal invasive follikuläre Karzinom (Fall 16) zeigte nur eine fokal schwache Färbung. Das oxyphile Karzinom (Fall 17) war diffus stark gefärbt.

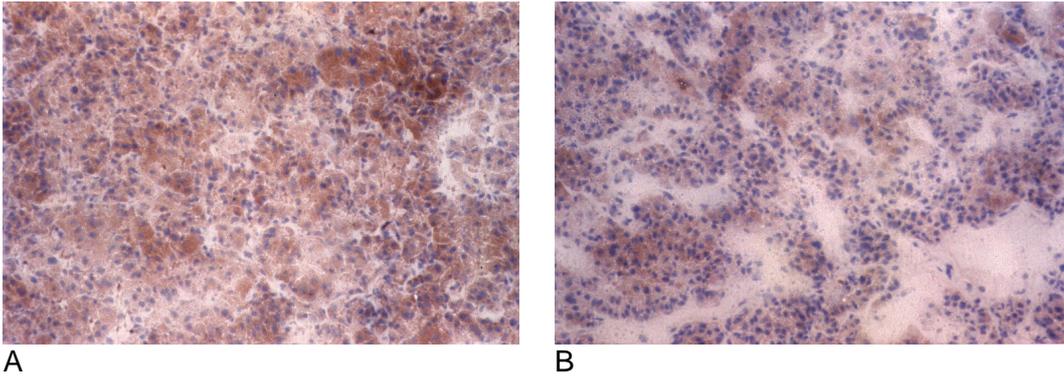
Von den 5 grob invasiven Primärtumoren zeigte 1 Tumor (Fall 19) eine diffus starke und 3 Tumoren eine fokal starke TIMP-2-Expression (Abb. 15B).

Bei den FTC-Rezidiven war eine überwiegend fokal starke Stromafärbung zu beobachten. Auch hier fiel bei einigen Tumoren eine starke Immunreaktivität, vor allem der peripheren Ränder des jeweiligen Tumors, auf.

Fall	Tumorart	TIMP-1	TIMP-2
16	FTC minimal invasiv	-	-
17	FTC oxyphile Variante	++	++
18	FTC grob invasiv	+	+
19	FTC grob invasiv	++	++
20	FTC grob invasiv	++	+
21	FTC grob invasiv	+	+
22	FTC grob invasiv	-	-
23	FTC-Rezidiv grob invasiv	+	+
24	FTC-Rezidiv grob invasiv	+	+
25	FTC-Rezidiv grob invasiv	+	+

**Tab. 23:** Immunreaktivität von TIMP-1 und TIMP-2 in follikulären Schilddrüsenkarzinomen (FTC)

- keine oder fokal schwache Färbung (< 50% positive Zellen), + fokal starke Färbung (< 50% positive Zellen) oder diffus schwache Färbung (> 50% positive Zellen), ++ diffus starke Färbung (> 50% stark positive Zellen)



**Abb. 15:** Immunhistochemischer Nachweis von TIMP-1 und TIMP-2 in follikulären Schilddrüsenkarzinomen (FTC) x20

- A: TIMP-1-Immunreaktivität in einem grob invasiven FTC, diffus starke Färbung des Tumorzellzytoplasmas (Fall 20).
- B: TIMP-2 Immunreaktivität in einem grob invasiven FTC, fokal starke Färbung des Tumorzellzytoplasmas (Fall 18).

### **Papilläre Schilddrüsenkarzinome (Tab. 24)**

#### *TIMP-1*

Bei den papillären Schilddrüsenkarzinomen war in allen 8 Primärtumoren eine positive Reaktion zu beobachten, wobei das PTC vom Lindsay-Typ (Fall 30), ein überwiegend follikulär aufgebautes PTC (Fall 31) (Abb.16A) und ein grob invasiv wachsendes PTC (Fall 27) eine diffus starke Färbung aufwiesen, die anderen 5 Tumoren, eingeschlossen das Mikrokarzinom (Fall 26), zeigten eine fokal starke bzw. diffus schwache Expression.

Das PTC (Fall 29a) und die dazugehörige Lymphknotenmetastase (Fall 29b) (Abb.16B) exprimierten in ähnlicher Weise TIMP-1. Die 7 Lymphknotenrezidive und die 2 Lokalrezidive waren alle positiv für TIMP-1. Die papillären Schilddrüsenkarzinome zeigten überwiegend eine zytoplasmatische Färbung der Tumorzellen und auch der den Tumor umgebenden Fibroblasten.

#### *TIMP-2*

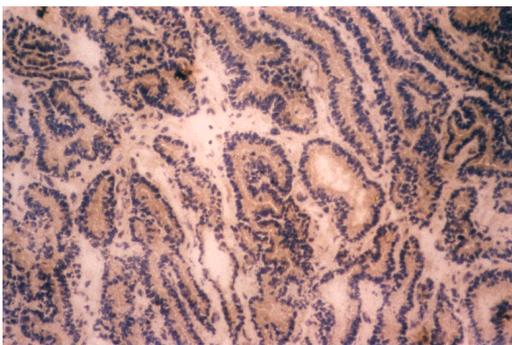
TIMP-2 konnte in 6 von 8 untersuchten PTC nachgewiesen werden, wobei ein überwiegend follikulär aufgebautes PTC (Fall 31) (Abb.16C), ein grob invasiv wachsendes PTC (Fall 27) und ein diffus sklerosierendes PTC (Fall 33) eine diffus starke Immunreaktivität zeigten.

Äquivalent dem Primärtumor (Fall 29a) zeigte die dazu gehörige Lymphknotenmetastase (Fall 29b) eine fokal starke Expression. Bei allen 7 Lymphknotenrezidiven (Abb.16D) und den 2 Lokalrezidiven konnte eine diffus schwache bis fokal starke Expression nachgewiesen werden. Das Immunreaktionsprodukt von TIMP-2 war überwiegend im Zytoplasma der Tumorzellen und angrenzenden Stromazellen lokalisiert.

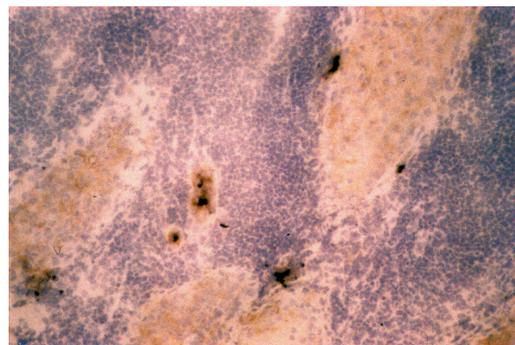
Fall	Tumorart	TIMP-1	TIMP-2
26	PTC Mikrokarzinom	+	+
27	PTC grob invasiv	++	++
28	PTC invasiv	+	-
29a	PTC überwiegend follikulär	+	+
29b	PTC LK-Metastase	+	+
30	PTC foll. Variante Lindsay	++	-
31	PTC überwiegend follikulär	++	++
32	PTC invasiv	+	+
33	PTC diffus sklerosierend	+	++
34	PTC LK - Rezidiv	+	+
35	PTC LK - Rezidiv	+	+
36	PTC LK - Rezidiv	+	+
37	PTC LK - Rezidiv	++	+
38	PTC LK - Rezidiv	+	+
39	PTC LK - Rezidiv	+	+
40	PTC LK - Rezidiv	+	+
41	PTC Lokalrezidiv.	+	+
42	PTC Lokalrezidiv.	+	+

**Tab. 24:** Immunreaktivität von TIMP-1 und TIMP-2 in papillären Schilddrüsenkarzinomen (PTC)

- keine oder fokal schwache Färbung (< 50% positive Zellen), + fokal starke Färbung (< 50% positive Zellen) oder diffus schwache Färbung (> 50% positive Zellen), ++ diffus starke Färbung (> 50% stark positive Zellen)



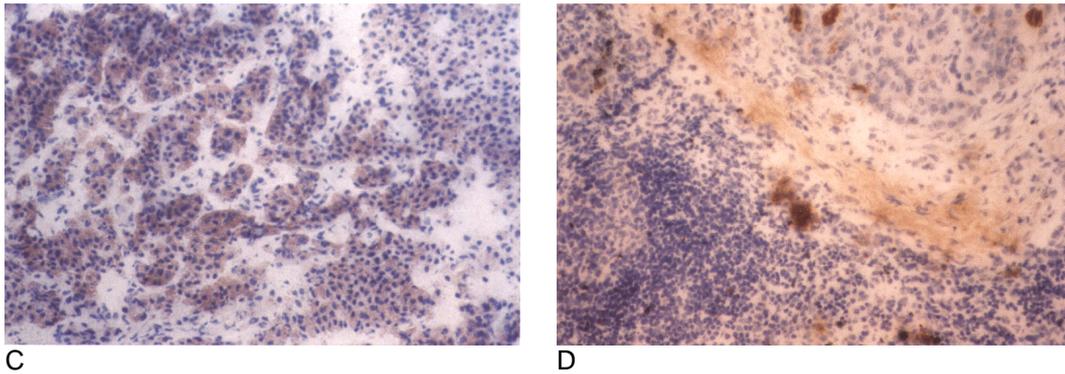
A



B

**Abb. 16:** Immunhistochemischer Nachweis von TIMP-1 und TIMP-2 in papillären Schilddrüsenkarzinomen (PTC) x20

- A: TIMP-1-Immunreaktivität in einem PTC, diffus starke Färbung des Tumorzellzytoplasmas und des Stromas (Fall 31).
- B: TIMP-1-Immunreaktivität in einer PTC-Lymphknotenmetastase, diffus schwache Färbung der Tumorzellen mit einzelnen fokal starken Zellen am Übergang Tumor-Lymphknoten (Fall 36).



**Abb. 16:** Immunhistochemischer Nachweis von TIMP-1 und TIMP-2 in papillären Schilddrüsenkarzinomen (PTC) x20

C: TIMP-2-Immunreaktivität in einem PTC, diffus starke Färbung des Tumorzellzytoplasmas (Fall 31).

D: TIMP-2 Immunreaktivität in einer PTC-Lymphknotenmetastase, intensive Färbung des Stromas an den invasiven Rändern des Tumors (Fall 37).

### Gering differenzierte (insuläre) Schilddrüsenkarzinome (Tab. 25)

#### TIMP-1

Bei allen 7 untersuchten gering differenzierten Karzinomen konnte eine positive TIMP-1-Expression aufgezeigt werden, wobei 5 Tumoren eine ausgeprägt starke Immunreaktivität aufwiesen (Abb. 17A), die anderen 2 zeigten eine fokal starke bzw. diffus schwache Reaktion.

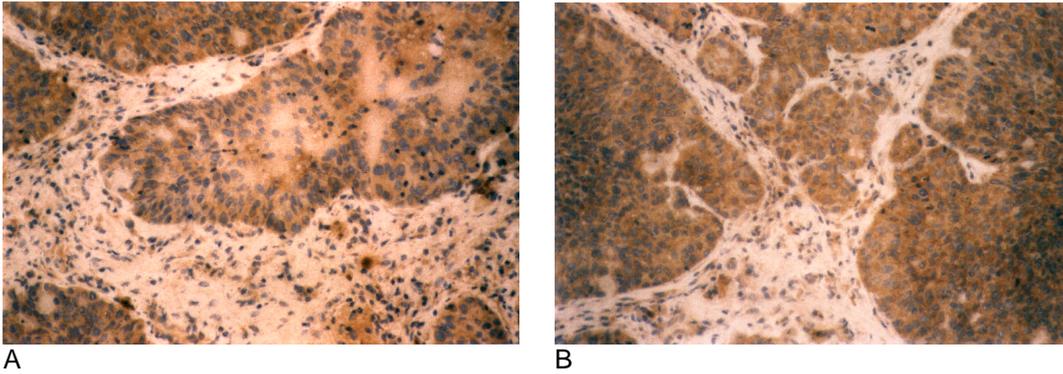
#### TIMP-2

Auch hier fiel eine überwiegend diffus starke TIMP-2-Expression in 5 von 7 Tumoren auf (Abb. 17B). 2 Tumoren zeigten eine fokal starke Expression. Sowohl bei TIMP-1 als auch TIMP-2 war das Immunreaktionsprodukt vor allem im Zytoplasma der Tumor- und Stromazellen, aber auch besonders in den Gefäßendothelien zu beobachten.

Fall	Tumorart	TIMP-1	TIMP-2
43	pdTC (PTC)	++	++
44	pdTC (FTC)	+	++
45	pdTC (FTC)	++	+
46	pdTC (FTC)	++	++
47	pdTC (FTC)	++	++
48	pdTC (FTC)	+	+
49	pdTC (FTC)	++	++

**Tab. 25:** Immunreaktivität von TIMP-1 und TIMP-2 in gering differenzierten Karzinomen (pdTC)

- keine oder fokal schwache Färbung (< 50% positive Zellen), + fokal starke Färbung (< 50% positive Zellen) oder diffus schwache Färbung (> 50% positive Zellen), ++ diffus starke Färbung (> 50% stark positive Zellen)



**Abb.17:** Immunhistochemischer Nachweis von TIMP-1 und TIMP-2 in gering differenzierten Karzinomen (pdTC) x20

- A: TIMP-1-Immunreaktivität in einem pdTC, diffus starke Färbung des Tumorzellzytoplasmas und diffus schwache Färbung des Stromas (Fall 46).
- B: TIMP-2-Immunreaktivität in einem pdTC, diffus starke Färbung des Tumorzellzytoplasmas und diffus schwache Färbung des Stromas (Fall 46).

### Undifferenzierte Schilddrüsenkarzinome (Tab. 26)

#### *TIMP-1*

Von den 14 untersuchten Primärtumoren erwiesen sich alle, bis auf eine Ausnahme (Fall 56), als immunhistologisch positiv. 4 UTC exprimierten TIMP-1 diffus stark (Abb. 18A), bei den anderen 9 Tumoren variierte die Expression von diffus schwach bis fokal stark.

Bei den 2 undifferenzierten Rezidivtumoren war eine fokal starke Reaktion zu beobachten.

#### *TIMP-2*

Alle 14 undifferenzierten Schilddrüsenkarzinome zeigten eine positive Immunreaktivität. 3 UTC zeigten eine diffus starke Expression, bei den restlichen 11 UTC war eine diffus schwach bis fokal starke TIMP-2-Expression zu beobachten (Abb. 18B).

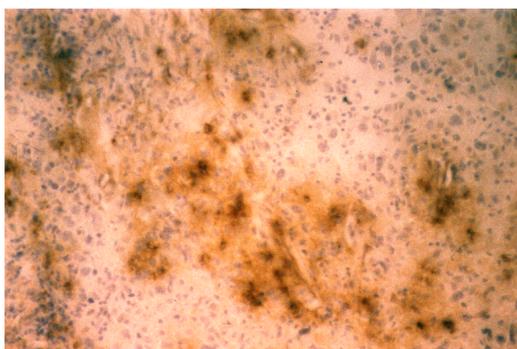
Die 2 undifferenzierten Rezidivtumoren reagierten mit einer fokal starken Expression.

In den undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen war die Immunreaktivität überwiegend im Tumorzellzytoplasma nachweisbar.

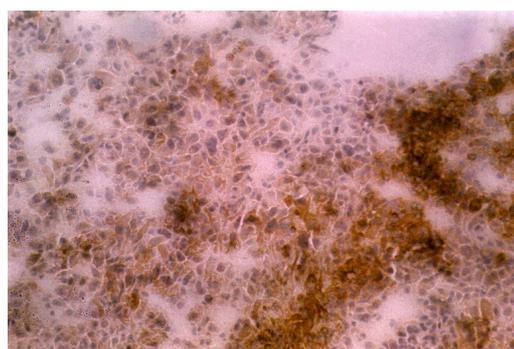
Fall	Tumorart	TIMP-1	TIMP-2
50	UTC	+	+
51	UTC	+	+
52	UTC	++	+
53	UTC	++	++
54	UTC	+	++
55	UTC	+	+
56	UTC	-	++
57	UTC	++	+
58	UTC	+	+
59	UTC	+	+
60	UTC	+	+
61	UTC	+	+
62	UTC	+	+
63	UTC	++	+
64	UTC - Rezidiv	+	+
65	UTC - Rezidiv	+	+

**Tab. 26:** Immunreaktivität von *TIMP-1* und *TIMP-2* in undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen (UTC)

- keine oder fokal schwache Färbung (< 50% positive Zellen), + fokal starke Färbung (< 50% positive Zellen) oder diffus schwache Färbung (> 50% positive Zellen), ++ diffus starke Färbung (> 50% stark positive Zellen)



A



B

**Abb. 18:** Immunhistochemischer Nachweis von *TIMP-1* und *TIMP-2* in undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen (UTC) x20

A: *TIMP-1*-Immunreaktivität in einem UTC, diffus starke Färbung des Tumorzellzytoplasmas und des Stromas (Fall 57).

B: *TIMP-2*-Immunreaktivität in einem UTC, fokal starke Färbung des Tumorzellzytoplasmas und diffus schwache Färbung des Stromas (Fall 57).

## **Medulläre Schilddrüsenkarzinome (Tab. 27)**

### *TIMP-1*

Bei den sporadischen medullären Schilddrüsenkarzinomen exprimierten alle 10 Primärtumoren TIMP-1, 7 Tumoren waren diffus stark (Abb. 19A-B), 3 Primärtumoren waren diffus schwach bzw. fokal stark. 3 der 4 untersuchten Lymphknotenrezidive zeigten eine fokal starke TIMP-1-Expression. In 8 der 9 Lokalrezidive konnte eine positive Reaktion nachgewiesen werden, wobei 2 Tumoren eine diffus starke Immunreaktion aufwiesen.

Bei den Fällen 82a-82c zeigte das 5. Lokalrezidiv eine negative Reaktion, während das 4. und 6. Lokalrezidiv diffus schwach TIMP-1 exprimierte. Alle 4 familiären MTC MEN IIa zeigten positive Reaktion für TIMP-1, 1 Tumor war diffus stark. Bei den 3 familiären MTC MEN IIb, hier exprimierten 2 Tumoren TIMP-1 diffus stark, 1 Tumor war fokal stark.

### *TIMP-2*

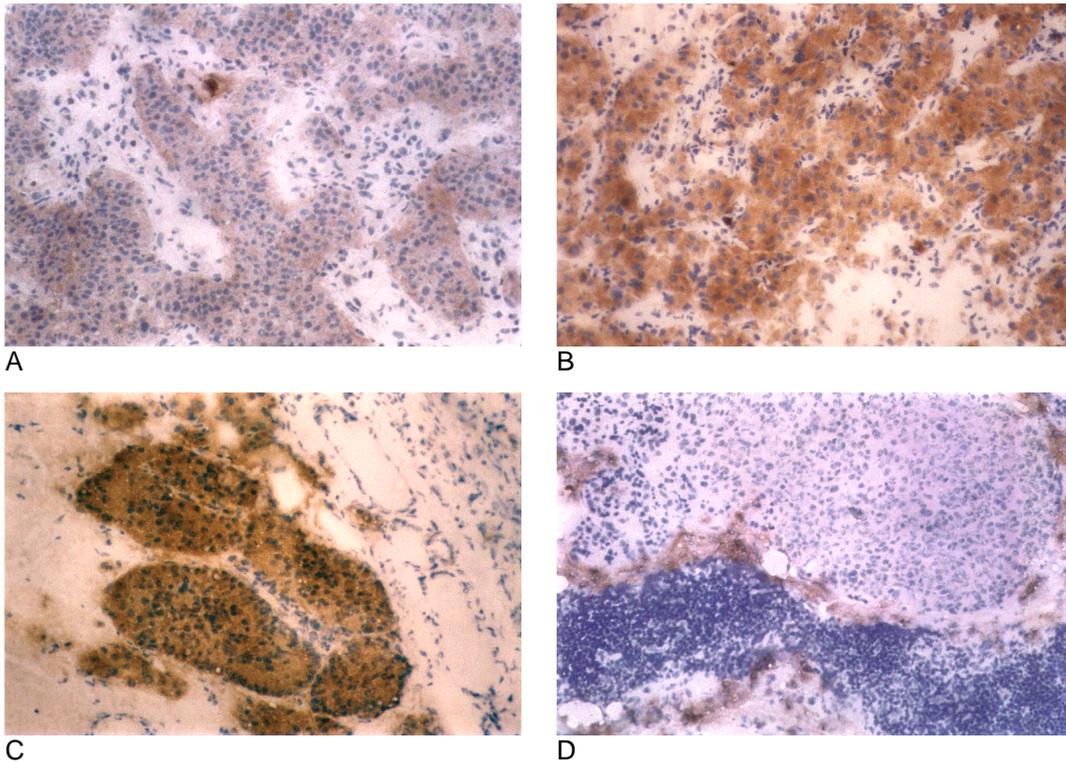
Von den 10 sporadischen primären medullären Schilddrüsenkarzinomen zeigten 2 eine diffus starke Immunreaktion (Abb. 19C), 6 eine diffus schwache bzw. fokal starke Reaktion, 2 waren negativ. 3 der 4 untersuchten Lymphknotenrezidive exprimierten TIMP-2 diffus schwach bzw. fokal stark. 1 Lymphknotenrezidiv zeigte keine Reaktion. In 6 der 9 Lokalrezidive konnte eine positive Reaktion nachgewiesen werden, wobei 1 Tumor eine diffus starke Immunreaktion aufwies. In den Fällen 82a-82c zeigten das 4. und 5. Lokalrezidiv eine negative Reaktion, während das 6. Lokalrezidiv TIMP-2 diffus schwach exprimierte. Bei den 4 familiären MTC MEN IIa erwies sich 1 Tumor als diffus stark, die anderen 3 waren diffus schwach bzw. fokal stark. 2 familiäre MTC MEN IIb exprimierten TIMP-2 fokal stark (Abb. 19D), 1 Tumor war negativ.

Sowohl für TIMP-1 als auch für TIMP-2 konnte eine überwiegend zytoplasmatische Färbung der Tumorzellen und der den Tumor umgebenden Fibroblasten nachgewiesen werden.

Fall	Tumorart	TIMP-1	TIMP-2
66	MTC	++	++
67	MTC	+	+
68	MTC	+	+
69	MTC	++	-
70	MTC	++	++
71	MTC	++	+
72	MTC	++	+
73	MTC	++	-
74	MTC	+	+
75	MTC	++	+
76	MTC LK - Rezidiv	+	-
77	MTC LK - Rezidiv	+	+
78	MTC LK - Rezidiv	++	+
79	MTC LK - Rezidiv	+	+
80	MTC Lokalrezidiv	+	+
81	MTC Lokalrezidiv	+	++
82a	MTC 4. Lokalrezidiv	+	-
82b	MTC 5. Lokalrezidiv	-	-
82c	MTC 6. Lokalrezidiv	+	+
83	MTC Lokalrezidiv	++	+
84	MTC Lokalrezidiv	++	+
85	MTC. Lokalrezidiv	+	-
86	MTC Lokalrezidiv	+	+
87	MTC MEN IIa	++	++
88	MTC MEN IIa	+	+
89	MTC MEN IIa	+	+
90	MTC MEN IIa	+	+
91	MTC MEN IIb	++	-
92	MTC MEN IIb	++	+
93	MTC MEN IIb	+	+

**Tab. 27:** Immunreaktivität von TIMP-1 und TIMP-2 in medullären Schilddrüsenkarzinomen (MTC)

- keine oder fokal schwache Färbung (< 50% positive Zellen), + fokal starke Färbung (< 50% positive Zellen) oder diffus schwache Färbung (> 50% positive Zellen), ++ diffus starke Färbung (> 50% stark positive Zellen)



**Abb. 19:** Immunhistochemischer Nachweis von TIMP-1 und TIMP-2 in medullären Schilddrüsenkarzinomen (MTC) x20

A: TIMP-1-Immunreaktivität in einem sporadischen MTC, diffus starke Färbung der Tumorzellen (Fall 70).

B: TIMP-1-Immunreaktivität in einem sporadischen MTC, diffus starke Färbung der Tumorzellen (Fall 71).

C: TIMP-2 Immunreaktivität in einem sporadischen MTC, diffus starke Färbung der Tumorzellen (Fall 66).

D: TIMP-2-Immunreaktivität in einer MTC (MEN IIb) -Lymphknotenmetastase, intensive Färbung des Stromas an den invasiven Rändern des Tumors (Fall 93).

## Gesamtübersicht

### TIMP-1

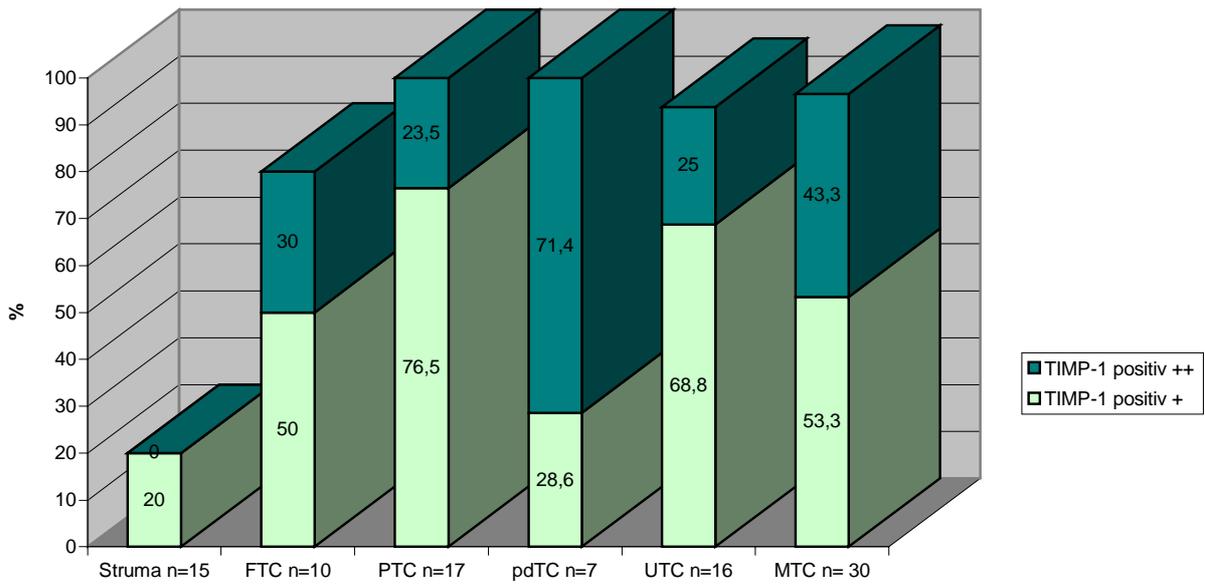
In den benignen Geweben konnte in 3 von 15 (20%) TIMP-1 detektiert werden. Dagegen konnte in 76 von 80 (95%) Schilddrüsenneoplasien eine positive Immunreaktion nachgewiesen werden.

Eine zusammenfassende Übersicht der Ergebnisse zeigt Abb. 20A.

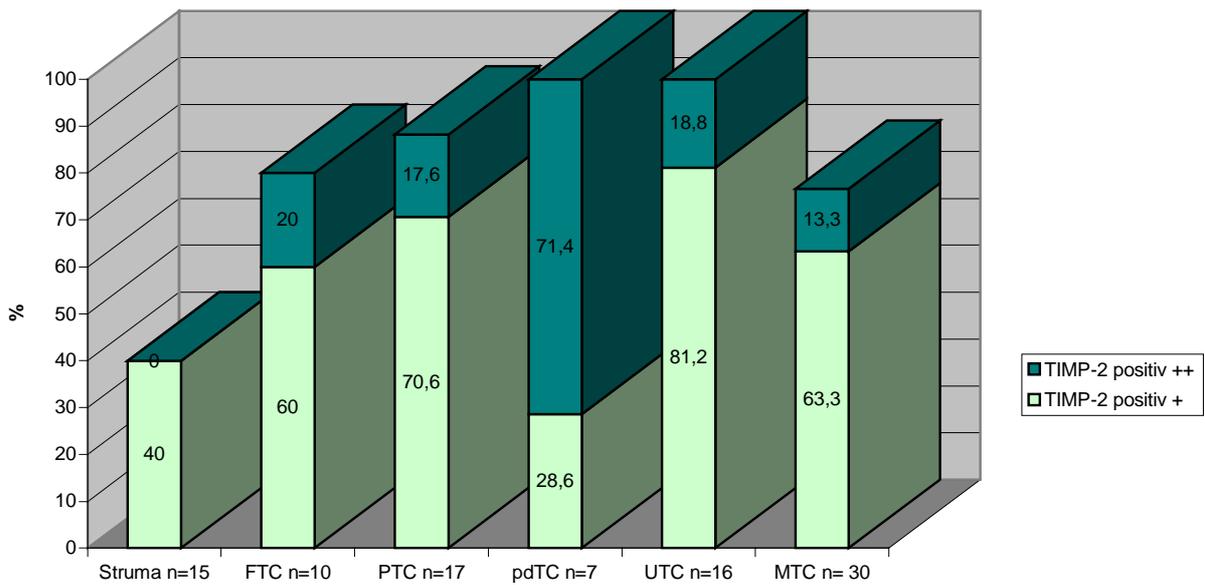
### TIMP-2

TIMP-2 konnte in 6 von 15 (40%) benignen Geweben beobachtet werden. 71 von 80 (89%) der Schilddrüsenneoplasien zeigten eine positive Immunreaktion.

Eine zusammenfassende Übersicht der Ergebnisse zeigt Abb. 20B.



A



B

**Abb. 20:** Prozentuale Anteile der TIMP-1 (A) und TIMP-2 (B) immunhistochemisch positiven Schilddrüsengewebe in benignen Strumen, follikulären (FTC), papillären (PTC), schlecht differenzierten (pdTC), undifferenzierten (UTC) und medullären Schilddrüsenkarzinomen (MTC). Die Höhe des Balkens entspricht der Anzahl der Gewebe mit positiver Antigenexpression. Der obere Anteil des Balkens ergibt die Anzahl der 2fach (++) und der untere Anteil die Anzahl 1fach (+) positiven Befunde

+ fokal stark < stark positive Zellen und diffus schwach > 50% schwach positive Zellen  
 ++ diffus stark > 50% stark positive Zellen

## **Untersuchung der Inhibitorexpression der Primärtumoren in Bezug auf das pTNM-Stadium**

(Auf Grund zahlreicher als Mx deklarerter Karzinome konnten nur 24 von 54 Primärtumoren in die Auswertung aufgenommen werden).

### *TIMP-1:*

In 94% der untersuchten Primärtumoren war eine positive TIMP-1-Expression zu beobachten, so daß kein Zusammenhang zwischen der Tumorgroße, dem Lymphknotenstatus und der hämatogenen Metastasierung ermittelt werden konnte (Abb. 21).

### *TIMP-2:*

Auch zwischen der TIMP-2-Expression und der Tumorgroße der Primärtumoren bzw. dem Lymphknotenstatus konnte keine Korrelation festgestellt werden. Karzinome mit hämatogener Metastasierung zeigten keinen Unterschied hinsichtlich der TIMP-2-Expression zu M0-Karzinomen (Abb. 22).

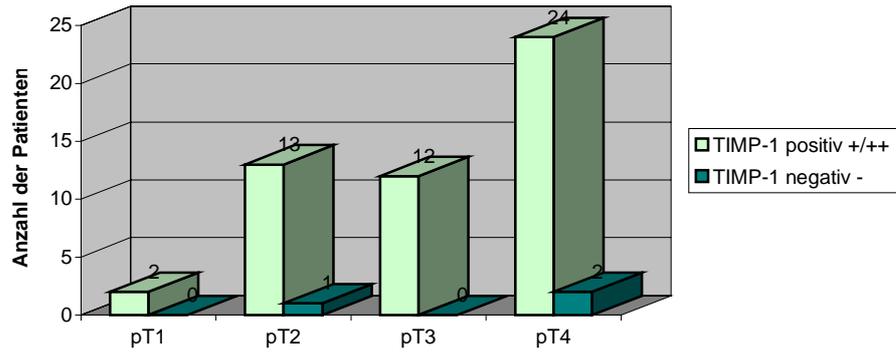
## **Untersuchung der Inhibitorexpression der Lokal- und Lymphknotenrezidive in Bezug auf das pTNM-Stadium der Primärtumoren**

### *TIMP-1:*

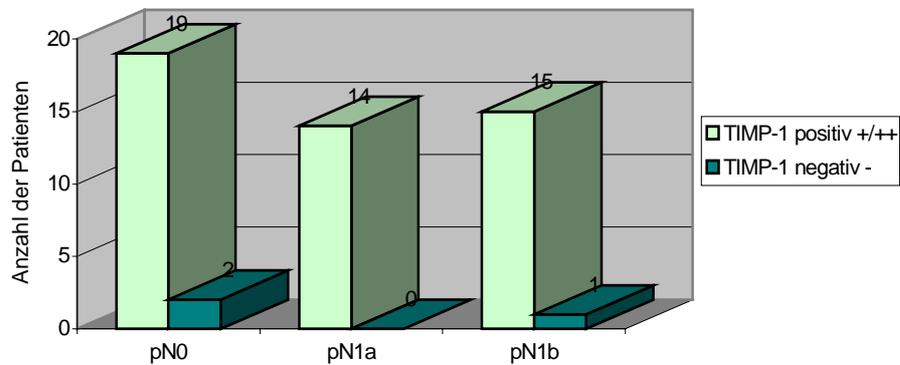
Alle untersuchten Rezidivtumoren zeigten eine positive Antigenexpression, so daß keine Korrelation in Bezug auf das pTNM-Stadium nachgewiesen werden konnte.

### *TIMP-2:*

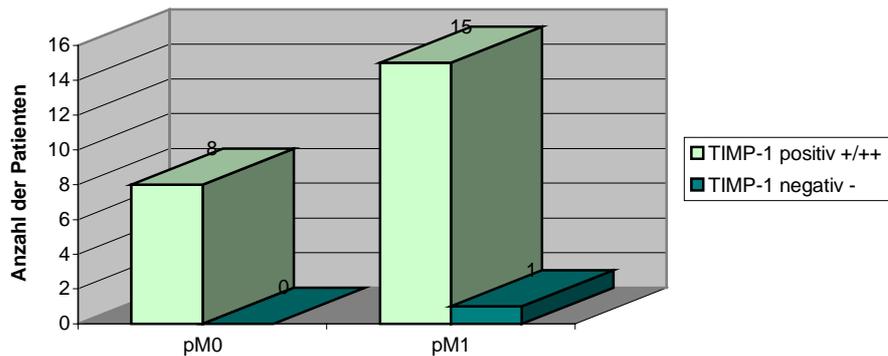
Auch hier konnte weder für die Tumorgroße, den Lymphknotenstatus noch für die hämatogene Metastasierung einen Zusammenhang mit der TIMP-2-Expression ermittelt werden.



A



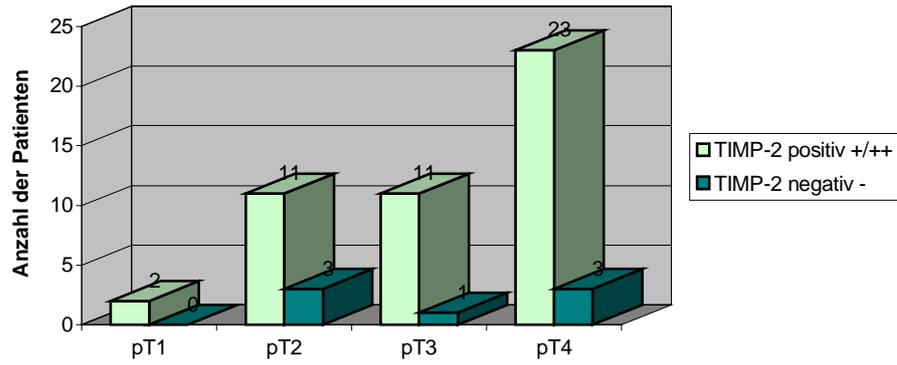
B



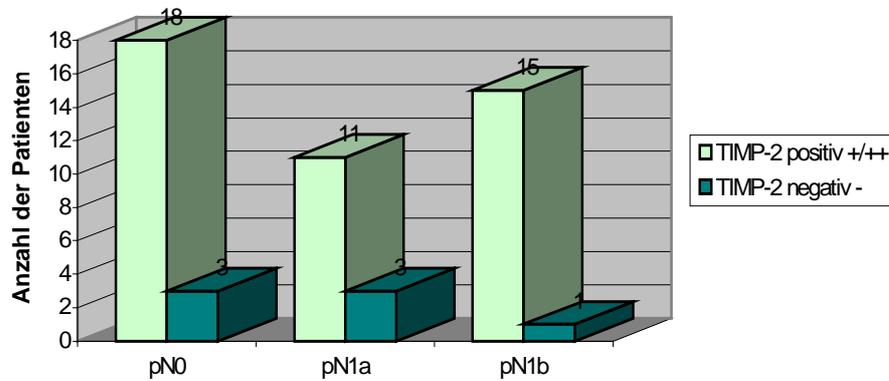
C

**Abb. 21:** TIMP-1 Immunreaktivität der Primärtumoren in Korrelation zur Tumorgroße pT1-pT4 (A), zur Lymphknotenbeteiligung pN0-pN1b (B) und zur Fernmetastasierung pM0-pM1 (C). (Postoperative histopathologische Klassifikation pTNM siehe S.12)

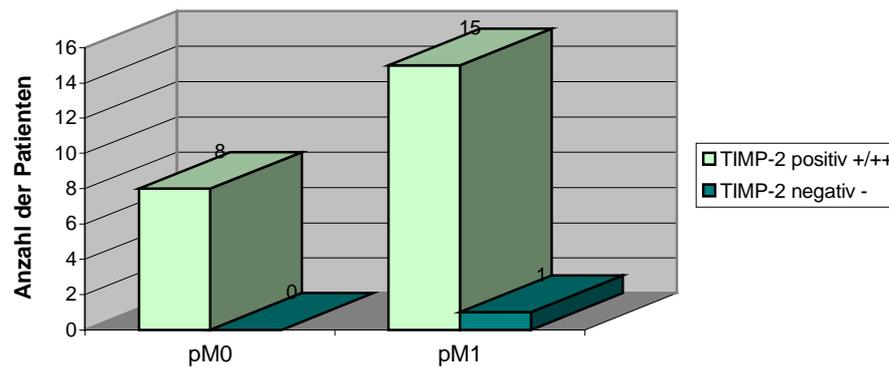
- negativ, keine oder fokal schwache Färbung < 50% schwach positive Zellen
- + fokal stark < 50% stark positive Zellen und diffus schwach > 50% schwach positive Zellen
- ++ diffus stark > 50% stark positive Zellen



A



B



C

**Abb. 22:** TIMP-2 Immunreaktivität der Primärtumoren in Korrelation zur Tumorgroße pT1-pT4 (A), zur Lymphknotenbeteiligung pN0-pN1b (B) und zur Fernmetastasierung pM0-pM1 (C). (Postoperative histopathologische Klassifikation pTNM siehe S. 12)

- negativ, keine oder fokal schwache Färbung < 50% schwach positive Zellen
- + fokal stark < 50% stark positive Zellen und diffus schwach > 50% schwach positive Zellen
- ++ diffus stark > 50% stark positive Zellen

## 5 Diskussion

### 5.1 MMP-2

Während der Invasion und dem Prozeß der Metastasierung müssen die Tumorzellen epitheliale und endotheliale Basalmembranen, zu deren Hauptbestandteil das Typ IV Kollagen gehört, durchqueren. Zu den Typ IV Kollagen hydrolytisch spaltenden Proteasen gehört die Matrixmetalloprotease MMP-2 (Gelatinase A). MMP-2 konnte in einem breiten Spektrum maligner Tumoren in hoher Expression nachgewiesen werden.

Mittels RT-PCR konnte eine moderate bis starke Expression der mRNA von MMP-2 in Schilddrüsenneoplasien aufgezeigt werden. Die immunhistochemisch untersuchten benignen Schilddrüsenngewebe (Struma colloidosa et nodosa) waren in 93% MMP-2 negativ.

In dieser Studie war ein hoher Anteil an MMP-2 positiven Geweben in den differenzierten Karzinomen FTC und PTC zu finden. Beim follikulären Karzinom fiel auf, daß das minimal invasive gekapselte Karzinom keine Immunreaktivität zeigte, während die grob invasiven Karzinome in 7 von 9 (78%) untersuchten Tumoren positiv waren. Auf Grund der geringen Fallzahl läßt sich hier jedoch keine signifikante Korrelation zwischen dem Grad der Invasivität und der Proteasenexpression feststellen. Im Gegensatz dazu wurde bei den papillären Karzinomen sowohl beim Mikrokarzinom als auch in den anderen PTC-Varianten ein ähnliches Expressionsmuster mit fokal starker MMP-2 Immunreaktivität in 14 von 17 (82%) Tumoren vorgefunden. Die in unserer Studie untersuchten Primärtumoren, Lymphknotenrezidive und Lokalrezidive unterschieden sich in der Expressionsausprägung nicht voneinander. Auch die bei einem Primärtumor mit untersuchte Lymphknotenmetastase zeigte ebenso wie der Primärtumor ein fokal schwaches MMP-2-Expressionsmuster. Andere Autoren berichteten, daß Metastasen und Lymphknotenmetastasen eine stärkere Expression aufweisen als ihre Primärtumoren (Campo et al., 1992; Karakiulakis et al., 1997).

Die untersuchten Schilddrüsenkarzinome zeigten sowohl eine zytoplasmatische Färbung der Tumorzellen als auch eine Färbung der den Tumor umgebenden Fibroblasten. Oft wiesen aber nur die invasiven Ränder der Tumoren eine Immunreaktivität auf. In zahlreichen immunhistochemischen Studien (Levy et al., 1991, Autio-Harmainen et al., 1993, Schoedel et al., 1996, Grignon et al., 1996, Talvensaaari-Mattila et al., 1998) wurde das MMP-2-Immunreaktionsprodukt überwiegend im Zytoplasma der Tumorzellen und zum Teil im desmoplastischen Stroma entdeckt. Im Gegensatz dazu lokalisierten andere Studiengruppen (Pyke et al., 1992, Poulsson et al., 1992, Heppner et al., 1996) die MMP-2 mRNA nur in den Fibroblasten des den Tumor umgebenden Stromas. In Pankreaskarzinomen konnten die MMP-2-Transkripte überwiegend in den Stromazellen und nur zum Teil im Tumorzytoplasma beobachtet werden, so daß man annehmen muß, daß sowohl Stroma als auch Tumorzellen als Quelle der Proteasen und auch der Inhibitoren in Frage kommen (Gress et al., 1995). Für diese Diskrepanz zwischen den einzelnen Studien bzw. den unterschiedlichen

Nachweisverfahren gibt es verschiedene Erklärungsmodelle, z.B. Aufnahme der von den Fibroblasten stammenden Proteasen durch die Karzinomzellen. Durch eine Immunelektronenmikroskopiestudie, konnte MMP-2 im rauhen endoplasmatischen Retikulum von Tumorfibroblasten in Magen- und Hautkrebs lokalisiert werden. Aber auch im Zytosol der Krebszellen fand sich MMP-2. Dies zeigt einen möglichen Mechanismus der Enzymaufnahme in die Tumorzellen auf (Ohtani et al., 1995). Andererseits kommt es zu Unterschieden in der mRNA Translationsrate und der Kapazität der intrazellulären Lagerung des Proteins oder es gibt Unterschiede im Bereich der Nachweisschwelle der einzelnen Verfahren wie der in situ Hybridisation und der Immunhistochemie (Poulsom et al., 1992; Nomura et al., 1996).

Ausgehend von klinischen Beobachtungen in Blasenkarzinomen und Neuroblastomen (Davies et al., 1993; Kanayama et al., 1998; Ara et al., 1998) war zu vermuten, daß die gering differenzierten insulären Karzinome und die anaplastischen Karzinome eine stärkere MMP-2-Expression aufweisen als die gut differenzierten Karzinome. Jedoch wiesen die pdTC ein ähnliches Bild mit überwiegend fokal starker MMP-2-Expression auf.

Die anaplastischen Tumoren zeigten ein unerwartetes Ergebnis, nur 56% der untersuchten UTC waren MMP-2 positiv. Eine mögliche Erklärung ist, daß auf Grund der Größe der meisten UTC nur zentrale Gebiete dieser Tumoren untersucht werden konnten und nicht die invasiven Randgebiete. Denn gerade in den Tumorrandgebieten kommt es zu einer erhöhten Freisetzung von Proteasen während des Tumorwachstums.

Auf Grund seiner Ableitung von parafollikulären C-Zellen und den daraus resultierenden biologischen, morphologischen und funktionellen Eigenschaften nimmt das medulläre Karzinom eine Sonderstellung innerhalb der epithelialen Schilddrüsenmalignome ein. Hinsichtlich der MMP-2-Expression in den Primärtumoren der sporadischen MTC konnte ein ähnliches Ergebnis wie in den differenzierten Schilddrüsenkarzinomen beobachtet werden. Jedoch in über 70% der Lokal- und Lymphknotenrezidive der sporadischen MTC konnten keine oder nur eine fokal schwache Antigenexpression nachgewiesen werden.

Im besonderen Fall einer Patientin, in dem 3 aufeinander folgende Lokalrezidive untersucht wurden, war ein durchgehend negatives Expressionsmuster zu beobachten. Auch bei den familiären MTC überwog eine negative Antigenexpression. Unklar bleibt, warum es im Fall der MTC solche Unterschiede zwischen Primärtumoren und Rezidiven gibt. Zur Klärung dieser Ergebnisse sollten auf jeden Fall noch andere Untersuchungsmethoden mit einbezogen werden.

In Bezug auf das TNM-Stadium konnte keine Korrelation mit dem Expressionsgrad oder Expressionsmuster von MMP-2 festgestellt werden. Lediglich die Rezidivtumoren wiesen in den größeren Tumoren eine stärkere Expression auf. Zu beachten ist dabei auch die sehr kleine Anzahl von T1- und T2- Tumoren. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Gress et al., sie

fanden keine Korrelation zwischen der MMP-2-Expression und dem TNM-Stadium sowie dem Differenzierungsgrad in Pankreastumoren (Gress et al., 1995).

Talvensaari-Mattila et al. konnten bei Mammakarzinomen eine Korrelation zur Überlebensrate nachweisen, aber keine Beziehung zum TNM-Stadium, zum histologischen Typ, zum Patientenalter und zum Östrogen-/Progesteron-Rezeptor-Status feststellen. MMP-2 scheint nicht zwingend notwendig mit anderen Hauptprognosefaktoren in Mammakarzinomen verbunden zu sein, obwohl es potentielle Aggressivität und invasive Kapazität anzeigen kann (Talvensaari-Mattila et al., 1998). Poulsom et al. fanden die MMP-2 Transkripte erhöht in Neoplasien, aber keine Korrelation zwischen der MMP-2-Expression und der Tumorprogression (Poulsom et al., 1993).

Entscheidend für die Funktion der Protease MMP-2 ist die Umwandlung der inaktiven Zymogenform in eine aktivierte Form. Deryugina et al. zeigten anhand von Gliom- und Fibrosarkomzelllinien, daß der Umbau der Kollagenmatrix durch die Tumorzellen eine Aktivierung und Zelloberflächenverbindung erfordert, wobei die Aktivierung abhängig von MT-1MMP (Membrane Type 1 Matrixmetalloprotease) ist. Dabei scheint die MMP-2 Aktivität auf der Zelloberfläche entscheidend für den Umbau der ECM durch die Tumorzellen zu sein (Deryugina et al., 1998). Durch Untersuchungen der aktiven und der latenten MMP-2 und MMP-9 Form in kolorektalen Karzinomen (CRC) durch Gelatin-Zymographie, konnte gezeigt werden, daß der Verlust von Basalmembran-Typ IV Kollagen mit einer erhöhten MMP-2 und MMP-9-Expression assoziiert ist. Des Weiteren konnten die latenten Formen in allen CRC und normaler Mukosa nachgewiesen werden, während die aktivierte Form überwiegend in CRC mit Metastasierung zu beobachten war (Zeng et al., 1998). Zu ähnlichen Schlüssen kamen Koshiba et al. . Sie wiesen in allen untersuchten Pankreasnormalgeweben und in Pankreaskarzinomen die latente Form von MMP-2 mittels Gelatinzymographie nach. Hingegen beobachteten sie die aktivierte Form von MMP-2 in allen Karzinomen, aber in nur 30% der Normalgewebe, so daß eine positive Korrelation zwischen MMP-2-Expression und TNM-Status nachgewiesen werden konnte (Koshiba et al., 1998). Aus diesem Grund scheint es von Bedeutung zu sein, daß die in unserer Studie verwendeten Antikörper nicht zwischen dem aktivem und dem latenten Enzym unterscheiden konnten und so die Auswertung in Bezug auf die Korrelation mit dem TNM-Stadium durch die Doppelerkennung erschwert ist.

## **5.2 MMP-9**

MMP-9 (Gelatinase B) eine weitere Typ IV Kollagenase, konnte in zahlreichen Studien in einem breiten Spektrum maligner Tumoren ermittelt werden. Bei den im Rahmen dieser Arbeit mittels RT-PCR untersuchten Neoplasien war in 76% der Gewebe MMP-9 mRNA nachweisbar. Von den daraufhin immunhistochemisch untersuchten

Schilddrüsenmalignomen zeigten insgesamt 89% der Fälle eine erhöhte MMP-9 Immunreaktivität. Ähnlich den Ergebnissen der Gelatinase A erwies sich der größte Teil der benignen Schilddrüsengewebe als MMP-9 negativ.

Vergleichbar mit den MMP-2 Ergebnissen zeigten sich die Expressionsraten der differenzierten Tumoren. In 8 von 10 (80%) der follikulären Karzinome bzw. in allen 17 papillären Karzinomen war eine überwiegend fokal starke MMP-9 Immunreaktivität zu beobachten. Primärtumoren, Lymphknotenrezidive und Lokalrezidive unterschieden sich in der Expressionsausprägung auch bei dieser Protease nicht voneinander. Die im Fall 29 mit untersuchte Metastase verhielt sich äquivalent dem Primärtumor.

Auffällig erscheint, daß bei den gering differenzierten insulären Karzinomen, gegenüber den MMP-2 markierten pdTC, eine höhere Anzahl von Geweben eine diffus starke Expression zeigte. Ebenso war bei den undifferenzierten Tumoren in 14 von 16 (87%) Fällen eine positive Reaktion nachzuweisen, wobei 5 (31%) Tumoren eine diffus starke Expression zeigten. In den medullären Karzinomen imponierte in 83% der Fälle ein positiver Antigennachweis. Die Expressionsausprägung in Primärtumoren, Lymphknotenrezidiven und Lokalrezidiven unterschied sich nicht. Sporadische und familiäre MTC zeigten im Vergleich ebenfalls ein ähnliches Reaktionsmuster.

Weitere Hinweise auf die Bedeutung der Gelatinase B im Prozeß der Tumordinvasion konnten Davidson et al. aufzeigen. Sie erbrachten den Nachweis einer erhöhten Immunreaktivität in höhergradigen zervikalen intraepithelialen Neoplasien (Präkanzerose der Zervix) und in Zervixkarzinomen durch Immunhistochemie und in situ Hybridisation und konnten somit aufzeigen, daß MMP-9 schon in potentiellen Vorstadien eines Malignoms eine große Rolle spielt (Davidson et al., 1999). Bezug nehmend auf dieses Ergebnis könnte man die positive MMP-9 Reaktion der beiden T1-Tumoren dahingehend erklären, daß unabhängig von der Tumorgroße eine Proteasenexpression in invasiven bzw. invasiv werdenden Prozessen erfolgt. In der vorliegenden Untersuchung wurde die Gelatinase B im Zytoplasma der Tumorzellen, im desmoplastischen Stroma und auch in den Endothelzellen der Tumorgefäße lokalisiert. Auch für die Gelatinase B konnte eine Diskrepanz im Bezug auf die Lokalisation bei den einzelnen Nachweisverfahren festgestellt werden, wobei aber in der Mehrzahl der untersuchten Tumoren ein Nachweis im desmoplastischen Stroma erfolgte. So zeigten Zeng et al. in mehreren Arbeiten die Expression von MMP-9 in kolorektalen Karzinomen sowohl durch Nachweis der mRNA als auch des Proteins. Beide mRNA- und auch Proteinsignale waren stark in den Stromazellen am Übergang Stroma - invasiver Tumor konzentriert. Die MMP-9 positiven Zellen wurden in der Mehrzahl der Fälle als Makrophagen identifiziert (Zeng et al., 1995, Zeng et al., 1996 a und b).

Die Arbeitsgruppe von Nielsen et al. untersuchte Kolonadenokarzinome immunhistochemisch und durch in situ Hybridisation, wobei sie in sämtlichen Tumoren eine MMP-9-Expression feststellen konnten. Mittels Doppelfärbung wurde MMP-9 auch hier in

den Makrophagen und den Neutrophilen im desmoplastischen Stroma lokalisiert (Nielsen et al., 1996). Eine andere Arbeitsgruppe lokalisierte MMP-9 überwiegend in Stromaendothelzellen. Des Weiteren fanden sie, daß die Endothelzellen der Blutgefäße der invasiven Tumoren MMP-9 exprimieren (Heppner et al., 1996). Das läßt den Schluß zu, daß MMP-9 eine wichtige Funktion im Rahmen der Angiogenese zukommt.

Wie auch MMP-2 wird MMP-9 in einer inaktiven Form sezerniert, welche einer Aktivierung bedarf, wobei nur die aktive, nicht die latente Kollagenase an Kollagen bindet. (Gallegos et al., 1995). So gilt auch hier zu bedenken, daß eine Auswertung in Bezug auf das TNM-Stadium auf Grund der Doppelerkennung von latenter und aktiver Gelatinase B erschwert ist. Eine Unterscheidung zwischen malignen und benignen Schilddrüsengeweben mittels immunhistochemischen MMP-9-Nachweises ist jedoch auf Grund der Expressionsunterschiede gut möglich.

### **5.3 TIMP-1**

Tissue inhibitors of matrix metalloproteases (TIMP) sind eine Familie von natürlichen Inhibitoren, welche die Aktivität der MMP in der ECM kontrollieren. Dabei beginnt die Tumordinvasion, wenn die Balance zwischen MMP und TIMP gestört ist und dieses Gleichgewicht dabei zur proteolytischen Funktion der MMP hin verschoben wird. Dann beginnen die Tumorzellen, in die umgebende Matrix, das Lymph- und das Gefäßsystem einzudringen.

TIMP-1 mRNA konnte mittels RT-PCR in fast allen untersuchten neoplastischen Geweben in starker Expression nachgewiesen werden. Immunhistochemisch wurde in 20% der benignen Schilddrüsengewebe ein positives Immunreaktionsprodukt beobachtet. In den neoplastischen Geweben konnte dagegen in 95% der Fälle eine fokal starke bzw. eine diffus starke TIMP-1-Expression nachgewiesen werden. Das TIMP-1 Protein, wie auch die beiden Proteasen, wurde immunhistochemisch, im Zytoplasma der Tumorzellen und in den den Tumor umgebenden Fibroblasten lokalisiert. Häufig exprimierten auch die Endothelzellen der Tumorblutgefäße TIMP-1. Die TIMP-1-Expression in den differenzierten Karzinomen zeigte überwiegend eine einfach positive Reaktion. Die im Fall 29 untersuchte Metastase verhielt sich äquivalent dem Primärtumor. Auffällig dagegen waren die gering differenzierten insulären Karzinome. Hier wurde in 71% der Fälle eine zweifach positive diffus starke Expression vorgefunden, während in den anaplastischen Karzinomen ein ähnliches Bild wie in den differenzierten Karzinomen zu beobachten war (nur 25% der Tumoren waren zweifach positiv). Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß besonders in der Übergangsphase zwischen differenzierten und anaplastischen Schilddrüsenkarzinomen eine verstärkte TIMP-1-Expression erfolgt. Wobei auch hier zu beachten ist, daß bei den anaplastischen Karzinomen auf Grund deren Größe meist nur zentrale Gebiete und weniger die invasiven

Randgebiete als bei den gering differenzierten insulären Karzinomen untersucht werden konnten. Auch bei den Inhibitoren unterschied sich die Expressionsausprägung in Primärtumoren, Lymphknotenrezidiven und Lokalrezidiven in allen Tumorarten nicht.

Beim medullären Karzinom zeigten die sporadische und familiäre Form ein ähnliches Reaktionsmuster. Bemerkenswert ist in den MTC eine insgesamt in 43% nachgewiesene zweifach positive Reaktion und in 53% eine einfach positive Reaktion, d.h. im Vergleich zu den Proteasen zeigte sich eine weit stärkere Expression der Inhibitoren.

Ähnlich den Ergebnissen bei den Proteasen konnte keine Korrelation mit dem TNM-Stadium festgestellt werden. Bei dieser in allen Schilddrüsenneoplasien, fast unabhängig von der histologischen Klassifikation, nachgewiesenen TIMP-1 Überexpression stellt sich die Frage, was die Ursachen bzw. die Auslöser für die erhöhte TIMP-1 Produktion sind. Kossakowska et al. beobachteten eine Überexpression von TIMP-1 in humanen Lymphomen assoziiert mit aggressiverem Verhalten und Yoshiji et al. wiesen eine signifikante Erhöhung der TIMP-1 Transkripte in Mamma-Ca nach (Kossakowska et al., 1991; Yoshiji et al., 1996).

In unserer Studie konnte eine Übereinstimmung der Expression der Protease MMP-9 und deren Inhibitor TIMP-1 aufgezeigt werden. Ein ähnliches Expressionsmuster fand sich sowohl in den Tumorzellen als auch im desmoplastischen Stroma, wobei die Inhibitorexpression etwas stärker ausgeprägt war. Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen Murray et al. in Magenkarzinomen und Duffy et al. in Mammakarzinomen (Murray et al., 1998; Duffy et al. 1995). Auch Heppner et al. fanden in Mammakarzinomen TIMP-1 überwiegend stark exprimiert im Tumorstroma desselben Zelltyps, welcher MMP produziert (Heppner et al., 1996).

Es scheint überraschend, daß TIMP-1, ein Kollagenaseinhibitor, in invasiven Tumoren erhöht ist. Zwei Erklärungsmodelle sind: daß eine Hochregulation des Inhibitors TIMP-1 infolge einer erhöhten Proteasenexpression erfolgt, aber die proteolytische Aktivität überwiegt oder aber, daß bei der Präsenz von exzessiv mehr TIMP als MMP im Tumorgewebe die wachstumsfördernden Aktivitäten des Inhibitors (s.u.) das Gleichgewicht zugunsten von Wachstum und Metastasierung verschieben läßt. (Sang et al., 1998; Tomita et al., 1996).

Der Inhibitor TIMP-1 stellt sich als multifunktionelles Protein dar, welches zum einen produziert wird, um der proteolytischen Funktion der MMP entgegenzuwirken und um die strukturelle Integrität der Kollagen- und Elastinkomponenten der ECM vor zirkulierenden Proteasen zu schützen, zum anderen zeigt es wachstumsfördernde Aktivitäten. So konnte die Regulation des Wachstums durch TIMP-1 in einem breiten Spektrum von humanen und bovinen Zelllinien nachgewiesen werden (Hayakawa et al., 1992).

Eine starke TIMP-1-Expression wurde in Mammakarzinomen in Zellen des Tumorstromas und in allen Gebieten mit ECM-Umbau beobachtet. Dabei erwies sich die TIMP-Expression als unabhängig vom Tumorstadium und von der Gelatinaseexpression. Es wird diskutiert,

daß TIMP-1 eine Rolle bei der Tumorprogression zu spielen scheint, welche nicht von einer MMP-Hemmung abhängt. Nur der Schutz der ECM und die Hemmung der Angiogenese sind beide abhängig von einer Hemmung der Proteasenaktivität. Im Gegensatz dazu ist die Stimulation des Wachstums und der Differenzierung der verschiedenen Zelltypen unabhängig von der Fähigkeit zur Hemmung der MMP-Aktivität (Lindsay et al., 1995 und 1997). So konnten auch Chesler et al. nachweisen, daß die wachstumsfördernden Aktivitäten von TIMP-1 und die antiproteolytische Fähigkeit physikalisch und funktionell unabhängig voneinander sind (Chesler et al., 1995). Welche der Funktionen von TIMP-1 ursächlich zur Überexpression im malignen Tumoren führt, bleibt noch ungeklärt.

Auf Grund unserer Ergebnisse muß die ausgeprägte Korrelation der Expressionsmuster der Protease MMP-9 und des korrespondierenden Inhibitors TIMP-1 als eine Antwort zur Tumorinvasion diskutiert werden und dabei die TIMP-1 Überexpression als der Versuch, die MMP-Aktivität zu kontrollieren und die ECM-Integrität zu erhalten. Für diese These sprechen auch die durch den Einsatz künstlicher Inhibitoren, z.B. Barimastat und Marimastat bei fortgeschrittenen malignen Tumorerkrankungen, erzielten Erfolge. Hier zeigte sich eine deutliche Reduktion der Tumorgroße.

#### **5.4 TIMP-2**

Annähernd übereinstimmend mit den TIMP-2 Ergebnissen zeigte sich auch die TIMP-2-Expression in den benignen und malignen Schilddrüsenneoplasien dieser Studie.

TIMP-2 mRNA konnte mittels RT-PCR in fast allen untersuchten neoplastischen Geweben in starker Expression ermittelt werden. Eine schwache bis mäßige TIMP-2 Expression fand sich in 40% der benignen Schilddrüsenewebe, wobei eine Parallelität zwischen TIMP-1- und TIMP-2-Expression nicht nachgewiesen werden konnte. Die malignen Gewebe waren in 86% der untersuchten Fälle TIMP-2 positiv.

Im Zytoplasma der Tumorzellen und in den den Tumor umgebenden Fibroblasten konnte TIMP-2 immunhistochemisch in fast identischer Lokalisation wie die beiden Proteasen und TIMP-1 nachgewiesen werden. Auch bei diesem Inhibitor war eine starke Expression in den Endothelzellen des Gefäßsystems der Neoplasien vorzufinden, was auf eine wichtige Rolle bei der Neoangiogenese von Schilddrüsentumoren hinweist.

Vergleichbar mit den TIMP-1 Ergebnissen zeigten sich die Expressionsraten der differenzierten Tumoren. In 80% der follikulären Karzinome bzw. in allen papillären Karzinomen war eine überwiegend fokal starke TIMP-2 Immunreaktivität zu ermitteln. Auffällig waren auch bei diesem Inhibitor die gering differenzierten insulären Karzinome.

Hier zeigte sich in 71% der Fälle eine zweifach positive diffus starke Expression. Ähnlich wie bei TIMP-1, scheint in der Übergangsphase zwischen differenzierten und anaplastischen Schilddrüsenkarzinomen eine verstärkte TIMP-Expression zu erfolgen. Auch bei

anaplastischen Karzinomen lassen sich Parallelen zu TIMP-1 feststellen. Es zeigten alle untersuchten Gewebe eine positive Immunreaktion, aber nur 19% der Tumoren waren zweifach positiv für TIMP-2. Bei den medullären Karzinomen waren im Vergleich zu TIMP-1 geringere Expressionsraten zu ermitteln. Für TIMP-2 fiel der Anteil zweifach positiver immunhistochemischer Reaktionen geringer aus (13%). Insgesamt 23 von 30 Fällen (77% gegenüber 96% bei TIMP-1) der MTC war ein positives Reaktionsprodukt zu beobachten. Ein ähnliches Expressionsmuster zeigten die sporadische und die familiäre Form der MTC.

Ein Zusammenhang zwischen der TIMP-2-Expression und der Tumorgroße, dem Lymphknotenstatus sowie der hämatogenen Metastasierung konnte nicht ermittelt werden. Diese Ergebnisse werden auch von der Gruppe Santoro et al. bestätigt. Sie wiesen in neoplastischen Zelllinien von humanen Schilddrüsen eine signifikante Erhöhung des TIMP-2 Transkriptes im Vergleich zu normaler Schilddrüse nach (Santoro et al., 1994). In immunhistochemischen Studien von Kolon-, Magen- und Mammakarzinomen war ebenfalls eine erhöhte TIMP-2-Expression im Tumorzellzytoplasma und im umgebenden Stroma zu beobachten (Höyhty et al., 1994). In Lungenneoplasien, mit Ausnahme des kleinzelligen Lungenkarzinoms konnte eine TIMP-2 Überexpression ermittelt werden (Kawano et al., 1997).

Eine weitere TIMP-2 Überexpression konnte in Blasenneoplasien nachgewiesen werden, dabei hauptsächlich im Stroma um invasive Zellnester, welche auch Gelatinase A positiv waren (Grignon et al., 1996). Entsprechend der Korrelation zwischen MMP-9 und TIMP-1 zeigte sich eine ähnliche immunhistochemische Lokalisation von TIMP-2 und der Gelatinase A, wobei auch hier die Intensität des Inhibitors stärker war. Somit läßt sich auch für TIMP-2 die Schlußfolgerung ableiten, daß die Überexpression entweder eine Gegenregulation zur Proteasenaktivität darstellt oder aber die Überexpression auf die wachstumsstimulierende Funktion des Inhibitors zurückzuführen ist. Denn TIMP-2 ist ebenso wie TIMP-1 ein multifunktionelles Protein, welches neben der die Proteasen hemmenden Aktivität auch die Funktion eines Wachstumsfaktors sowie eines Inhibitors der Angiogenese aufweist (Emmert-Buck et al., 1995, Hayakawa et al., 1994; Kostoulas et al., 1999).

Eine genaue Ursachenklärung bleibt Aufgabe weiterer Studien.

## 5.5 Klinische Bedeutung der gewonnenen Ergebnisse

Die Daten dieser Studie haben gezeigt, daß die Aktivität der Matrixmetalloproteasen und der Inhibitoren stark mit der Tumorinvasion und Metastasierung von Schilddrüsenkarzinomen assoziiert ist. Anhand der vorliegenden Ergebnisse dieser Studie ergibt sich eine mögliche klinische Bedeutung durch die Kontrolle der Proteasentätigkeit.

Da die Balance zwischen den Proteasen und deren Inhibitoren ein entscheidender Faktor bei der Tumorentstehung und -progression zu sein scheint, erfolgten zahlreiche Studien, in denen die Wirkungen der Inhibitoren untersucht wurden. Dabei kam es zu widersprüchlichen Ergebnissen. Einige Studien zeigten eine Tumorreduktion durch TIMP-1 bzw. TIMP-2 auf (Khokha et al., 1992.; DeClerck et al., 1992; Valente et al., 1998). Während in der Mehrzahl der Studien die Inhibitoren wahrscheinlich durch die wachstumsstimulierende Funktion ohne den Nachweis einer tumorreduzierenden Wirkung hoch reguliert waren. (McCarthy et al., 1999; Goss et al., 1998; Lindsay et al., 1997). Erfolge bei der Hemmung der Tumorinvasion, Metastasierung und Tumorangiogenese versprechen präklinische Daten über mindestens 6 verschiedene synthetische Inhibitoren der Matrixmetalloproteasen (u.a. Batimastat und Marimastat). Batimastat, der am umfangreichsten untersuchte synthetische Inhibitor, ist ein Hydroxamsäureanalogon. Er erfaßt ein breites Spektrum der MMP Aktivität. Sowohl in animalen als auch in humanen Karzinomen bzw. Karzinomzelllinien konnte eine Hemmung sowohl des Tumorwachstums als auch der Metastasierung festgestellt werden (Sledge et al., 1995; Tonn et al., 1999; Bu et al. 1998). Auf Grund in der klinischen Anwendung aufgetretener Nebenwirkungen (keine orale Verfügbarkeit, toxische Lokalreaktionen bei intraperitonealer Anwendung) wurde ein oral verfügbarer Inhibitor „Marimastat“ entwickelt. Marimastat, ebenfalls ein Hydroxamsäureanalogon, wird z.Z. an Patienten mit Pankreas-, Lungen- und Magenkarzinomen sowie Glioblastomen in Studien der Phase III untersucht. Die endgültigen Ergebnisse liegen noch nicht vor. Dabei ist zu beachten, daß die synthetischen Inhibitoren eher zytostatische als zytotoxische Effekte besitzen und daher als adjuvante Therapie nach der chirurgischen Entfernung des Tumors, Radiotherapien oder Knochenmarktransplantationen zum Schutz vor erneuten Tumorwachstum geeignet sind (Watson et al., 1999; Yu et al., 1998; Cockett et al., 1998; Wojtowicz-Praga et al., 1997).

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Hinweise auf die Bedeutung der Matrixmetalloproteasen MMP-2 und MMP-9 sowie deren Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 lassen den Schluß zu, daß auch in Schilddrüsenkarzinomen eine Anwendung der synthetischen Inhibitoren mit dem therapeutischen Ziel der Hemmung der Tumorprogression bei den undifferenzierten Tumoren zu überlegen ist.

Die Beeinflussung der MMP-Aktivität ist somit ein erfolgversprechender Schritt im Kampf gegen die Invasivität und Metastasierung von Karzinomen.

## 6 Zusammenfassung

Einer der wichtigsten Schritte für die Metastasierung eines Tumors ist die Aktivierung der lokal produzierten proteolytischen Enzyme, welche einen Abbau der umgebenden extrazellulären Matrixproteine bewirken. Zu diesen Enzymen zählen die Matrixmetalloproteasen. Die Aktivierung und die enzymatische Aktivität dieser Proteasen werden durch spezifische Inhibitoren (Tissue inhibitor of matrixmetalloproteases TIMP) reguliert. Ziel dieser Arbeit war der Nachweis der Matrixmetalloproteasen MMP-2 und MMP-9 und deren Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 in malignen und benignen Schilddrüsengeweben.

- 1) Mittels RT-PCR konnte eine Korrelation der mRNA Expression mit der immunhistochemisch nachgewiesenen Proteinexpression der Proteasen und ihrer Inhibitoren in Schilddrüsenkarzinomen aufgezeigt werden.
- 2) Die zum Vergleich mit den Neoplasien mit untersuchten benignen Schilddrüsengewebe zeigten keine oder nur eine geringe Expression der beiden Proteasen und auch der Inhibitoren.
- 3) In den malignen Geweben war eine signifikant höhere Expression sowohl von MMP-2 und MMP-9 als auch von TIMP-1 und TIMP-2 zu beobachten.
  - 0 MMP-2 war hoch exprimiert in den FTC, PTC und pdTC. Während in den UTC und MTC nur in 56% bzw. 40% der Tumoren eine erhöhte Expression vorzufinden war.
  - 1 MMP-9 zeigte in allen malignen Schilddrüsengeweben eine starke Expression, im besonderen Maße in den pdTC und in den UTC.
  - 2 TIMP-1 konnte in allen Tumoren in hoher Expression beobachtet werden, wobei eine besonders starke Expression in den pdTC auffiel.
  - 3 Ein ähnliches Ergebnis wies TIMP-2 auf, hier zeigte sich in allen Schilddrüsenneoplasien eine starke Expression, wobei auch hier für die pdTC eine auffallend starke Immunreaktion nachgewiesen werden konnte.
- 4) Der Übergang vom differenzierten zum undifferenzierten Karzinom ist mit einer stark erhöhten Expression sowohl der Proteasen als auch der Inhibitoren verbunden.
- 5) Das Immunreaktionsprodukt der Proteasen und auch der Inhibitoren war im Zytoplasma der Tumorzellen und auch in den Fibroblasten des umgebenden Stromas zu beobachten.
- 6) Zwischen den Primärtumoren und den Rezidiven der einzelnen Tumorarten konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.
- 7) In Bezug auf die Tumorgröße, die Lymphknotenbeteiligung und die hämatogene Metastasierung konnte keine Korrelation mit dem Expressionsgrad von MMP-2, MMP-9, TIMP-1 und TIMP-2 festgestellt werden.

Trotz der Schwierigkeit der Doppelerkennung der latenten und der aktiven Form der Matrixmetalloproteasen durch die verwendeten Antikörper können die vorliegenden Ergebnisse eine deutliche Assoziation der malignen Schilddrüsengewebe mit einer starken Expression der Proteasen und deren Inhibitoren aufzeigen.

## 7 Literaturverzeichnis

**Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD:** Zellverbindungen, Zell/Zell-Adhäsion und die extrazelluläre Matrix. In: Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD, Übers. Von Jaenicke L (Hrsg): Molekularbiologie der Zelle. 3.Auflage, VCH, Weinheim, New York, Basel usw., 1997, S. 1156-1175

**Altenähr E, Böcker W:** Schilddrüse. In: Altenähr E, Böcker W, Dhom G, Gusek W, Heitz PH, Klöppel G, Lietz H, Mitschke H, Saeger W, Schäfer HJ, Staub JJ, Steiner H: Pathologie der endokrinen Organe. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1981, S.303-354

**Ara T, Fukuzawa M, Kusafuka T, Komoto Y, Oue T, Inoue M, Okada A:** Immunohistochemical expression of MMP-2, MMP-9 and TIMP-2 in neuroblastoma: association with tumor progression and clinical outcome. J Pediatr Surg 33 (1998) 1272-1278

**Autio-Harmainen H, Karttunen T, Hurskainen T, Höyhty M, Kauppila A, Tryggvason K:** Expression of 72 kilodalton type IV collagenase in benign and malignant ovarian tumors. Lab. Invest. 69 (1993) 312-321

**Brabant G, Maenhaupt C, Köhrle J, Scheumann G, Dralle H, Hoang-Vu C, Hesch RD, Von zur Mühlen A, Vassart G, Dumont JE:** Human thyrotropin receptor gene: Expression in thyroid tumors and correlation to markers of thyroid differentiation and dedifferentiation. Mol. Cell Endocrinol 82 (1991) R7-R12

**Bu W, Tang ZY, Sun FX, Ye SL, Liu KD, Xue Q, Chen J, Gao DM:** Effects of matrix metalloproteinase inhibitor BB-94 on liver cancer growth and metastasis in a patient-like orthotopic model LCI-D20. Hepatogastroenterology 45 (1998) 1056-1061

**Campo E, Merino M, Liotta L, Neumann R, Stetler Stevenson WG:** Distribution of the 72-kd type IV collagenase in nonneoplastic and neoplastic thyroid tissue. Hum. Pathol. 23 (1992) 1395-1401

**Chan JKC:** Tumors of the thyroid and parathyroid glands. In: Fletcher CDM: Diagnostic histopathology of tumor. volume 2, Churchill Livingstone, Edinburgh, Hong Kong, London, Madrid, Melbourne, New York, Tokyo 1995

**Chesler L, Golde DW, Bersch N, Johnson MD:** Metalloproteinase inhibition and erythroid potentiation are independent activities of tissue inhibitor of metalloproteinases-1. Blood 86 (1995) 4506-4515

- Cockett MI, Murphy G, Birch ML, O'Connell JP, Crabbe T, Millican AT, Hart IR, Docherty AJP:** Matrix metalloproteinases and metastatic cancer. *Biochem. Soc. Symp.* (1998) 295-313
- Corcoran M, Kleiner DE Jr, Stetler-Stevenson WG:** Regulation of matrix metalloproteinases during extracellular matrix turnover. *Adv. Exp. Med. Biol.* 385 (1995) 151-159
- Corcoran M, Hewitt RE, Kleiner DE Jr, Stetler-Stevenson WG:** MMP-2: expression, activation and inhibition. *Enzyme Protein* 49 (1996) 7-19
- Corcoran M, Stetler-Stevenson WG:** Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 stimulates fibroblast proliferation via cAMP-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* (1995) 13453-13459
- Crawford HC, Matrisian LM:** Tumor and stromal expression of matrix metalloproteinases and their role in tumor progression. *Inv Metast.* 14 (1994/95) 234-245
- Crawford HC, Matrisian LM:** Mechanisms controlling the transcription of matrix metalloproteinase genes in normal and neoplastic cells. *Enzyme Protein* 49 (1996) 20-37
- Davidson B, Goldberg I, Kopolovic J, Lerner-Geva L, Gotlieb WH, Weis B, Ben-Baruch G, Reich R:** Expression of matrix metalloproteinase-9 in squamous cell carcinoma of the uterine cervix-clinicopathologic study using immunohistochemistry and mRNA in situ hybridization. *Gynecol Oncol* 72 (1999) 380-386
- Davies B, Miles DW, Happerfield LC, Naylor MS, Bobrow LG, Rubens RD, Balkwill FR:** Activity of type IV collagenase in benign and malignant disease. *Br. J. Cancer* 67 (1993) 1126-1131
- Davies B, Waxman J, Wasan H, Abel P, Williams G, Krausz T, Neal D, Thomas D, Hanby A, Balkwill FR:** Levels of matrix metalloproteinases in bladder cancer correlate with tumor grade and invasion. *Cancer Res.* 53 (1993) 5365-5369
- Dralle H, Schwarzrock R, Lang W, Bocker W, Ziegler H, Schroder S, Geerlings H:** Comparison of histology and immunohistochemistry with thyroglobulin serum levels and radioiodine uptake in recurrences and metastases of differentiated thyroid carcinomas. *Acta Endocrinol (Copenh)* 108 (4) (1985) 504-510

**DeClerck YA, Perez N, Shimada H, Boone TC, Langley KE, Taylor SM:** inhibition of invasion and metastasis in cells transfected with an inhibitor of metalloproteinases. *Cancer Res.* 52 (1992) 701-708

**DeClerck YA, Imren S:** Protease inhibitors: role and potential therapeutic use in human cancer. *Eur. J. Cancer* 30a (1994) 2170-2180

**Deryugina EI, Bourdon MA, Reisfeld RA, Strongin A:** Remodeling of collagen matrix by human tumor cells requires activation and cell surface association of matrix metalloproteinase-2. *Cancer Res.* 58 (1998) 3743-3750

**Duffy MJ, Blaser J, Duggan C, McDermott E, O'Higgins N, Fennelly JJ, Tschesche H:** Assay of matrix metalloproteinases types 8 and 9 by ELISA in human breast cancer. *Br. J. Cancer* 71 (1995) 1025-1028

**Emmert-Buck MR, Emonard HP, Corcoran ML, Kruttsch HC, Foidart JM, Stetler-Stevenson WG:** Cell surface binding of TIMP-2 and pro-MMP-2/TIMP-2 complex. *FEBS Letters* 364 (1995) 28-32

**Eng C, Mulligan LM:** Mutations of the RET prot-oncogene in the multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes, related sporadic tumours, and the hirschsprung disease. *Hum. Mutat.* 9 (1997) 97-109

**Fridman R, Toth M, Pena D, Mobashery S:** Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP-2). *Cancer Res.* 55 (1995). 2548-2555

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

**Goss KJ, Brown PD, Matrisian LM:** Differing effects of endogenous and synthetic inhibitors of metalloproteinases on intestinal tumorigenesis. *Int. J. Cancer* 23 (1998) 629-635

**Gress TM, Müller-Pillasch F, Lerch MM, Friess H, Büchler M, Adler G:** Expression and in situ localization of genes coding for extracellular matrix proteins and extracellular matrix degrading proteases in pancreatic cancer. *Int. J. Cancer* 62 (1995) 407-413

**Grignon DJ, Sakr W., Toth M, Ravery V, Angulo J, Shamsa F, Pontes JE, Crissman JC, Fridman R:** High levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) expression are associated with poor outcome in invasive bladder cancer. *Cancer Res.* 56 (1996) 1654-1659

**Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, Ichijima E, Iwata K:** Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 for a wide range of cells. *FEBS Letters* 298 (1992) 29-32

**Hayakawa T, Yamashita K, Ohuchi E, Shinagawa A:** Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *J. Cell Science* 107 (1994) 2373-2379

**Heppner KJ, Matrisian ML, Jensen RA, Rodgers WH:** Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response. *Am. J. Pathol.* 149 (1996) 273-282

**Hibbs MS, Hastv KA, Sever JM, Kang AH, Mainardi CL:** Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 2493-2500

**Hibbs MS, Hoidal JR, Kang AH:** Expression of a metalloproteinase that degrades native type V collagen and denatured collagens by cultured human alveolar macrophages. *J. Clin. Invest.* 80 (1987) 1644-1650

**Hoang-Vu C, Dralle H, Scheumann G, Maenhaut C, Horn R, von zur Mühlen A, Brabant G:** Gene expression of differentiation- and dedifferentiation markers in normal and malignant human thyroid tissues. *Exp Clin Endocrinol.* 100 (1992) 51-56

**Hölting T, Zielke A, Siperstein AE, Clark OH, Duh QY:** Aberrations of growth factor control in metastatic follicular thyroid cancer in vitro. *Clin. Exp. Metastasis* 12 (1994) 315-323

**Hölting T, Zielke A, Siperstein AE, Clark OH, Duh QY:** Transforming growth factor-beta 1 is a negative regulator for differentiated thyroid cancer: studies of growth, migration, invasion, and adhesion of cultured follicular and papillary thyroid cancer cell lines. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 79 (1994) 806-813

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

**Johnson MD, Kim HR, Chesler L, Tsao-Wu G, Bouck N, Polverini PJ:** Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase. *J. Cell Physiol.* 160 (1994) 194-202

- Kanayama K, Yokota K, Kurokawa Y, Murakami Y, Nishitani M, Kagawa S:** Prognostic values of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in bladder cancer. *Cancer* 82 (1998) 1359-1366
- Karakiulakis G, Papanikolaou C, Jankovic SM, Aletras A, Papakonstantinou E, Vretou E, Mirtsou-Fidani V:** Increased type IV collagen-degrading activity in metastases originating from primary tumors of the human colon. *Inv. Metast.* 17 (1997) 158-168
- Kawano N, Osawa H, Ito T, Nagashima Y, Hirahara F, Inayama Y, Nakatani Y, Kimura S, Kitajima H, Koshikawa N, Miyazaki K, Kitamura H:** Expression of gelatinase A tissue inhibitor of metalloproteinases-2, matrilysin, and trypsinogen in lung neoplasms. *Hum. Pathol.* 28 (1997) 613-622
- Khokha R, Zimmer MJ, Graham CH, Lala PK, Waterhouse P:** Suppression of invasion by inducible expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in B16-F10 melanoma cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 84 (1992) 1017-1022
- Khokha R:** Suppression of the tumorigenic and metastatic abilities of murine B16-F10 melanoma cells in vivo by the overexpression of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *J. Natl. Cancer Inst.* 86 (1994) 299-304
- Koshiba T, Hosotani R, Wada M, Miyamoto Y, Fujimoto K, Lee JU, Doi R, Arie S, Imamura M:** Involvement of matrix metalloproteinase-2 activity in invasion and metastasis of pancreatic carcinoma. *Cancer* 82 (1998) 642-650
- Kossakowska AE, Urbanski, Edwards DR:** Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) RNA is expressed at elevated levels in malignant non-hodgkin's lymphomas. *Blood* 77 (1991) 2475-2481
- Kossakowska AE, Urbanski SJ, Watson A, Hayden LJ, Edwards DR:** Patterns of expression of metalloproteinases and their inhibitors in human malignant lymphomas. *Oncol. Res.* 5 (1993) 19-28
- Kostoulas G, Lang A, Nagase H, Baici A:** Stimulation of angiogenesis through cathepsin B inactivation of the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *FEBS Letters* 455 (1999) 286-290
- Larsen PR, Davies TF, Hay ID:** The thyroid gland. In: Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR (Hrsg): *Williams Textbook of Endocrinology*. 9. Auflage, W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto usw., 1998, S.482-495

**Levy A, Cioce V, Sobel ME, Garbisa S, Grigioni WF, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG:**

Increased expression of the Mr 72,000 type IV collagenase in human colonic adenocarcinoma. *Cancer Res.* 51 (1991) 439-444

**Lindsay CK, Thorgeisson UP:** Localization of messenger RNA for tissue inhibitors of matrix metalloproteinases-1 and type IV collagenases/gelatinases in monkey hepatocellular carcinomas. *Clin. Exp. Metastasis* 13 (1995) 381-388

**Lindsay CK, Thorgeisson UP, Tsuda H, Hirohashi S:** Expression of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases-1 and type IV collagenase/gelatinase messenger RNAs in human breast cancer. *Hum. Pathol.* 28 (1997) 359-366

**Lu X, Levy M, Weinstein B, Santella RM:** Immunological quantitation of levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human colon cancer. *Cancer Res.* 51 (1991) 6231-35

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

**McCarthy K, Maguire T, McGreal G, McDermott, O'Higgins N, Duffy MJ:** High levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 predict poor outcome in patients with breast cancer. *Int. J. Cancer* 84 (1999) 44-48

**Mignatti P, Rifkin DB:** Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol. Rev.* 73 (1993) 161-195

**Monteagudo C, Merino MJ, San-Juan J, Liotta LA, Stetler Stevenson WG:**

Immunohistochemical distribution of type IV collagenase in normal, benign and malignant breast tissue. *Am. J. Pathol.* 136 (1990) 585-592

**Mukai M, Sadahiro S, Tokunaga N, Isuhizu K, Ito I, Kameya T, Ishikawa K, Iwase H, Suzuki T, Kimura T, Ishida H, Tajika T, Makuuchi H:** The expression of MMP-2 and TIMP-2 in patients with colorectal adenocarcinoma invaded to the submucosal and proper muscle layer. *Oncol. Rep.* 5 (1998) 335-340

**Murphy AN, Unsworth EJ, Stetler Stevenson WG:** Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 inhibits bFGF-induced human microvascular endothelial cell proliferation. *J. Cell. Physiol.* 157(2) (1993) 351-358

**Murray GI, Duncan ME, Arbuckle E, Melvin WT, Fothergill JE:** Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gastric cancer. *Gut* 43 (1998) 791-797

**Nagase H:** Cell surface activation of progelatinase A (proMMP-2) and cell migration. *Cell Res.* 8 (1998) 179-186

- Nielsen BS, Timshel S, Kjeldsen L, Sehested M, Pyke C, Borregaard N, Dano K:** 92 kda type IV collagenase (MMP-9) is expressed in neutrophils and macrophages but not in malignant epithelial cells in human colon cancer. *Int. J. Cancer* 65 (1996) 57-62
- Nomura H, Fujimoto N, Seiki M, Mai M, Okada Y:** Enhanced production of matrix metalloproteinases and activation of matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) in human gastric carcinomas. *Int. J. Cancer* 69 (1996) 9-16
- Ogata Y, Enghild JJ, Nagase H:** Matrix metalloproteinase 3 activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9. *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 3581-3584
- Ogata Y, Itoh Y, Nagase H:** Steps involved in activation of the pro-matrix metalloproteinase 9 tissue inhibitor of metalloproteinase-1 complex by 4-aminophenylmercuric acetate and proteinases *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 18506-18511
- Ohtani H, Tabata N, Nagura H:** Immunoelectron microscopic localization of gelatinase A in human gastrointestinal and skin carcinomas: difference between cancer cells and fibroblasts. *Jpn. J. Cancer Res.* 86 (3) (1995) 304-309
- Polette M, Clavel C, Birembaut P:** Localization by in situ hybridization of m RNAs encoding stromelysin 3 and tissue inhibitor of metalloproteinases TIMP-1 and TIMP-2 in human head and neck carcinomas. *Path. Res. Pract.* 189 (1993) 1052-1057
- Poulsom R, Pignatelli M, Stetler Stevenson WG, Liotta LA, Wright PA, Jeffery RE, Longcroft JM, Rogers L, Stamp GWH:** Stromal expression of 72 kda type IV collagenase (MMP-2) and TIMP-2 mRNAs in colorectal neoplasia. *Am. J. Pathol.* 141 (1992) 389-396
- Poulsom R, Hanby AM, Pignatelli M, Jeffery RE, Longcroft Jm, Rogers L, Stamp GWH:** Expression of gelatinase A and TIMP-2 mRNAs in desmoplastic fibroblasts in both mammary carcinomas and basal cell carcinomas of the skin. *J. Clin. Pathol.* 46 (1993, ) 429-436
- Pyke C, Ralfkiaer E, Huhtala P, Hurskainen T, Dano K, Tryggvason K:** Localization of messenger RNA for Mr 72,000 and 92,000 type IV collagenases in human skin cancers by in situ hybridization. *Cancer Res.* 52 (1992) 1336-1341
- Ray JM, Stetler Stevenson WG:** The role of the matrix metalloproteases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur. Respir. J* 7 (1994) 2062-2072
- Rooprai HK, McCormick D:** Proteases and their inhibitors in human brain tumours: a review. *Anticancer Res.* 17 (1997) 4151-4162

**Sang QX:** Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Cell Res.* 8 (1998) 171-177

**Santoro M, Battaglia C, Zhang L, Carlomagno F, Martelli ML, Salvatore D. Fusco A:** Cloning of the rat tissue inhibitor of metalloproteinases type 2 (TIMP-2) gene: analysis of its expression in normal and transformed thyroid cells. *Exp. Cell Res.* 213 (1994) 398-403

**Sato H, Kida Y, Mai M, Endo Y, Sasaki T, Tanaka J, Seiki M:** Expression of genes encoding type IV collagen-degrading metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in various human tumor cells. *Oncogene* 7 (1992) 77-83

**Schmid K, Böker W :** Schilddrüse. In: Remmele W : *Pathologie* (4). 2. Aufl. Springer, New York, Berlin, Heidelberg 1997, S. 579-615

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

**Schröder S,** *Pathologie und Klinik maligner Schilddrüsentumoren. Klassifikation, Immunhistologie, Prognosekriterien.* Hrsg.: Dhom, G., Eder, M., Fischer, R., Holzner, H., Lennert, K., Seifert, G., Thoenes, W.; Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York (1988)

**Sellers A, Murphy F, Meikle MC, Reynolds M:** Rabbit bone collagenase inhibitor blocks the activity of other neutral metalloproteinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 87 (1979) 581-587

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

**Stearns ME, Stearns M:** Immunohistochemical studies of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2a) expression human prostate cancer. *Oncol. Res.* 8 (1996) 63-67

**Stearns ME, Stearns M:** Evidence for increased activated MMP-2 expression associated with human prostate cancer progression. *Oncol. Res.* 8 (1996) 69-75

**Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Kleiner DE Jr:** Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis: *FASEB J.* 7 (1993) 1434-1441

- Stetler-Stevenson WG:** Proteases and their inhibitors in invasion and metastasis  
Progelatinase A activation during tumor cell invasion. *Inv. Metast.* 14 (1994/5) 259-268
- Stetler-Stevenson WG, Hewitt R, Corcoran M:** Matrix metalloproteinases and tumor invasion: from correlation and causality to the clinic. *Semin. Cancer Biol.* 7 (1996) 147-154
- Stetler-Stevenson WG, Corcoran M:** Tumor angiogenesis: functional similarities with tumor invasion. *EXS* 79 (1997) 413-418
- Sugiura Y, Shimada H, Seeger RC, Laug WE, DeClerck YA:** Matrix metalloproteinases-2 and -9 are expressed in human neuroblastoma: contribution of stromal cells to their production and correlation with metastasis. *Cancer Res.* 58 (1998) 2209-2216
- Talvensaari-Mattila A, Pääkkö P, Blanco-Sequeiros G, Turpeenniemi-Hujanen T:** Matrix metalloproteinase-2 immunoreactive protein. *Cancer* 83 (1998) 1153-1162
- Tomita T, Kazushi I:** Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in colon adenomas-adenocarcinomas. *Dis. Colon Rectum* 39 (1996) 1255-1264
- Tonn JC, Kerkau S, Hanke A, Bouterfa H, Mueller JG, Wagner S, Vince GH, Roosen K:** Effect of synthetic matrix metalloproteinase inhibitor on invasive capacity and proliferation of human malignant gliomas in vitro. *Int. J. Cancer* 80 (1999) 764-772
- Valente P, Fassina G, Melchiori A, Masiello L, Cilli M, Vacca A, Onisto M, Santi L, Stetler-Stevenson, Albini A:** TIMP-2 overexpression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. *Int. J. Cancer* 75 (1998) 246-253
- Visscher DW, Höyhty M, Ottosen SK, Liang CM, Sarkar FH, Crissman JD, Fridman R:** Enhanced expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) in the stroma of breast carcinomas correlates with tumor recurrence. *Int. J. Cancer* (1994) 339-344
- Woessner JF Jr:** Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* 5 (8) (1991) 2145-2154
- Watson SA, Morris TM, Collins HM, Bawden LJ, Hawkins K, Bone EA:** Inhibition of tumour growth by marimastat in a human xenograft model of gastric cancer: relationship with levels of circulating CEA. *Br. J. Cancer* 81 (1999) 19-23

- Wojtowicz-Praga SM, Dickson RB, Hawkins MJ:** Matrix metalloproteinase inhibitors. Invest. New Drugs 15 (1997) 61-75
- Van Noorden S:** Principles of immunostaining In: Filipe MI, Lake BD (Hrsg): Histochemistry in Pathology, Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne, (1990), S. 31-58
- Yoshiji H, Gomez DE, Thorgeisson P:** Enhanced RNA expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in human breast cancer. Int. J. Cancer 69 (1996) 131-134
- Yu AE, Hewitt RE, Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG:** Molecular regulation of cellular invasion - role of gelatinase A and TIMP-2. Biochem. Cell Biol. 74 (1996) 823-831
- Yu AE, Hewitt RE, Connor EW, Stetler-Stevenson WG:** Matrix metalloproteinases: novel targets for directed cancer therapy. Drugs Aging 11 (3) (1997) 229-244
- Zeng ZS, Cohen AM, Zhang ZF, Stetler-Stevenson, Guillem JG:** Elevated tissue inhibitor of metalloproteinase 1 RNA in colorectal cancer stroma correlates with lymph node and distant metastasis. Clin. Cancer Res. 1 (1995) 899-906
- Zeng ZS, Guillem JG:** Distinct pattern of matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 mRNA expression in human colorectal cancer and liver metastases. Br. J. Cancer 72 (1995) 575-582
- Zeng ZS, Guillem JG:** Colocalisation of matrix metalloproteinase-9-mRNA and protein in human colorectal cancer stromal cells. Br. J. Cancer 74 (1996) 1161-1167
- Zeng ZS, Huang Y, Cohen AM, Guillem JG:** Prediction of colorectal cancer relapse and survival via tissue RNA levels of matrix metalloproteinase-9. J. Clin. Oncol. 14 (1996) 3133-3140
- Zeng ZS, Cohen AM, Guillem JG:** Loss of basement membrane type IV collagen is associated with increased expression of metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) during human colorectal tumorigenesis. Carcinogenesis 20 (1999) 749-755
- Zielke A:** Wachstumsfaktoren und Onkogene bei Schilddrüsenkarzinomen. Der Onkologe 3 (1997) 7-15

## 8 Thesen

Der Prozeß des Tumorwachstums und der Metastasierung ist eine komplexe Kaskade von Ereignissen, wobei der essentielle Schritt die Basalmembrandestruktion durch proteolytischen Abbau der Extrazellulärmatrix (ECM) ist. Verantwortlich für den ECM-Abbau sind die Matrixmetalloproteasen (MMP), deren proteolytische Aktivität durch spezifische Inhibitoren (Tissue inhibitor of matrixmetalloproteases TIMP) reguliert wird. Ziel der vorliegenden Arbeit war der Nachweis der Matrixmetalloproteasen MMP-2 und MMP-9 und deren Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 mittels RT-PCR und Immunhistochemie in malignen Schilddrüsengeweben. Zum Vergleich wurden benigne Gewebe der Schilddrüse mituntersucht.

1. Mittels RT-PCR konnten in den malignen Schilddrüsengeweben die Transkriptionslevel von MMP-2 in 68% , MMP-9 in 72%, TIMP-1 in 84% und TIMP-2 in 88% der Tumoren ermittelt werden.
2. In den immunhistochemischen Untersuchungen war MMP-2 hoch exprimiert in den FTC, PTC und pdTC. In den UTC und MTC ließ sich eine erhöhte MMP-2 Expression in 56% bzw. 40% der Tumoren nachweisen.
3. MMP-9 zeigte in allen malignen Schilddrüsengeweben eine starke Expression, insbesondere in den schlecht differenzierten und undifferenzierten Karzinomen (pdTC und UTC).
4. Eine hohe Expression von TIMP-1 war in fast allen Tumoren (95%) zu beobachten, wobei eine besonders starke Expression in den schlecht differenzierten Karzinomen (pdTC) auffiel.
5. Der Nachweis einer erhöhten TIMP-2 Expression erfolgte in 86% der Schilddrüsenneoplasien, hier konnte in den pdTC eine starke Immunreaktivität nachgewiesen werden.
6. Die zum Vergleich mit den Neoplasien untersuchten benignen Strumen zeigten keine oder nur eine geringe Expression der Proteasen MMP-2, MMP-9 und deren Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2.
7. Eine Übereinstimmung der Expressionsmuster von MMP-2- und dessen spezifischen Inhibitors TIMP-2 konnte in den meisten Neoplasien festgestellt werden.

8. Ein ähnliches Ergebnis zeigten MMP-9 und dessen spezifischer Inhibitor TIMP-1, hier konnte in der Mehrzahl der untersuchten Neoplasien eine Übereinstimmung der Expressionsmuster erfaßt werden.
9. Das Immunreaktionsprodukt der Proteasen und der Inhibitoren war im Zytoplasma der Tumorzellen und in den Fibroblasten des umgebenden Stromas zu beobachten.
10. Zwischen den Primärtumoren und den Rezidiven der einzelnen Tumorarten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.
11. Die von den C-Zellen ausgehenden medullären Schilddrüsenkarzinome glichen in Bezug auf die Proteasen- und Inhibitorexpression, mit Ausnahme von MMP-2 (in 40% der MTC), den vom Follikelepithel hervorgehenden Schilddrüsenkarzinomen.
12. In Bezug auf die Tumorgroße, die Lymphknotenbeteiligung und die hämatogene Metastasierung ließ sich kein eindeutiger Zusammenhang mit dem Expressionsgrad von MMP-2, MMP-9, TIMP-1 und TIMP-2 darstellen.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Proteasen und die Inhibitoren mit dem malignen Verhalten der untersuchten Schilddrüsenneoplasien assoziiert sind. Beim Übergang vom differenzierten zum undifferenzierten Karzinom war eine verstärkte Expression von Proteasen und Inhibitoren zu beobachten.

Die Beeinflussung der MMP-Aktivität durch synthetische Inhibitoren könnte auch bei den Schilddrüsenneoplasien ein erfolgversprechender Schritt im Kampf gegen Invasivität und Metastasierung sein.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Antje Spens, geb. Dornheim  
Geburtstag und -ort: 10.09.1970 in Halle/Saale  
Familienstand: verheiratet, ein Kind

### Schulbildung

09/1977 - 07/1987 Polytechnische Oberschule „Wilhelm Pieck“ Halle  
09/1990 - 06/1992 Abendgymnasium Halle  
06/1992 Abitur

### Berufsausbildung

09/1987 - 08/1990 Ausbildung zur Krankenschwester  
Carl von Basedow Kreiskrankenhaus Merseburg  
09/1990 - 09/1992 Tätigkeit als Krankenschwester  
St. Elisabeth Krankenhaus Halle

### Universitäre Ausbildung

10/1992 - 10/1998 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-  
Universität Halle-Wittenberg  
09/1994 Physikum  
08/1995 1. Staatsexamen  
08/1997 2. Staatsexamen  
10/1998 3. Staatsexamen  
10/1998 Erteilung der vorläufigen Approbation

### Klinischer und wissenschaftlicher Werdegang

07 - 09/1996 Innere Medizin/ Pulmologie, University of Stellenbosch,  
Tygerberg Hospital, Cape Town, South-Africa  
10/1997 - 09/1998 Praktisches Jahr:  
Chirurgie, St. Elisabeth Krankenhaus Halle  
Innere Medizin, St. Elisabeth Krankenhaus Halle  
Dermatologie, MLU Halle-Wittenberg  
Seit 12/99 Ärztin im Praktikum  
in der Klinik für Innere Medizin II der Martin-Luther-  
Universität Halle-Wittenberg (Direktor: Prof. Dr. B.Osten)

Seit Oktober 1997

Bearbeitung eines Teilprojektes im Rahmen des vom Land Sachsen-Anhalt geförderten Forschungsschwerpunktes „Tumorbiologie“ an dem Projekt: „Bedeutung von proteolytischen Komponenten für die Invasivität und Metastasierung von Schilddrüsenkarzinomen“

## **Selbständigkeitserklärung und Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Ich erkläre hiermit, daß ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Frühere Promotionsversuche der Autorin bestehen nicht. Die vorliegende Arbeit wurde weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgestellt.

Antje Spens

## **Publikationen:**

Ergebnisse dieser Arbeit wurden bei folgenden Veranstaltungen vorgestellt:

Dornheim A, Hoang-Vu C, Schwarz I, Lotz O, Dralle H

Expression of matrix metalloproteinases (MMP-9 and MMP-2) and their inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) in human thyroid tissues: An immunohistochemical study

41. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Lübeck 1997

Dornheim A, Hoang-Vu C, Schwarz I, Dralle H

Immunhistochemischer Nachweis von MMP-2 und MMP-9 sowie TIMP1 und TIMP 2 in benignen und malignen Schilddrüsengeweben

12. Arbeitstagung experimentelle Schilddrüsenforschung, Berlin, 1996

A. Spens, B. Scholle, C. Hoang-Vu, U. Schneyer, H. Dralle

Expression der Matrixmetalloproteasen (MMP-2 und MMP-9) und ihrer Inhibitoren (TIMP-1 und TIMP-2) in humanen Schilddrüsengeweben

10. Tagung der Chirurgenvereinigung, Sachsen-Anhalt, Halle, 25. – 27. Mai 2000

Die Veröffentlichung von Ergebnissen dieser Arbeit erfolgte unter:

Dornheim A, Hoang-Vu C, Schwarz I, Lotz O, Dralle H

Expression of matrix metalloproteinases (MMP-9 and MMP-2) and their inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) in human thyroid tissues: An immunohistochemical study

Exp Clin Endocrinol Diab 105 Suppl.1 (1997) 53

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit entstand in der Klinik für Allgemein Chirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg AG Experimentelle & Chirurgische Onkologie.

Für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsumfeldes danke ich Herrn Prof. Dr. H. Dralle, Direktor der Klinik für Allgemein Chirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Besonderen Dank schulde ich meinem Lehrer und Mentor Dr. C. Hoang-Vu, Arbeitsgruppenleiter „Experimentelle und chirurgische Onkologie“ der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für die wissenschaftliche, methodische und moralische Unterstützung.

Prof. Dr. Wetzel und Dr. H. Bahn, Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität (Direktor Prof. Dr. F.W. Rath), danke ich für die Unterstützung bei der histologischen und immunhistochemischen Auswertung.

Für die Hilfsbereitschaft und die freundliche und sachkundige Einführung in die Laborarbeit möchte ich Frau I. Schwarz, Frau K. Hammje und Frau C. Sauer danken.