

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 colloidales et nodosa
2	w	42	Struma colloidales et nodosa
3	w	57	Struma colloidales et nodosa
4	w	35	Struma colloidales et nodosa
5	w	42	Struma colloidales et nodosa
6	w	61	Struma colloidales et nodosa
7	w	51	Struma colloidales et nodosa
8	m	73	Struma colloidales et nodosa
9	m	65	Struma colloidales et nodosa
10	w	41	Struma colloidales et nodosa
11	w	47	Struma colloidales et nodosa
12	w	43	Struma colloidales et nodosa
13	w	60	Struma colloidales et nodosa
14	w	74	Struma colloidales et nodosa
15	w	35	Struma colloidales 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)