

Aus der Abteilung Pathologie
(Prof. Dr. med. H.-J. Radzun)
im Zentrum Pathologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Untersuchungen zur Expression der
zellzyklusassoziierten Proteine p27^{Kip1} und Ki-67
und der Matrixmetalloproteinaseinhibitoren TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-3
in häufigen humanen Karzinomen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Julia Huber, geb. Heimann
aus Bielefeld
Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: PD Dr. med. B. Hemmerlein

II. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Alves

III. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 01.03.2011

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Der cyclin-abhängige Proteinkinase-Inhibitor p27Kip1	1
1.2 Das proliferationsassoziierte Protein Ki-67	2
1.3 Matrixmetalloproteinasen (MMP)	2
1.4 Gewebshemmer der Matrixmetalloproteinasen (TIMP)	3
1.4.1 TIMP-1	4
1.4.2 TIMP-2.....	4
1.4.3 TIMP-3.....	5
1.4.4 TIMP-4.....	6
1.5 TIMP in humanen Tumoren	7
1.6 Promotormethylierung und Histonacetylierung als epigenetische Mechanismen der Genexpressionskontrolle	8
2. Ziele der Arbeit	9
3. Material und Methoden	10
3.1 Technische Geräte	10
3.2 Glaswaren	10
3.3 Verbrauchsmaterialien	10
3.3.1 Reagenzien zur Gewebefixation und Einbettung	11
3.3.2 Reagenzien für die Histologie	11
3.3.3 Reagenzien für die Immunhistochemie	11
3.4 Vorbereitung der Objektträger	12
3.5 Morphologische Analyse und Gewebspräparation	12
3.5.1. Formalinfixation und Paraffineinbettung	12
3.5.2 HOPE-Konservierung und Einbettung in „low-melting“ Paraffin	12
3.6 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	12
3.7 Immunhistochemie	12
3.7.1 Vorbereitung der Schnitte.....	12
3.7.2 Immunhistochemisches Färbeprotokoll	13
3.7.3 Immunhistochemische Analyse	14
3.8. DNA-Analyse	14
3.8.1 DNA-Extraktion aus HOPE-konserviertem paraffineingebetteten Gewebe	14
3.8.2. Bisulfidmodifikation	16
3.8.3 Methylierungsspezifische PCR	16
3.8.4 Primer.....	17
3.8.5 Protokolle der methylierungsspezifischen PCR	17
3.9 Statistik	18
4. Ergebnisse	19
4.1 Mammakarzinome	19
4.1.1 Patienten.....	19

4.1.2 p27Kip1-Expression	19
4.1.3 Ki-67-Expression	19
4.1.4 Expression der TIMP	20
4.1.5 Vergleich der Proliferationsaktivität mit der TIMP-2 und -3-Expression ...	20
4.2 Prostatakarzinome	20
4.2.1 Patienten	20
4.2.2 p27Kip1-Expression	21
4.2.3 Ki-67-Expression	21
4.2.4 Expression der TIMP	21
4.2.5 Vergleich der Proliferationsaktivität mit der TIMP-2 und -3-Expression ...	22
4.3. Harnblasenkarzinome	22
4.3.1 Patienten	22
4.3.2 p27Kip1-Expression	22
4.3.3 Ki-67-Expression	22
4.3.4 Expression der TIMP	23
4.3.5 Vergleich der Proliferationsaktivität mit der TIMP-2 und -3-Expression ...	23
4.4 Nierenzellkarzinome	23
4.4.1 Patienten	23
4.4.2 p27Kip1-Expression	24
4.4.3 Ki-67-Expression	24
4.4.4 Expression der TIMP	24
4.4.5 Vergleich der Proliferationsaktivität mit der TIMP-2 und -3-Expression ...	24
4.5. Bronchialkarzinome	25
4.5.1 Patienten	25
4.5.2 p27Kip1-Expression	25
4.5.3 Ki-67-Expression	25
4.5.4 Expression der TIMP	25
4.5.5 Vergleich der Proliferationsaktivität mit der TIMP-2 und -3-Expression ...	26
4.6. Kolonkarzinome	26
4.6.1 Patienten	26
4.6.2 p27Kip1-Expression	26
4.6.3 Ki-67-Expression	26
4.6.4 Expression der TIMP	27
4.6.5 Vergleich der Proliferationsaktivität mit der TIMP-2 und -3-Expression ...	27
4.7 Zusammenfassende Analyse der immunhistologischen Untersuchungen	27
4.8 Ergebnisse der methylierungsspezifischen PCR (MSP)	28
4.8.1 Mammakarzinome	28
4.8.2 Prostatakarzinome	28
4.8.3 Harnblasenkarzinome	29
4.8.4 Nierenzellkarzinome	30
4.8.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der MSP-Analyse	31
5. Diskussion	32
6. Zusammenfassung	43
7. Anhang	45
7.1 Mammakarzinome	45

7.1.1 Tabelle: Ergebnisse Mammakarzinome - Immunhistologie	45
7.1.2 Tabelle: Ergebnisse Mammakarzinome - PCR	46
7.2 Prostatakarzinome	47
7.2.1 Tabelle: Ergebnisse Prostatakarzinome - Immunhistologie	47
7.2.2 Tabelle: Ergebnisse Prostatakarzinome - PCR	48
7.3 Harnblasenkarzinome	49
7.3.1 Tabelle: Ergebnisse Harnblasenkarzinome - Immunhistologie	49
7.3.2 Tabelle: Ergebnisse Harnblasenkarzinome - PCR	50
7.4 Nierenkarzinome	51
7.4.1 Tabelle: Ergebnisse Nierenkarzinome - Immunhistologie	51
7.4.2 Tabelle: Ergebnisse Nierenkarzinome - PCR	52
7.5 Lungenkarzinome	53
7.6. Kolonkarzinome	54
7.7 Immunhistochemische Färbungen an Mammakarzinomen	55
7.8 Immunhistochemische Färbungen an Prostatakarzinomen	56
7.9 Tabelle: Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse	57
8. Literaturverzeichnis	58

Abkürzungsverzeichnis

(soweit im Text nicht anders angegeben)

Abb.: Abbildung

bidest.: bidestilliert

BSA: „bovine serum albumin“ = Kälberserum

Ca: Karzinom

Cdk: cyclinabhängige Proteinkinasen

COX: Cyclooxygenase

DNA: Desoxyribonukleinsäure

EGF: „epidermal growth factor“ = Epidermaler Wachstumsfaktor

f: fortgeschritten

Geschl.: Geschlecht

Grad: Malignitätsgrad

HE: Hämatoxylin-Eosin

IL: Interleukin

IRS: Immunreaktiver Score

kDa: Kilodalton

l: lokalisiert

m: männlich

methyl.: methyliert

min.: Minuten

MMP: Matrixmetalloproteinasen

mRNA: messenger RNA

MSP: Methylierungsspezifische PCR

n.a.: nicht ausgewertet

NOS: „not otherwise specified“ = nicht näher bezeichnet

OSS: Knochenmetastase

PCR: „Polymerase Chain Reaction“ = Polymerasekettenreaktion

RNA: Ribonukleinsäure

SKI: Hautmetastase

Skp: S-Phase-kinase-assoziiertes Protein

TACE: „TNF- α -converting enzyme“ = TNF- α -konvertierendes Enzym

TBS: „Tris buffered solution“ = Tris-Puffer

TGF: "transforming growth factor" = Transformierender Wachstumsfaktor

TIMP: Tissue Inhibitors of Metalloproteinases

TNF: Tumor-Nekrose-Faktor

TNM: Tumorstadium

unmethyl: unmethyliert

w: weiblich

z.B.: zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Der cyclin-abhängige Proteinkinase-Inhibitor p27^{Kip1}

Die unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus werden von Cyclinen und cyclin-abhängigen Proteinkinasen (Cdk) kontrolliert (Kaldis 2007).

p27^{Kip1} ist ein spezifischer Inhibitor der Cdk2 und Cdk4 (Lloyd et al. 1999).

Das p27^{Kip1}-Gen ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 12 (12p13) lokalisiert und wird während des Zellzyklus konstant exprimiert. Seine Aktivität wird hauptsächlich auf Proteinebene reguliert (Hershko und Shapira 2006). Zell-Zell-Kontakt oder andere extrazelluläre antiproliferative Signale führen zu einer höheren Aktivität des Proteins (Worm et al. 2000). Eine Phosphorylierung durch unterschiedliche Kinasen, wie z.B. Scr-Kinase, Lyn-Kinase, Abl-Kinase, führt hingegen zu einer Inaktivierung des Proteins (Kaldis 2007). Zusätzlich bewirken spezifische Enzyme, insbesondere Ubiquitin-Ligasen, die Degradation des Proteins (Hershko und Shapira 2006). Epigenetische Veränderungen, wie z.B. die Methylierung des p27^{Kip1}-Gens, scheinen eine untergeordnete Rolle zu spielen, wurden bislang allerdings erst für wenige Tumore untersucht (Kibel et al. 2001).

Die Bindung von p27^{Kip1} an Cdk2 oder Cdk4 führt zu einem Stopp des Zellzyklus in der frühen G1-Phase. Erst nach Abfall der p27^{Kip1}-Konzentration steigt die Aktivität der Kinasen an und die Zelle kann in die S-Phase des Zellzyklus eintreten (Lloyd et al. 1999).

Hohe p27^{Kip1}-Level konnten dementsprechend in nicht-proliferierenden, hochdifferenzierten Geweben, wie Skelettmuskel, Knorpel und in mesenchymalen Fibroblasten nachgewiesen werden. In Geweben mit hohem Zellumsatz, wie dem Epithel, wurden dementsprechend niedrige Konzentrationen gefunden (Hershko und Shapira 2006). Genmanipulierte p27^{Kip1}-defiziente Mäuse zeigten eine erhöhte Körpergröße, Organomegalie, sie entwickelten Hypophysentumore und Nebennierenhyperplasien sowie Netzhaut- und Thymusmissbildungen (Lloyd et al. 1999).

Viele Untersuchungen konnten eine erniedrigte p27^{Kip1}-Konzentration in malignen Tumoren belegen. Insbesondere für Kolon- und Prostatakarzinome wurde der Zusammenhang zwischen einer niedrigen p27^{Kip1}-Expression und einer

Verschlechterung der Prognose gezeigt (Hershko und Shapira 2006; Yang et al. 1998). Für diese Patienten wurde daher von den Untersuchern eine Therapiesteuerung aufgrund der p27^{Kip1}-Konzentration gefordert.

Es wurde zudem untersucht, ob in den p27^{Kip1}-degradierenden Enzymen neue Angriffspunkte für zukünftige therapeutische Interventionen liegen (Hershko und Shapira 2006).

1.2 Das proliferationsassoziierte Protein Ki-67

Ki-67 kommt in zwei Isoformen von 320 und 359 kDa vor. Seine Regulation ist eng mit dem Zellzyklus verbunden. Ki-67 wird ausschließlich während der G1, S, G2 und Mitose-Phase des Zellzyklus exprimiert und ist somit auf proliferierenden Zellen beschränkt. Während der Interphase liegt Ki-67 vorwiegend im Nucleolus vor, den es erst nach Aufbrechen der nukleären Membran im Rahmen der Mitose verlässt. Anhand von Ki-67 als Proliferationsmarker lässt sich auf die Wachstumsfraktion einer Zellpopulation schließen. Auch wenn seine biologische Funktion im Zellzyklus bislang ungeklärt ist, konnte Ki-67 bereits als prognostischer Faktor für einige maligne Neoplasien eingesetzt werden (Scholzen und Gerdes 2000).

Ein Zusammenhang zwischen Ki-67-Expression und Krankheitsverlauf wurde bei Multiplen Myelomen, Weichteilsarkomen, Mamma- und Prostatakarzinomen nachgewiesen. So konnte bei letzteren über die Ki-67-Konzentration im Tumor das Risiko für Rezidive und Lymphknotenmetastasen ermittelt werden (De Azambuja et al 2007; Quinn et al 2005).

Untersuchungen von Kolonkarzinomen zeigten zudem einen linearen Anstieg der Ki-67 Expression bei steigendem Malignitätsgrad der Tumorzellen (Radovic et al. 2006).

1.3 Matrixmetalloproteinasen (MMP)

Die Modulierung der Extrazellulärmatrix spielt eine wichtige Rolle bei zahlreichen physiologischen Vorgängen wie zum Beispiel dem Wachstum, der Embryonal- und Organentwicklung oder der Wundheilung. Eine unkontrollierte Lyse und Neubildung von Basalmembranen und Extrazellulärmatrix begünstigt die Entstehung, das Wachstum und die Metastasierung maligner Tumoren (Ray und Stetler-Stevenson 1994).

Matrixmetalloproteinasen sind eine Familie von über 20 Enzymen, die in der Lage sind, Extrazellulärkomponenten wie Adhäsionsmoleküle, Wachstumsfaktoren, Zytokine und Rezeptoren zu lysieren (Sternlicht und Werb 2001). MMP können in 4 Subklassen unterteilt werden: Gelatinasen (Typ IV-Kollagenasen), Stromelysine, interstitielle Kollagenasen und die an der Zelloberfläche lokalisierten „membrane type“- MMP.

Die Regulation der MMP-Expression und -Aktivität erfolgt auf transkriptioneller, translationeller und posttranslationeller Ebene (Chirco et al. 2006).

Mutationen, die eine Überexpression des H-ras-Onkogens bewirken, können zu einer vermehrten Expression von MMP führen, wie für MMP-1,-3 und -9 gezeigt wurde (Arbiser et al. 1997). Wachstumsfaktoren, inflammatorische Zytokine wie Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 β (IL-1 β), Extrazellulärmatrixkomponenten, Stressoren wie Sauerstoffradikale, und die Tumorpromotoren Phorbol-ester und Concanavalin A können die Transkription von MMP stimulieren (Belkhiry et al. 1997; Chirco et al. 2006; Ray und Stetler-Stevenson 1994, Ries et al. 1994). Steroide, Retinsäure, der COX-Hemmer Indomethacin und Zytokine wie zum Beispiel „transforming growth factor- β “ (TGF- β), Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-6 (IL-6) können die Transkription hemmen (Pan et al. 2001; Ries et al. 1994).

Auf Proteinebene werden MMP dadurch reguliert, dass sie als inaktive Vorstufen produziert und erst durch Abspaltung eines Peptides an ihrem N-terminalen Ende in eine aktive Form überführt werden (Ray und Stetler-Stevenson 1994).

Darüber hinaus modulieren spezifische Inhibitoren ihre Funktion.

1.4 Gewebsinhibitoren der Matrixmetalloproteinasen (TIMP)

Die natürlichen Inhibitoren der MMP sind die sogenannten „Tissue Inhibitors of Metalloproteinases“ (TIMP). TIMP kontrollieren die Aktivität sezernierter MMP im Extrazellularraum, indem sie sowohl die aktive Form, als auch die inaktive Form proMMP binden (Ray und Stetler-Stevenson 1994).

Es werden mittlerweile vier verschiedene, teilweise protease-spezifische TIMP unterschieden, die durch inverse Zymographie, Western Blot, In-situ-Hybridisierung und Immunhistochemie dargestellt werden können.

Neben ihrer MMP-inhibitorischen Wirkung zeigen TIMP weitere gewebetypische Funktionen und stellen wichtige Elemente des „extracellular signalling network“ dar (Chirco et al. 2006). TIMP-1 und -2 sind Proteine, die das Zellwachstum stimulieren

und anti-apoptotisch wirken können (Jiang et al. 2002). Für TIMP-3 wird zusätzlich die Rolle eines Tumorsuppressor-Gens diskutiert (Bian et al. 1996).

Die einzelnen TIMP werden unabhängig voneinander, von verschiedenen Genen, die sich auf unterschiedlichen Chromosomen befinden, kodiert. Sie sind immunologisch verschieden, verfügen dennoch über ähnliche strukturelle Eigenschaften, wie zum Beispiel 12 Cystein-Reste, die 6 Disulphidbrücken ausbilden. Ebenfalls weisen alle TIMP eine NH₂-terminale Domäne auf, die ihnen ermöglicht, 1:1 an MMP zu binden und diese so zu inaktivieren (Chirco et al. 2006).

1.4.1 TIMP-1

TIMP-1 ist ein 28,5 kDa großes Glykoprotein. Faktoren wie Phorboläster und IL-1 β stimulieren die Expression von TIMP-1, wie auch die der MMP. TGF- β und Retinoide fördern die Expression von TIMP-1, unterdrücken aber die von MMP-1. TNF- α zeigt einen dosisabhängigen Einfluss auf die Regulation von TIMP-1, da es in geringen Konzentrationen stimulierend, in höheren aber supprimierend wirkt (Gomez et al. 1997).

Im Rahmen der Tumorgenese spielt TIMP-1 eine Doppelrolle. Neben seiner klassischen Funktion als MMP-Inhibitor, greift TIMP-1 auch direkt als Mitogen in die Zellproliferation ein. Eine Überexpression von TIMP-1 konnte in vielen Tumoren nachgewiesen werden (dargestellt in Tabelle 1.1). TIMP-1 fördert die maligne Transformation der Zellen, stimuliert das Zellwachstum und wirkt anti-apoptotisch (Holten-Andersen et al. 2005). Hierbei handelt es sich um eine zusätzliche, von der MMP-Inhibition unabhängige Funktion, die durch einen TIMP-1 neutralisierenden Antikörper, nicht aber durch einen synthetischen MMP-Inhibitor antagonisiert werden kann. Auch strukturelle Untersuchungen zeigen, dass die wachstumsfaktorähnliche und anti-apoptotische Funktion unabhängig von der MMP-inhibierenden Funktion ist. Während über die NH₂-terminale Domäne die MMP-Bindung hergestellt wird, stellt die C-terminale Domäne die Bindung an Zelloberflächen und andere Proteine her (Chirco et al. 2006).

1.4.2 TIMP-2

TIMP-2 ist ein 21 kDa großes nicht-glykosiertes Protein. Im Gegensatz zu TIMP-1, lässt sich die Transkription des TIMP-2-Gens kaum stimulieren. Nur durch die Gabe von Steroiden ließe sich die Synthese von TIMP-2 in Mammakarzinomzellen um

50% vermindern und in uterinen oder zervikalen Fibroblasten steigern (Gomez et al. 1997).

TIMP-2 zeigt eine hohe Affinität zu Typ-IV-Kollagenasen, insbesondere zu pro-Gelatinase A (proMMP-2). Auch TIMP-2 greift durch seine MMP-inhibitorische Funktion, wie auch über die Modulation von Wachstumsfaktoren, in den Ablauf des Zellzyklus ein (Murphy et al. 1993).

In vielen Tumoren spielt TIMP-2, ähnlich TIMP-1, eine wachstumsfördernde Rolle (siehe Tabelle 1.1).

1.4.3 TIMP-3

TIMP-3 ist ein 24-kDa Protein, das, im Unterschied zu den anderen Inhibitoren, in den Extrazellularraum sezerniert und dort gebunden wird (Ray und Stetler-Stevenson 1994).

TIMP-3 wird in zellzyklusabhängiger Weise exprimiert, seine Synthese wird in der G1-Phase von Signalen, die Mitogenese, Differenzierung und Zellalterung steuern, hochreguliert (Wick et al. 1994). Die TIMP-3-Expression wird sowohl über Methylierung regulatorischer Gensequenzen als auch über Histonacetylierung epigenetisch modifiziert (Bachman et al. 1999; Clark et al. 2007). Wachstumsfaktoren wie „epidermal growth factor“ (EGF) oder TGF- β 1 kontrollieren die transkriptionelle Synthese (Leco et al. 1994).

TIMP-3 wird im Rahmen der Lyse von Extrazellulärmatrix freigesetzt und greift neben seiner MMP-inhibitorischen Funktion auch direkt in Wachstum und Differenzierung der Zellen ein (Wick et al. 1994). Durch Binden von „TNF- α -converting enzyme“ (TACE), das für den Abbau des TNF- α -Rezeptors verantwortliche Enzym, fördert TIMP-3 den Zelltod. Die proapoptotische Domäne des TIMP-3-Proteins konnte, zusammen mit der MMP-inhibitorischen Aktivität, auf den drei N-terminalen Schleifen lokalisiert werden (Bond et al. 2000). Beide Funktionen lassen sich durch Punktmutationen verändern. Derartige Veränderungen konnten im Zusammenhang mit rheumatischer Arthritis oder auch der Sorsby Fundus Dystrophie (SDF) beobachtet werden (Woessner 2001). Bei letzterer induziert exzessiv abgelagertes mutiertes TIMP-3 eine Apoptose retinaler Ganglienzellen.

Unter Substratmangel konnte in zahlreichen experimentellen Tumoren eine Überexpression von TIMP-3 beobachtet werden, die zu einem Wachstumsstopp der

Tumorzellen führte. Darüber hinaus konnte ein vermindertes Tumorwachstum, die Bildung großer Zellaggregate in flüssigen Nährmedien und das Einsetzen von Apoptose, teils auch von Nekrosen, festgestellt werden. Durch Transfektion mit aktivem TIMP-3 stagnierte so z.B. das Wachstum der humanen Kolonkarzinomzelllinie DLD-1 (Bian et al. 1996) und der Prostatakarzinomzelllinien PC-3 und DU-145 (Deng et al. 2006).

In vivo konnte für einige Tumore eine Herabregulierung der TIMP-3- Expression durch Genmethylierung beobachtet werden (Bachman et al. 1999). Die Auswirkungen einer verminderten TIMP-3-Sekretion für die verschiedenen Tumore zeigt Tabelle 1.1.

1.4.4 TIMP-4

TIMP-4 ist ein 22 kDa großes Protein, das wie die anderen Mitglieder der TIMP-Familie über 12 Cystein-Reste verfügt, die über Disulphid-Brücken die Struktur des Proteins bestimmen (Greene et al. 1996).

Über die Regulation der TIMP-4-Expression existieren bislang keine Daten. Das Vorkommen von TIMP-4 scheint auf wenige Gewebe beschränkt zu sein, so konnte eine hohe Konzentration in Herzzellen und eine niedrigere Konzentration in Nieren-, Pankreas-, Kolon- und Hodenzellen gefunden werden. Kein TIMP-4 konnte z.B. in gesundem Gewebe von Leber, Gehirn, Lunge und Thymus gefunden werden (Greene et al. 1996). In fibroblastisch veränderten Lungen konnte TIMP-4 hingegen nachgewiesen werden (Selman et al. 2000).

TIMP-4 ist der potenteste Gegenspieler von MMP-26 (Lee et al. 2006) und hat wie TIMP-2 eine besondere Affinität zu pro-MMP-2 (Bigg et al. 1997). TIMP-4 und MMP-2 befinden sich in hoher Konzentration in aktivierten Thrombozyten und werden im Rahmen der Thrombozytenaggregation freigesetzt. TIMP-4 hemmt dabei die MMP-2-vermittelte Thrombozytenaggregation (Radomski et al. 2002).

In kardialen Fibroblasten verhindert TIMP-4 eine Migration und Invasion von Zellen und induziert die Apoptose transformierter Zellen (Mannello und Gazzanelli 2001).

Überexprimiert, konnte für TIMP-4 eine pro-apoptische Wirkung in der humanen Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-435 beobachtet werden. In vitro reduziert TIMP-4 sowohl Tumorwachstum, als auch Invasivität, Metastasierung und Angiogenese der transfizierten Zellen (Wang et al. 1997). Die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf *in vivo* bestehende Verhältnisse wurde bislang noch nicht hinreichend geprüft.

1.5 TIMP in humanen Tumoren

TIMP beeinflussen das biologische Verhalten der einzelnen Tumorentitäten unterschiedlich, übersichtlich dargestellt in Tabelle 1.1.

Tabelle 1.1 Literaturübersicht zu Effekten der TIMP auf das Wachstum, die Invasivität und die Metastasierung der einzelnen Tumortypen

	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3	TIMP-4
Mamma	gesteigert Yoshiji et al. 1998, Garbett et al. 1999, Vizoso et al. 2007	gesteigert Vizoso et al. 2007	vermindert Mylona et al.2006, Kotzsch et al. 2005 gesteigert Gonzalez et al. 2008	vermindert Wang et al. 1997
Prostata	vermindert Lichtinghagen et al. 2002 ¹⁾	vermindert Still et al. 2000, Pulukuri et al. 2007	vermindert Deng et al. 2006	vermindert Lee et al. 2006 ²⁾
Harn- blase	gesteigert Wallard et al.2006, Miyata et al. 2004	gesteigert Grignon et al. 1996	gesteigert Wallard et al. 2006	keine Daten
Niere	vermindert Hagemann et al. 2001 ³⁾ gesteigert Bhuvaramurthy et al. 2006	vermindert Hagemann et al. 2001 ³⁾ gesteigert Bhuvaramurthy et al. 2006	vermindert Hagemann et al. 2001 ³⁾ , Bachman et al. 1999	vermindert Hagemann et al. 2001 ³⁾
Lunge	gesteigert Gouyer et al. 2005, Thomas et al. 2000 ⁴⁾ vermindert Iniesta et al. 2007, Hoikkala et al. 2006	gesteigert Thomas et al. 2000 ⁴⁾ vermindert Gouyer et al. 2005	vermindert Mino et al. 2007	vermindert Wang et al. 1997
Kolon	gesteigert Garbett et al. 1999, Lu et al. 1991, Holten-Andersen et al. 2005	gesteigert Urbanski et al. 1993	vermindert Bian et al. 1996, Hilska et al. 2007 ⁵⁾	vermindert Hilska et al. 2007 ⁵⁾

1) verminderter Nachweis von TIMP-1 im Tumor im Vergleich zu gesundem Gewebe, jedoch kein Unterschied auf RNA-Ebene

2) höhere TIMP-4 Expression in hochgradigen Neoplasien im Vergleich zu gesundem Gewebe, Abnahme bei weiterem Fortschreiten der Tumorgenese

3) alle TIMP im Tumorgewebe herunterreguliert, im umliegenden Gewebe hochreguliert

4) betrifft insbesondere Adenokarzinome

5) betrifft nur rektale Tumore

1.6 Promotormethylierung und Histonacetylierung als epigenetische Mechanismen der Genexpressionskontrolle

Die übermäßige DNA-Methylierung tritt im Bereich von CpG-Inseln auf. Diese regulatorischen Gensequenzen an der 5` Position der Gene zeichnen sich durch einen besonders hohen Cytosinphosphat- und Guaningehalt aus und liegen normalerweise unmethyliert vor. Durch Bindung von Methylgruppen (CH₃) an spezifische Cytosine der DNA kommt es zu einer Stilllegung der entsprechenden Gene, da die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren inhibiert wird und die Transkription des Gens supprimiert wird. Das Methylierungsmuster wird dabei durch Methyltransferasen, welche die palindromartige CG-Sequenz im komplementären Strang erkennen, weitergegeben.

Im Rahmen der malignen Transformation können epigenetische Alterationen, insbesondere im Bereich von Tumorsuppressor-Genen und Zellyklus-regulierenden Proteinen, die gleiche funktionelle Bedeutung erlangen wie strukturelle genetische Veränderungen (Auerkari 2006).

Ein weiterer epigenetischer Mechanismus, der die Transkription der DNA unterdrückt, ist die Histondeacetylierung.

Durch Acetylierung werden die positiven Ladungen von Lysylresten der Histonproteine neutralisiert und damit die Wechselwirkung von Histonproteinen mit der DNA geschwächt. Dies führt zu einer Lockerung der Chromatinstruktur, die für eine Gentranskription essentiell ist. Hierbei spielt insbesondere die Acetylierung der Histonproteins H-3 und -4 eine wichtige Rolle. Die Entfernung der Acetylgruppen erfolgt wiederum durch eine Vielzahl spezifischer Histondeacetylasen. Sie bewirken über die räumliche Veränderung der Chromatinstruktur eine transkriptionelle Repression (Lübbert und Claus 2007).

Beide epigenetischen Mechanismen, DNA-Methylierung und Histondeacetylierung, wirken somit synergistisch. Insbesondere für hämatologische Erkrankungen stellen die epigenetischen Mechanismen therapeutische Zielstrukturen dar. Auch in einer Vielzahl solider Tumoren konnten diese Mechanismen der Gen-Expressionskontrolle für eine Reihe von Genen gezeigt werden, unter anderem auch für TIMP-3 und p27^{Kip1} (Kang et al. 2000; Lloyd et al. 1999). Therapeutische Ansätze hierfür existieren jedoch allenfalls in Anfängen.

2. Ziele der Arbeit

Auf der Basis der bekannten Daten, welche der Expression von p27^{Kip1} und der Expression von Gewebseinhibitoren der Matrixmetalloproteinasen einen das Tumorwachstum fördernden oder hemmenden Effekt zuschreiben, sollten folgende Fragen an Mamma-, Prostata-, Harnblasen-, Nieren-, Lungen- und Kolonkarzinomen untersucht werden:

1. Wie lässt sich die Expression der Zellzyklus-assoziierten Proteine p27^{Kip1} und Ki-67 in malignen Tumoren im Hinblick auf das Tumorstadium und den Malignitätsgrad charakterisieren?
2. Wie lässt sich die Expression von TIMP-1, -2 oder TIMP-3 in malignen Tumoren im Hinblick auf das Tumorstadium und den Malignitätsgrad charakterisieren?
3. Lässt sich ein Zusammenhang zwischen der Expression Zellzyklus-assoziiierter Proteine und der Expression von TIMP-1, -2 oder TIMP-3 nachweisen ?
4. Kann mittels methylierungsspezifischer Polymerasekettenreaktion an Gewebeproben der oben genannten malignen Tumoren eine Assoziation der Proteinexpression von p27^{Kip1} und TIMP-3 mit dem Methylierungsstatus gefunden werden?

3. Material und Methoden

3.1 Technische Geräte

Agarose-Gel-Elektrophorese-Kammer	Biometra, Göttingen
Agargel-Standard; 10x10 cm	Biometra, Göttingen
Dampfgarer, Multigourmet	Braun, Kronberg/Taunus
Einbettter Leica TP 1020	Leica, Wetzlar
Elektrophoresekammer und Stromgerät	Biometra, Göttingen
Gefrierkombination (+4°C/-20°C)	Bosch, München
Geldokumentationssystem	Biometra, Göttingen
Horizontalschüttler	GFL, Burgwedel
Hybridisierungsöfen: Midi Dual 14	Hybaid, Middlesex/England
Magnetrührer: Ikamag RH	Ika-Werke, Oberstaufen
Megafuge 1.OR, Rotoren 2705/1379	Heraeus Sepatech, Hanau
Mikrotom: Schlittenmikrotom Typ: HN40	Reichert-Jung, Heidelberg
pH-Meter: Typ HI9321	HANNA Instruments, Kehl am Rhein
Schüttler: Modell 3016	GFL, Burgwedel
Spannungsquelle: Modell GPS 200/400	Pharmacia, Freiburg
Sterilisatoren: Bioclav 3HD-Dampfsterilisator	Schütt, Göttingen
Thermo-Cycler: T Gradient	Biometra, Göttingen
Thermomixer: Modell 5436	Eppendorf, Hamburg
Trockensterilisator	Memmert, Schwabach
Vortex: Genie2: G-560E	Bender&Hobein, Zürich/CH
Waage: Modell MCI; Typ MD BA 200	Sartorius, Göttingen
Wasserbäder: Modell W19	Haake, Karlsruhe

3.2 Glaswaren

Die benutzten Glaswaren wurden bei 180°C über Nacht sterilisiert.

3.3 Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Reagenzien stammen, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (München) und Boehringer (Mannheim).

Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit Aqua bidest. angesetzt.

3.3.1 Reagenzien zur Gewebefixation und Einbettung

3-Aminopropyltriethoxy-Silan	Sigma-Aldrich, München
Formalin	Sigma-Aldrich. München
Paraffin	Vogel, Gießen
HOPE-Solution I und II	DCS Innovative Diagnostik Systeme, Hamburg
Low-melting Paraffin	DCS Innovative Diagnostik Systeme, Hamburg

3.3.2 Reagenzien für die Histologie

Meyers-Hämalaun:	Hämatotoxylin	1 g
	KAl(SO ₄) x 12H ₂ O	50 g
	NaJO ₄	0,2 g
	Chloralhydrat	50 g
	Zitronensäure-Monohydrat	1 g
	Aqua bidest.	ad 1000 ml

3.3.3 Reagenzien für die Immunhistochemie

0,01 M Zitratpuffer, pH 6,0:	0,1 M Zitronensäure	18 ml
	0,1 M Natriumzitat	82 ml
	Aqua bidest.	ad 1000 ml
TBS-Puffer, pH 7,4:	150 mM NaCl	87,7 g
	7,7 mM Tris-HCl, pH 7,5	12,1 g
	Aqua bidest.	ad 1000 ml
Eindeckmedium:	Eukit, Kindler GmbH, Freiburg	
Envision-Peroxidase anti-Maus/Kaninchen :	DAKO, Hamburg	
Diaminobenzidine:	DAKO, Hamburg	

3.4 Vorbereitung der Objektträger

Um die Haftungseigenschaften der Paraffinschnitte auf den Objektträgern zu verbessern, wurden die Objektträger zur Entfettung in Salzsäure getaucht und anschließend mit 3-Aminopropyltriethoxy-Silan beschichtet.

Reinigung: 1 Molare HCl

Beschichtung: 2% 3-Aminopropyltriethoxy-Silan in Aceton

3.5 Morphologische Analyse und Gewebspräparation

3.5.1. Formalinfixation und Paraffineinbettung

Die verwendeten Gewebe wurden kurz nach der Entnahme in 4% neutral gepuffertem Formaldehyd fixiert und mit Hilfe eines automatischen Einbett-Systems in Paraffin eingebettet.

3.5.2 HOPE-Konservierung und Einbettung in „low-melting“ Paraffin

Frische Gewebsblöcke mit einer Dicke von maximal 5 mm wurden in HOPE-Konservierungslösung Gemisch I auf Eis über Nacht inkubiert, anschließend mit HOPE-Lösung Gemisch II in Aceton dehydriert und über Nacht in low-melting Paraffin immersiirt. Danach wurden die Gewebe in Blöcken aus low-melting Paraffin ausgegossen und bei 4 °C konstant gelagert.

3.6 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur morphologischen Begutachtung und zur Beurteilung des histopathologischen Malignitätsgrades erfolgte eine Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung der Schnittpräparate. Zur Kerndarstellung wurden die Schnitte 5 min. in Meyers-Hämalaun gefärbt und anschließend unter fließendem Leitungswasser gebläut. Die Gegenfärbung des Zytoplasmas erfolgte durch kurzes Eintauchen in Eosin.

3.7 Immunhistochemie

3.7.1 Vorbereitung der Schnitte

Die histologischen Untersuchungen erfolgten an 2,5 µm dicken Schnitten paraffineingebetteten formalinfixierten Untersuchungsmaterials, die auf silanbeschichtete Objektträger aufgezogen wurden. Die Paraffinschnitte wurden über Nacht bei 37°C getrocknet und bis zur weiteren Verwendung staubgeschützt bei Raumtemperatur archiviert.

3.7.2 Immunhistochemisches Färbeprotokoll

Die 2,5 µm dicken Paraffinschnitte wurden zunächst 15 min. in Xylol entparaffiniert und danach in einer absteigenden Ethanolreihe schrittweise rehydriert.

Zur Antigendemaskierung wurden die histologischen Präparate für die Färbung des Ki-67-Antigens, von p27^{Kip1} und TIMP-3 je 60 min. in 10 mM Zitratpuffer in einem Dampfgarer erhitzt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden die Schnitte 3 mal 5 min. in TBS gespült. Endogene Peroxidasen wurden 10 min. mit 3% H₂O₂ blockiert, die Schnitte danach mit Aqua bidest. gespült.

Die unspezifische Bindung von Antikörpern wurde durch eine zehnminütige Inkubation mit 10% „bovine serum albumin“ (BSA) in einer feuchten Kammer geblockt. Danach wurden die Schnitte in mit TBS verdünntem Primärantikörper inkubiert. Die individuellen Färbebedingungen sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst. Die Schnitte wurden nach den einzelnen Inkubationsschritten jeweils 3 mal 5 min. in TBS gewaschen. Danach wurde das Detektionssystem EnVision™-Peroxidase aufgetragen und die Schnitte für 1 Stunde in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen mit TBS-Puffer wurden die Schnitte in Diaminobenzidine 20 min. inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte wieder mit TBS-Puffer gespült, kurz mit Aqua bidest. behandelt und mit Hämalaun gegengefärbt. Durch eine aufsteigende Alkoholreihe wurden die Präparate dehydriert, bevor sie mit Eukit® eingedeckt wurden.

Tabelle 2.1 Immunhistochemisches Färbeprotokoll

Antikörper	Verdünnung	Inkubationsdauer der Primärantikörper	Firma
TIMP-1 (Clone 147- D11)	1:70	über Nacht	Calbiochem, Bad Sooden
TIMP 2 (67- 4H11)	1:70	über Nacht	Oncogene, Bad Sooden
TIMP-3	1: 70 §	2 Stunden	Oncogene, Bad Sooden
MIB-1 (Ki-67)	1: 50 §	2 Stunden	Immunotech, Hamburg
p27^{Kip1}	1: 50 §	2 Stunden	Dako, Hamburg

§ mit Antigendemaskierung

3.7.3 Immunhistochemische Analyse

Semiquantitative Analyse der TIMP-Expression

Diese wurde mittels eines semiquantitativen immunreaktiven Scores (IRS) durchgeführt.

Die gefärbten Präparate wurden hinsichtlich der Färbeintensität und Menge positiver Tumorzellen beurteilt und ein additiver Färbeindex zwischen „2“ und „6“ errechnet (Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2 Immunreaktiver Score (IRS)

Maximale Färbeintensität	Menge der positiven Tumorzellen mit maximaler Färbeintensität	IRS	Expressionshöhe
0	0 = 0	0	0
1	1-10% = 1	≤ 4	niedrig
2	1-50% = 2		
3	> 50 % = 3	≥ 5	hoch

Quantitative Analyse der Proliferation

Für die Evaluation des MIB-1-Index (Proliferationsindex) und des p27^{kip1}-Index wurden die positiven Zellen in Serienschnitten korrespondierender repräsentativer Gesichtsfelder in mindestens 500 Tumorzellen ausgezählt. Die Anzahl der positiven Zellen ist in Prozent der Gesamtzahl der ausgezählten Zellen angegeben.

3.8. DNA-Analyse

3.8.1 DNA-Extraktion aus HOPE-konserviertem paraffineingebetteten Gewebe

Hierzu wurden von den archivierten Gewebsblöcken HE-gefärbte Schnitte hergestellt um zu gewährleisten, dass repräsentatives Untersuchungsmaterial enthalten war. Danach wurden eine Serie von mindestens 5 Schnitten mit einer Dicke von 5-10 µm unter nukleasefreien Bedingungen angefertigt und die Schnitte in kleinen sterilen Reaktionsgefäßen gesammelt.

Gemäß dem Protokoll der HOPE-Fixation wurden die Schnitte in absolutem Isopropanol bei 60 °C auf einem Thermomixer 2 mal 20 min. entparaffiniert und zum Schluss in 100% Ethanol gewaschen.

Darauf erfolgte die Extraktion der DNA nach einem modifiziertem Protokoll mit dem Allprep DNA/RNA Minikit (Qiagen, Hilden). Hierfür wurden die Schnitte in 600 µl Lysispuffer RLT Plus lysiert und über QIAshredder-Säulen (Qiagen) homogenisiert. Die weiteren Schritte erfolgten nach dem Protokoll des Herstellers. Letztendlich wurde die genomische DNA in einem Gesamtvolumen von 100 µl Puffer eluiert und bei –80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Zur Qualitätsanalyse der extrahierten DNA wurde ein 5 µl Aliquot in eine quantitative Real-Time PCR mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green (iQ SYBR Green Supermix, Bio Rad, München) zum Nachweis von β-Globin eingesetzt.

Tabelle 2.3 PCR-Ansatz der Qualitätsanalyse

Ansatz für PCR	Menge
Bio Rad Mastermix	10 µl
Sense Primer	0,15 µl
Antisense Primer	0,15 µl
Nucleasefreies H ₂ O	8,7 µl
DNA	1 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Zur Qualitätsanalyse wurden die in Tabelle 2.4 aufgeführten Primer verwendet.

Tabelle 2.4 β-Globin-Primer

β-Globin	Sequenz 5`-3
Globin S1	ATGGTGACCTGACTCCTGAGG
Globin AS2	GCCATCACTAAAGGCACCGAGC

DNA war dann in ausreichender Menge vorhanden, wenn nach maximal 32 Amplifikationszyklen spezifische PCR-Produkte nachweisbar waren.

3.8.2. Bisulfidmodifikation

Das Prinzip der Bisulfidmodifikation genomischer DNA beruht auf der chemische Umwandlung nicht-methylierter Cytosin-Basen durch Deaminierung in Uracil-Basen. Methylierte Cytosin-Basen sind gegenüber dieser chemischen Modifikation stabil. Somit können CG-reiche DNA-Abschnitte, sogenannte CpG-Inseln, hinsichtlich ihres Methylierungsstatus analysiert werden. Die durch die Modifikation umgewandelten Basen verhalten sich wie Punktmutationen wie das Beispiel in Tabelle 2.5 verdeutlicht.

Tabelle 2.5 Beispiel einer Bisulfidmodifikation an einem methylierten und einem unmethylierten DNA-Abschnitt

	Original Sequenz	nach Bisulfidmodifikation
Unmethylierte DNA	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N	N-U-G-N-U-G-N-U-G-N
Methylierte DNA	N- C -G-N- C -G-N- C -G-N	N- C -G-N- C -G-N- C -G-N

N = Nukleotid A oder T

Das Epitect Bisulfid Kit basiert auf einem standardisierten Protokoll des Herstellers: Zunächst erfolgt die bisulfid-vermittelte Umwandlung von unmethylierten Cytosinen (zu Uracil), die umgewandelte einsträngige DNA wird dann an die Membran der Epitect Säule gebunden und Überstände entfernt. Es folgt die Desulfonierung der membrangebundenen DNA und schließlich Auswaschen der reinen, umgewandelten DNA von der Säule in 20 µl Elutionsvolumen.

3.8.3 Methylierungsspezifische PCR

Bisulfidmodifizierte DNA kann dann mittels Sequenzierung, „single strand conformation polymorphism“(SSCP)-Analyse oder mittels Restriktion durch methylierungssensitive Endonukleasen analysiert werden. Die methylierungsspezifischen PCR (MSP) ist darüber hinaus eine hochsensitive Methode, die eine orientierende Analyse für methylierte CG-reiche Sequenzen darstellt und auf der Affinität von Primern für methylierte und nicht-methylierte Gensequenzen beruht.

3.8.4 Primer

Das Primerdesign soll im Folgenden am Beispiel von TIMP-3 dargestellt werden:

Im Bereich des 5'- Endes der untranslatierten Region von TIMP-3 (Accession number AF001361) befindet sich eine ausgedehnte CpG-Insel. Innerhalb dieser CpG-Insel wurden, in einem circa 190 Basenpaare langen Segment, Primer für die MSP gewählt. Für den methylierungsspezifischen forward-Primer wurde die Sequenz 840 bis 867 gewählt, für den methylierungsspezifischen reverse-Primer die Sequenz 939 bis 954. Für den forward-Primer der nicht-methylierten Sequenz wurden die Basen 837 bis 867 und für den reverse-Primer die Basen 939 bis 958 gewählt. Die ausgewählten Primer wurden bereits in vorherigen Studien anderer Arbeitsgruppen verwendet.

Tabelle 2.6 Zusammenfassung der Primer

		Methyliert (5'-3')		Unmethyliert (5'-3')	Anealing-Temperatur
3. p27		as	CCGAAAACCCCGCCTCG	CCCCCAAAAACCCACCTCA	59°C
		s	CGTTTCGTTATTTTTGTTTTCGGTTTC	TTTTGTTTTGTATTTTTGTTTTGGTTTT	
3. p27	R1	as	AACCTAAACCAAAAACCGCG		57°C
		s	GGCGTTTAGTTTTTTAGTAAACGTTT		
	R2	as	GCCGAAAATTAATAATCGCG		57°C
		s	CGAATTTTAGGTTTCGTTTTAGGTTTT		
	R3	as	TATCCGACGAATCAATCTTAAA	AACCCCATCTAACTATCCAACA	methyliert: 55°C unmethyliert: 57°C
		s	TTCGAGTTTTATTATAGATTTTCGC	TTGTTTGAGTTTTATTATAGATTTTGT	

TIMP-3 nach Bachman et al. 1999; p27^{Kip1} nach Worm et al. 2000

3.8.5 Protokolle der methylierungsspezifischen PCR

Zur Durchführung der methylierungsspezifischen PCR wurden 2 Ansätze unter nucleasefreien Bedingungen nach folgender Anleitung pipettiert.

Tabelle 2.7 PCR-Ansatz der methylierungsspezifischen PCR

Ansatz für PCR	Menge
HotstartTaq MM	10 µl
Primer sense	0,5 µl
Primer antisense	0,5 µl
PCR-Wasser	7 µl
Modifizierte DNA	2 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Jeder Ansatz durchlief im PCR-Cycler das aufgeführte Temperaturprotokoll.

Tabelle 2.8 Cycler-Protokoll

Zeit		Temperatur	
15 min.	Polymeraseaktivierung	95°C	40 Wiederholungen
30 sec.	Denaturierung	95°C	
30 sec.	Annealing	§	
30 sec.	Extension	72°C	
5 min.	Finale Extension	72°C	

§ Annealing-Temperaturen siehe Tabelle 2.6

Die PCR-Produkte wurden durch Gelelektrophorese in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt und geprüft.

3.9 Statistik

Die statistischen Analysen wurden mit dem automatisierten Computerprogramm GraphPad Prism, 1999, GraphPad Software Inc., San Diego CA (www.graphpad.com.) durchgeführt. Die Art des verwendeten Tests ist jeweils im Ergebnisteil aufgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Mammakarzinome

4.1.1 Patienten

Es wurden 23 Patientinnen im Alter zwischen 32 und 91 Jahren (Median 62 Jahre) untersucht.

Es handelte sich um 17 duktale invasive, 3 lobuläre invasive und 3 duktal-lobuläre invasive Mammakarzinome. Zwanzig Tumore waren vom Malignitätsgrad 2 und 3 vom Malignitätsgrad 3. Fünfzehn Karzinome waren lokalisiert (maximales Tumorstadium pT3, keine nodalen oder systemischen Metastasen), 8 Karzinome waren fortgeschritten (Tumorstadium pT4, alle Tumore mit nodalen und systemischen Metastasen). Insgesamt war bei 21 Patientinnen der Hormonrezeptorstatus bekannt. Der Östrogenrezeptor war in 18 Fällen positiv. Von 15 Patientinnen war der Her2/neu-Status bestimmt. Drei Karzinome wiesen einen Her2/neu-Score von 3+, 2 Fälle von 2+ und 1 Fall von 1+ auf.

4.1.2 p27^{Kip1}-Expression

Von 18 Patientinnen wurde der nukleäre p27^{Kip1}-Index quantifiziert, der zwischen 0,8% und 100% variierte (Median 87,1%).

Hinsichtlich des Tumorstadiums waren im Vergleich der 11 lokalisierten Karzinome mit den 7 fortgeschrittenen Karzinomen keine Unterschiede bezüglich der Expression von p27^{Kip1} nachweisbar ($p > 0,05$; Mann-Whitney-Test).

Unterschiede zwischen mäßig differenzierten Karzinomen (G2, n=15) und wenig differenzierten Karzinomen (G3, n=3) waren bezüglich des p27^{Kip1}-Index nicht nachweisbar ($p > 0,05$; Mann-Whitney-Test).

Hinsichtlich des Östrogenrezeptorstatus und Her2/neu-Status fanden sich keine p27^{Kip1}-Index-Unterschiede ($p > 0,05$; Mann-Whitney-Test).

4.1.3 Ki-67-Expression

Von 18 Patientinnen wurde der nukleäre Ki-67-Index quantifiziert, der zwischen 5,1% und 90,3% variierte (Median 20,8%).

Hinsichtlich des Tumorstadiums waren im Vergleich der 11 lokalisierten Karzinome mit den 7 fortgeschrittenen Karzinomen keine Unterschiede des Ki-67-Index nachweisbar ($p > 0,05$; Mann-Whitney-Test).

Unterschiede zwischen mäßig differenzierten Karzinomen (G2, n=15) und wenig differenzierten Karzinomen (G3, n=3) waren bezüglich des Ki-67-Index ebenfalls nicht nachweisbar ($p > 0,05$; Mann-Whitney-Test).

Hinsichtlich des Östrogenrezeptorstatus und Her2/neu-Status fanden sich gleichfalls keine Unterschiede ($p > 0,05$; Mann-Whitney-Test).

4.1.4 Expression der TIMP

In 21 Fällen erfolgte eine semiquantitative Analyse von TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-3. Dreizehn Fälle waren lokalisiert, 8 Fälle waren fortgeschritten. Hinsichtlich des Tumorstadiums waren für die Expressionshöhe von TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-3 keine Unterschiede nachweisbar ($p > 0,05$; exakter Test nach Fisher).

Unterschiede zwischen mäßig differenzierten Karzinomen (G2, n=18) und wenig differenzierten Karzinomen (G3, n=3) waren bezüglich der TIMP-1, -2 oder -3-Expression nicht nachweisbar ($p > 0,05$; Chi-Quadrat-Test). Auch hinsichtlich des Östrogenrezeptorstatus und Her2/neu-Status fanden sich keine Unterschiede der Expression der TIMP ($p > 0,05$; Exakter Test nach Fisher) .

4.1.5 Vergleich der Proliferationsaktivität mit der TIMP-2 und -3-Expression

Da p27^{Kip1} in der G1-Phase des Zellzyklus dominant exprimiert wird und Ki-67 speziell in der Proliferationsphase, wurde eine mögliche negative Korrelation untersucht. Eine negative Korrelation von p27^{Kip1}-Index und Ki-67-Index konnte nicht nachgewiesen werden ($r = 0,24$; $p = 0,34$; Korrelationskoeffizient nach Spearman).

Da TIMP-2 und TIMP-3 auch in der G1-Phase verstärkt exprimiert und z.T. auch nukleär transloziert werden, wurde die Assoziation mit dem p27^{Kip1}-Index geprüft. Eine Assoziation der TIMP-2- und TIMP-3-Expression mit der Tumorpheriferation war nicht nachweisbar, da weder eine Korrelation mit dem Ki-67-Index, noch mit dem p27^{Kip1}-Index erkennbar war ($p > 0,05$; Mann-Whitney-Test).

4.2 Prostatakarzinome

4.2.1 Patienten

Es wurden 18 Adenokarzinome der Prostata von Patienten im Alter zwischen 49 und 74 Jahren (Median 63 Jahre) untersucht. Einen Malignitätsgrad (Gleason-Score) von 7(3+4) oder niedriger wiesen 14 Patienten auf, bei 4 Patienten ließ sich ein Score von 7(4+3) oder höher ermitteln. Es handelt sich um 8 lokalisierte

(maximales Tumorstadium pT2, ohne nodale oder systemische Metastasen) und 10 fortgeschrittene Tumore (minimales Tumorstadium pT3 und mehr, alle Tumore mit nodalen oder systemischen Metastasen).

4.2.2 p27^{Kip1}-Expression

Von 16 Patienten wurde der nukleäre p27^{Kip1}-Index quantifiziert, der zwischen 1,4% und 100% variierte (Median 80,1%).

Hinsichtlich des Tumorstadiums waren im Vergleich von 7 lokalisierten mit 9 fortgeschrittenen Karzinomen keine Unterschiede ihres p27^{Kip1}-Index nachweisbar ($p > 0,05$; Mann-Whitney-Test).

Unterschiede zwischen 12 Tumoren mit einem Gleason-Score von 7 (3+4) oder niedriger und 4 Tumoren mit einem Score von 7 (4+3) oder höher ließen sich bezüglich der p27^{Kip1}-Expression nicht feststellen ($p > 0,05$; Mann-Whitney-Test).

4.2.3 Ki-67-Expression

Von 16 Patienten wurde der nukleäre Ki-67-Index quantifiziert, der zwischen 1% und 23,7% variierte (Median 5%).

Hinsichtlich des Tumorstadiums waren im Vergleich von 7 lokalisierten mit 9 fortgeschrittenen Karzinomen ebenfalls kein Unterschied des Ki-67-Index nachweisbar ($p > 0,05$; Mann-Whitney-Test).

Zwischen 12 Tumoren mit einem Gleason Score unter 7 (3+4) und 4 Tumoren mit einem Score über 7 (4+3) ließen sich bezüglich der Ki-67-Expression keine Unterschiede feststellen ($p > 0,05$; Mann-Whitney-Test).

4.2.4 Expression der TIMP

In allen 18 Fällen erfolgte eine semiquantitative Analyse von TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-3.

Hinsichtlich des Tumorstadiums waren für die Expressionshöhe von TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-3 keine Unterschiede nachweisbar ($p > 0,05$; Exakter Test nach Fisher).

Auch hinsichtlich des Malignitätsgrades konnten keine Unterschiede zwischen 14 wenig differenzierten und 4 mäßig differenzierten Tumoren festgestellt werden ($p > 0,05$; Exakter Test nach Fisher).

4.2.5 Vergleich der Proliferationsaktivität mit der TIMP-2 und -3-Expression

Es konnte keine Korrelation von p27^{Kip1}-Index und Ki-67-Index festgestellt werden ($r=0,78$; $p>0,05$; Korrelationskoeffizient nach Spearman). Eine Korrelation von TIMP-2 oder TIMP-3 konnte weder mit dem p27^{Kip1}-Index, noch mit dem Ki-67-Index nachgewiesen werden ($p>0,05$; Mann-Whitney-Test).

4.3. Harnblasenkarzinome

4.3.1 Patienten

Es wurden 7 Urothelkarzinome von einer weiblichen Patientin und 6 männlichen Patienten im Alter zwischen 58 und 86 Jahren (Median 68 Jahre) untersucht.

Zwei Tumore wurden dem Malignitätsgrad 2 zugeordnet, 5 Tumore dem Grad 3. Es handelte sich um 3 lokalisierte Karzinome (maximales Tumorstadium pT2, ohne nodale oder systemische Metastasen) und 4 fortgeschrittene Karzinome (Tumorstadium pT3 und mehr, alle Tumore mit Metastasen).

4.3.2 p27^{Kip1}-Expression

Von 7 Patienten wurde der nukleäre p27^{Kip1}-Index bestimmt, der zwischen 0% und 46,8% variierte (Median 8%).

Hinsichtlich des Tumorstadiums war im Vergleich von 3 lokalisierten mit 4 fortgeschrittenen Karzinomen kein Unterschied nachweisbar ($p>0,05$; Mann-Whitney-Test).

Unterschiede zwischen 2 mäßig differenzierten und 5 wenig differenzierten Karzinomen waren bezüglich des p27^{Kip1}-Index ebenfalls nicht nachweisbar ($p>0,05$; Mann-Whitney-Test).

4.3.3 Ki-67-Expression

Von 7 Patienten wurde der nukleäre Ki-67-Index quantifiziert, der zwischen 8% und 86,3% variierte (Median 37,6%). Hinsichtlich des Tumorstadiums waren im Vergleich von 3 lokalisierten mit 4 fortgeschrittenen Karzinomen keine Unterschiede des Ki-67-Index nachweisbar. ($p>0,05$; Mann-Whitney-Test).

Unterschiede zwischen 2 mäßig differenzierten und 5 wenig differenzierten Karzinomen waren bezüglich des Ki-67-Index ebenfalls nicht nachweisbar ($p>0,05$; Mann-Whitney-Test).

4.3.4 Expression der TIMP

In allen 7 Fällen erfolgte eine semiquantitative Auswertung von TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-3.

Eine statistische Auswertung von TIMP-1 hinsichtlich des Tumorstadiums und des Malignitätsgrades ist nicht möglich, da sowohl für lokalisierte und fortgeschrittene, wie auch für mäßig und wenig differenzierte Karzinome eine sehr hohe TIMP-1-Expression (hoher IR-Score) gemessen wurde.

Für die Expression von TIMP-2 und TIMP-3 ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen 3 lokalisierten und 4 fortgeschrittenen Fällen nachweisen ($p > 0,05$; Exakter Test nach Fisher).

Ebenso ließen sich zwischen 2 mäßig differenzierten und 5 wenig differenzierten Karzinomen keine signifikanten Unterschiede bezüglich ihrer Expression von TIMP-2 und TIMP-3 erkennen ($p > 0,05$; Exakter Test nach Fisher).

4.3.5 Vergleich der Proliferationsaktivität mit der TIMP-2 und -3-Expression

Eine Korrelation, speziell eine negative Korrelation, von p27^{Kip1} und Ki-67 ließ sich nicht feststellen ($r = 0,63$; $p > 0,05$; Korrelationskoeffizient nach Spearman).

Eine Korrelation von TIMP-2 mit p27^{Kip1} oder mit Ki-67 konnte nicht statistisch untersucht werden, da die TIMP-2-Expression generell niedrig war.

Für TIMP-3 besteht keine Korrelation mit p27^{Kip1} oder Ki-67 ($p > 0,05$; Mann-Whitney-Test).

4.4 Nierenzellkarzinome

4.4.1 Patienten

Es wurden Nierenzellkarzinome von 5 weiblichen Patientinnen und 17 männlichen Patienten im Alter von 38 bis 75 Jahren (Median 63 Jahre) untersucht.

Es handelte sich um 18 klarzellige, 3 papilläre und 1 chromophobes Nierenzellkarzinom. Vier Patienten wiesen einen Malignitätsgrad von 1 auf, 14 einen Malignitätsgrad von 2, 4 Patienten einen Malignitätsgrad von 3. Sieben Karzinome waren lokalisiert, (maximales Tumorstadium pT2, das heißt ohne nodale, ohne systemische Metastasen), 15 befanden sich in einem fortgeschrittenen Stadium (das heißt Tumorstadium pT3 und Tumore mit nodalen oder Organmetastasen).

4.4.2 p27^{Kip1}-Expression

Von 15 Patienten wurde der nukleäre p27^{Kip1}-Index quantifiziert, der zwischen 6,2% und 94,2% variierte (Median 30,3%).

Hinsichtlich des Tumorstadiums war im Vergleich von 5 lokalisierten mit 10 fortgeschrittenen Karzinomen kein Unterschied für die Expression von p27^{Kip1} nachweisbar ($p > 0,05$; Mann-Whitney-Test).

Bezüglich des Malignitätsgrades ließ sich ebenfalls kein Unterschied der p27^{Kip1}-Expression feststellen ($p > 0,05$; Kruskal-Wallis-Test).

4.4.3 Ki-67-Expression

Von 17 Patienten wurde der nukleäre Ki-67-Index quantifiziert, der zwischen 1,3% und 90,6% variierte (Median 5,7%).

Hinsichtlich des Tumorstadiums war im Vergleich von 6 lokalisierten mit 11 fortgeschrittenen Karzinomen kein Unterschied der Expressionshöhe von Ki-67 nachweisbar ($p > 0,05$; Mann-Whitney-Test).

Ebenso ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen 13 mäßig und 4 wenig differenzierten Karzinomen nachweisen ($p > 0,05$; Kruskal-Wallis-Test).

4.4.4 Expression der TIMP

In allen 22 Fällen erfolgte eine semiquantitative Analyse von TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-3.

Hinsichtlich des Tumorstadiums waren für die Expressionshöhe der einzelnen TIMP keine Unterschiede zwischen den 7 lokalisierten und den 15 fortgeschrittenen Fällen festzustellen ($p > 0,05$; Exakter Test nach Fisher).

Darüber hinaus ließ sich keine Korrelation der TIMP-Expression mit dem Malignitätsgrad der Tumore nachweisen ($p > 0,05$; Chi-Quadrat-Test).

4.4.5 Vergleich der Proliferationsaktivität mit der TIMP-2 und -3-Expression

Eine Korrelation von p27^{Kip1}-Index und Ki-67-Index konnte nicht festgestellt werden ($r = 0,38$; $p > 0,05$; Korrelationskoeffizient nach Spearman).

Die statistische Auswertung von TIMP-2 bezüglich der Expressionshöhe von p27^{Kip1} und Ki-67 entfällt, da nur wenige Tumore ein hohes Expressionsniveau (hoher IR-Score) von TIMP-2 aufwiesen.

Für TIMP-3 ließ sich keine Korrelation mit p27^{Kip1} oder Ki-67 nachweisen ($p > 0,05$; Mann-Whitney-Test).

4.5. Bronchialkarzinome

4.5.1 Patienten

Es wurden eine weibliche Patientin und 8 männliche Patienten im Alter von 50 bis 78 Jahren (Median 63) untersucht.

Es handelte sich um 8 Plattenepithelkarzinome und 1 broncho-alveoläres Karzinom. Ein Tumor war hochdifferenziert, 6 Tumore mäßig differenziert und 2 Tumore wenig differenziert. Drei Karzinome waren lokalisiert (maximales Tumorstadium pT3, ohne nodale oder systemische Metastasen), 6 Karzinome waren fortgeschritten (Tumorstadium pT4, alle Tumore mit nodalen und systemischen Metastasen).

4.5.2 p27^{Kip1}-Expression

Von allen 9 Patienten wurde der nukleäre p27^{Kip1}-Index quantifiziert, der zwischen 4% und 89,6% (Median 33,4%) variierte.

Hinsichtlich des Tumorstadiums war im Vergleich der 3 lokalisierten Karzinomen mit den 6 fortgeschrittenen Karzinomen kein Unterschied nachweisbar ($p > 0,05$; Mann-Whitney-Test).

Eine statistische Auswertung bezüglich des Malignitätsgrades wurde aufgrund der geringen Fallzahl wenig differenzierter Karzinome nicht durchgeführt.

4.5.3 Ki-67-Expression

Von allen 9 Patienten wurde der nukleäre Ki-67-Index quantifiziert, der zwischen 5,4% und 83,7% (Median 34,5%) variierte.

Hinsichtlich des Tumorstadiums war kein signifikanter Unterschied bezüglich der Expression von Ki-67 festzustellen ($p > 0,05$; Mann-Whitney-Test).

4.5.4 Expression der TIMP

In allen 9 Fällen erfolgte jeweils eine Bestimmung der TIMP-1 und TIMP-3-Expression, in 8 Fällen erfolgte eine Bestimmung der TIMP-2-Expression.

Für TIMP-2 erfolgte keine statistische Auswertung möglich, da TIMP-2 generell niedrig exprimiert war.

Für TIMP-1 und TIMP-3 ließ sich keine Korrelation von Expressionshöhe und Tumorstadium feststellen ($p > 0,05$; Exakter Test nach Fisher).

Die Expressionshöhe von TIMP-1 korrelierte nicht mit dem Malignitätsgrad der Tumore ($p > 0,05$; Chi-Quadrat-Test).

Für die Expression von TIMP-3 ließ sich allerdings eine positive Assoziation zum Malignitätsgrad zeigen ($p = 0,011$; Chi-Quadrat-Test;). Somit korreliert eine hohe Expression von TIMP-3 mit mäßig bis wenig differenzierten Karzinomen.

4.5.5 Vergleich der Proliferationsaktivität mit der TIMP-2 und -3-Expression

Eine Korrelation von $p27^{Kip1}$ -Index und Ki-67-Index konnte nicht festgestellt werden ($r = 0,26$; $p > 0,05$; Korrelationskoeffizient nach Spearman). Aufgrund zu geringer Fallzahlen in den einzelnen Gruppen erfolgte keine Auswertung der TIMP-2- und TIMP-3-Expression bezüglich des $p27^{Kip1}$ - und Ki-67-Index.

4.6. Kolonkarzinome

4.6.1 Patienten

Es wurden 8 Patienten, davon 4 weibliche und 4 männliche, im Alter von 59 bis 79 Jahren (Median 69) untersucht. Sechs Tumore waren mäßig differenziert, 2 Tumore nur wenig differenziert.

Es handelte sich um 2 lokalisierte (maximales Tumorstadium pT3, ohne nodale oder systemische Metastasen) und 6 fortgeschrittene (Tumorstadium pT4, alle Tumore mit nodalen und systemischen Metastasen) Adenokarzinome des Kolons.

4.6.2 $p27^{Kip1}$ -Expression

Von 6 Tumoren erfolgte eine Bestimmung des $p27^{Kip1}$ -Index, der zwischen 0 und 92,3% (Median 50,9%) lag. Eine statistische Bewertung des $p27^{Kip1}$ -Index bezüglich des Tumorstadiums entfällt, da nur ein ausgewerteter Tumor lokalisiert war. Auch hinsichtlich des Malignitätsgrades war eine Untersuchung nicht möglich.

4.6.3 Ki-67-Expression

Von 6 Tumoren erfolgte eine Bestimmung des Ki-67-Index, der zwischen 43,1% und 92,9% (Median 71%) lag. Eine statistische Bewertung des Ki-67-Index bezüglich des Tumorstadiums sowie des Malignitätsgrades war ebenfalls nicht möglich.

4.6.4 Expression der TIMP

In allen 8 Fällen erfolgte jeweils eine Bestimmung der TIMP-1, -2 und -3-Expression. Auch hier war keine statistische Bewertung möglich, TIMP-1 und -2 waren sowohl bei lokalisierten, als auch bei fortgeschrittenen Karzinomen nur wenig exprimiert, zudem erwies sich die Fallzahl der lokalisierten Karzinome als zu gering. Gleiches gilt bezüglich des Malignitätsgrades.

4.6.5 Vergleich der Proliferationsaktivität mit der TIMP-2 und -3-Expression

Eine Korrelation von p27^{Kip1}-Index und Ki-67-Index konnte nicht festgestellt werden ($r=0,143$, $p>0,05$; Korrelationskoeffizient nach Spearman). Aus den unter 4.6.4 genannten Gründen entfiel eine Auswertung der TIMP-2 und TIMP-3-Expression bezüglich des p27^{Kip1}- und Ki-67-Index.

4.7 Zusammenfassende Analyse der immunhistologischen Untersuchungen

Um zu überprüfen, ob unabhängig vom Tumortyp für die Parameter p27^{Kip1} oder Ki-67 eine gemeinsame Beziehung dargestellt werden konnte, wurden die Daten sämtlicher Tumore zusammengefasst:

p27^{Kip1} wurde in hoch bis mäßig differenzierten Karzinomen signifikant höher exprimiert als in wenig differenzierten Karzinomen ($p=0,003$; Mann-Whitney-Test).

Dies galt nicht für den Proliferationsmarker Ki-67 ($p>0,05$; Mann-Whitney-Test), dieser zeigt keine Assoziation mit dem Malignitätsgrad.

Für p27^{Kip1} konnte keine Korrelation bezüglich des Tumorstadiums gesehen werden ($p>0,05$; Mann-Whitney-Test).

Für Ki-67 ließ sich eine Tendenz hinsichtlich des Tumorstadiums beobachten, ein höherer Ki-67-Index war hier mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium assoziiert ($p=0,09$; Mann-Whitney-Test).

Über die Gesamtheit aller bearbeiteten Fälle konnte eine positive Korrelation von p27^{Kip1}- und Ki-67-Index gesehen werden ($r=0,41$, $p=0,0005$; Korrelationskoeffizient nach Pearson).

4.8 Ergebnisse der methylierungsspezifischen PCR (MSP)

4.8.1 Mammakarzinome

Insgesamt wurden 8 Fälle mittels methylierungsspezifischer PCR analysiert. Für p27^{Kip1} zeigte sich in 4 Fällen sowohl ein methyliertes als auch ein unmethyliertes Gen und in 4 Fällen lediglich ein PCR-Produkt im methylierungsspezifischen Ansatz. Eine Assoziation mit der immunhistochemischen Signalintensität von p27^{Kip1} lag nicht vor.

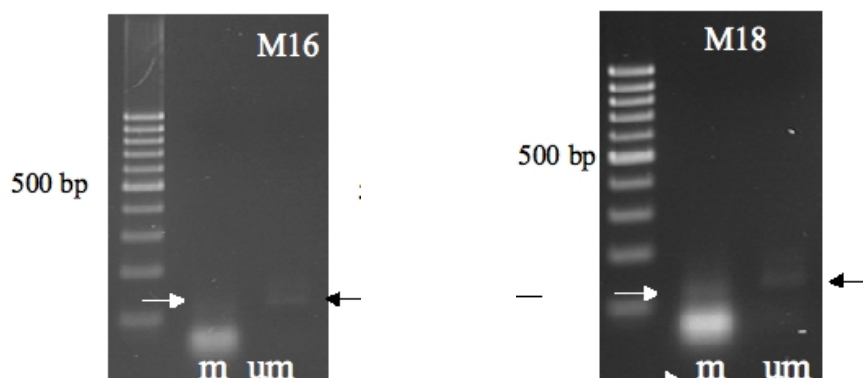
Abb. 4.1 Methylierungsspezifische PCR für p27^{Kip1} an Mammakarzinomen



m = methyliert; um = unmethyliert

Für TIMP-3 zeigte sich in einem Fall ein unmethyliertes Gen und in 7 Fällen sowohl ein methyliertes als auch ein unmethyliertes Gen. Insgesamt zeigte sich eine hohe immunhistochemische Signalintensität von TIMP-3.

Abb. 4.2 Methylierungsspezifische PCR für TIMP-3 an Mammakarzinomen



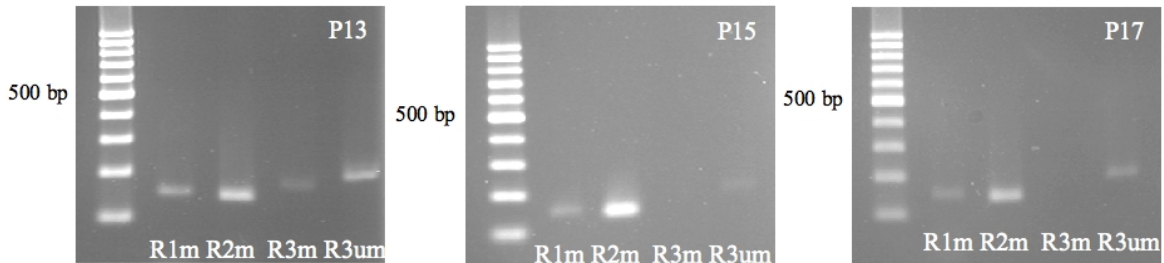
weißer Pfeil: methyliertes PCR-Produkt; schwarzer Pfeil: unmethyliertes PCR-Produkt

4.8.2 Prostatakarzinome

Es wurden 6 Fälle mittels methylierungsspezifischer PCR analysiert. Für TIMP-3 zeigte sich in 6 Fällen ein unmethyliertes Gen. Für p27^{Kip1} zeigte sich in 6 Fällen

sowohl ein methyliertes als auch ein unmethyliertes Gen. Eine Assoziation mit der immunhistochemischen Signalintensität von p27^{Kip1} lag nicht vor.

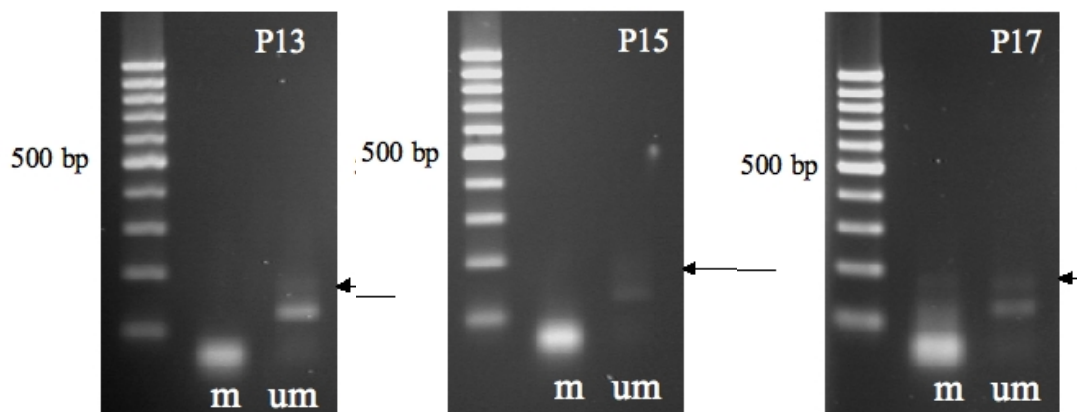
Abb. 4.3 Methylierungsspezifische PCR für p27^{Kip1} an Prostatakarzinomen



m = methyliert; um = unmethyliert

Insgesamt zeigte sich eine hohe immunhistochemische Signalintensität für TIMP-3.

Abb. 4.4 Methylierungsspezifische PCR für TIMP-3 an Prostatakarzinomen



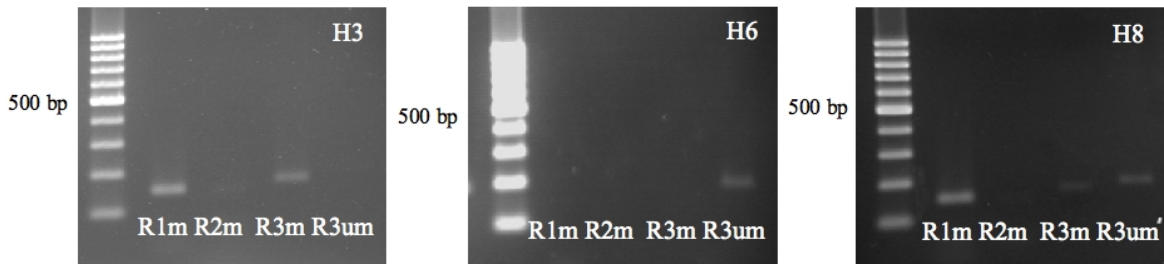
m = methyliert; um = unmethyliert; Pfeil= unmethyliertes PCR-Produkt

4.8.3 Harnblasenkarzinome

Insgesamt wurden alle 7 Fälle mittels methylierungsspezifischer PCR analysiert.

Für p27^{Kip1} zeigte sich in 5 Fällen sowohl ein methyliertes als auch ein unmethyliertes Gen und in je einem Fall entweder lediglich ein PCR-Produkt im methylierten bzw. im unmethylierten Ansatz. Eine Assoziation mit der immunhistochemischen Signalintensität von p27^{Kip1} lag nicht vor.

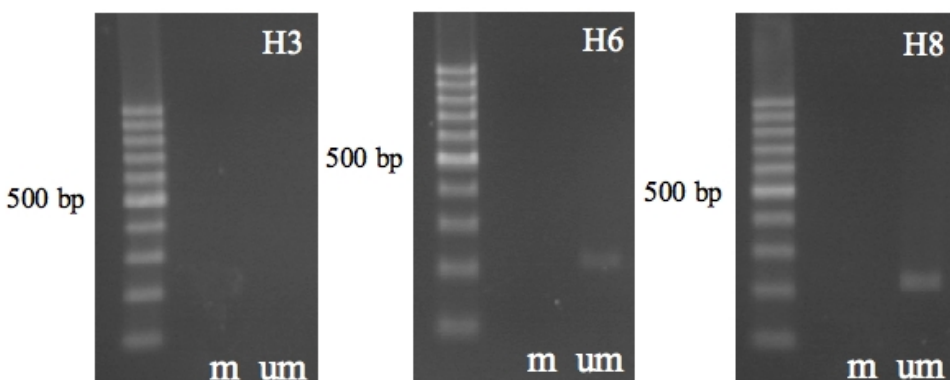
Abb. 4.5 Methylierungsspezifische PCR für p27^{Kip1} an Harnblasenkarzinomen



m = methyliert; um = unmethyliert

Für TIMP-3 zeigte sich in 5 Fällen ein unmethyliertes Gen, in einem Fall sowohl ein methyliertes als auch ein unmethyliertes Gen. In 2 Fällen war in beiden Ansätzen kein PCR-Produkt nachweisbar. Insgesamt zeigte sich eine hohe immunhistochemische Signalintensität von TIMP-3.

Abb. 4.6 Methylierungsspezifische PCR für TIMP-3 an Harnblasenkarzinomen



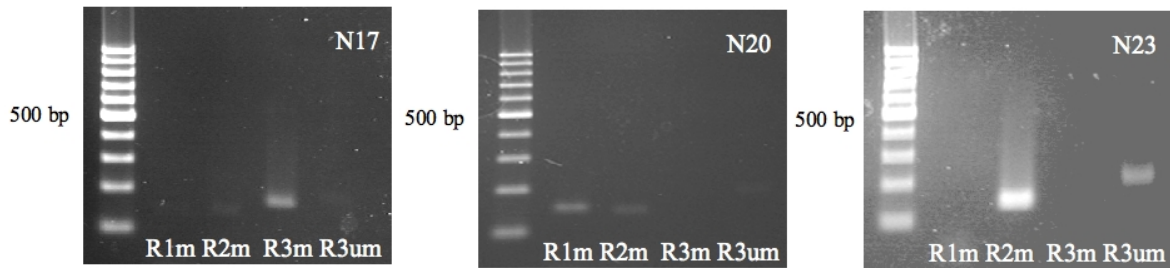
m = methyliert; um = unmethyliert

4.8.4 Nierenzellkarzinome

Insgesamt wurden 7 Fälle mittels methylierungsspezifischer PCR analysiert.

Für p27^{Kip1} zeigte sich in 6 Fällen sowohl ein methyliertes als auch ein unmethyliertes Gen und in einem Fall lediglich ein PCR-Produkt im methylierten Ansatz. Eine Assoziation mit der immunhistochemischen Signalintensität von p27^{Kip1} lag nicht vor.

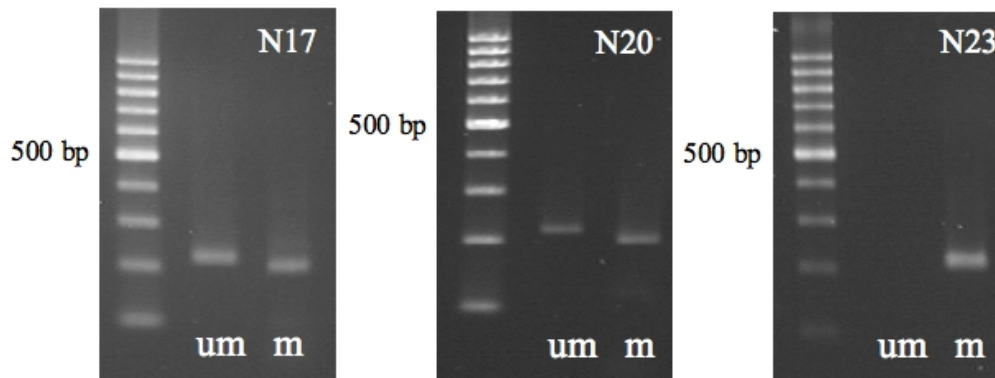
Abb. 4.7 Methylierungsspezifische PCR für p27^{Kip1} an Nierenzellkarzinomen



m = methyliert; um = unmethyliert

Für TIMP-3 zeigte sich in 2 Fällen ausschließlich ein methyliertes Gen und in 5 Fällen sowohl ein methyliertes als auch ein unmethyliertes Gen. Insgesamt zeigt sich eine intermediäre immunhistochemische Signalintensität für TIMP-3.

Abb. 4.8 Methylierungsspezifische PCR für TIMP-3 an Nierenzellkarzinomen



m = methyliert; um = unmethyliert

4.8.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der MSP-Analyse

Der Nachweis von methylierten und unmethylierten Gensequenzen gelang mittels methylierungsspezifischer PCR für TIMP-3 und p27^{Kip1}. In den meisten Fällen zeigte sich eine Mischung aus methylierten und unmethylierten Genabschnitten. Ein Einfluss auf die Proteinexpression ließ sich jeweils nicht nachweisen. Auch in den Tumoren, deren Analyse nur PCR-Produkte entweder für methylierte oder für unmethylierte Sequenzen ergab, konnte kein Bezug zur Intensität des immunhistochemischen Signals festgestellt werden.

5. Diskussion

Wesentliches Ziel der Arbeit war zu klären, ob die Expression von p27^{Kip1} und TIMP in unterschiedlichen Tumorentitäten mit unterschiedlicher Tumorpherese und Tumorausbreitung assoziiert ist. Weiterhin sollte untersucht werden, ob p27^{Kip1} und TIMP-3 in relevanter Methylierung im Tumorgewebe nachweisbar sind.

p27^{Kip1} ist ein nukleäres Protein, das als ein Inhibitor cyclin-abhängiger Proteinkinasen den Zellzyklus in der G1-Phase blockiert. Demzufolge könnte eine Suppression der p27^{Kip1}-Expression mit einer gesteigerten Proliferationsaktivität einhergehen.

Für Mammakarzinome konnten wir keine Korrelation zwischen der p27^{Kip1}-Expression und dem Malignitätsgrad als auch zwischen der p27^{Kip1}-Expression und dem Tumorstadium nachweisen.

Catzavelos et al. (1997) wiesen in Mammakarzinomen eine im Vergleich zum Normalgewebe reduzierte p27^{Kip1}-Expression nach. Erniedrigte Expression von p27^{Kip1} korrelierte nach Tan et al. (1997) mit einer schlechteren Prognose für Mammakarzinome.

Fredersdorf et al. (1997) konnten zwar eine negative Korrelation zwischen p27^{Kip1}-Expression und Zellproliferation in gesunden Geweben bestätigen, fanden jedoch große Mengen p27^{Kip1} in stark proliferierenden Mammakarzinomen.

Somit bestehen für p27^{Kip1} in Mammakarzinomen keine einheitlichen Beobachtungen hinsichtlich einer prognostischen Relevanz.

Auch in Prostatakarzinomen fanden wir keine Assoziation der p27^{Kip1}-Expression mit dem Tumorstadium oder dem Malignitätsgrad der untersuchten Fälle.

Untersuchungen von Cheville et al. (1998) zeigten eine Korrelation von niedriger p27^{Kip1}-Expression mit einem höheren Gleason-Score und einem fortgeschrittenen Stadium von Prostatakarzinomen. Laut Yang et al. (1998) wies eine niedrige p27^{Kip1}-Expression auf eine schlechtere Prognose, Tsihlias et al. (1998) werteten eine fehlende p27^{Kip1}-Expression als Zeichen eines Therapieversagens. Eine Korrelation zwischen p27^{Kip1}-Expression und präoperativ bestimmten PSA-Werten konnte nicht belegt werden (Cote et al. 1998).

Für Harnblasenkarzinome zeigten unsere Untersuchungen ebenfalls keine Unterschiede der p27^{Kip1}-Expression zwischen niedrig und hochmalignen, wie auch zwischen fortgeschrittenen und lokalisierten Tumoren.

Diese Befunde bestätigen vorausgegangene Untersuchungen, die ebenfalls zeigen konnten, dass die Bestimmung von p27^{Kip1} allein kein sicherer prognostischer Marker war (Rosenblatt et al. 2008). Ioachim (2008) konnten für Urothelkarzinome keinen Zusammenhang zwischen der p27^{Kip1}-Expression und der Prognose von Urothelkarzinomen feststellen. Ähnlich unserer Ergebnisse war der Anteil der p27^{Kip1}-positiven Tumorzellen insgesamt niedrig, ließ aber keine Rückschlüsse auf Tumorstadium und Malignitätsgrad zu.

Auch für Nierenzellkarzinome zeigten unsere Ergebnisse keine Korrelation zwischen p27^{Kip1}-Expression und Tumorstadium oder Malignitätsgrad.

Pertia et al. (2007) konnten zeigen, dass eine verminderte p27^{Kip1}-Expression im Tumor mit einem erhöhten Malignitätsgrad und einem erhöhtem Tumorstadium einher ging. Hennenlotter et al. (2008) hingegen konnten im Vergleich von gesunden Nierengewebe zu Nierenzellkarzinomen eine generell höhere p27^{Kip1}-Expression im Tumor feststellen.

Weitere Untersuchungen bestätigen die heterogenen Ergebnisse der p27^{Kip1}-Expression in Nierenzellkarzinomen. Durch Gewebearrayanalyse konnten Merseburger et al. (2007) darstellen, dass eine verminderte p27^{Kip1}-Expression am invasiven Tumorrand zwar mit einer schlechteren Prognose korrelierte, die p27^{Kip1}-Expression im Primärtumor insgesamt aber keine Aussagekraft besaß.

Für Bronchialkarzinome konnten wir keine Korrelation zwischen Tumorstadium und p27^{Kip1}-Expression feststellen.

In nicht-kleinzelligen Tumoren wurde von Kawana et al. (1998) eine niedrigere p27^{Kip1}-Expression als im umliegenden gesunden Gewebe beschrieben, die Höhe der p27^{Kip1}-Expression korrelierte in anderen Untersuchungen (Esposito et al. 1997) zudem mit der Prognose.

In kleinzelligen Tumoren konnten diese Ergebnisse nicht bestätigt werden, hier fand sich eine generell höhere p27^{Kip1}-Expression als im umliegenden gesunden Gewebe (Yatabe et al. 1998).

Für Kolonkarzinome existieren ebenfalls unterschiedliche Beobachtungen.

Ciaparrone et al. (1998) konnten keinen Unterschied der p27^{Kip1}-Expression in gesunder Kolonschleimhaut, hyperplastischen Polypen, und unterschiedlichen Stadien kolorektaler Karzinome feststellen.

Die Auswertung unserer Untersuchungen zeigt erst im organ-übergreifendem Vergleich aller Tumore, dass p27^{Kip1} in hoch bis mäßig differenzierten Karzinomen im Vergleich zu wenig differenzierten Karzinomen signifikant höher exprimiert wurde. Daraus lässt sich schließen, dass möglicherweise für die Einzelentitäten zu geringe Fallzahlen untersucht wurden.

Einen Zusammenhang zwischen p27^{Kip1}-Verlust und Tumorstadium konnten wir darüber hinaus nicht feststellen. Untersuchungen anderer Autoren konnten die Bedeutung des p27^{Kip1}-Verlustes ebenfalls nicht immer bestätigen.

Insgesamt ließ sich kein einheitliches Muster einer Assoziation von hoher p27^{Kip1}-Expression und niedriger Proliferationsaktivität feststellen. Im Gegensatz dazu wurde über eine Assoziation einer hohen p27^{Kip1}-Expression mit einer gesteigerten Tumorzellproliferation in Mamma- und Kolonkarzinomen (Fredersdorf et al. 1997), wie auch in Nierenzellkarzinomen (Hennenlotter et al. 2008), kleinzelligen Bronchialkarzinomen (Yatabe et al. 1998) und malignen Non-Hodgkin-Lymphomen der B-Zellreihe (Sanchez-Beato et al. 1999) berichtet.

Eine mögliche Erklärung könnte eine verstärkte Expression antagonistischer Proteinkinasen im Tumor darstellen. Fredersdorf et al. (1997) fanden neben einer hohen p27^{Kip1}-Konzentration eine ebenso gesteigerte Proliferation der Proteinkinase D1. Sanchez-Beato et al. (1999) stellten in Burkitt-Lymphomen neben p27^{Kip1} eine hohe Konzentration von Cyclin D3 fest. Sie vermuteten daher eine mögliche Komplexbildung von p27^{Kip1}/Cyclin D3, die eine Inaktivierung und nachfolgende Akkumulation erklären könnte.

Die von Yatabe et al. (1998) gezeigte hohe Proliferationsrate der klein-zelligen Bronchialkarzinome trotz hoher p27^{Kip1}-Expression erklärt sich möglicherweise durch zusätzliche Mutationen in Tumor-Suppressor-Genen (z.B. Rb und p53) oder eine Überexpression von c-myc, wie sie bei diesen Tumoren häufig gesehen wurde (Lloyd et al. 1999). Diese zusätzlichen genetischen Alterationen scheinen in der Lage zu sein, den inhibitorischen Effekt von p27^{Kip1} zu überspielen.

Über die Regulation von p27^{Kip1} ist bislang wenig bekannt. Auf Proteinebene konnte in vitro bereits mehrfach eine Phosphorylierung an verschiedenen Aminosäuren nachgewiesen werden. Inwiefern sich diese Mechanismen in vivo auswirken ist bislang allerdings unklar (Kaldis 2007).

Der Mechanismus einer epigenetischen Suppression mit Methylierung regulatorischer Promotor-Sequenzen des p27^{Kip1}-Gens scheint keine herausragende Bedeutung für die p27^{Kip1}-Expression zu haben, wie die eigenen Untersuchungen ergeben haben. In den untersuchten Tumoren war keine bedeutsame Genmethylierung festzustellen, die einen immunhistochemisch nachweisbaren Einfluss auf die p27^{Kip1}-Proteinexpression ausgeübt hätte.

Diese Ergebnisse decken sich mit Untersuchungen von Kibel et al. (2001), die bei Prostatakarzinomen lediglich eine sporadische Methylierung des p27^{Kip1}-Gens feststellen konnten, ohne dass eine Verminderung des p27^{Kip1}-Proteins im Zellkern auftrat.

Das p27^{Kip1}-Protein wird hauptsächlich auf Proteinebene reguliert und ist von der mRNA-Menge unabhängig (Auerkari 2006). Somit kommt p27^{Kip1} keine Rolle als Tumor-Suppressor-Gen zu.

Die Regulation auf Proteinebene scheint hauptsächlich über den Abbau von p27^{Kip1} zu erfolgen. Berichte über Mamma- (Traub et al. 2006) und Kolonkarzinome (Hershko und Shapira 2006) zeigten einen direkten Zusammenhang zu der Funktion eines S-Phase kinase-assoziierten Proteins (Skp2). Dieses Protein vermittelt den Abbau von p27^{Kip1} durch das Ubiquitin-System. Seine Konzentration ist dementsprechend niedrig in der G0- und G1-Phase des Zellzyklus und steigt in der S-Phase an. Ein niedriger p27^{Kip1}-Level, möglicherweise bedingt durch eine hohe Skp2-Expression, korrelierte in diesen Untersuchungen mit einer schlechteren Prognose.

Weitere Komplexbildungen, wie z.B. p27^{Kip1}/Cyclin D3/Cdk6 oder p27^{Kip1}/Cyclin D3/Cdk4 sind denkbar (Sanchez-Beato et al. 1999), wurden bislang allerdings kaum untersucht.

Endkoppelte Proliferation, gestörte Maturation und Alterung sowie invasives Wachstum und Metastasierung sind Charakteristika maligner Tumore.

Ki-67 ist ein proliferationsassoziiertes nukleäres Antigen, das in der Routinediagnostik zur Darstellung proliferierender Zellen genutzt wird.

In Mammakarzinomen konnten von uns keine signifikanten Unterschiede der Ki-67-Expression für das Tumorstadium oder den Malignitätsgrad festgestellt werden.

Potemski et al. (2006) konnten sowohl immunhistochemisch als auch mittels PCR-Analyse eine hohe Ki-67-Expression in Grad 3 Mammakarzinomen feststellen, diese korrelierte aber wiederum nicht mit dem Tumorstadium, Lymphknotenstatus, Hormonrezeptorstatus oder der Prognose. Veronese et al. (1993) stellten dar, dass Tumore mit einer hohen Ki-67-Expression eine höhere Rezidivrate aufwiesen. In einer Meta-Analyse von De Azambuja et al. (2007) über 46 Studien an Mammakarzinomen stellte sich ebenfalls eine Korrelation zwischen der Höhe der Ki-67-Expression und einem kürzerem rezidiv-freien Intervall heraus.

Burcombe et al. (2006) hingegen konnten anhand der Ki-67-Expression zu bestimmten Therapiezeitpunkten nicht zwischen Therapieerfolg und Therapieversagen unterscheiden. Der vor, während und nach einer neoadjuvanten Chemotherapie bestimmte Ki-67-Index korrelierte in dieser Untersuchung nicht mit dem Apoptoseindex der entnommenen Mammakarzinom-Biopsien. Eine ähnliche Diskrepanz zwischen Apoptoseindex und Ki-67-Expression konnte von Jalava et al. (2006) festgestellt werden.

Auch in Prostatakarzinomen bestanden in unserer Untersuchung keine signifikanten Unterschiede der Ki-67-Expression für das Tumorstadium oder den Malignitätsgrad. Nariculam et al. (2008) konnten für Prostatakarzinome einen deutlichen Anstieg der Ki-67-Expression im Vergleich zum Normalgewebe beobachten. Innerhalb der Gruppe der Karzinome korrelierte die Höhe der Expression allerdings nicht mit der Prognose der Patienten. Zu diesem Ergebnis kam auch Moul (1999), der ebenfalls keine Korrelation zwischen der Höhe der Ki-67-Expression und dem Auftreten eines Rezidives nach Prostatektomie feststellen konnte. Aaltomaa et al. (1997 a) postulierten, dass die Ki-67-Expression nur dann als prognostischer Faktor zu werten ist, wenn sowohl Tumorstadium und Malignitätsgrad in die Bewertung miteinbezogen werden.

In Harnblasenkarzinomen waren in unserer Untersuchung ebenfalls keine Unterschiede der Ki-67-Expression zwischen niedrig und hochmalignen, wie auch zwischen fortgeschrittenen und lokalisierten Tumoren nachweisbar.

Santos et al. (2003) zeigten, dass Ki-67 für die Gruppe der niedrigmalignen Urothelkarzinome als prognostischer Faktor zu verwenden ist. Die Übersichtsarbeit von Rosenblatt et al. (2008) hielt dagegen, dass unabhängig vom Malignitätsgrad Ki-67 keine Korrelation mit der Prognose aufweist.

Unsere Ergebnisse zeigten ebenfalls keine Unterschiede bezüglich der Ki-67-Expression in Nierenzellkarzinomen.

Eine Untersuchung von Aaltomaa et al. (1997 b) konnte jedoch eine Korrelation von Ki-67 mit dem Tumorgrad und der Mitoseaktivität darstellen. Insbesondere für niedrigmalignen Nierenzellkarzinome war Ki-67 ein zuverlässiger prognostischer Faktor.

In Bronchialkarzinomen bestand in unseren Untersuchungen keine Korrelation zwischen Tumorstadium, Malignitätsgrad und Ki-67-Expression.

Für Adenokarzinome der Lunge konnten Demarchi et al. (2000) belegen, dass Ki-67, allerdings nur in Verbindung mit Tumorstadium und immunhistochemischem Nachweis von p53, prognostisch relevant war. Auch für nicht-kleinzellige Lungenkarzinome gilt Ki-67 allein nicht als unabhängiger prognostischer Faktor, wie eine Untersuchung von Nguyen et al. (2000) zeigen konnte. Für kleinzellige Bronchialkarzinome konnten Paik et al. (2006) zwar in allen Fällen eine überdurchschnittlich hohe Ki-67-Expression feststellen, diese stand jedoch in keinem Zusammenhang mit der Prognose der einzelnen Fälle.

Erst im organübergreifendem Vergleich konnten wir eine Assoziation von hohem Ki-67-Index und fortgeschrittenen Tumorstadium beobachten.

Welche Funktion Ki-67 in proliferierenden Zellen ausübt, ist unklar. Dennoch gilt die Fraktion der Ki-67 positiven Zellen als prognostisches Kriterium für viele Tumorentitäten, auch wenn bislang nicht einheitlich definiert wurde, ab welchem Färbeindex Zellkerne als „positiv“ gewertet werden. Einige Autoren beurteilten erst einen Färbeindex von mindestens 20% als „hoch“ (Wiesner et al. 2009; Veronese et al. 1993), andere Untersucher (Cheng et al. 1999) definierten bereits 6% positive Zellen als einen hohen Färbeindex. Die Färbeintensität, ab der ein Kern als „positiv“ gewertet wird, ist ebenfalls durch hohe Inter- und Intraobservervariabilität

gekennzeichnet, was unterschiedliche Bewertungen des Ki-67-Index erklären könnte.

Ki-67 wird zudem nicht in allen aktiven Zellzyklus-Phasen gleichmäßig exprimiert. Von Starborg et al. (1996) wurde eine beginnende Expression in der späten G1-Phase beobachtet, Du Manoir et al. (1991) konnten einen weiteren Anstieg in der S-Phase, und später in der G2-Phase feststellen. Die höchsten Werte konnten von beiden Autoren in der Metaphase gesehen werden. Zellen, die sich in der frühen G1-Phase befinden und noch kein Ki-67 exprimieren, können so dem Nachweis entgehen.

Van Oijen et al. (1998) konnten zudem Ki-67 auch in nicht-proliferierenden Zellen nachweisen, insbesondere wenn diese zusätzlich p53 oder p21 überexprimierten. Osteosarkomzellen, deren DNA-Synthese in dem Übergang von G1 zu S oder G2 zu M blockiert war, konnten so weiterhin Ki-67 exprimieren.

Anhand von Gliomzellen konnten Couldwell et al. (1995) zeigen, dass die Ki-67-Expression unter einer zytostatischen Therapie mit Tamoxifen oder Staurosporin deutlich anstieg. Ki-67 allein ist somit kein zuverlässiger Marker zur Abschätzung der Proliferationsrate.

Da p27^{Kip1} und Ki-67 somit unterschiedliche Phasen des Zellzyklus charakterisieren sollen, wäre eine negative Korrelation beider Parameter, das heißt im Rahmen der Tumorgenese ein hoher Proliferationsindex bei einem niedrigen p27^{Kip1}-Index zu erwarten gewesen.

Entgegen diesem theoretischem Ansatz konnten wir weder in der Untersuchung der einzelnen Tumore, noch in der Gesamtheit aller Fälle eine negative Korrelation darstellen. Stattdessen zeigte sich in der Übersicht aller Tumore eine geringe positive Korrelation.

Eine paradoxe positive Korrelation von p27, wie auch p21, mit Ki-67 wurde zuvor bereits von Cheng et al. (1999) für kolorektale Karzinome beschrieben. Andere Autoren (Barbareschi et al. 1996; Yasui et al. 1996) konnten bereits in Mamma- und Magenkarzinomen eine positive Korrelation von p21 und Ki-67 beobachten.

Weitere Untersuchungen bestätigen ein gemischtes Bild. Tan et al. (1997) konnten für Mammakarzinome keine negative Korrelation von Ki-67 und p27^{Kip1} belegen. Nikoleishvili (2008) et al. stellten hingegen für Prostatakarzinome eine negative Korrelation beider Faktoren fest. Kawana et al. (1998) konnten für nicht-kleinzelligen

Lungenkarzinome eine schwache, aber signifikante negative Korrelation zwischen Ki-67 und p27^{Kip1} zeigen, auch wenn beide Marker für sich genommen nicht mit dem Malignitätsgrad oder dem Tumorstadium korrelierten.

Cheng et al. (1999) begründeten die gemeinsame Hochregulation beider Parameter im Tumor dadurch, dass p27^{Kip1} in fortgeschrittenen Stadien vermehrt inaktiviert und reaktiv hochreguliert vorliege.

Wir gehen davon aus, dass sich in den von uns untersuchten Tumorgeweben ein Großteil der Zellen in der späten G1-Phase befanden, so dass es zu einer Überlappung beider Parameter kam.

Ki-67 wird bereits vor dem Eintritt der Zelle in die S-Phase exprimiert (Scholzen und Gerdes 2000), während im Zellkern zwar möglicherweise inaktiviertes, aber noch nicht degradiertes p27^{Kip1} vorliegt (Lloyd et al. 1999). Befinden sich ausreichend Zellen an diesem Übergang, lassen beide Parameter keinen Rückschluss mehr auf Proliferationsarrest oder Proliferation zu und somit keine Rückschlüsse auf die Aggressivität des Tumors.

Für die einzelnen Tumorentitäten konnten wir keinen Zusammenhang zwischen der Höhe der TIMP-1-Expression und dem Tumorstadium oder dem Malignitätsgrad feststellen. Für Harnblasenkarzinome sahen wir generell eine sehr hohe TIMP-1-Expression, in Kolonkarzinomen war TIMP-1 hingegen generell herabreguliert.

Zhao et al. (1998) konnten anhand von gingivalen Fibroblastenzellen nachweisen, dass die höchste Konzentration von TIMP-1 im Zellkern während der S-Phase des Zellzyklus vorlag. Auch von anderen Autoren konnte bereits dargestellt werden, dass die Überexpression von TIMP-1 in verschiedenen Tumoren mit einer schlechteren Prognose assoziiert war (Yoshiji et al. 1998; Zeng et al. 1995). Insbesondere konnte in Mammakarzinomen eine gemeinsame Überexpression von TIMP-1 und des anti-apoptotischen bcl-2-Gens beobachtet werden, die in keinem Zusammenhang mit einer MMP-Aktivierung stand (Li et al. 1999). Tumore, die TIMP-1 in höheren Mengen synthetisierten, wurden unempfindlicher gegenüber Signalen, die sonst intrinsisch oder extrinsisch Apoptose induzierten (Chirco et al. 2006).

Anders stellte sich jedoch die Rolle von TIMP-1 für die Zellproliferation an sich dar. TIMP-1 hatte einen wachstumsinhibierenden Effekt auf gesunde Epithelzellen (Fata et al. 1999). In nicht transformierten Mammaepithelzellen regulierte TIMP-1 das wachstumsfördernde Cyclin D1 herab und stabilisierte den wachstumshemmenden Inhibitor p27^{Kip1} (Taube et al. 2006).

Wir konnten keinen Zusammenhang zwischen der Höhe der TIMP-2-Expression und dem Tumorstadium oder dem Malignitätsgrad für die einzelnen Tumorentitäten feststellen. In Kolon- und Bronchialkarzinomen wurde TIMP-2 generell niedrig exprimiert. Eine signifikante Korrelation von TIMP-2 und p27^{Kip1} oder Ki-67 konnte nicht dargestellt werden, für Mammakarzinome sahen wir lediglich eine positive Assoziation zwischen der Expression von TIMP-2 und p27^{Kip1}.

TIMP-2 bewirkte durch die Modulation von Wachstumsfaktoren einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase von Endothelzellen und inhibierte so die Angiogenese (Seo et al. 2003).

Die TIMP-2-vermittelte Stabilisierung von fibrillärem Typ-Kollagen in Melanomzellen bewirkte in vitro ebenfalls einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase. Dieser Effekt, der direkt auf der MMP-inhibitorischen Funktion beruhte, ging mit einer erhöhten Konzentration von p27^{Kip1} einher (Henriet et al. 1999).

Eine positive Korrelation zwischen der Höhe der TIMP-3-Expression und dem Malignitätsgrad konnten unsere Untersuchungen nur für Bronchialkarzinome bestätigen. TIMP-3 wurde zwar von allen untersuchten Tumoren exprimiert, die Expressionshöhe variierte ansonsten jedoch stark. Somit ließ die Expressionshöhe keine Rückschlüsse auf die Tumorbiologie zu.

Eine positive Korrelation von und TIMP-3 mit p27^{Kip1} konnten wir, ebenso wie eine negative Korrelation mit Ki-67, nicht belegen.

TIMP-3 wird insbesondere in der Mitte der G1-Phase exprimiert, seine Konzentration sinkt bereits vor dem Übergang in die S-Phase des Zellzyklus (Wick et al. 1994). In vitro konnte nach Transfektion mit TIMP-3 eine Abnahme des Zellwachstums und der Proliferation beobachtet werden, die Zellen verblieben zu einem größeren Anteil in der G1-Phase (Bian et al. 1996). Über eine Stabilisierung des p53 TNF- α -Systems kam es darüber hinaus zu einer vermehrten Apoptose

dieser Zellen (Smith et al. 1997). TIMP-3 wurde daher, ähnlich p27^{Kip1}, eine tumorsupprimierende Funktion zugeschrieben.

Eine hohe Expression von TIMP-3 in Tumoren korrelierte in einigen Studien mit einer niedrigeren Malignitätsgraden und einer besseren Prognose (Mylona et al. 2006; Kotzsch et al. 2005; Hilska et al. 2007; Mino et al. 2007). Allerdings führte auch eine Untersuchung zu einem abweichenden Ergebnis, da von Wallard et al. (2006) eine Korrelation von hoher TIMP-3-Expression mit einem höherem Malignitätsgrad für Urothelkarzinome festgestellt konnte.

Die Expression von TIMP-3 wird insbesondere von Wachstumsfaktoren induziert, die durch die MMP-vermittelte Lyse von Extrazellulärmatrix freigesetzt werden. Im Rahmen einer Tumorinvasion ist die Höhe der TIMP-3-Expression damit nicht verwertbar. Zudem zeigten Untersuchungen an transfizierten Mäusen, dass bei einer massiven Überexpression von TIMP zwar die pro-apoptotische Funktion im Vordergrund stand, die in vivo geringeren Konzentrationen aber rasch durch MMP geblockt wurden (Jiang et al. 2002).

Neben den in vivo vorherrschenden antagonistischen Prozessen, kommt auch das Mischbild heterogener Tumore zum Tragen. Durch immunhistochemische Färbung ließ sich TIMP-1 auch in interstitiellen Makrophagen, TIMP-2 in teils eingewanderten Fibroblasten, und TIMP-3 in hoher Konzentration in der elastischen Membran von Blutgefäßen nachweisen (Selman et al. 2000; Vizoso et al. 2007; Jiang et al. 2002). Die gezielten Entnahme von Tumorzellen, z.B. durch Lasermikrodissektion, lieferte andererseits keine Information über die Interaktion von Tumorzelle und Extrazellulärmatrix.

Wir konnten keinen Zusammenhang zwischen der Regulation der TIMP-3-Protein-Expression in den von uns untersuchten Tumoren und der Methylierung von CpG-Inseln, wie sie durch MSP-Analyse erfaßt werden kann, feststellen. In nahezu allen Proben war eine Mischung aus methylierten und unmethylierten Sequenzen nachweisbar.

In anderen Untersuchungen konnte, insbesondere für Ösophagus- und Magenkarzinom-Zelllinien, eine Herabregulation durch vermehrte Methylierung nachgewiesen werden. Für hepatozellulären Karzinom- und Cervixkarzinom-

Zelllinien schien der Methylierungsstatus jedoch keine Bedeutung zu haben (Kang et al. 2000).

6. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war, zu untersuchen, ob die Expression des cyclinabhängigen Proteinkinaseinhibitors p27^{Kip1} und des proliferationsassoziierten Kernproteins Ki-67 mit der Expression von TIMP-1, -2 und -3 assoziiert ist, da diesen Proteinen anti- und pro-apoptische Wirkungen neben den MMP-inhibitorischen Wirkungen zugeschrieben werden. Zusätzlich sollte mittels einer methylierungsspezifischen PCR an einer Gruppe der untersuchten Tumore geprüft werden, ob p27^{Kip1} und TIMP-3 methyliert vorlagen und ob dies Einfluss auf die Proteinexpression hat.

Für sämtliche untersuchte Tumorentitäten konnte keine Beziehung zwischen

- p27^{Kip1}-Index und Tumorstadium oder Malignitätsgrad,
 - Ki-67-Index und Tumorstadium oder Malignitätsgrad,
 - der TIMP-Expression und Tumorstadium oder Malignitätsgrad
- nachgewiesen werden.

Darüber hinaus fand sich keine Assoziation von p27^{Kip1}-Expression, bzw. Ki-67-Index und der Expression von TIMP-1, -2 und -3. Es konnte lediglich in der Zusammenfassung aller Tumorentitäten eine Assoziation von einer niedrigen p27^{Kip1}-Expression mit einem niedrigen Tumordifferenzierungsgrad festgestellt werden.

Die Untersuchungen der Methylierung der zellzyklus-assoziierten Gene p27^{Kip1} und TIMP-3 ergaben jeweils ein Mischbild von unmethylierten und methylierten Sequenzen. Somit konnte keine Assoziation mit der Proteinexpression nachgewiesen werden. Der Grund hierfür ist methodisch; die genetischen Analysen wurden an Homogenisaten von Schnitten durchgeführt, die ein Gemisch an unterschiedlichen Zelltypen aufwiesen, wogegen die immunhistochemische Analyse eine Lokalisation in Tumorzellen erlaubte.

Somit muss zusammenfassend gesagt werden, dass an Tumorproben eine Assoziation von TIMP mit bestimmten Phasen des Zellzyklus nicht nachgewiesen werden konnte, und dass ein Bezug von Methylierungsstatus und Expression zellzyklus-assoziiierter Proteine gleichfalls nicht möglich war.

Die Aussagekraft der Untersuchungen wird eingeschränkt durch die relativ kleine Fallzahl der Proben und die Heterogenität des Untersuchungsmaterials.

Zukünftige Untersuchungen sollten auf größeren Fallzahlen definierter Tumortypen oder Tumorsubtypen aufbauen. Die Methylierungsuntersuchungen sollten an durch

Lasermikrodissektion aufbereiteten, reinen Tumorzellgeweben vorgenommen werden.

7. Anhang

7.1 Mammakarzinome

7.1.1 Tabelle: Ergebnisse Mammakarzinome - Immunhistologie

Fall	Tumortyp	Alter (Jahre)	Tumorstadium	Grad	ÖR	PR	Her2/neu-Score	TIMP-1 (IRS)	TIMP-2 (IRS)	TIMP-3 (IRS)	p27 ^{Kip1} (%)	Mib-1 (%)
M1	invasives ductales Ca, NOS	68	pT1c N0 Mx	I	2	+	0	n.a.	n.a.	n.a.	88,6	9,6
M2	invasives ductales Ca, NOS	46	pT2 Nx Mx	I	2	n.a.	n.a.	5	5	5	1,1	5,1
M3	invasives ductales Ca, NOS	62	pT1c Nx Mx R0	I	2	+	0	2	5	6	83,9	87
M4	invasives ductales Ca, NOS	91	bifokal pT1c Nx Mx	I	2	+	n.a.	5	5	3	89,5	24,8
M5	invasives ductales Ca, NOS	51	pT2 N1 M1 R0	f	2	+	0	4	5	5	85,5	15,1
M6	invasives lobuläres Ca	32	pT2 Nx Mx	f	2	+	0	4	5	5	90,2	16,8
M7	invasives ductal-lobuläres Ca	52	pT1c Nx Mx	I	2	+	n.a.	5	5	5	100	9,3
M8	invasives ductales Ca, NOS	46	pT1c Nx Mx	I	2	-	n.a.	4	5	5	100	90,3
M9	invasives ductales Ca, NOS	50	pT2 Nx Mx	I	2	+	0	5	5	5	96,3	39,6
M10	invasives ductales Ca, NOS	82	pT2 N1 Mx	f	2	+	n.a.	6	2	4	97,2	37,5
M11	invasives duktal-lobuläres Ca	56	pT1b N0 Mx	I	2	+	0	n.a.	n.a.	n.a.	1,3	15,3
M12	invasives ductales Ca NOS	72	pT2 Nx Mx	I	2	n.a.	n.a.	5	6	5	100	12,1
M13	invasives ductales Ca, NOS	39	pT1c Nx Mx	f	2	+	3	5	5	4	n.a.	n.a.
M14	invasives ductales Ca, NOS	78	pT1c Nx Mx	I	2	+	n.a.	3	5	5	n.a.	n.a.
M15	invasives ductales Ca, NOS	76	pT1b Nx Mx	I	2	+	n.a.	4	5	5	n.a.	n.a.
M16	invasives lobuläres Ca, NOS	74	pT1c N0 Mx I	I	2	+	2	6	0	6	n.a.	n.a.
M17	invasives duktal-lobuläres Ca	82	pT3 N2a Mx I-d	f	3	-	2	6	4	6	0,8	31,3
M18	invasives ductales Ca, NOS	79	pT1c N0 Mx d	I	2	+	0	6	3	6	n.a.	n.a.
M19	invasives ductales Ca, NOS	68	pT1c N0 Mx d	I	3	+	1	6	4	5	22,9	9,6
M20	invasives ductales Ca, NOS	62	pT1c N1a Mx d	f	3	-	3	6	4	6	38,6	28,5
M21	invasives ductales Ca, NOS	58	pT3a N1 Mx a-d	f	2	+	3	4	3	6	97,9	27,7
M22	invasives lobuläres Ca, NOS	58	pT3 N3 Mx a-I	f	2	+	0	6	0	5	37,8	33
M23	invasives ductales Ca, NOS	65	pT1b N0 Mx d	I	2	+	0	6	0	6	37,4	8,9

+ = Rezeptor vorhanden
- = Rezeptor nicht vorhanden

7.1.2 Tabelle: Ergebnisse Mammakarzinome - PCR

Fall	Tumortyp	Alter (Jahre)	Tumorstadium	Grad	p27 ^{KIP1}				Timp-3	
					R1- methyl	R2- methyl	R3- methyl	R3- unmethyl	methyl	unmethyl
M16	invasives lobuläres Ca, NOS	74	pT1c ND Mx I	2	+	+	-	-	+	+
M17	invasives duktal-lobuläres Ca	82	pT3 N2a Mx I-d	3	-	+	+	+	+	+
M18	invasives ductales Ca, NOS	79	pT1c ND Mx d	2	-	+	-	+	-	+
M19	invasives ductales Ca, NOS	68	pT1c ND Mx d	3	-	-	+	+	+	+
M20	invasives ductales Ca, NOS	62	pT1c N1a Mx d	3	+	+	-	+	+	+
M21	invasives ductales Ca, NOS	58	pT3a N1 Mx a-d	2	+	+	-	-	+	+
M22	invasives lobuläres Ca, NOS	58	pT3 N3 Mx a-l	2	-	+	-	-	+	+
M23	invasives ductales Ca, NOS	65	pT1b ND Mx d	2	-	+	+	-	+	+

+ = PCR-Produkt vorhanden
 - = kein PCR-Produkt vorhanden

7.2 Prostatakarzinome

7.2.1 Tabelle: Ergebnisse Prostatakarzinome - Immunhistologie

Fall	Tumortyp	Alter (Jahre)	Tumorstadium	Grad (Gleason Score)	TIMP-1 (IRS)	TIMP-2 (IRS)	TIMP-3 (IRS)	p27 ^{Kip1} (%)	Mib-1 (%)
P1	Adenokarzinom	49	pT2a N0 Mx I	6 (3+3)	0	4	4	80,7	11,7
P2	Adenokarzinom	60	pT3a N0 Mx f	6 (3+3)	0	2	5	63	2,1
P3	Adenokarzinom	54	pT2b N0 Mx I	5 (2+3)	3	5	5	91	2,1
P4	Adenokarzinom	63	pT3a N0 Mx f	6 (3+3)	5	5	5	n.a.	3,3
P5	Adenokarzinom	58	pT4 N0 Mx f	5 (2+3)	0	4	5	84,3	10,9
P6	Adenokarzinom	53	pT3a N0 Mx f	6 (3+3)	0	5	5	83,7	n.a.
P7	Adenokarzinom	68	pT3a N0 Mx f	5 (2+3)	3	5	3	93,5	2,3
P8	Adenokarzinom	64	pT2a N1 Mx f	8 (5+3)	0	4	3	41,3	9,4
P9	Adenokarzinom	70	pT2b N0 Mx I	6 (3+3)	0	4	4	67	1,1
P10	Adenokarzinom	62	pT2b N0 Mx I	3 (1+2)	0	5	4	100	1
P11	Adenokarzinom	68	pT3b N0 Mx f	8 (4+4)	3	4	5	57,8	21,1
P12	Adenokarzinom	69	pT1b N0 Mx I	6 (3+3)	0	4	4	n.a.	n.a.
P13	Adenokarzinom	74	pT2c N0 Mx I	6 (3+3)	5	3	6	56	1,1
P14	Adenokarzinom	64	pT3b N0 Mx f	8 (5+3)	6	4	6	79,4	12,1
P15	Adenokarzinom	63	pT3b N1 Mx f	7 (4+3)	5	5	6	72,6	5,8
P16	Adenokarzinom	69	pT2c N0 Mx I	6 (3+3)	6	4	6	100	6,2
P17	Adenokarzinom	60	pT3a N0 Mx f	7 (3+4)	6	4	6	100	23,7
P18	Adenokarzinom	63	pT2c N0 Mx I	7 (3+4)	5	4	5	1,4	4,1

7.2.2 Tabelle: Ergebnisse Prostatakarzinome - PCR

Fall	Tumortyp	Alter (Jahre)	Tumorstadium	Grad (Gleason Score)	p27 ^{KIP1}				Timp-3	
					R1-methyl	R2-methyl	R3-methyl	R3-unmethyl	methyl	unmethyl
P13	Adenokarzinom	74	pT2c N0 Mx	I	6 (3+3)	+	+	+	-	+
P14	Adenokarzinom	64	pT3b N0 Mx	f	8 (5+3)	+	+	-	-	+
P15	Adenokarzinom	63	pT3b N1 Mx	f	7 (4+3)	+	+	-	-	+
P16	Adenokarzinom	69	pT2c N0 Mx	I	6 (3+3)	-	+	-	-	+
P17	Adenokarzinom	60	pT3a N0 Mx	f	7 (3+4)	+	+	-	-	+
P18	Adenokarzinom	63	pT2c N0 Mx	I	7 (3+4)	-	+	-	-	+

+ = PCR-Produkt vorhanden
 - = kein PCR-Produkt vorhanden

7.3 Harnblasenkarzinome

7.3.1 Tabelle: Ergebnisse Harnblasenkarzinome - Immunhistologie

Fall	Tumortyp	Alter	Geschl.	Tumorstadium	Grad	TIMP-1 (IRS)	TIMP-2 (IRS)	TIMP-3 (IRS)	p27 ^{Kip1} (%)	Mib-1 (%)
U1	UrothelCa	58	m	pT3b N0 M0 R1	3	6	4	6	6,3	86,3
U2	UrothelCa	70	w	pT4a N2 Mx R0	3	6	4	6	8	31,6
U3	UrothelCa	62	m	pT3b N0 Mx R0	2	5	2	5	0	17,5
U4	UrothelCa	86	m	pT4a Nx Mx R0	3	5	4	6	32,5	40,6
U5	UrothelCa	75	m	pT4a N1 Mx R1	3	5	5	3	0	8
U6	UrothelCa	67	m	pT2a N0 Mx R0	3	6	4	6	29,7	37,6
U8	UrothelCa	68	m	pT4a N2 M1 R1	2	6	4	4	46,8	47,2

7.3.2 Tabelle: Ergebnisse Harnblasenkarzinome - PCR

Fall	Tumortyp	Alter	Geschl.	Tumorstadium	Grad	p27 ^{KIP1}				Timp-3	
						R1- methyl	R2- methyl	R3- methyl	R3- unmethyl	methyl	unmethyl
U1	UrothelCa	58	m	pT3b N0 M0 R1	I	3	-	+	+	-	-
U2	UrothelCa	70	w	pT4a N2 Mx R0	f	3	-	+	+	-	+
U3	UrothelCa	62	m	pT3b N0 Mx R0	I	2	+	+	-	-	-
U4	UrothelCa	86	m	pT4a Nx Mx R0	f	3	+	+	+	-	+
U5	UrothelCa	75	m	pT4a N1 Mx R1	f	3	-	+	+	+	+
U6	UrothelCa	67	m	pT2a N0 Mx R0	I	3	-	-	+	-	+
U8	UrothelCa	68	m	pT4a N2 M1 R1	f	2	+	-	+	-	+

+ = PCR-Produkt vorhanden
 - = kein PCR-Produkt vorhanden

7.4 Nierenkarzinome

7.4.1 Tabelle: Ergebnisse Nierenkarzinome - Immunhistologie

Fall	Tumortyp	Alter (Jahre)	Geschl.	Tumorstadium	Grad	TIMP-1 (IRS)	TIMP-2 (IRS)	TIMP-3 (IRS)	p27KIP1 (%)	Mib-1 (%)
N1	klarzelliges NierenzellCa	68	w	pT3a Nx Mx	f 2	0	4	4	82,4	3,2
N2	klarzelliges NierenzellCa	63	w	pT3c Nx Mx	f 2	4	3	3	74,3	2,3
N3	klarzelliges NierenzellCa	57	m	pT3b Nx Mx	f 3	4	0	5	17,9	17
N4	klarzelliges NierenzellCa	48	m	pT1a Nx Mx	l 1	0	2	0	74,9	6,1
N5	klarzelliges NierenzellCa	70	w	pT3b Nx Mx	f 2	2	2	5	87,8	1,3
N6	klarzelliges NierenzellCa	61	m	pT1b Nx Mx	l 2	4	4	5	19,9	5,7
N7	klarzelliges NierenzellCa	72	m	pT3a Nx Mx	f 2	3	4	5	44,2	28,6
N8	chromophobes NierenzellCa	47	m	pT3a pN1 Mx	f 3	5	5	4	n.a.	8,2
N9	papilläres NierenzellCa	63	m	pT1 N1 Mx	f 2	5	5	4	6,2	n.a.
N10	klarzelliges NierenzellCa	55	m	pT2 pNx pMx	l 2	4	4	4	n.a.	89,7
N11	papilläres NierenzellCa	68	m	pT1a Nx Mx	f 1	5	5	5	n.a.	90,6
N13	papilläres NierenzellCa	63	m	pT2 ND Mx	l 2	5	3	5	n.a.	n.a.
N14	klarzelliges NierenzellCa	75	m	pT3a Nx Mx	f 2	4	3	3	n.a.	n.a.
N15	klarzelliges NierenzellCa	69	m	pT3a Nx Mx	f 2	4	4	4	n.a.	n.a.
N16	klarzelliges NierenzellCa	58	m	pT3b pND pM1	f 2	5	4	5	n.a.	n.a.
N17	klarzelliges NierenzellCa	73	m	pT1a Nx M1SKI	f 3	5	4	3	32,7	6
N18	klarzelliges NierenzellCa	68	m	pT2 Nx M1OSS	f 3	6	5	6	29,2	1,8
N19	klarzelliges NierenzellCa	61	m	pT3b Nx Mx	f 2	5	3	4	30,3	14,8
N20	klarzelliges NierenzellCa	68	m	pT3a ND Mx	f 2	5	2	3	23,6	2,2
N21	klarzelliges NierenzellCa	48	m	pT2 Nx Mx	l 1	6	3	3	24,6	4,8
N22	klarzelliges NierenzellCa	69	w	pT1a Nx Mx	l 1	6	0	4	94,2	4
N23	klarzelliges NierenzellCa	38	w	pT1b Nx Mx	l 2	6	2	4	30,3	4,4

7.4.2 Tabelle: Ergebnisse Nierenkarzinome - PCR

Fall	Tumortyp	Alter (Jahre)	Geschl.	Tumorstadium	Grad	p27 ^{KIP1}				Timp-3	
						R1- methyl	R2- methyl	R3- methyl	R3- unmethyl	methyl	unmethyl
N17	klarzelliges NierenzellCa	73	m	pT1a Nx M1SKI	f	3	-	+	+	+	+
N18	klarzelliges NierenzellCa	68	m	pT2 Nx M1OSS	f	3	+	+	-	+	+
N19	klarzelliges NierenzellCa	61	m	pT3b Nx Mx	f	2	-	+	+	+	+
N20	klarzelliges NierenzellCa	68	m	pT3a ND Mx	f	2	+	+	-	+	+
N21	klarzelliges NierenzellCa	48	m	pT2 Nx Mx	l	1	+	+	+	+	+
N22	klarzelliges NierenzellCa	69	w	pT1a Nx Mx	l	1	-	+	-	+	-
N23	klarzelliges NierenzellCa	38	w	pT1b Nx Mx	l	2	-	+	-	+	-

+ = PCR-Produkt vorhanden
 - = kein PCR-Produkt vorhanden

7.5 Lungenkarzinome

Tabelle: Ergebnisse Lungenkarzinome - Immunhistologie

Fall	Tumortyp	Alter (Jahre)	Geschl.	Tumorstadium	Grad	TIMP-1 (IRS)	TIMP-2 (IRS)	TIMP-3 (IRS)	p27 ^{Kip1} (%)	Mib-1 (%)
L1	invasives PlattenepithelCa	50	m	pT2 N1 Mx	f	4	n.a.	5	4	17,7
L2	invasives PlattenepithelCa	52	w	pT4 N2 Mx	f	5	2	5	81	12,3
L3	invasives PlattenepithelCa	65	m	pT2 N2 Mx	f	2	0	5	17,4	83,7
L4	invasives PlattenepithelCa	67	m	pT1 N1 Mx	f	5	2	5	89,6	68,9
L5	invasives PlattenepithelCa	58	m	pT1 ND Mx	l	3	0	5	18,8	5,4
L6	invasives PlattenepithelCa	63	m	pT2 ND Mx	l	2	3	5	86,9	71,3
L7	bronchoalveoläres Ca	61	m	pT4 ND Mx	f	4	2	4	31,7	5,6
L8	invasives PlattenepithelCa	78	m	pT2 N1 Mx	f	5	0	5	80,9	34,5
L9	invasives PlattenepithelCa	78	m	pT1 ND Mx	l	2	4	5	33,4	63,4

7.6. Kolonkarzinome

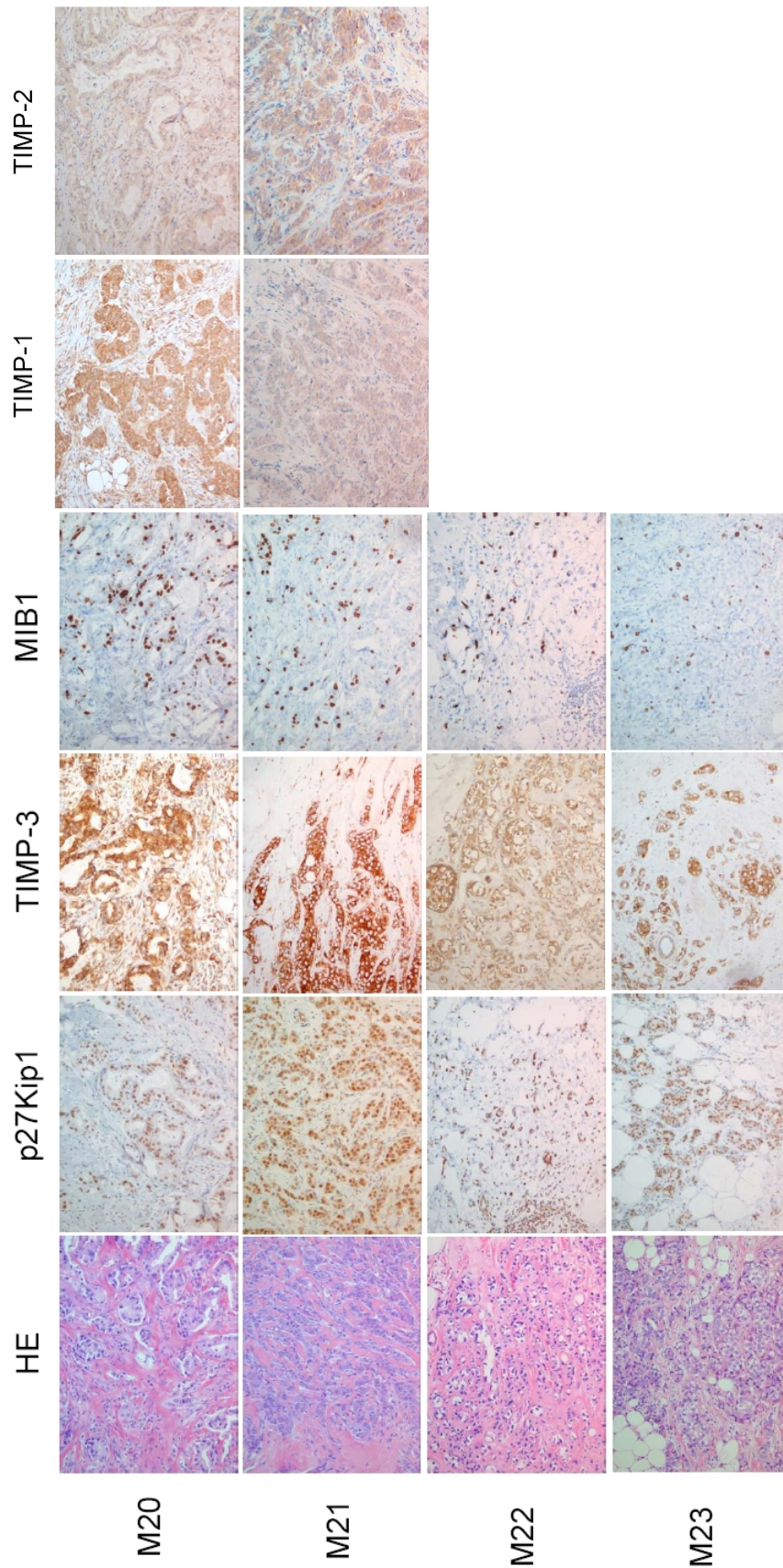
Tabelle: Ergebnisse Kolonkarzinome - Immunhistologie

Fall	Tumortyp	Alter (Jahre)	Geschl.	Tumorstadium	Grad	TIMP-1 (IRS)	TIMP-2 (IRS)	TIMP-3 (IRS)	p27Kip1 (%)	Mib-1 (%)
C2	Adenokarzinom	72	m	pT3 N1 Mx	f	2	0	5	72,7	74,7
C3	Adenokarzinom	73	w	pT3c N0 Mx	l	3	0	5	19,1	74,4
C4	Adenokarzinom	68	m	pT3a N2 Mx	f	2	0	4	38,4	92,9
C5	Adenokarzinom	79	m	pT4 N2 M1	f	3	0	0	0	43,1
C6	Adenokarzinom	61	w	pT2 N1 M1	f	2	3	5	63,4	67,5
C7	Adenokarzinom	66	m	pT4 N2 Mx	f	2	0	4	92,3	65,7
C8	Adenokarzinom	70	w	pT2 N1 Mx	f	2	4	5	n.a.	n.a.
C10	Adenokarzinom	59	w	pT2 N0 Mx	l	2	0	4	n.a.	n.a.

7.7 Immunhistochemische Färbungen an Mammakarzinomen

Abbildung 7.1 stellt die immunhistochemischen Färbungen an Mammakarzinomen entsprechend den in Tabelle 7.1.1 aufgeführten Fällen dar.

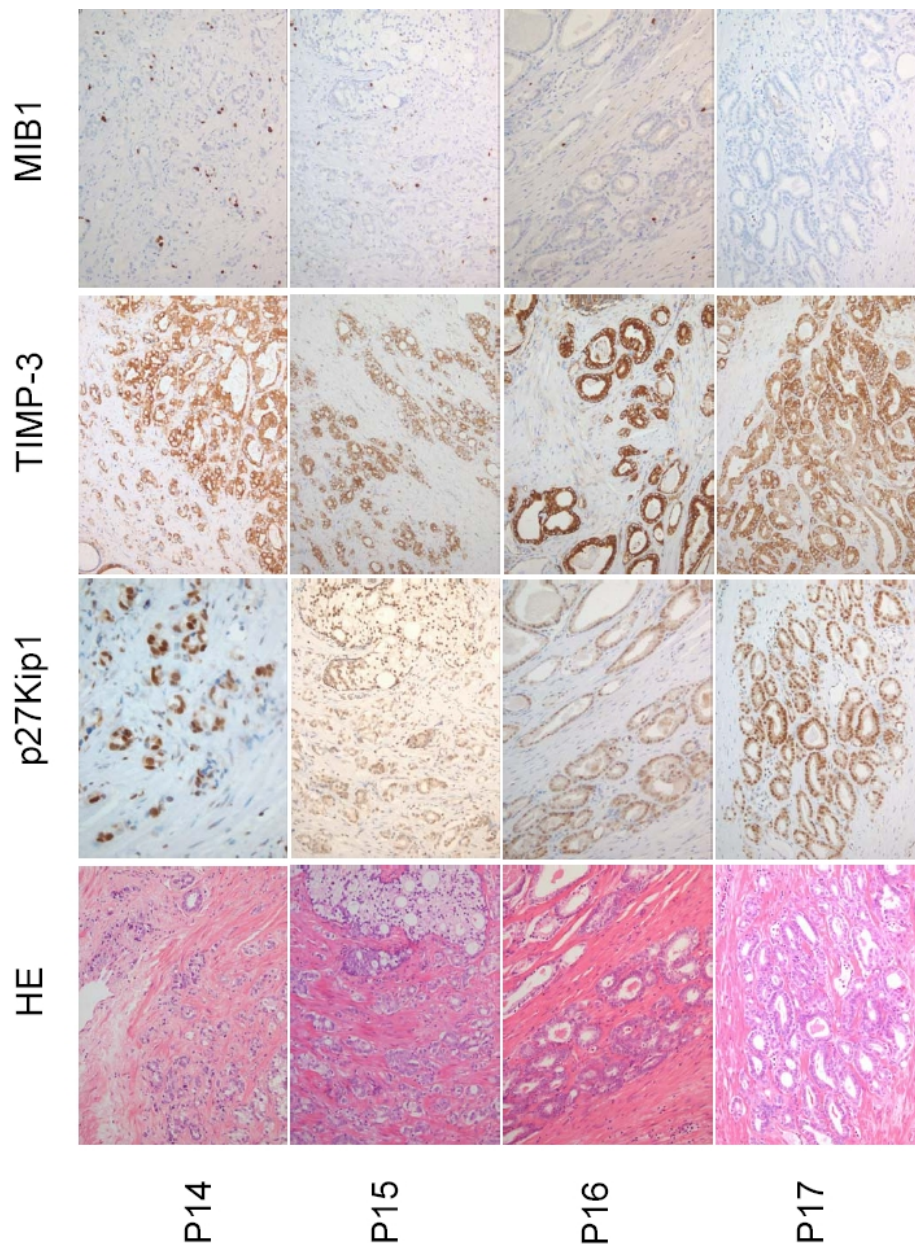
Abb. 7.1



7.8 Immunhistochemische Färbungen an Prostatakarzinomen

Abbildung 7.2 stellt die immunhistochemischen Färbungen an Prostatakarzinomen entsprechend den in Tabelle 7.2.1 aufgeführten Fällen dar.

Abb. 7.2



7.9 Tabelle: Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse

	Mamma	Prostata	Harnblase	Niere	Lunge	Kolon
p27 ^{Kp1} / TNM	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	n.a.
p27 ^{Kp1} / Grad	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	n.a.	n.a.
Ki-67 / TNM	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	n.a.
Ki-67 / Grad	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	n.a.	n.a.
TIMP-1 / TNM	p>0,05	p>0,05	n.a.	p>0,05	p>0,05	n.a.
TIMP-2 / TNM	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	n.a.	n.a.
TIMP-3 / TNM	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	n.a.
TIMP-1 / Grad	p>0,05	p>0,05	n.a.	p>0,05	p>0,05	n.a.
TIMP-2 / Grad	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	n.a.	n.a.
TIMP-3 / Grad	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,05	n.a.
p27 ^{Kp1} / Ki-67	p=0,34 r=0,24	p>0,05 r=0,78	p>0,05 r=0,63	p<0,05 r=0,38	p>0,05 r=0,26	p>0,05 r=0,14
TIMP-2 / p27 ^{Kp1}	pos. Assoziation	p>0,05	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
TIMP-2 / Ki-67	p>0,05	p>0,05	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
TIMP-3 / p27 ^{Kp1}	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	n.a.	n.a.
TIMP-3 / Ki-67	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	n.a.	n.a.

8. Literaturverzeichnis

- Aaltomaa S, Lipponen P, Vesalainen S, Ala-Opas M, Eskelinen M, Syrjanen K** (1997 a): Value of Ki-67 immunolabelling as a prognostic factor in prostate cancer. *Eur Urol* 32 (4), 410-415
- Aaltomaa S, Lipponen P, Ala-Opas M, Eskelinen M, Syrjanen K** (1997 b): Prognostic value of Ki-67 expression in renal cell carcinomas. *Eur Urol* 31 (3), 350-355
- Arbiser JL, Moses MA, Fernandez CA, Ghiso N, Cao Y, Klauber N, Frank D, Brownlee M, Flynn E, Parangi S** (1997): Oncogenic H-ras stimulates tumor angiogenesis by two distinct pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (3), 861-866
- Auerkari EI** (2006): Methylation of tumor suppressor genes p16(INK4a), p27(Kip1) and E-cadherin in carcinogenesis. *Oral Oncol* 42 (1), 5-13
- Bachman KE, Herman JG, Corn PG, Merlo A, Costello JF, Cavenee WK, Baylin SB, Graff J** (1999): Methylation-associated silencing of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene suggests a suppressor role in kidney, brain, and other human cancers. *Cancer Res* 59 (4), 798-802
- Barbareschi M, Caffo O, Doglioni C, Fina P, Marchetti A, Buttitta F, Leek R, Morelli L, Leonardi E, Bevilacqua G** (1996): p21WAF1 immunohistochemical expression in breast carcinoma: correlations with clinicopathological data, oestrogen receptor status, MIB1 expression, p53 gene and protein alterations and relapse-free survival. *Br J Cancer* 74 (2), 208-215
- Belkhiri A, Richards C, Whaley M, McQueen SA, Orr FW** (1997): Increased expression of activated matrix metalloproteinase-2 by human endothelial cells after sublethal H₂O₂ exposure. *Lab Invest* 77 (5), 533-539
- Bhuvaramurthy V, Kristiansen GO, Johannsen M, Loening SA, Schnorr D, Jung K, Staack A** (2006): In situ gene expression and localization of metalloproteinases MMP1, MMP2, MMP3, MMP9, and their inhibitors TIMP1 and TIMP2 in human renal cell carcinoma. *Oncol Rep* 15 (5), 1379-1384
- Bian J, Wang Y, Smith MR, Kim H, Jacobs C, Jackman J, Kung H, Colburn NH, Sun Y** (1996): Suppression of in vivo tumor growth and induction of suspension cell death by tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3. *Carcinogenesis* 17 (9), 1805-1811

Bigg HF, Shi YE, Liu YE, Steffensen B, Overall CM (1997): Specific, high affinity binding of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) to the COOH-terminal hemopexin-like domain of human gelatinase A *J Biol Chem* 272 (24) 15496-15500

Bond M, Murphy G, Bennett MR, Amour A, Knauper V, Newby AC, Baker AH (2000): Localization of the death domain of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 to the N terminus. *J Biol Chem* 275 (52), 41358-41363

Burcombe R, Wilson GD, Dowsett M, Khan I, Richman PI, Daley F, Detre S, Makris A (2006): Evaluation of Ki-67 proliferation and apoptotic index before, during and after neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer. *Breast Cancer Res* 8 (3), R31

Catzavelos C, Bhattacharya N, Ung YC, Wilson JA, Roncari L, Sandhu C, Shaw P, Yeger H, Morava-Protzner I, Kapusta L (1997): Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nat Med* 3 (2), 227-230

Cheng JD, Werness BA, Babb JS, Meropol NJ (1999): Paradoxical correlations of cyclin-dependent kinase inhibitors p21waf1/cip1 and p27kip1 in metastatic colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res* 5 (5), 1057-1062

Cheville JC, Lloyd RV, Sebo TJ, Cheng L, Erickson L, Bostwick DG, Lohse CM, Wollan P (1998): Expression of p27kip1 in prostatic adenocarcinoma. *Mod Pathol* 11 (4), 324-328

Chirco R, Liu XW, Jung KK, Kim HR (2006): Novel functions of TIMPs in cell signaling. *Cancer Metastasis Rev* 25 (1), 99-113

Ciaparrone M, Yamamoto H, Yao Y, Sgambato A, Cattoretti G, Tomita N, Monden T, Rotterdam H, Weinstein IB (1998): Localization and expression of p27KIP1 in multistage colorectal carcinogenesis. *Cancer Res* 58 (1), 114-122

Clark IM, Swingler TE, Young DA (2007): Acetylation in the regulation of metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinases gene expression. *Front Biosci* 12, 528-535

Cote RJ, Shi Y, Groshen S, Feng AC, Cordon-Cardo C, Skinner D, Lieskovosky G (1998): Association of p27Kip1 levels with recurrence and survival in patients with stage C prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 90 (12), 916-920

Couldwell WT, Weiss MH, Law RE, Hinton DR (1995): Paradoxical elevation of Ki-67 labeling with protein kinase inhibition in malignant gliomas. *J Neurosurg* 82 (3), 461-468

De Azambuja E, Cardoso F, de Castro G, Colozza M, Mano MS, Durbecq V, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart-Gebhart MJ, Paesmans M (2007): Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12 155 patients. *Br J Cancer* 96 (10), 1504-1513

Demarchi LM, Reis MM, Palomino SA, Farhat C, Takagaki TY, Beyruti R, Saldiva PH, Capelozzi VL (2000): Prognostic values of stromal proportion and PCNA, Ki-67, and p53 proteins in patients with resected adenocarcinoma of the lung. *Mod Pathol* 13 (5), 511-520

Deng X, Bhagat S, Dong Z, Mullins C, Chinni SR, Cher M (2006): Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 induces apoptosis in prostate cancer cells and confers increased sensitivity to paclitaxel. *Eur J Cancer* 42 (18), 3267-3273

Du Manoir S, Guillaud P, Camus E, Seigneurin D, Brugal G (1991): Ki-67 labeling in postmitotic cells defines different Ki-67 pathways within the 2c compartment. *Cytometrie* 12 (5), 455-463

Esposito V, Baldi A, De Luca A, Groger AM, Loda M, Giordano GG, Caputi M, Baldi F, Pagano M, Giordano A (1997): Prognostic role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 57 (16), 3381-3385

Fata JE, Leco KJ, Moorehead RA, Martin DC, Khokha R (1999): Timp-1 is important for epithelial proliferation and branching morphogenesis during mouse mammary development. *Dev Biol* 211 (2), 238-254

Fredersdorf S, Burns J, Milne AM, Packham G, Fallis L, Gillett CE, Royds JA, Peston D, Hall PA, Hanby AM (1997): High level expression of p27(kip1) and cyclin D1 in some human breast cancer cells: inverse correlation between the expression of p27(kip1) and degree of malignancy in human breast and colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94 (12), 6380-6385

Garbett EA, Reed MW, Brown NJ (1999): Proteolysis in human breast and colorectal cancer. *Br J Cancer* 81 (2), 287-293

Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP (1997): Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 74 (2), 111-122

Gonzalez LO, Corte MD, Vazquez J, Junquera S, Sanchez R, Vina A, Rodriguez JC, Lamelas ML, Vizoso F (2008): Study of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in ductal in situ carcinomas of the breast. *Histopathology* 53 (4), 403-415

Gouyer V, Conti M, Devos P, Zerimech F, Copin MC, Creme E, Wurtz A, Porte H, Huet G (2005): Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 is an independent predictor of prognosis in patients with nonsmall cell lung carcinoma who undergo resection with curative intent. *Cancer* 103 (8), 1676-1684

Greene J, Wang M, Liu YE, Raymond LA, Rosen C, Shi YE (1996): Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J Biol Chem* 271 (48), 30375-30380

Grignon DJ, Sakr W, Toth M, Ravery V, Angulo J, Shamsa F, Pontes JE, Crissman JC, Fridman R (1996): High levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) expression are associated with poor outcome in invasive bladder cancer. *Cancer Res* 56 (7), 1654-1659

Hagemann T, Gunawan B, Schulz M, Fuzesi L, Binder C (2001): mRNA expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors differs in subtypes of renal cell carcinomas. *Eur J Cancer* 37 (15), 1839-1846

Hennenlotter J, Ohneseit PA, Simon P, Merseburger AS, Serth J, Kuehs U, Kramer M, Hartmann JT, Stenzl A, Kuczyk MA (2008): PTEN and p27Kip1 are not downregulated in the majority of renal cell carcinomas--implications for Akt activation. *Oncol Rep* 19 (5), 1141-1147

Henriet P, Blavier L, Declerck YA (1999): Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) in invasion and proliferation. *APMIS* 107 (1), 111-119

Hershko DD, Shapira M (2006): Prognostic role of p27Kip1 deregulation in colorectal cancer. *Cancer* 107 (4), 668-675

Hilska M, Roberts PJ, Collan YU, Laine VJ, Kossi J, Hirsimaki P, Rahkonen O, Laato M (2007): Prognostic significance of matrix metalloproteinases-1, -2, -7 and -13 and tissue inhibitors of metalloproteinases-1, -2, -3 and -4 in colorectal cancer. *Int J Cancer* 121 (4), 714-723

Hoikkala S, Paakko P, Soini Y, Makitaro R, Kinnula V, Turpeenniemi-Hujanen T (2006): Tissue MMP-2 and MMP-9 are better prognostic factors than serum MMP-2/TIMP-2-complex or TIMP-1 in stage I-III lung carcinoma. *Cancer Lett* 236 (1), 125-132

Holten-Andersen MN, Hansen U, Brunner N, Nielsen HJ, Illemann M, Nielsen BS (2005): Localization of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) in human colorectal adenoma and adenocarcinoma. *Int J Cancer* 113 (2), 198-206

Iniesta P, Moran A, De Juan C, Gomez A, Hernando F, Garcia-Aranda C, Frias C, Diaz-Lopez A, Rodriguez-Jimenez FJ, Balibrea JL (2007): Biological and clinical significance of MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 17 (1), 217-223

Ioachim E (2008): Expression patterns of cyclins D1, E and cyclin-dependent kinase inhibitors p21waf1/cip1, p27kip1 in colorectal carcinoma: correlation with other cell cycle regulators (pRb, p53 and Ki-67 and PCNA) and clinicopathological features. *Int J Clin Pract* 62 (11), 1736-1743

Jalava P, Kuopio T, Juntti-Patinen L, Kotkansalo T, Kronqvist P, Collan Y (2006): Ki67 immunohistochemistry: a valuable marker in prognostication but with a risk of misclassification: proliferation subgroups formed based on Ki67 immunoreactivity and standardized mitotic index. *Histopathology* 48 (6), 674-682

Jiang Y, Goldberg ID, Shi YE (2002): Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene* 21 (14), 2245-2252

Kaldis P (2007): Another piece of the p27Kip1 puzzle. *Cell* 128 (2), 241-244

Kang SH, Choi HH, Kim SG, Jong HS, Kim NK, Kim SJ, Bang YJ (2000): Transcriptional inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene by dna hypermethylation of the 5'-CpG island in human gastric cancer cell lines. *Int J Cancer* 68 (5), 632-635

Kawana H, Tamaru J, Tanaka T, Hirai A, Saito Y, Kitagawa M, Mikata A, Harigaya K, Kuriyama T (1998): Role of p27Kip1 and cyclin-dependent kinase 2 in the proliferation of non-small cell lung cancer. *Am J Pathol* 153 (2), 505-513

Kibel AS, Christopher M, Faith DA, Bova GS, Goodfellow PJ, Isaacs WB (2001): Methylation and mutational analysis of p27(kip1) in prostate carcinoma. *Prostate* 48 (4), 248-253

Kotzsch M, Farthmann J, Meye A, Fuessel S, Baretton G, Tjan-Heijnen VC, Schmitt M, Luther T, Sweep FC, Magdolen V (2005): Prognostic relevance of uPAR-del4/5 and TIMP-3 mRNA expression levels in breast cancer. *Eur J Cancer* 41 (17), 2760-2768

Leco KJ, Khokha R, Pavloff N, Hawkes SP, Edwards DR (1994): Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) is an extracellular matrix-associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse cells and tissues. *J Biol Chem* 269 (12), 9352-9360

Lee S, Desai KK, Iczkowski KA, Newcomer RG, Wu KJ, Zhao YG, Tan WW, Roycik MD, Sang QX (2006): Coordinated peak expression of MMP-26 and TIMP-4 in preinvasive human prostate tumor. *Cell Res* 16 (9), 750-758

Li G, Fridman R, Kim HR (1999): Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 inhibits apoptosis of human breast epithelial cells. *Cancer Res* 59 (24), 6267-6275

Lichtinghagen R, Musholt PB, Lein M, Romer A, Rudolph B, Kristiansen G, Hauptmann S, Schnorr D, Loening SA, Jung K (2002): Different mRNA and protein expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in benign and malignant prostate tissue. *Eur Urol* 42 (4), 398-406

Lloyd RV, Erickson LA, Jin L, Kulig E, Qian X, Cheville JC, Scheithauer BW (1999): p27kip1: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers. *Am J Pathol* 154 (2), 313-323

Lu XQ, Levy M, Weinstein IB, Santella RM (1991): Immunological quantitation of levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human colon cancer. *Cancer Res* 51, 6231-6235

Lübbert M, Claus R (2007): Epigenetische Inaktivierung von Genexpression. *Onkologe* 13, 46-55

Mannello F, Gazzanelli G (2001): Tissue inhibitors of metalloproteinases and programmed cell death: conundrums, controversies and potential implications. *Apoptosis* 6 (6), 479-482

Merseburger AS, Serth J, von der Heyde E, Kobierski A, Wegener U, Mengel M, Jonas U, Kuczyk M (2007): Heterogeneous p27(Kip1) expression within primary renal cell cancers, their invasive margins and peritumoral renal parenchyma correlation with pathological and prognostic features. *Urol Int* 79 (2), 164-169

Mino N, Takenaka K, Sonobe M, Miyahara R, Yanagihara K, Otake Y, Wada H, Tanaka F (2007): Expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) and its prognostic significance in resected non-small cell lung cancer. *J Surg Oncol* 95 (3), 250-257

Miyata Y, Kanda S, Nomata K, Hayashida Y, Kanetake H (2004): Expression of metalloproteinase-2, metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in transitional cell carcinoma of upper urinary tract: correlation with tumor stage and survival. *Urology* 63 (9), 602-608

Moul JW (1999): Angiogenesis, p53, bcl-2 and Ki-67 in the progression of prostate cancer after radical prostatectomy. *Eur Urol* 35 (5-6), 399-407

Murphy AN, Unsworth EJ, Stetler-Stevenson WG (1993): Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits bFGF-induced human microvascular endothelial cell proliferation. *J Cell Physiol* 157 (2), 151-158

Mylona E, Magkou C, Giannopoulou I, Agrogiannis G, Markaki S, Keramopoulos A, Nakopoulou L (2006): Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP)-3 protein in invasive breast carcinoma: relation to tumor phenotype and clinical outcome. *Breast Cancer Res* 8 (5), R57

Nariculam J, Freeman A, Bott S, Munson P, Cable N, Brookman-Amisshah N, Williamson M, Kirby RS, Masters J, Feneley M (2008): Utility of tissue microarrays for profiling prognostic biomarkers in clinically localized prostate cancer: the expression of BCL-2, E-cadherin, Ki-67 and p53 as predictors of biochemical failure after radical prostatectomy with nested control for clinical and pathological risk factors. *Asian J Androl* 11 (1), 109-118

Nguyen VN, Mirejovsky P, Mirejovsky T, Melinova L, Mandys V (2000) : Expression of cyclin D1, Ki-67 and PCNA in non-small cell lung cancer: prognostic significance and comparison with p53 and bcl-2. *Acta Histochem* 102 (3), 323-338

Nikoleishvili D, Pertia A, Trsintsadze O, Gogokhia N, Managadze L, Chkhotua A (2008): Expression of p27((Kip1)), cyclin D3 and Ki67 in BPH, prostate cancer and hormone-treated prostate cancer cells. *Int Urol Nephrol* 40 (4), 953-959

Paik KH, Park YH, Ryoo BY, Yang SH, Lee JC, Kim CH, Ki SS, Kim JM, Park MJ, Ahn HJ (2006): Prognostic value of immunohistochemical staining of p53, bcl-2, and Ki-67 in small cell lung cancer. *J.Korean Med Sci* 21 (1), 35-39

Pan MR, Chuang LY, Hung WC (2001): Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit matrix metalloproteinase-2 expression via repression of transcription in lung cancer cells. *FEBS Lett* 508 (3), 365-368

Pertia A, Nikoleishvili D, Trsintsadze O, Gogokhia N, Managadze L, Chkhotua A (2007): Prognostic significance of p27(Kip 1) expression in renal cell carcinoma. *Georgian Med News* 143 (12), 12-17

Potemski P, Pluciennik E, Bednarek AK, Kusinska R, Kubiak R, Jesionek-Kupnicka D, Watala C, Kordek R (2006): Ki-67 expression in operable breast cancer: a comparative study of immunostaining and a real-time RT-PCR assay. *Pathol Res Pract* 202 (7), 491-495

Pulukuri SM, Patibandla S, Patel J, Estes N, Rao JS (2007): Epigenetic inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) gene in human prostate tumors. *Oncogene* 26 (36), 5229-5237

Quinn DI, Henshall SM, Sutherland RL (2005): Molecular markers of prostate cancer outcome. *Eur J Cancer* 41 (6), 858-887

Radomski A, Jurasz P, Sanders EJ, Overall CM, Bigg HF, Edwards DR, Radomski MW (2002): Identification, regulation and role of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) in human platelets. *Br J Pharmacol* 137 (8), 1330-1338

Radovic S, Vukobrat-Bijedic Z, Selak I, Babic M (2006): Expression of p53, bcl-2, and Ki-67 proteins in the inflammatory regenerative and dysplastic epithelial lesions of flat colonic mucosa. *Bosn J Basic Med Sci* 6 (1), 39-45

Ray JM, Stetler-Stevenson WG (1994): The role of matrix metalloproteases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur Respir J* 7 (11), 2062-2072

Ries C, Kolb H, Petrides PE (1994): Regulation of 92-kD gelatinase release in HL-60 leukemia cells: tumor necrosis factor-alpha as an autocrine stimulus for basal- and phorbol ester-induced secretion. *Blood* 83 (12), 3638-3646

Rosenblatt R, Jonmarker S, Lewensohn R, Egevad L, Sherif A, Kalkner KM, Nilsson S, Valdman A, Ullen A (2008): Current status of prognostic immunohistochemical markers for urothelial bladder cancer. *Tumour Biol* 29 (5), 311-322

Sanchez-Beato M, Camacho FI, Martinez-Montero JC, Saez AI, Villuendas R, Sanchez-Verde L, Garcia JF, Piris MA (1999): Anomalous high p27/KIP1 expression in a subset of aggressive B-cell lymphomas is associated with cyclin D3 overexpression. p27/KIP1-cyclin D3 colocalization in tumor cells. *Blood* 94 (2), 765-772

Santos LL, Amaro T, Pereira SA, Lameiras CR, Lopes P, Bento MJ, Oliveira J, Criado B, Lopes CS (2003): Expression of cell-cycle regulatory proteins and their prognostic value in superficial low-grade urothelial cell carcinoma of the bladder. *Eur J Surg Oncol* 29 (1), 74-80

Scholzen T, Gerdes J (2000): The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182 (3), 311-322

Selman M, Ruiz V, Cabrera S, Segura L, Ramirez R, Barrios R, Pardo A (2000): TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279 (3), 562-574

Seo DW, Li H, Guedez L, Wingfield PT, Diaz T, Salloum R, Wei BY, Stetler-Stevenson WG (2003): TIMP-2 mediated inhibition of angiogenesis: an MMP-independent mechanism. *Cell* 114 (2), 171-180

Smith MR, Kung H, Durum SK, Colburn NH, Sun Y (1997): TIMP-3 induces cell death by stabilizing TNF-alpha receptors on the surface of human colon carcinoma cells. *Cytokine* 9 (10), 770-780

Starborg M, Gell K, Brundell E, Hoog C (1996): The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. *J Cell Sci* 109, 143-153

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

Still K, Robson CN, Autzen P, Robinson MC, Hamdy FC (2000): Localization and quantification of mRNA for matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 (TIMP-2) in human benign and malignant prostatic tissue. *Prostate* 42 (1), 18-25

Tan P, Cady B, Wanner M, Worland P, Cukor B, Magi-Galluzzi C, Lavin P, Draetta G, Pagano M, Loda M (1997): The cell cycle inhibitor p27 is an independent prognostic marker in small (T1a,b) invasive breast carcinomas. *Cancer Res* 57 (7), 1259-1263

Taube ME, Liu XW, Fridman R, Kim HR (2006): TIMP-1 regulation of cell cycle in human breast epithelial cells via stabilization of p27(KIP1) protein. *Onkogene* 25 (21), 3041-3048

Thomas P, Khokha R, Shepherd FA, Feld R, Tsao MS (2000): Differential expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in non-small cell lung cancer. *J Pathol* 190 (2), 150-156

Traub F, Mengel M, Luck HJ, Kreipe HH, von Wasielewski R (2006): Prognostic impact of Skp2 and p27 in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 99 (2), 185-191

Tsihlias J, Kapusta LR, DeBoer G, Morava-Protzner I, Zbieranowski I, Bhattacharya N, Catzavelos GC, Klotz LH, Slingerland JM (1998): Loss of cyclin-

dependent kinase inhibitor p27Kip1 is a novel prognostic factor in localized human prostate adenocarcinoma. *Cancer Res* 58 (3), 542-548

Urbanski SJ, Edwards DR, Hershfield N, Huchcroft SA, Shaffer E, Sutherland L, Kossakowska AE (1993): Expression pattern of metalloproteinases and their inhibitors changes with the progression of human sporadic colorectal neoplasia. *Diagn Mol Pathol* 2 (2), 81-89

Van Oijen MG, Medema RH, Slootweg PJ, Rijksen G (1998): Positivity of the proliferation marker Ki-67 in noncycling cells. *Am J Clin Pathol* 110 (1), 24-31

Veronese SM, Gambacorta M, Gottardi O, Scanzi F, Ferrari M, Lampertico P (1993): Proliferation index as a prognostic marker in breast cancer. *Cancer* 71 (12), 3926-3931

Vizoso FJ, Gonzalez LO, Corte MD, Rodriguez JC, Vazquez J, Lamelas ML, Junquera S, Merino AM, Garcia-Muniz JL (2007): Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. *Br J Cancer* 96 (6), 903-911

Wallard MJ, Pennington CJ, Veerakumarasivam A, Burt G, Mills IG, Warren A, Leung HY, Murphy G, Edwards DR, Neal DE (2006): Comprehensive profiling and localisation of the matrix metalloproteinases in urothelial carcinoma. *Br J Cancer* 94 (4), 569-577

Wang M, Liu YE, Greene J, Sheng S, Fuchs A, Rosen EM, Shi YE (1997): Inhibition of tumor growth and metastasis of human breast cancer cells transfected with tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *Oncogene* 14 (23), 2767-2774

Wick M, Burger C, Brusselbach S, Lucibello FC, Muller R (1994): A novel member of human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) gene family is regulated during G1 progression, mitogenic stimulation, differentiation, and senescence. *J Biol Chem* 269 (29), 18953-18960

Wiesner FG, Magener A, Fasching PA, Wesse J, Bani MR, Rauh C, Jud S, Schrauder M, Loehberg CR, Beckmann MW (2009): Ki-67 as a prognostic molecular marker in routine clinical use in breast cancer patients. *Breast* 18 (2), 135-141

Woessner JF (2001): That impish TIMP: the tissue inhibitor of metalloproteinases-3. *J Clin Invest* 108 (6), 799-800

Worm J, Bartkova J, Kirkin AF, Straten P, Zeuthen J, Bartek J, Guldborg P (2000): Aberrant p27Kip1 promoter methylation in malignant melanoma. *Oncogene* 19 (44), 5111-5115

Yang RM, Naitoh J, Murphy M, Wan HJ, Phillipson J, deKernion JB, Loda M, Reiter RE (1998): Low p27 expression predicts poor disease-free survival in patients with prostate cancer. *J Urol* 159 (3), 941-945

Yasui W, Akama Y, Kuniyasu H, Yokozaki H, Semba S, Shimamoto F, Tahara E (1996): Expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 in non-neoplastic mucosa and neoplasia of the stomach: relationship with p53 status and proliferative activity. *J Pathol* 180 (2), 122-128

Yatabe Y, Masuda A, Koshikawa T, Nakamura S, Kuroishi T, Osada H, Takahashi T, Mitsudomi T (1998): p27KIP1 in human lung cancers: differential changes in small cell and non-small cell carcinomas. *Cancer Res* 58 (5), 1042-1047

Yoshiji H, Harris SR, Raso E, Gomez DE, Lindsay CK, Shibuya M, Sinha CC, Thorgeirsson UP (1998): Mammary carcinoma cells over-expressing tissue inhibitor of metalloproteinases-1 show enhanced vascular endothelial growth factor expression. *Int J Cancer* 75 (1), 81-87

Zeng ZS, Cohen AM, Zhang ZF, Stetler-Stevenson W, Guillem JG (1995): Elevated tissue inhibitor of metalloproteinase 1 RNA in colorectal cancer stroma correlates with lymph node and distant metastases. *Clin Cancer Res* 1 (8), 899-906

Zhao WQ, Li H, Yamashita K, Guo XK, Hoshino T, Yoshida S, Shinya T, Hayakawa T (1998): Cell cycle-associated accumulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in the nuclei of human gingival fibroblasts. *J Cell Sci* 111, 1147-1153

Lebenslauf

Am 6.11.1976 wurde ich als erstes Kind des Richters am Amtsgericht Wolfgang Heimann und der Oberstudienrätin Mareile Heimann, geborene Carrié, in Bielefeld geboren. Von 1983 bis 1987 besuchte ich die Grundschule Am Bültmannshof in Bielefeld. Es folgte der Wechsel an das Max-Planck-Gymnasium Bielefeld, welches ich im Juni 1996 mit Erlangung der allgemeinen Hochschulreife abschloss.

Zum Wintersemester 1996 nahm ich das Studium der Rechtswissenschaften an der Universität Bielefeld auf. Zum Wintersemester 1997 wechselte ich zum Studium der Humanmedizin an die Georg-August-Universität Göttingen. Die ärztliche Vorprüfung erfolgte im September 1999, der erste Abschnitt der ärztlichen Prüfung ein Jahr darauf und der zweite Abschnitt im April 2003. Das Praktische Jahr absolvierte ich von April bis Juni 2003 am Mayo General Hospital in Castlebar/Irland. Von Juni 2003 bis April 2004 erfolgte die weitere Ausbildung am Krankenhaus Links der Weser in Bremen, welches Lehrkrankenhaus der Universität Göttingen ist. Mein Studium beendete ich mit dem dritten Abschnitt der ärztlichen Prüfung am 26.04.2004.

Seit dem 01.06.2004 bin ich im Elisabeth-Kinderkrankenhaus des Klinikums Oldenburg angestellt. Bis zum 30.09.2004 arbeitete ich zunächst als Ärztin im Praktikum, ab dem 01.10.2004 als vollbeschäftigte Assistenzärztin in Weiterbildung. Am 07.07.2009 absolvierte ich die Prüfung zur Fachärztin für Kinderheilkunde und Jugendmedizin und befinde mich seither in der Fachweiterbildung Neonatologie.

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Untersuchungen führte ich zwischen Juni 2000 und Februar 2003 unter der Anleitung von PD Dr. med. B. Hemmerlein durch.