

**MMP- und TIMP-Isoformen in Pleuraergüssen unterschiedlicher Genese und
physiologischer Pleuralavage**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Lörx, Rainer
aus Berlin, Charlottenburg

Gießen 2004

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
Medizinischen Klinik II und Poliklinik
Leiter: Prof. Dr. med. Werner Seeger
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. med. Werner Seeger

Gutachter: PD Dr. rer. nat. Günter Lochnit

Tag der Disputation: 15. Februar 2005

Für meine Eltern

Ever tried? Ever failed?
No matter.
Try again. Fail again. Fail better.

Samuel Beckett
(1906-1989)

<i>Abkürzungen</i>		<i>I</i>
<i>Erklärung</i>		<i>IV</i>
1	<i>EINLEITUNG</i>	<i>1</i>
1.1	Pleuraergüsse	1
1.1.1	Allgemein	1
1.2	Transsudat und Exsudat	1
1.2.1	Die Light-Kriterien	1
1.2.2	Ätiologie	2
1.2.3	Pathomechanismus	2
1.3	Die extrazelluläre Matrix	3
1.3.1	Allgemein	3
1.3.2	Dynamische Gleichgewicht der EZM	3
1.4	Die Matrix Metalloproteasen	4
1.4.1	Allgemein	4
1.4.2	Enzymfamilie der MMP	5
1.4.3	Grundstruktur der MMP	6
1.4.4	Regelmechanismen der MMP-Aktivität	6
1.4.5	Aktivierung der MMP	7
1.5	Die Inhibitoren der Matrix Metalloproteasen	8
1.5.1	TIMP-Isoformen	8
1.6	Untersuchungen im Pleuraspalt	10
1.7	Kontext der Arbeit	10
1.8	Fragestellung	11
2	<i>PATIENTENKOLLEKTIV</i>	<i>11</i>
2.1	Übersicht über Diagnosegruppen	11
2.2	Pleuraergüsse	11
2.2.1	Klinische und laborchemische Daten der Patienten mit Transsudaten	12
2.2.2	Klinische und laborchemische Daten der Patienten mit parapneumonischen Exsudaten	14
2.2.3	Klinische und laborchemische Daten der Patienten mit paraneoplastischen Exsudaten	16
2.3	Pleuralavagen	18
2.3.1	Klinische und laborchemische Daten von Patienten der Pleuralavagen	18
3	<i>MATERIAL UND METHODEN</i>	<i>20</i>
3.1	Klinisches Untersuchungsmaterial	20

3.1.1	Gewinnung der Pleuraergüsse _____	20
3.1.2	Gewinnung der Pleuralavagen _____	20
3.2	Enzyme _____	20
3.3	Proteinstandard _____	21
3.4	Chemikalien und Geräte _____	21
3.5	Zusammensetzung der Analysegeällösung für die Gelatinzymographie _____	22
3.6	Zusammensetzung der Sammelgeällösung für die Gelatinzymographie _____	22
3.7	Lösungen und Puffer _____	23
3.8	Prinzip der Gelelektrophorese _____	23
3.9	Gelatinzymographie _____	24
3.9.1	Prinzip der Gelatinzymographie _____	24
3.9.2	Herstellung eines 8% SDS-Polyacrylamid Mini Gels mit 0,1% Gelatine _____	25
3.9.3	Durchführung der Gelatinzymographie _____	25
3.10	Gelatinzymographie und Proteasen-Inhibitoren _____	26
3.11	„Enzyme-linked immuno sorbent assay“ (ELISA) _____	26
3.11.1	Prinzip des ELISA _____	26
3.11.2	Durchführung des ELISA _____	27
3.11.2.1	Allgemein _____	27
3.11.2.2	Für MMP-1 _____	27
3.11.2.3	Für MMP-2 _____	28
3.11.2.4	Für MMP-9 _____	28
3.11.2.5	Für TIMP-1 _____	29
3.11.2.6	Für TIMP-2 _____	29
3.12	Proteinbestimmung _____	29
3.13	Quantitative Daten und statistische Analysen _____	30
4	<i>ERGEBNISSE</i> _____	31
4.1	Zymographie _____	31
4.1.1	Nachweis von MMP-2 und MMP-9 in der Gelatinzymographie _____	31
4.1.2	Unterscheidung gelatinolytischer Aktivität _____	32
4.1.3	Gelatinzymographie von Pleuraergüssen _____	34
4.1.4	Gelatinzymographie von Pleuralavagen _____	36
4.1.5	Vergleich der einzelnen MMP-Bandenmuster in der Gelatinzymographie _____	36
4.2	Quantitative Daten (ELISA) und Statistische Ergebnisse _____	37
4.2.1	Analyse der absoluten Werte _____	37

4.2.1.1	MMP- und TIMP-Isoformen in der Gesamtheit der Proben	37
4.2.1.1.1	MMP-1-Isoform	39
4.2.1.1.2	MMP-2-Isoform	41
4.2.1.1.3	MMP-9-Isoform	43
4.2.1.1.4	TIMP-1-Isoform	45
4.2.1.1.5	TIMP-2-Isoform	47
4.2.1.2	MMP- und TIMP-Isoformen in Pleuralavagen	49
4.2.1.3	MMP- und TIMP-Isoformen in Pleuraergüssen und Pleuralavagen als Einzelwertdarstellung	51
4.2.1.4	Zusammenfassung	52
4.2.2	Analyse der absoluten Werte bezogen auf den Protein-Gehalt	53
4.2.2.1	MMP- und TIMP-Isoformen in der Gesamtheit der Proben	54
4.2.2.1.1	MMP-1-Isoform	55
4.2.2.1.2	MMP-2-Isoform	57
4.2.2.1.3	MMP-9-Isoform	58
4.2.2.1.4	TIMP-1-Isoform	60
4.2.2.1.5	TIMP-2-Isoform	62
4.2.2.2	MMP- und TIMP-Isoformen in Pleuralavagen	63
4.2.2.3	MMP- und TIMP-Isoformen in Pleuraergüssen und Pleuralavagen als Einzelwertdarstellung	65
4.2.2.4	Zusammenfassung	66
4.3	Vergleich der Ergebnisse von Zymographie und ELISA-Analysen	67
4.4	Schlussfolgerung	69
5	<i>DISKUSSION</i>	69
5.1	MMP- und TIMP-Isoformen im Kompartiment der Lunge	69
5.2	MMP und Pleuraergüsse	71
5.3	Ziel dieser Arbeit: Analyse der MMP- und TIMP-Isoformen in der Flüssigkeit von Pleuraergüssen und Pleuralavagen	73
5.4	Serinproteasen und MMP in der Gelatinzymographie	73
5.5	Identifizierung der MMP- und TIMP-Isoformen	74
5.5.1	Eigenschaften und Charakterisierung der MMP-1-Isoform	75
5.5.2	Eigenschaften und Charakterisierung der MMP-2-Isoform	75
5.5.3	Eigenschaften und Charakterisierung der MMP-9-Isoform	76
5.5.4	Eigenschaften und Charakterisierung der TIMP-Isoformen	79
5.6	Ergebnisse anhand der MMP- und TIMP-Expressionsmuster	83
5.7	Beurteilung	84

6	ZUSAMMENFASSUNG	86
7	SUMMARY	87
8	LITERATURVERZEICHNIS	89
9	DANKSAGUNG	98
10	LEBENS LAUF	99
11	Patientendaten- Pleuraergüsse	I
12	Patientendaten- Pleuralavagen	VIII

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
ANOVA	„analysis of variances“, Varianzanalyse
APMA	4-Aminophenyl-Quecksilberazetat
APS	Ammoniumsulfat
ARDS	„adult respiratory distress syndrome“, akutes Lungenversagen, (syn. Schocklunge)
BAL	bronchoalveoläre Lavage
bFGF	„basic fibroblast growth factor“
BPB	Bromphenolblau
bzw.	beziehungsweise
C	paraneoplastische Exsudate
ca.	circa
Ca	Karzinom
Ca ²⁺	Calcium
CBB	Coomassie Brilliant Blau
CH	Schweiz
Cl	Chlor
D	Deutschland
Dat.	Datum
d.F.	der Fälle
d.h.	das heißt
DTT	Dithiothreitol
ECL	„enhanced chemiluminescence“
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EGF	„endothelial growth factor“
ELISA	„enzyme-linked immuno sorbent assay“
entspr.	entspricht
evtl.	eventuell
EZM	extrazelluläre Matrix
Fc	„fragment crystalline“, Immunglobulinfragment nach Aufspaltung durch Papain
g/l	Gramm pro Liter

GB	Großbritannien
Geb.	Geburts
geom. MW	geometrischer Mittelwert
h	Stunde
i.d.R.	in der Regel
i.e.S.	im engeren Sinne
i.R.	im Rahmen
i.S.	im Sinne
IFN- γ	Interferon- γ
IgG	Immunglobulin-G
IL-1	Interleukin-1
kDa	Kilo Dalton = 1000 Dalton
Konf.-Int.	Konfidenzintervall
LDH	Laktatdehydrogenase
log	Logarithmus einer reellen Zahl zur Basis 10
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molar
mA	Milliamper
min.	Minuten
ml	Milliliter = 10^{-3} Liter
mm	Millimeter = 10^{-3} Meter
mM	Millimolar = 10^{-3} Mol
MMP	Matrix Metalloproteasen
mRNA	„messenger-ribonucleic acid“, Messenger-Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
n	Anzahl
Na	Natrium
Na ₂ HPO ₄	Natriumphosphat
ng	Nanogramm = 10^{-9} Gramm
NGF	„nerve growth factor“
nm	Nanometer = 10^{-9} Meter
n.m.	nicht messbar
OD	„optical density“, optische Dichte
o.g.	oben genannte

OP	Operation
P	parapneumonische Exsudate
PAGE	Polyacrylamid-Gel Elektrophorese
PAI	„plasminogen activator inhibitors“
PDGF	„platelet-derived growth factor“
pH	negative dekadische Logarithmus der H ⁺ -Ionen-Konzentration in Mol pro Liter
PL	Pleuralavage
PMA	Phorbol-Myristatessigsäure
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Fluorid
POD	Peroxidase
Prot.	Protein
Punkt.	Punktion
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SERPINE	„serine protease inhibitors“
syn.	synonym
T	Transsudate
Tab.	Tabelle
TBST	„tris-buffered saline and Tween“
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- α , - β	„transforming growth factor- α , - β “
TIMP	„tissue inhibitors of metalloproteases“
TNF- α	„tumor necrosis factor- α “
TPA	12-O-Tetradecanoyl Phorbol-13-Azetat
t-PA	„tissue-type plasminogen activator“
Tris-HCl	Tris-Salzsäure
u.a.	unter anderem
U/l	„units per liter“ Einheiten pro Liter
u-PA	„urokinase-type plasminogen activator“
UpM	Umdrehungen pro Minute
USA	Vereinigten Staaten von Amerika
UV	Ultraviolett

μl	Mikroliter = 10^{-6} Liter
V.a.	Verdacht auf
vs.	versus
vWF	von-Willebrand-Faktor
z.B.	zum Beispiel
Zn^{2+}	Zink
Z.n.	Zustand nach

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niederlegt sind, eingehalten.

1 EINLEITUNG

1.1 Pleuraergüsse

1.1.1 Allgemein

Pleuraergüsse sind definiert als Flüssigkeitsansammlungen im Pleuraspalt über das normale Maß hinaus, d.h. mehr als 20 ml (SEEGER 1991). Sie sind nicht Ursache, sondern Symptom eines pathologischen Zustandes, eines Ungleichgewichtes zwischen Bildung und Abbau von Pleuraflüssigkeit (SAHN 1988).

Häufig ist ein Pleuraerguss Ausdruck einer Erkrankung, die von der Lunge oder der Pleura selbst ausgeht. Die Ursache kann jedoch auch extrapulmonal sein: z.B. kardiogen (Herzinsuffizienz, Myokardinfarkt), nephrogen (nephrotisches Syndrom), hepatogen (Hepatitis, Zirrhose mit Aszites), pankreatogen (akute Pankreatitis), systemisch: z.B. bei Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis (rheumatoide Arthritis, systemischer Lupus erythematodes), i.R. einer infektiösen Erkrankung (durch z.B. Mykobakterien, Viren, Pilze, Parasiten) oder iatrogen: als Folge einer medikamentösen Therapie (z.B. Nitrofurantoin) oder einer Strahlentherapie (CLASSEN et al. 1993, SAHN 1988, LIGHT 1995).

Die untere Nachweisgrenze für Pleuraergüsse liegt radiologisch zwischen 100 und 300 ml (BERKMAN UND KRAMER 1993, CLASSEN et al. 1993). Sonographisch können bereits Mengen ab 10 ml erfasst werden (MÜLLER 1997).

1.2 Transsudat und Exsudat

1.2.1 Die Light-Kriterien

Durch eine diagnostische Thorakozentese lässt sich Ergussflüssigkeit gewinnen und anschließend ätiologisch einteilen. Als Standard zur Unterscheidung zwischen Transsudat und Exsudat dienen die Light-Kriterien. Demnach gilt für ein Exsudat mindestens eines der drei folgenden Kriterien (LIGHT et al. 1972, LIGHT 1995, BURGESS et al. 1995, BERKMAN und KRAMER 1993):

- 1) Der Quotient aus Erguss- zu Serumproteingehalt ist größer als 0,5.
- 2) Der Quotient aus Erguss- zu Serum-LDH-Gehalt ist größer als 0,6.
- 3) Der Laktatdehydrogenase (LDH)-Gehalt in der Ergussflüssigkeit ist größer als zwei Drittel des oberen Normwertes des Serum-LDH-Gehalts, d.h. >200 U/l (Classen et al. 1993).

1.2.2 Ätiologie

Transsudate sind definiert als nichtentzündliche Ergüsse, die auf Grund hydrostatischer oder onkotischer Druckdifferenzen oder durch Flüssigkeitsverschiebung aus dem peritonealen Raum entstehen. Im Falle eines Transsudats sind i.d.R. keine weiteren diagnostischen Schritte erforderlich und die Therapie richtet sich nach der zugrunde liegenden Erkrankung (z.B. Herzinsuffizienz, Leberzirrhose oder nephrotisches Syndrom). Ist der Erguss ein Exsudat, schließen sich weitere Fragen nach dessen Grunderkrankung an und eine umfassendere Diagnostik ist indiziert (LIGHT 1997).

Bei Exsudaten steht eine Entzündung der Pleura, der pleuralen Mesothelzellen, im Vordergrund. Die Folge ist eine Beeinträchtigung der Lymphdrainage aus dem Pleuraspalt. Diese können bei Infektionen, Neoplasien, immunologischen und abdominellen Erkrankungen oder Erkrankungen i.B. der Lymphbahnen auftreten. (SAHN 1988, LIGHT 1995, ANTONY 2002).

1.2.3 Pathomechanismus

Jeder Pleuraerguss ist demzufolge Ausdruck eines Ungleichgewichtes zwischen Flüssigkeitsbildung (mikrovaskulärer Filtration) und/oder lymphatischer Drainagekapazität (HAMM 1997, MISEROCCHI 1997). Bei der Genese von Exsudaten sind entzündliche und antifibrinolytische Prozesse grundlegend beteiligt, z.B. durch:

- Lokal gesteigerte Produktion (Mesothelzellen) inflammatorischer Zytokine, z.B. Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8), welche via Chemotaxis zu einer deutlichen Erhöhung der neutrophilen Granulozytenzahl im Pleuraraum führen (ANTONY et al. 1993, PARK et al. 2003).
- Gesteigerte Expression von Wachstumsfaktoren wie z.B. „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) oder „transforming growth factor-beta1“ (TGF- β 1) (LÖRX et al. 1998, CEYHAN et al. 2002).
- Gesteigerte Produktion von Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren (PAI-1, PAI-2 möglich) durch ortsansässige (Mesothel- und Endothelzellen) und eingewanderte Zellen (neutrophile Granulozyten, Monocyten), angeregt durch Zytokine wie z.B.: Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), Interleukin-1 (IL-1). Konsekutiv wird die Plasminaktivierung vermindert, d.h. die Inhibition der Fibrinolyse gesteigert (PHILIP-JOËT et al 1995, IDELL et al. 1991).

Zudem korreliert der erhöhte Pleuraspiegel von PAI- mit der Neutrophilen-Zellzahl und dem von-Willebrand-Faktor-(vWF)-Spiegel in der Pleuraflüssigkeit sowie dem Fibrinogen-Plasmaspiegel i.S. eines entzündlichen Prozesses (PHILIP-JOËT et al. 1995).

Ein weiterer Ausdruck der proinflammatorischen Veränderungen innerhalb des Pleuraspalts ist das verstärkte Auftreten von proteolytischen und matrixdegradierenden Enzymen, die durch ortständige Pleurazellen und eingewanderte neutrophile Granulozyten synthetisiert und abgegeben werden (HUREWITZ et al. 1992, O'CONNOR et al. 1994).

Eine freie bzw. unzureichend gehemmte proteolytische Aktivität dieser Proteasen kann die intakte Mesothelschicht, sowie subpleurale Strukturen (z.B. die Basalmembran) schädigen. Die Folge ist eine Auflösung von Zellverbindungen der den Pleuraraum auskleidenden Mesothelzellen (i.e.S. der Zonulae occludentes, der sog. „tight junctions“) und somit einer Permeabilitätsänderung des Kapillarbettes. Ein Verlust der Schrankenfunktion zwischen Kapillar- und Pleuraraum führt zu gesteigertem Flüssigkeits-, Zell- und Proteineinstrom in den Pleuraspalt. Dieser wird durch prokoagulatorische und verminderte fibrinolytische Verhältnisse weiter verstärkt (MARSHALL et al. 1993): Fibringerinnsel behindern die für die Flüssigkeitsdrainage elementar wichtigen Lymphlakunen der Pleura parietalis (SAHN 1988, IDELL et al. 1991). Somit wird deutlich, welche grundlegende Bedeutung dem dynamischen Gleichgewicht von matrixdegradierenden und matrixkonservierenden Kräften zukommt.

1.3 Die extrazelluläre Matrix

1.3.1 Allgemein

Für die Struktur eines Gewebes ist die Einbettung der Zellen in die extrazelluläre Matrix (EZM) von besonderer Bedeutung. Sie besteht aus den Bestandteilen der Basalmembran und des interstitiellen Bindegewebes. Die EZM bildet ein dichtes Netz aus Kollagen, Proteoglykan, Elastin, Laminin und Fibronectin. Dies trägt entscheidend zur Stabilisierung der Parenchymzellen und zur Formgebung des Organkompartimentes bei. Um den spezifischen Anforderungen des jeweiligen Gewebes Rechnung zu tragen, variiert die Zusammensetzung der EZM zwischen den einzelnen Gewebetypen (STRYER 1991, DUNSMORE et al. 1996, LAURENT 1987).

1.3.2 Dynamische Gleichgewicht der EZM

Zudem ist die EZM kein statisches Gewebe sondern einem ständigen, situationsabhängigen Umbau unterworfen. Dieser Umbau kann auf drei verschiedenen Ebenen erfolgen:

- 1) der Neusynthese und extrazellulären Ablagerung von EZM-Molekülen;
- 2) dem Abbau der EZM-Bestandteile durch Proteasen und
- 3) der Hemmung proteolytischer Aktivität durch Proteasen-Inhibitoren (DUNSMORE et al. 1996).

So weist EICKELBERG et al. (1997) auf die Bedeutung eines dynamischen Gleichgewichtes zwischen proteolytischen und antiproteolytischen Enzymen im Falle von Erkrankungen als auch bei Heilungsprozessen der Pleura hin.

Bei der Degradation der EZM-Bestandteile spielen vier verschiedene Proteasen-Antiproteasen-Systeme eine Rolle (DAVIES et al. 1992, DUNSMORE et al. 1996, NAGASE und OKADA 1997):

- 1) Aspartinproteasen (wie z.B. Kathepsin D, Pepsinogen-1 bis -3) und Pepstatine;
- 2) Zysteinproteasen (wie z.B. Kathepsin B und L) und Zystatine;
- 3) Serinproteasen (wie z.B. Neutrophile Elastase, Plasmin, Kathepsin G, Kallikrein, „tissue-type“ (t-PA) oder „urokinase-type“ (u-PA) Plasminogenaktivator) und Serinproteasen-Inhibitoren (SERPINE für „serine protease inhibitors“) wie z.B. Plasminogenaktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) oder -2 (PAI-2);
- 4) Matrix Metalloproteasen (MMP) und deren Inhibitoren (TIMP für „tissue inhibitors of metalloproteases“).

Bei der Degradation der extrazellulären Matrix kommt den MMP eine Schlüsselrolle zu: MMP sind grundlegend am täglichen Kollagenumsatz beteiligt, bei der Lunge mehr als 10% der gesamten Kollagenmasse, und ihre proteolytische Aktivität ist synergistisch gegen alle EZM-Bestandteile, wie Kollagen, Proteoglykan, Elastin und Laminin, gerichtet (LAURENT 1987, DUNSMORE et al. 1996).

Hinzu kommt, dass MMP auch zirkulierende, zelloberflächengebundene oder perizelluläre Eiweiße degradieren können. Sie nehmen so Einfluss auf (i) Zell-Zell- und Zell-Gewebe-Interaktion, (ii) die Freisetzung, Aktivierung oder Inaktivierung von autokrinen oder parakrinen Signalmolekülen und (iii) der entscheidenden Aktivierung oder Inaktivierung von Zelloberflächenrezeptoren. (STERNLICHT und WERB 2001).

1.4 Die Matrix Metalloproteasen

1.4.1 Allgemein

Die proteolytische Aktivität der Matrix Metalloproteasen (MMP) spielt eine grundlegende Rolle bei:

- physiologischen Prozessen wie: Wachstum (WERB und CHIN 1998), Knochenentwicklung (MARTIGNETTI et al. 2001), Wundheilung und Epithelialisierung (LUND et al. 1999, LOHI et al. 2001, MOHAN et al. 2002), Ovulation und Uterusinvolution (WOESSNER 1989, FATA et al. 2000), Nidation der Blastozyste und Embryogenese (MATRISIAN 1990, HERRLER et al. 2003), Angiogenese (BURBRIDGE et al. 2002);

- pathologischen Vorgängen wie: Metastasierung und Tumorinvasion (ALVAREZ et al. 1990, LIOTTA et al. 1991, DECLERCK et al. 1992, SREENATH et al. 1992, ONISTO et al. 1993, MONTGOMERY et al. 1994, NAWROCKI et al. 1997, JUNG et al. 1997, KOSSAKOWSKA et al. 1998, VALENTE et al. 1998, OVERALL und LOPEZ-OTIN 2002, LYNCH und MATRISIAN 2002), Multipler Sklerose (OPDENAKKER et al. 2003), rheumatoider Arthritis (MURPHY und HEMBRY 1992, HIROSE et al. 1992, ISHIGURO et al. 1996), Osteoarthritis (OTHA et al. 1998), Periodontitis (BIRKEDAL-HANSEN 1993, SORSA et al. 1994, EJEIL et al. 2003), Arteriosklerose (LI et al. 1996, KNOX et al. 1997, IKEDA und SHIMADA 2003);
- verschiedenen Lungenerkrankungen wie: Asthma bronchiale (VIGNOLA et al. 1998, CATALDO et al. 2002), chronisch obstruktive Bronchitis (BELVISI und BOTTOMLEY 2003, ATKINSON und SENIOR 2003), Lungenemphysem (TETLEY 1993, FINLAY et al. 1997, TETLEY 1997), idiopathische Lungenfibrose (HAYASHI et al. 1996, EICKELBERG et al. 1999, ATKINSON und SENIOR 2003, BEEH et al. 2003), Bronchiektasen (SEPPER et al. 1994, SEPPER et al. 1995), Mukoviszidose (DELACOURT et al. 1995), Lungentuberkulose (CHANG et al. 1996) und bei dem akuten Lungenversagen (ARDS für „adult respiratory distress syndrome“) (BITTERMAN 1992, RICOU et al. 1996, DECLAUX et al. 1997, OHBAYASHI 2002).

1.4.2 Enzymfamilie der MMP

Die Matrix Metalloproteasen sind eine Enzymfamilie von Zink-abhängigen Endoproteasen. Seit der Entdeckung des ersten Mitgliedes, der Kollagenase (GROSS und LAPIÈR 1962), sind 24 Wirbeltier-MMP-Isoformen bekannt und kloniert, wovon 23 beim Menschen zu finden sind (LOHI et al. 2001). Anhand von Struktur und Substratpräferenz lassen sie sich in 6 Untergruppen einteilen (VISSE und NAGASE 2003):

- 1) Kollagenasen: z.B. interstitielle und neutrophile Kollagenase, syn. für MMP-1 und MMP-8, sowie Kollagenase-3 und -4, syn. für MMP-13 und MMP-18;
- 2) Gelatinasen: Gelatinase-A syn. für MMP-2 (72-kDa Type IV Kollagenase) und Gelatinase-B syn. für MMP-9 (92-kDa Type IV Kollagenase);
- 3) Stromelysine: z.B. Stromelysin-1, -2, -3, syn. für MMP-3, -10, -11;
- 4) Matrilysine: z.B. Matrilysin-1 und -2, syn. für MMP-7 und MMP-26;
- 5) Membranständige MMP (MT-MMP): z.B. für MT1-MMP bis MT4-MMP, syn. für MMP-14 bis MMP-17, sowie MT5-MMP und MT6-MMP, syn. für MMP-24 und MMP-25;
- 6) Andere: z.B. MMP-12, MMP-19 bis MMP-21, MMP-23, MMP-27 und MMP-28, welche in den vorherigen Kategorien nicht klassifiziert sind.

Diese Einteilung, international anerkannt, ist allerdings wegen der sich überlappenden Substratspezifität nur begrenzt charakteristisch (WOESSNER 1994, RAY und STETLER-STEVENSON 1994, SATO et al. 1994).

1.4.3 Grundstruktur der MMP

Alle Enzyme der MMP-Familie besitzen eine ähnliche Grundstruktur, welche aus mindestens drei Domänen besteht:

- 1) einer N-terminalen Propeptidsequenz, welche bei Aktivierung gespalten oder entfernt wird,
- 2) einer zentralen katalytischen Domäne, welche die Zink-Bindungsstelle beinhaltet und
- 3) einer C-terminalen, hemopexinähnlichen Domäne, welche die Bindung von TIMP, verschiedenen Substraten und einen Teil der proteolytischen Aktivitäten beeinflussen.

Zusätzlich besitzen die Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9) jeweils drei fibronectinähnliche Domänen, die erforderlich sind um Kollagen, Gelatin und Elastin zu binden und zu spalten und die Membranständigen-MMP (MT-MMP) eine hydrophobe N-terminale Membranverankerungsdomäne (EICKELBERG et al. 1998). Diese Domänen lassen sich auf mRNA- wie auf Proteinebene klar zuordnen. (RAY und STETLER-STEVENSON 1994, STERNLICHT und WERB 2001).

1.4.4 Regelmechanismen der MMP-Aktivität

Die MMP sind entscheidend an den physiologischen Umbauprozessen der EZM beteiligt. Für die Gewebekomöostase ist somit eine effektive Kontrolle ihrer proteolytischen Aktivität essentiell erforderlich. Zum überwiegenden Teil wird diese auf der Ebene der Genexpression bzw. der Transkription geregelt (MURPHY und DOCHERTY 1992, STERNLICHT und WERB 2001). Allerdings mit der bemerkenswerten Ausnahme von MMP-2, welches oft konstitutiv exprimiert ist und durch einen einzigartigen Mechanismus der Enzymaktivierung kontrolliert wird. Bei diesem Aktivierungsweg sind verschiedene MT-MMP, vor allem MT1-MMP sowie TIMP-2, beteiligt (s. 1.5.1).

Die Regulation der proteolytische Aktivität ist komplex und findet auf folgenden Ebenen statt: 1.) der Genaktivierung, 2.) der Transkription, 3.) der Stabilität der mRNA, 4.) der Translation, 5.) der Sekretion des Proenzym, 6.) der Bindung des Proenzym an Zellmembranen und EZM-Bestandteilen, 7.) der Aktivierung des Enzym, 8.) der Hemmung durch spezifische Inhibitoren (TIMP) und 9.) der Degradation und Beseitigung des aktiven Enzym (RAY und STETLER-STEVENSON 1994).

Zytokine, Wachstumsfaktoren, Onkogene und Hormone bestimmen so das Ausmaß der MMP-Produktion über Beeinflussung von Genaktivität, Transkription, Translation und schließlich Sekretion (MATRISIAN 1990). Im Allgemeinen werden die meisten der MMP durch Interleukin-1 β (IL-1 β), „tumor nekrosis faktor- α “ (TNF- α), „platelet-derived growth factor“ (PDGF), „transforming growth factor- α “

(TGF- α), „epidermal growth factor“ (EGF), „basic fibroblast factor“ (bFGF), „nerve growth factor“ (NGF) und Phorbolster-Tumorpromoter induziert. Durch Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin-4 (IL-4), „transforming growth factor- β “ (TGF- β), Östrogene, Progesteron und Glukokortikoide wird die Genexpression unterdrückt (BIRKEDAL-HANSEN 1993, MARSHALL et al. 1993, RAY und STETLER-STEVENSON 1994, BIRKEDAL-HANSEN 1995, BORDEN und HELLER 1997).

Eine weitere Ebene der Regulation findet peri- bzw. extrazellulär statt. Das Ausmaß und die Lokalisierung der matrixdegradierenden Enzymaktivität kann hierdurch kontrolliert werden. Dies geschieht durch die Aktivierung der sezernierten Proenzyme und der anschließenden Hemmung durch endogene Inhibitoren: durch α 2-Makroglobulin oder durch ihre spezifischen Inhibitoren, den „tissue inhibitors of metalloproteases“, den TIMPs (MURPHY und DOCHERTY 1992, NAGASE und OKADA 1997).

1.4.5 Aktivierung der MMP

Bis auf MMP-11 (Stromelysin-3), MMP-27 (Epilysin) und die vier membranständigen MT-MMP werden alle MMP als lösliches, inaktives Zymogen, als Proenzym, sezerniert und erst extrazellulär aktiviert. Die Aktivierung erfolgt durch Abspaltung der N-terminalen Propeptidsequenz wodurch das katalytische Zentrum freigelegt wird.

Dieser Vorgang ist von SPRINGMAN et al. (1990) *in vitro* umfassend beschrieben worden. Er bezeichnete diese schrittweise Aktivierung als „cystein-switch“ Mechanismus: Hierbei wird die aufeinander abgestimmte Bindung zwischen dem zweiwertigen Metallion (meist Zn^{2+} , oder auch Ca^{2+}) der katalytischen Domäne und dem freien Zysteinrest der N-terminalen Propeptidsequenz destabilisiert. Durch Dissoziation des Zysteins vom Metallion entsteht eine Konformationsänderung des Enzyms, welche das katalytische Zentrum freilegt. Nachfolgend findet die autolytische Spaltung des N-terminalen Propeptids statt. Die proteolytische Aktivität der MMP basiert auf einem an dem katalytischen Zentrum gebundenen, zweiwertigen Metallion (Zn^{2+} oder Ca^{2+}), welches der Enzymfamilie auch zu ihrem Namen verhalf.

Eine Aufhebung der Zystein-Zink-Bindung und Aktivierung des Proenzym kann auf vielfältigem Wege erfolgen. Möglich ist eine Aktivierung der MMP untereinander. Einige dieser MMP-Aktivierungspaare sind *in vitro* charakterisiert worden: z.B. die Aktivierung von Pro-MMP-9 durch MMP-2 (FRIDMAN et al. 1995) oder MMP-3 (OGATA et al. 1992) und von Pro-MMP-1 durch MMP-3 (WOESSNER 1991).

Als Besonderheit für Pro-MMP-2 *in vivo* gilt, dass diese weder durch Serinproteasen noch durch die Plasminkaskade in die katalytisch wirksame Form überführt wird (WILL et al. 1996), sondern über

einen einzigartigen Wirkmechanismus an der Zelloberfläche, welcher schrittweise MT1-MMP (MMP-14) und TIMP-2 erfordert, siehe auch 1.5.1 (STRONGIN et al. 1995).

Eine *in vivo* Aktivierung der Proenzyme von MMP-1, MMP-3 und MMP-9 kann durch die Plasminkaskade, Trypsin oder Kallikrein erfolgen (MURPHY et al. 1994, RAY und STETLER-STEVENSON 1994). So stellt aktiviertes MMP-3 den wahrscheinlichsten *in vivo*-Aktivator für Pro-MMP-9 dar (OGATA et al. 1992, ITHO und NAGASE 1995). Die genauen Schritte der *in vivo* Aktivierung sind allerdings erst unzureichend geklärt, erschwert durch unterschiedliche MMP -Expressionsmuster in Gewebe- und Zellkultur (VAN WART und BIRKEDAL-HANSEN 1990, BIRKEDAL-HANSEN 1995, VISSE und NAGASE 2003).

Eine Aktivierung kann zusätzlich über chemische, biologische und physikalische Reize erfolgen, teils *in vivo* teils *in vitro* untersucht. So kann das Proenzym über verschiedenste Stimuli wie z.B. Uratkristalle, Druck, Hitze, UV-Licht, sauren pH-Wert, Entzündungsmediatoren wie Prostaglandin E oder durch Sodium Dodecyl Sulfat (SDS) und organische Quecksilberverbindungen (APMA) aktiviert werden (WOESSNER 1991, NAGASE und OKADA 1997).

1.5 Die Inhibitoren der Matrix Metalloproteasen

Entscheidend bei der spezifischen Hemmung von MMP-Aktivität durch deren Inhibitoren, den „tissue inhibitors of metalloproteases“ (TIMP) ist die reversible, non-kovalente Bindung im Verhältnis von 1:1 (GOMEZ et al. 1997). Das dynamische Gleichgewicht zwischen aktivierten MMP und freien TIMP bestimmt die „Netto-MMP-Aktivität“. Eine Änderung dieses Equilibriums beeinflusst den Prozess von Zellinvasion, Gewebedegradation und Umbau der subendothelialen Basalmembran. Zusätzlich zum hemmenden Einfluss auf das bereits aktivierte Enzym stabilisieren TIMP MMP-Proenzyme und verhindern so eine Autoaktivierung, indem sie im Verhältnis von 1:1 an das Proenzym binden (RAY und STETLER-STEVENSON 1994, BIRKEDAL-HANSEN 1995). Die Aktivität von TIMP kann über Degradation durch Serinproteasen aufgehoben werden (ITOH und NAGASE 1995).

1.5.1 TIMP-Isoformen

Vier Mitglieder der TIMP (TIMP-1 bis TIMP-4) sind bisher für Wirbeltiere beschrieben und charakterisiert worden. TIMP-1 und TIMP-2 wird wegen ihrer Schlüsselrolle die größere Aufmerksamkeit beigemessen. Sie sind ubiquitär als freie Moleküle in menschlichen Geweben und Körperflüssigkeiten vorhanden. Beide, TIMP-1 und TIMP-2, sind fest bindende Inhibitoren, sowohl von allen aktivierten MMP, als auch von Pro-MMP-2 und Pro-MMP-9. Zusätzlich werden TIMP-1 und TIMP-2 noch *in vitro* die Eigenschaften eines Inhibitors der Angiogenese und jene ähnlich eines Wachstumsfaktors zugeschrieben (MURPHY et al. 1994, GOMEZ et al. 1997, VALENTE et al. 1998).

TIMP-1, ein Glykoprotein mit einer Masse von 28,5 kDa, bildet bevorzugt einen Komplex mit der Proenzymform von MMP-9, mit aktiviertem MMP-9 und mit aktiviertem MMP-3, wodurch es deren Aktivierung bzw. proteolytische Aktivität hemmt (ALVAREZ et al. 1990).

TIMP-2, ein nicht glykosyliertes Protein mit einer Masse von 21 kDa, hemmt vorrangig über die N-terminale Domäne das Proenzym und die aktive Form von MMP-2. Zudem nimmt TIMP-2 eine grundlegende Stellung bei der MMP-2-Aktivierungskaskade ein: Im Gegensatz zu TIMP-1 hemmt TIMP-2 über eine Bindung mit der N-terminalen Domäne MT1-MMP. Somit kann die C-terminale Domäne von TIMP-2 mit Pro-MMP-2 eine feste Bindung eingehen. Pro-MMP-2 ist somit zelloberflächengebunden und kann anschließend durch nicht gehemmtes MT1-MMP aktiviert werden (STRONGIN et al. 1995, BERNARDO und FRIDMAN 2003). Zusätzlich blockiert es die hydrolytische Aktivität aller MMP. LECO et al. (1994) betont (gültig im Maus-Modell) die weitgehend konstitutive Genexpression von TIMP-2, wegen der mäßigen Stimulierbarkeit durch exogene Noxen (DECLERCK et al. 1989, DECLERCK et al. 1991, HOWARD et al. 1991, RAY und STETLER-STEVENSON 1994, VISSE und NAGASE 2003).

TIMP-3 wurde 1992 von PAVLOFF et al. und TIMP-4 1996 von GREENE et al. erstmalig charakterisiert. Sie liegen nach ihrer Sezernierung im Interstitium nicht als freie Moleküle vor, wie TIMP-1 und TIMP-2, sondern in fester Bindung an EZM-Bestandteile. TIMP-3 wird eine besondere Rolle im Auge zugeschrieben aufgrund des erhöhten Nachweises bei degenerativen Erkrankungen der Retina (LANGTON et al. 1998), während TIMP-4 bisher nur in Herzgewebe nachgewiesen werden konnte (GOMEZ et al. 1997).

Obwohl die einzelnen TIMP-Isoformen überlappende inhibitorische Aktivität aufweisen, sind sie immunologisch verschiedene Proteine. Sie werden jeweils auf einem anderen Chromosom kodiert und ihre Genexpression erfolgt aufgrund individueller Stimuli. Dieses deutet auf spezifische und verschiedene biologische Funktionen hin (RAY und STETLER-STEVENSON 1994, O'CONNOR und FITZGERALD 1994, GOMEZ et al. 1997, BORDEN und HELLER 1997).

Unabhängig von der Eigenschaft als MMP-Inhibitor, weisen TIMP-1 und TIMP-2 auch zellproliferative Aktivität auf (VISSE und NAGASE 2003). Außerdem wird für TIMP-2 eine Hemmung der Angiogenese, MMP unabhängig (SEO et al. 2003), als auch eine antiapoptotische Wirkung beschrieben (VALENTE et al. 1998). Wohingegen BOND et al. (2002) für TIMP-3 apoptoseinduzierende Eigenschaften nachweisen konnten. In Zellkultur bewirkt die Überexpression von TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-3 eine Reduktion im Tumorwachstum (GOMEZ et al. 1997). Ungeklärt sind bisher die Mechanismen wie TIMP einerseits Zellwachstum fördern und andererseits Zelltod bewirken als auch Proliferationssignale unterdrücken können (STERNLICHT und WERB 2001).

1.6 Untersuchungen im Pleuraspalt

Bei der Untersuchung des Verhältnisses von Proteasen und Antiproteasen in der extrazellulären Matrix nimmt der Pleuraraum eine Sonderrolle ein. Die einfach durchzuführende Punktion des Pleuraspalts ermöglicht die Gewinnung einer Flüssigkeit, die weitestgehend die *in vivo* Situation der extrazellulären Matrix repräsentiert und stellvertretend für andere, schwerer zu erreichende EZM untersucht werden kann. Bisher wurden Transsudate als Näherung des physiologischen Zustandes der Pleuraflüssigkeit angesehen. Hierbei wird wegen der erhaltenen Schrankenfunktion angenommen, dass die qualitative und quantitative Verteilung der endogenen Proteasen dem physiologischen Zustand weitestgehend entspricht (SAHN 1988, MISEROCCHI 1997).

Die Gewinnung von Pleuralavageflüssigkeit im Rahmen einer Thorakotomie, eröffnet die Möglichkeit, Pleuraflüssigkeit zu erhalten, welche physiologische Verhältnisse ohne die Alteration eines Ergusses wiedergibt.

1.7 Kontext der Arbeit

HUREWITZ et al. haben 1992 erstmalig, bei geringer Fallzahl (n=32), MMP in Pleuraergüssen nachgewiesen. Anhand einer größeren Anzahl (n=88) von Pleuraergüssen zeigten EICKELBERG et al. 1997 das qualitative Vorkommen von MMP und TIMP in Pleuraergüssen unterschiedlicher Genese. Sie brachten ihre Ergebnisse mit der Pathogenese der unterschiedlichen Ergüsse in Verbindung, allerdings standen nur semiquantitative Daten zur Verfügung.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die qualitative und quantitative Analyse von MMP-1 (interstitieller Kollagenase), MMP-2 (Gelatinase-A oder 72-kDa Typ IV Kollagenase), MMP-9 (Gelatinase-B oder 92-kDa Typ IV Kollagenase) und deren Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2. Untersucht wurden 96 Pleuraergüsse unterschiedlicher Genese und 10 Pleuralavagen. Die Lavagen wurden bei lungengesunden Patienten in der Abteilung für Herz-Thorax-Chirurgie der Universitätsklinik Basel gewonnen. Zusätzlich wurden die klinischen Patientendaten der Abteilung für Pulmologie und der Abteilung für Pathologie der Universitätsklinik Basel mit denen im Labor erhaltenen Ergebnissen der Proteinanalyse korreliert. Das Protokoll der Studie wurde von der Ethikkommission der Universitätsklinik Basel genehmigt. Bei der Literaturrecherche wurden Publikationen bis zum 01. Dezember 2003 berücksichtigt.

1.8 Fragestellung

Bei dieser Arbeit standen folgende Fragen im Vordergrund:

- Im Falle einer gestörten Schrankenfunktion bei exsudativer Pleuraflüssigkeit wäre ein verändertes Proteasen-Antiproteasen-Profil (MMP und TIMP) zu erwarten. Lassen sich somit Rückschlüsse anhand des quantitativen Vorkommens einzelner Proteasen oder Inhibitoren bezüglich der Genese der Pleuraergüsse ziehen?
- Wie sind die einzelnen MMP- und TIMP-Isoformen quantitativ in Pleuraergüssen unterschiedlicher Genese verteilt?
- Ist eine Unterscheidung in konstitutive und induzierte Isoformen möglich?
- Welche Schlussfolgerung (in Bezug auf konstitutive und induzierte Isoformen) ergibt der Vergleich mit den Pleuralavagen, den „physiologischen“ Pleura-Flüssigkeiten?

2 PATIENTENKOLLEKTIV

2.1 Übersicht über Diagnosegruppen

2.2 Pleuraergüsse

Alle 96 verwendeten Pleuraergüsse stammen von der Abteilung für Pulmologie der Universitätsklinik Basel, die im Rahmen von therapeutischen oder diagnostischen Pleurapunktionen gewonnen wurden. Das Gesamtkollektiv umfasst 55 Frauen und 41 Männer mit einem Durchschnittsalter von 71 Jahren \pm 13,6 Jahren. Der Median liegt bei 73 Jahren mit einem Minimum von 32 und einem Maximum von 93 Jahren.

Die Einteilung der Ergussflüssigkeit in Transsudat oder Exsudat erfolgt nach laborchemischen Parametern. Als Standard werden die drei folgenden Light-Kriterien angewandt, wobei für ein Exsudat mindestens eines der Kriterien erfüllt sein sollte:

- 1) Der Quotient aus Erguss- zum Serumproteingehalt ist größer als 0,5.
- 2) Der Quotient aus Erguss- zum Serum-LDH-Gehalt ist größer als 0,6.
- 3) Der Laktatdehydrogenase (LDH)-Gehalt in der Ergussflüssigkeit ist größer als zwei Drittel des oberen Normwertes des Serum-LDH-Gehalts, d.h. >200 U/l (Classen et al. 1993).

(LIGHT et al. 1972, LIGHT 1995, BURGESS et al. 1995, Berkman und Kramer 1993).

Für die Einteilung werden im Folgenden das 1. und 3. Light-Kriterium angewandt. Unter Berücksichtigung der klinischen Diagnose werden die Ergüsse unterteilt in transsudative Ergüsse (n=28), parapneumonische (n=24) oder paraneoplastische Exsudate (n=44).

2.2.1 Klinische und laborchemische Daten der Patienten mit Transsudaten

Von den 96 untersuchten Pleuraergüssen werden 28 als Transsudat eingestuft. Diese Ergüsse sind alle für das 1. Light-Kriterium negativ und in 27 von 28 Fällen negativ für das 3. Light-Kriterium. Im Transsudat Nr. 26 kann der leicht erhöhte LDH-Gehalt (328 U/l) weder durch eine infektiöse noch eine maligne Grunderkrankung erklärt werden.

Die Genese der Transsudate ist bei 19 Patienten eine Herzinsuffizienz, bei 6 Patienten eine Niereninsuffizienz, bei einem Patienten eine Kombination aus Herzinsuffizienz und Niereninsuffizienz, bei einer Patientin der Zustand nach einer Abdominal-OP mit Reizerguss und bei einem Patienten eine Colitis ulcerosa. Die genauere Aufgliederung ist in Tabelle 2 wiedergegeben.

Eine Übersicht über die Verteilung des Alters, des Protein-Quotienten (1. Light-Kriterium) und des LDH-Gehalts im Erguss (2. Light-Kriterium) bietet Tabelle 1.

Transsudate			
	Alter (Jahre)	Prot.-Quot.	LDH-E (U/l)
n	28	27	28
Median	79	0,33	148
Minimum	42	0,18	66
Maximum	93	0,46	328

Tabelle 1 Verteilung der Parameter Alter, 1. Light-Kriterium (Prot.-Quot.) und 3. Light-Kriterium (LDH-E) bei 28 transsudativen Ergüssen

(Abkürzungen: Prot.-Quot.= Quotient aus (Proteingehalt im Erguss zu Proteingehalt im Serum), LDH-E= Laktatdehydrogenasegehalt (U/l) im Erguss, n= Anzahl)

Transsudate									
Nr.	Sex	Geb. Dat.	Punkt. Dat.	Alter (Jahre)	Diagnose	Prot.-S (g/l)	Prot.-E (g/l)	Prot.-Quot.	LDH-E (U/l)
1	m	29.09.54	06.06.96	42	Niereninsuffizienz	65	24	0,37	178
2	m	20.03.14	14.05.96	82	HI bei KHK und Kardiomegalie	67	23	0,34	75
3	w	16.10.10	13.10.96	86	Herzinsuffizienz	64	21	0,33	88

Nr.	Sex	Geb. Dat.	Punkt. Dat.	Alter (Jahre)	Diagnose	Prot.-S (g/l)	Prot.-E (g/l)	Prot.-Quot.	LDH-E (U/l)
4	m	29.06.20	04.10.96	76	HI bei KHK und HHK	69	25	0,36	177
5	w	13.10.11	11.10.96	85	Herzinsuffizienz bei KHK	62	26	0,42	175
6	w	02.02.55	22.10.96	42	Reizerguss nach Abdominal-OP	67	27	0,40	176
7	w	17.02.26	23.10.96	71	dekomp. Herzinsuffizienz	66	30	0,45	238
8	m	06.05.25	06.11.96	72	Erguss bei Colitis ulcerosa	59	22	0,37	89
9	m	09.10.12	14.11.96	84	Herzinsuffizienz und chr NI	81	16	0,20	135
10	w	04.03.12	22.11.96	85	Herzinsuffizienz	64	19	0,30	66
11	w	16.06.30	09.12.96	67	Niereninsuffizienz	68	22	0,32	89
12	m	12.05.42	20.12.96	55	Herzinsuffizienz	69	19	0,28	187
13	w	11.12.03	23.01.97	93	dekomp. Herzinsuffizienz	58	21	0,36	142
14	w	17.07.12	28.01.97	85	Herzinsuffizienz	56	26	0,46	319
15	m	12.05.28	07.02.97	69	Herzinsuffizienz	61	26	0,43	211
16	w	17.07.12	10.02.97	85	Herzinsuffizienz	66	21	0,32	256
17	m	09.11.45	07.03.97	51	Herzinsuffizienz	46	20	0,43	220
18	m	23.02.18	15.03.97	79	Niereninsuffizienz	59	24	0,41	188
19	w	26.10.15	19.03.97	81	Herzinsuffizienz bei KHK	72	22	0,31	133
20	m	23.02.18	26.03.97	79	Niereninsuffizienz	69	21	0,30	154
21	m	14.10.15	02.04.97	82	Herzinsuffizienz	74	20	0,27	189
22	w	06.07.32	02.04.97	65	Niereninsuffizienz	68	20	0,29	122
23	w	11.12.03	02.04.97	93	Herzinsuffizienz	63	21	0,33	132
24	m	20.01.21	04.04.97	76	Herzinsuffizienz	78	21	0,27	115
25	w	01.02.26	14.04.97	71	Herzinsuffizienz	60	22	0,37	134
26	m	05.06.38	11.05.97	59	akute NI bei Rhabdomyolyse	48	15	0,31	328
27	m	18.09.12	22.05.97	85	Herzinsuffizienz	-	14	-	115
28	w	25.09.12	23.05.97	85	Herzinsuffizienz bei KHK	73	13	0,18	128

Tabelle 2 Daten der Patienten mit transsudativen Ergüssen (klinische sowie laborchemische) (Abkürzungen: Nr.= Nummer, m= männlich, w= weiblich, Geb. Dat.= Geburtsdatum, Punkt. Dat.= Punktionsdatum, Prot.-S= Proteinmenge (g/l) im Serum, Prot.-E= Proteinmenge (g/l) im Erguss, Prot.-Quot.= Quotient aus (Prot.-E / Prot.-S), LDH-E= Laktatdehydrogenasegehalt (U/l) im Erguss, HI= Herzinsuffizienz, NI= Niereninsuffizienz, KHK= Koronare Herzkrankheit, HHK= Hypertone Herzkrankheit, chr= chronisch, dekomp= dekompensiert)

2.2.2 Klinische und laborchemische Daten der Patienten mit parapneumonischen Exsudaten

Von den 96 Ergüssen werden 68 Ergüsse nach dem 1. Light-Kriterium oder dem 3. Light-Kriterium als Exsudat eingestuft, wobei 24 anhand der klinischen Diagnose auf eine parapneumonische Genese zurückgeführt werden. Die Kriterien der klinischen Diagnose sind: Krankheitsgefühl, Fieber Husten, Pleuraschmerz (häufig) und Dyspnoe (selten), positiver auskultatorischer Befund (fakultativ), radiologischer Nachweis eines neu aufgetretenen Infiltrats im Thorax-Röntgenbild bzw. positiver Erregernachweis in Sputum oder Serum, erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit und Blutbildveränderungen i.S. einer Leukozytose, einer Linksverschiebung im Differentialblutbild und toxischer Granulation (CLASSEN et al. 1993). Klinisch und zytologisch ergaben sich keine Hinweise auf maligne Neoplasien von Lunge oder Pleura.

In 23 von 24 Fällen liegt dem Erguss eine Pneumonie zugrunde, in einem Fall eine septische Pleuritis mit septischer Lungenembolie. Eine genauere Auflistung der relevanten Patientendaten findet sich in Tabelle 4.

Eine Übersicht über die Verteilung von Alter, Protein-Quotienten (1. Light-Kriterium) und LDH-Gehalt im Erguss (2. Light-Kriterium) für die 24 parapneumonischen Exsudate fasst Tabelle 3 zusammen.

Parapneumonische Exsudate			
	Alter (Jahre)	Prot.-Quot.	LDH-E (U/l)
n	24	24	24
Median	73	0,56	450
Minimum	46	0,32	154
Maximum	90	1,02	2147

Tabelle 3 Verteilung der Parameter Alter, Protein-Quotient (1. Light-Kriterium) und LDH-Gehalt im Erguss (2. Light-Kriterium) bei 24 parapneumonischen Exsudaten
(Abkürzungen: Prot.-Quot.= Quotient aus (Proteingehalt im Erguss zu Proteingehalt im Serum), LDH-E= Laktatdehydrogenasegehalt (U/l) im Erguss, n= Anzahl)

Parapneumonische Exsudate									
Nr.	Sex	Geb. Dat.	Punkt. Dat.	Alter (Jahre)	Diagnose	Prot.-S (g/l)	Prot.-E (g/l)	Prot.-Quot.	LDH-E (U/l)
1	w	22.10.14	12.02.96	81	Pneumonie	71	44	0,62	1288
2	w	28.10.18	16.02.96	77	Pneumonie	69	36	0,52	422
3	m	25.09.27	20.03.96	69	Pneumonie, Z.n. ARDS	58	30	0,52	643
4	m	16.08.29	29.05.96	67	Pneumonie	66	39	0,59	228
5	w	22.01.06	11.06.96	90	Pneumonie	72	30	0,42	1309
6	w	20.10.20	08.05.96	76	Pneumonie, Hyperthyreose	56	27	0,48	432
7	m	26.12.28	17.05.96	67	Pneumonie	72	55	0,76	269
8	w	20.10.20	14.05.96	76	Pneumonie, Hyperthyreose	56	31	0,55	566
9	m	06.05.50	04.06.96	46	Pneumonie	69	33	0,48	297
10	m	07.05.18	11.07.96	78	Pneumonie	62	35	0,56	433
11	w	01.12.40	20.09.96	56	Pneumonie, Z.n. ARDS	76	46	0,61	405
12	m	23.04.11	04.10.96	86	Pneumonie	75	49	0,65	321
13	w	14.06.34	07.10.96	62	Pneumonie	58	28	0,48	567
14	w	01.12.40	03.10.96	56	Pneumonie, Z.n. ARDS	69	36	0,52	255
15	w	15.06.19	23.10.96	77	Pneumonie	68	29	0,43	467
16	w	12.08.12	18.12.96	84	Pneumonie	65	21	0,32	154
17	m	22.02.14	07.03.97	83	Pneumonie	74	47	0,64	2147
18	w	02.10.26	24.03.97	71	Pneumonie	70	36	0,51	534
19	w	11.02.25	03.04.97	72	Pneumonie	68	51	0,75	972
20	m	27.07.13	13.05.97	84	Aspirationspneumonie	51	52	1,02	599
21	w	28.02.23	20.05.97	74	Pneumonie	65	30	0,46	700
22	m	02.08.44	19.06.97	53	Pneumonie	48	30	0,63	389
23	m	09.09.41	11.06.97	56	Pneumonie	66	51	0,77	602
24	w	03.03.30	14.08.97	67	sept. Pleuritis und sept. LE	56	35	0,63	256

Tabelle 4 Daten der Patienten mit parapneumonischen, exsudativen Ergüssen (klinische sowie laborchemische)

(Abkürzungen: Nr.= Nummer, m= männlich, w= weiblich, Geb. Dat.= Geburtsdatum, Punkt. Dat.= Punktionsdatum, Prot.-S= Proteinmenge (g/l) im Serum, Prot.-E= Proteinmenge (g/l) im Erguss, Prot.-Quot.= Quotient aus (Prot.-E / Prot.-S), LDH-E= Laktatdehydrogenasegehalt (U/l) im Erguss, ARDS= „adult respiratory distress syndrome“- akutes Lungenversagen, LE= Lungenembolie, sept.= septisch, Z.n.= Zustand nach)

2.2.3 Klinische und laborchemische Daten der Patienten mit paraneoplastischen Exsudaten

Die 44 paraneoplastischen Exsudate zeigen, neben einem positiven 1. Light-Kriterium oder einem positiven 3. Light-Kriterium, maligne Zellen in der Zytologie. Die Gruppeneinteilung dieser Exsudate wird gestützt von der klinischen Diagnose und den Ergebnissen aus pathologischer und radiologischer Diagnostik. Die Ergüsse werden entweder durch maligne Erkrankungen der Lunge, der Pleura bzw. der Lunge und der Pleura selbst oder durch pulmonale Beteiligung (z.B. Lungenmetastasen) extrapulmonaler Tumore hervorgerufen. Einen Überblick über die Patientendaten gibt Tabelle 6.

Die Verteilung von Alter, Protein-Quotienten (1. Light-Kriterium) und LDH-Gehalt im Erguss (3. Light-Kriterium) für die 44 paraneoplastischen Exsudate fasst Tabelle 5 zusammen. Es zeigt sich eine auffallend hohe LDH-E-Standardabweichung, welche vier Ergüssen mit besonders erhöhten LDH-Konzentrationen (> 4000 U/l) zuzuschreiben ist.

Paraneoplastische Exsudate			
	Alter (Jahre)	Prot.-Quot.	LDH-E (U/l)
n	44	44	44
Median	69	0,60	522,5
Minimum	32	0,30	162
Maximum	92	0,74	10410

Tabelle 5 Verteilung der Parameter Alter, Protein-Quotient (1. Light-Kriterium) und LDH-Gehalt im Erguss (2. Light-Kriterium) bei 44 paraneoplastischen Exsudaten (Abkürzungen: Prot.-Quot.= Quotient aus (Proteingehalt im Erguss zu Proteingehalt im Serum), LDH-E= Laktatdehydrogenasegehalt (U/l) im Erguss, n= Anzahl)

Paraneoplastische Exsudate									
Nr.	Sex	Geb. Dat.	Punkt. Dat.	Alter (Jahre)	Diagnose	Prot.-S (g/l)	Prot.-E (g/l)	Prot.-Quot.	LDH-E (U/l)
1	m	30.12.20	29.01.96	75	NSCLC (Plattenepithel-Ca)	74	39	0,53	560
2	w	03.11.38	31.01.96	57	Mamma-Ca	79	47	0,59	760
3	w	11.01.44	06.02.96	52	Mamma-Ca	69	49	0,71	351
4	m	30.10.63	22.02.96	32	Pleuramesotheliom	82	35	0,43	5520
5	m	25.09.15	07.03.96	81	met. Adeno-Ca (Kolon)	63	41	0,65	587

Nr.	Sex	Geb. Dat.	Punkt. Dat.	Alter (Jahre)	Diagnose	Prot.-S (g/l)	Prot.-E (g/l)	Prot.-Quot.	LDH-E (U/l)
6	w	10.01.29	11.03.96	67	Mamma-Ca	70	46	0,66	357
7	w	29.04.45	12.03.96	51	Mamma-Ca	85	52	0,61	469
8	w	16.07.27	29.03.96	69	Pleuramesotheliom	67	31	0,46	221
9	w	26.12.41	25.04.96	54	met. Adeno-Ca (Kolon)	70	32	0,46	338
10	w	14.04.27	02.05.96	69	Mamma-Ca	71	40	0,56	365
11	m	24.08.24	07.08.96	72	NSCLC (Plattenepithel-Ca, pancoast)	62	36	0,58	469
12	m	17.11.29	11.09.96	67	NSCLC (Plattenepithel-Ca)	55	36	0,65	10410
13	w	24.11.40	27.09.96	56	NHL	71	36	0,51	1646
14	w	29.06.38	01.09.96	58	Plasmozytom	77	51	0,66	4800
15	w	11.11.17	01.10.96	79	met. Endometriumsarkom	64	45	0,70	1166
16	m	12.07.09	08.10.96	87	cb-B-NHL	67	37	0,55	10100
17	w	12.01.53	21.10.96	44	Mamma-Ca	66	40	0,61	522
18	w	26.08.50	01.01.96	45	NSCLC (Adeno-Ca)	66	38	0,58	275
19	w	11.11.17	15.11.96	79	met. Endometriumsarkom	72	48	0,67	1079
20	w	29.03.15	18.11.96	82	Mamma-Ca	77	47	0,61	162
21	w	25.11.18	20.12.96	78	met. Adeno-Ca (Niere)	69	43	0,62	680
22	w	07.04.21	15.01.97	76	met. Angiosarkom	52	35	0,67	299
23	m	13.12.54	01.01.97	42	met. Hämangioperizytom	52	22	0,42	934
24	m	04.06.14	14.01.97	83	NSCLC	57	25	0,44	313
25	w	25.11.18	01.01.96	77	met. Adeno-Ca (Niere)	69	43	0,62	581
26	m	13.02.35	01.01.97	62	met. Adeno-Ca (Kolon)	74	51	0,69	443
27	w	31.10.41	21.01.97	55	met. Adeno-Ca (Ovar)	64	37	0,58	818
28	m	16.09.35	27.01.97	61	Pleuramesotheliom	72	44	0,61	268
29	w	18.04.45	03.02.97	52	SCLC ("oat cell carcinoma")	69	38	0,55	213
30	m	18.07.38	04.02.97	59	NSCLC (Adeno-Ca)	70	44	0,63	396
31	m	22.12.27	13.02.97	69	NSCLC (Plattenepithel-Ca)	72	46	0,64	232
32	m	02.07.28	20.02.97	69	SCLC	80	58	0,73	644
33	w	09.08.14	04.03.97	83	met. NSCLC (Adeno-Ca)	66	49	0,74	523
34	w	30.10.09	07.03.97	87	Mamma-Ca	63	31	0,49	200

Nr.	Sex	Geb. Dat.	Punkt. Dat.	Alter (Jahre)	Diagnose	Prot.-S (g/l)	Prot.-E (g/l)	Prot.-Quot.	LDH-E (U/l)
35	w	30.10.09	15.03.97	87	Mamma-Ca	50	29	0,58	192
36	w	14.01.05	25.03.97	92	cb B-NHL	53	28	0,53	1652
37	m	21.07.19	02.04.97	78	NSCLC (Adeno-Ca), CLL	57	35	0,61	732
38	w	23.05.37	03.04.97	60	NSCLC (Adeno-Ca)	65	36	0,55	475
39	w	25.05.23	11.04.97	74	NSCLC	65	44	0,68	244
40	m	16.05.16	08.08.96	80	met. NSCLC (Plattenepithel-Ca)	58	32	0,55	1912
41	w	13.09.15	20.05.97	82	met. Adeno-Ca (Niere)	65	38	0,58	695
42	m	30.07.39	26.05.97	58	NSCLC (Adeno-Ca)	78	52	0,67	711
43	w	26.10.36	23.06.97	61	met. SCLC ("oat cell carcinoma")	64	38	0,59	2270
44	m	18.01.23	03.07.97	75	met. NSCLC (Adeno-Ca)	70	21	0,30	468

Tabelle 6 Daten der Patienten mit paraneoplastischen, exsudativen Ergüssen (klinische sowie laborchemische)

(Abkürzungen: Nr.= Nummer, m= männlich, w= weiblich, Geb. Dat.= Geburtsdatum, Punkt. Dat.= Punktionsdatum, Prot.-S= Proteinmenge (g/l) im Serum, Prot.-E= Proteinmenge (g/l) im Erguss, Prot.-Quot.= Quotient aus (Prot.-E / Prot.-S), LDH-E= Laktatdehydrogenasegehalt (U/l) im Erguss, NSCLC="non-small cell lung cancer"- Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom, SCLC= „small cell lung cancer“- Kleinzelliges Bronchialkarzinom, Ca= Karzinom, NHL= Non-Hodgkin-Lymphom, cb B-NHL= zentroblastisches Non-Hodgkin-Lymphom vom B-Zell-Typ, CLL= chronisch lymphatische Leukämie, met.= metastasiert)

2.3 Pleuralavagen

Alle 10 verwendeten Pleuralavagen wurden von der Abteilung für Pulmologie der Universitätsklinik Basel in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Herz- und Thoraxchirurgie der Universitätsklinik Basel entnommen. Ausgesucht wurden ausschließlich Patienten, bei denen eine aortokoronare Bypassoperation durchgeführt und praeoperativ ein Pleuraerguss klinisch und radiologisch ausgeschlossen worden war. Alle Patienten haben als Grunderkrankung eine koronare Herzkrankheit (1-, 2- oder 3-Gefäßerkrankung).

2.3.1 Klinische und laborchemische Daten von Patienten der Pleuralavagen

Die Pleuralavagen stammen von 10 Patienten der Abteilung für Herz-Thoraxchirurgie der Universitätsklinik Basel. Diese Pleuralavagen wurden während einer aortokoronaren Bypass-Operation durch die Abteilung für Pulmologie der Universitätsklinik Basel entnommen (s. 3.12). Es wurden nur Patienten ausgewählt, bei denen ein Erguss klinisch und radiologisch ausgeschlossen worden war. Alle Patienten haben als Grunderkrankung eine koronare Herzkrankheit (1- bis 3-Gefäß Gefäßerkrankung).

Bei vier Pleuralavagen bleiben die genaueren Patientendaten trotz intensiver Nachforschungen unklar. Die Patientendaten sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Die Verteilung der Parameter Alter und Proteingehalt ist zur Übersicht in Tabelle 7 dargestellt. Das Gesamtkollektiv umfasst 3 Frauen und 7 Männer.

Pleuralavagen		
	Alter (Jahre)	Protein (g/l)
n	10	10
Median	63	0,69
Minimum	52	0,31
Maximum	81	1,19

Tabelle 7 Verteilung der Parameter Alter und Proteingehalt in 10 Pleuralavagen (Abkürzungen: SD= Standardabweichung, n= Anzahl)

Pleuralavagen						
Nr.	Sex	Geb. Dat.	Punkt. Dat.	Alter (Jahre)	Diagnose	Protein (g/l)
PL1	w	01.30.17	10.14.97	81	2 Gefäß-KHK	0,48
PL2	m	11.25.39	07.18.97	58	1 Gefäß-KHK	0,56
PL3	m	04.02.24	07.29.97	73	valv. + 2-3 Gefäß-KHK	0,31
PL4	m	04.29.44	10.28.97	54	3 Gefäß-KHK	1,09
PL5	m	01.26.46	11.24.97	52	2 Gefäß-KHK, Z.n. Myokardinfarkt	0,90
PL6	w	07.21.28	08.27.97	69	valv. + 2 Gefäß-KHK	0,97
PL7	w	01.16.35	01.16.98	63	1 Gefäß-KHK	0,81
PL8	m	11.12.26	09.10.97	71	2 Gefäß-KHK	0,36
PL9	m	08.13.39	09.22.97	58	3 Gefäß-KHK, Z.n. Re-Myokardinfarkt	0,36
PL10	m	02.28.35	09.22.97	63	3 Gefäß-KHK	1,19

Tabelle 8 Daten der Patienten mit Pleuralavagen (klinisch sowie laborchemische) (Abkürzungen: PL= Pleuralavage, Nr.= Nummer, m= männlich, w= weiblich, Geb. Dat.= Geburtsdatum, Punkt. Dat.= Punktionsdatum, Protein= Proteinmenge (g/l) in der Pleuralavage, KHK= Koronare Herzkrankheit, valv.= valvulär, Z.n.= Zustand nach, Re= Rezidiv)

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Klinisches Untersuchungsmaterial

3.1.1 Gewinnung der Pleuraergüsse

Sämtliche Pleuraergüsse wurden in der Abteilung für Pulmologie der Universitätsklinik Basel, Schweiz, gewonnen. Nach klinischer und radiologischer Diagnose eines Pleuraergusses erfolgte die Thorakozentese: Dem sitzenden Patienten wurde hierfür mit einer Infiltrationsanästhesie (1% Lidocain) die Haut über dem Erguss und dem darunter liegenden Gewebe bis zur Pleura parietalis betäubt. Die Thorakozentesenadel wurde am Oberrand der betreffenden Rippe im Bereich der vorderen Axillarlinie in den Pleuraspalt eingeführt und der Erguss mittels einer 50 ml Blasenspritze drainiert. Zusätzlich zu der für die Pathologie diagnostisch notwendigen Flüssigkeitsmenge wurden 10 ml des Ergusses in silikonisierten Röhrchen gewonnen, sofort mit 0,5 ml 0,5 M EDTA versetzt und unter 3500 UpM für 20 Minuten bei 4° Celsius zentrifugiert. Der Überstand des Zentrifugats wurde aliquotiert und entweder sofort analysiert oder bei -70° Celsius bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren.

3.1.2 Gewinnung der Pleuralavagen

Alle Pleuralavagen (PL) wurden von der Abteilung für Pulmologie der Universitätsklinik Basel in Kooperation mit der Abteilung für Herz- und Thoraxchirurgie der Universitätsklinik Basel entnommen. Ausgesucht wurden ausschließlich Patienten, bei denen eine aortokoronare Bypass-Operation durchgeführt wurde und praeoperativ ein Pleuraerguss klinisch und radiologisch ausgeschlossen werden konnte.

Zur Gewinnung der PL wurde den Patienten nach medianer Längssternotomie und Durchtrennung der Pleura parietalis der Pleuraspalt mit 100 ml sterilem, isotonischen Phosphatpuffer (s. 3.8) gespült. Dabei wurde darauf geachtet, dass kein Blut in die Probe gelangte. Die Lavageflüssigkeit wurde in silikonisierten Röhrchen aspiriert, welche ebenfalls mit 0,5 ml 0,5 M EDTA versetzt waren und sofort entsprechend der Ergussproben weiterverarbeitet.

Das Protokoll der Studie wurde von der Ethikkommission der Universitätsklinik Basel genehmigt.

3.2 Enzyme

rekombinantes MMP-2-/MMP-9-Antigen Gemisch (C2)
(triple point biologics®, USA)

3.3 Proteinstandard

Die Größenbestimmung des Molekulargewichtes eines Proteins wird bei der Elektrophorese durch das Mitführen eines definierten Proteinstandards ermöglicht. Der verwendete Proteinstandard besteht aus 8 unterschiedlich gefärbten und somit leicht identifizierbaren Proteinen, deren Molekulargewichte bekannt sind. Durch die Farbkodierung kann die Proteinwanderung während der Elektrophorese kontrolliert werden. Der verwendete Proteinstandard (SIGMA®, Wide Range) setzt sich folgendermaßen zusammen:

PROTEIN	MOLEKULARGEWICHT(kDa)	FARBE
Myosin	205	Blau
β-Galactosidase	125	Türkis
Rinder-Serumalbumin	78	Rosa
Ovalbumin	51	Gelb
Rinder-Carboanhydrase	30	Orange
Soyabohnen-Trypsininhibitor	23	Grün
Rinder-α-Lactalbumin	16,5	Lila
Rinder-Aprotinin	10,5	Blau

3.4 Chemikalien und Geräte

Von BIO-RAD, Zürich (CH) stammen die Elektrophorese-Kammern, Rahmen, Glasscheiben, Taschenkäbme, Abstandhalter, Glasplatten-Halterungen für Mini-Gel-Gießformen, Ammoniumsulfat (APS), Glycin, Acryl-/Bisacrylamid und das Coomassie-Brilliant-Blau (R-250).

Von Promega, Madison (USA) wurden die „gel-drying“ Zellulosefolien sowie die Zymographie-Trockenrahmen produziert.

Von Sigma Chemicals, Emmenbrücke (CH), wurden Trisbase, Kalziumchlorid, Äthylen-diamintetraessigsäure (EDTA), Natriumchlorid, Tris-HCl und das Triton X-100 (Octoxynol-9) erworben.

Die Gelatine, Isopropanol, Essigsäure, Butanol und Methanol wurden von der Merck AG, Dietikon (CH) bezogen.

GIBCO (GB) stellte das Natrium Dodecyl Sulfat (SDS), sowie Boehringer Mannheim, Rotkreuz (CH) das Brij-35 her.

Von Amersham™ LIFE SCIENCE (GB) wurden die verwendeten BIOTRAK™ ELISA Systeme produziert.

N,N,N';N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) und Bromphenolblau wurden von Serva Feinbiochemica, Heidelberg (D), Glycerol von Fluka Chemie AG, Buchs (CH) gefertigt.

Den Transformator lieferte die Renner GmbH, Darmstadt (D). Weiter wurden folgende Geräte verwendet: eine Mikrowelle (Panasonic), ein Wasserbad (Büchi Laboratoriums-Technik-AG, Flawil, CH), ein pH-Meter (Herisau, CH), Zentrifugen („Megafuge 3.0R“ und „Biofuge 13“, Heraeus AG, Zürich, CH), Magnetrührer (Framo Geräte-Technik, Reinach, CH), Vortex und Schüttler (Bender & Hohbein AG, Zürich, CH), Scanner „studio star“ (AGFA-Gevaert AG, D), Feinwaagen (Mettler Instrumente AG, CH) und ein Mikroplattenleser („thermomax microplate reader“, Molecular Devices, Menlo Park, USA mit Statistikprogramm „softmax®“, Macintosh).

3.5 Zusammensetzung der Analysegeällösung für die Gelatinzymographie

Mengenangaben für ein 3,2 cm³ Minigel in Anlehnung an HEUSSEN und DOWDLE (1980):

8% Acrylamid	≅	1 ml Acryl/Bisacrylamid 40% (19:1), (BIO RAD)
0,4% SDS	≅	1,25 ml 4x TRIS-HCl-SDS 0,4%, pH 8,8
0,1% Gelatine	≅	0,25 ml warme Gelatine 2% (MERCK AG)

ergänzt mit 2,5 ml Aqua bidest

Zur Polymerisation werden

25 µl APS (10%), (BIO RAD)

5 µl TEMED (Serva Feinbiochemica) zugegeben.

3.6 Zusammensetzung der Sammelgeällösung für die Gelatinzymographie

Mengenangaben für ein 3,2 cm³ Minigel in Anlehnung an HEUSSEN und DOWDLE (1980):

4% Acrylamid	≅	0,25 ml Acryl/Bisacrylamid 40% (19:1), (BIO RAD)
0,4% SDS	≅	0,75 ml 4x TRIS-HCl-SDS 0,4%, pH 8,8

ergänzt mit 1,75 ml Aqua bidest

Zur Polymerisation werden

12,5 µl APS (10%), (BIO RAD)

2,5 µl TEMED (Serva Feinbiochemica) zugegeben.

3.7 Lösungen und Puffer

<u>Phosphatpuffer (pH 7,4):</u>	18,87 mM Na ⁺ (0,45 g NaCl), (0,96g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O), 7,70 mM Cl ⁻ , 0,99 mM K ⁺ (0,12 g KH ₂ PO ₄) 6,66 mM H ₂ PO ₄ ²⁻ (0,06 g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O)
<u>100 ml steriler, isotonischer Puffer:</u>	enthält: 0.45 g NaCl, 0.96 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O, 0.12 g KH ₂ PO ₄ , 0.06 g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O. entspricht: 18.87 mmol Na ⁺ , 7.70 mmol Cl ⁻ , 0.99 mmol K ⁺ , 6.66 mmol H ₂ PO ₄ ²⁻
<u>TRIS-HCl-SDS-Lösung (4x):</u>	1,5 M TRIS-Base, 0,4 % SDS (pH 8,8)
<u>Elektrodenpuffer:</u>	0,2 M Glycin 26 mM TRIS 0,1 % SDS
<u>Probenpuffer für Zymographie:</u>	400 mM TRIS-HCl (pH 6,8) 5 % SDS 0,006 % Bromphenolblau (BPB) 20 % Glycerol
<u>Inkubationspuffer für Zymographie:</u>	50 mM TRIS-HCl (pH 7,5) 200 mM NaCl 5 mM CaCl ₂ 0,02 Brij 35

3.8 Prinzip der Gelelektrophorese

Bei der Polyacrylamid-Gel Elektrophorese (PAGE) nach LAEMMLI (1970) werden elektrisch geladene Moleküle (z.B. Proteine) nach ihrer Molekülgröße in einem elektrischen Feld fraktioniert. Das Polyacrylamid-Gel bildet dabei eine elektrisch neutrale, inerte Matrix, durch welche die Moleküle wandern. Diese Gele werden hierfür zwischen zwei Kammern installiert (s. 4.10). Beide Kammern sind mit Elektrodenpuffer (s. Materialien) aufgefüllt und anschließend wird ein Gleichstrom angelegt.

Negativ geladene Moleküle wandern somit zur Anode. Auf der Seite der Kathode (d.h. oben, bei vertikaler PAGE-Anordnung) besitzen die Gele zehn bis fünfzehn Taschen mit einem Fassungsvermögen von 10-50 µl. In diese Taschen werden die zu untersuchenden Proben eingefüllt. Diese wandern, abhängig von der angelegten Spannung und der Ladung der Proteine, in das Gel ein. Je kleiner die Molekülgröße der Proteine in einer Probe ist, je weiter wandern diese innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls. Eine Komplexbildung der Proteine würde diese elektrophoretische Auftrennung

erschweren. Deswegen wird sowohl dem Gel als auch dem Elektrodenpuffer ein denaturierendes Agens, Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) hinzu gegeben.

Das Polyacrylamid bildet mit seinen Fasern ein Netz, durch das die Moleküle hindurchwandern, wobei die Polyacrylamidkonzentration die Porengröße der PAGE-Gele bestimmt und so die Laufeigenschaften der Moleküle beeinflusst. Ableitend davon gibt es je nach Molekulargewicht der Proteine einen optimalen Konzentrationsbereich des Polyacrylamides, d.h. eine optimale Porengröße: Bei kleinen Molekülen (5-25 kDa) gelingt eine gute Auftrennung in Gelen mit hoher Polyacrylamidkonzentration (10-20%). Große Moleküle (>100 kDa) werden dagegen besser in Gelen mit niedriger Polyacrylamidkonzentration (4-15%) fraktioniert.

3.9 Gelatinzymographie

3.9.1 Prinzip der Gelatinzymographie

Die Gelatinzymographie ist ein funktioneller Assay, mit dem eine Aktivitäts- und Größenbestimmung von Gelatine-verdauenden Proteasen möglich ist. Hierfür wird einem SDS-PAGE-Gel vor der Polymerisation 0,1% Gelatine hinzugefügt. Die Gelatine dient als Substrat für die in den Proben vorhandenen Proteasen, die Gelatine spezifisch verdauen. Durch den Vorgang der Elektrophorese liegen die Proteine der Größe nach aufgetrennt vor. Bei der Zymographie werden nur denaturierende, nicht-reduzierende Zusätze verwendet: Dadurch ist eine Renaturierung der Enzyme, durch Entfernen des SDS mittels Detergenz, Triton X-100 (Octoxynol-9), in einem anschließenden Waschschrift möglich. Die somit renaturierten Enzyme erhalten ihre Tertiärstruktur, ihre katalytisch wirksame Form, zurück. (GRANELLI-PIPERNO und REICH 1978).

Der Gelatineverdau findet während eines anschließenden Inkubationsschrittes in einem physiologischen Puffer statt. Durch eine Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliant-Blau (CBB) kann die im Gel enthaltene Gelatine gefärbt werden, während die Zonen gelatinolytischer Aktivität ungefärbt bleiben. Dadurch können gleichzeitig zwei Eigenschaften nachgewiesen werden: die Substratspezifität, anhand des Gelatineverdaus, und das ungefähre Molekulargewicht, anhand eines mitgelaufenen Proteinstandards. Vergleiche zwischen Banden bekannter, rekombinanter Proteasen, die auf das Gel aufgetragen wurden und der durch die Proben entstandenen Banden geben weitere Hinweise über den Ursprung und den Charakter der gelatinolytischen Aktivität in den Proben. Eine zusätzliche Identifikation der zu untersuchenden Proteasen ist mit spezifischen Inhibitoren der in Frage kommenden Enzyme möglich (s. 4.11).

3.9.2 Herstellung eines 8% SDS-Polyacrylamid Mini Gels mit 0,1% Gelatine

Die Methode erfolgt in Anlehnung an HEUSSEN und DOWDLE (1980). Alle Angaben gelten für ein 5 x 8 x 0,08 cm großes Mini-Gel:

Es werden zwei Glasplatten (8 x 10 cm) sorgfältig mit Ethanol gereinigt und zusammen mit zwei Abstandhaltern so in den vorgefertigten Rahmen (BIO RAD, Zürich, CH) eingespannt, dass zwischen ihnen ein Spalt von 0,08 cm entsteht. Dieser Rahmen wird in einem speziell dafür hergestellten Ständer (BIO RAD, Zürich, CH) eingeklemmt, wobei auf einen genauen Bundabschluss geachtet werden muss. Die Analysegeällösung wird frisch angesetzt. Ihr werden (s. 3.6) 0,25 ml Gelatine (2%ig), die in der Mikrowelle auf 50° Celsius vorgewärmt wurde, 25 µl APS und 5 µl TEMED zugefügt. Die unpolymersierte Gelmatrix wird in den Spalt zwischen den Glasplatten bis 2 cm unter den Rand eingefüllt. Über das noch flüssige Gel werden 2 ml Butanol gegeben, um eine gerade Oberkante des SDS-PAGE-Gels zu erhalten. Nach einer Stunde ist das Gel ausreichend polymerisiert, so dass das Butanol abgegossen und die verbliebenen 2 cm bis zum Oberrand der Glasscheiben mit der frisch angesetzten Sammelgeällösung (4%ige Polyacrylamid-Lösung) aufgefüllt werden können. In das noch flüssige Sammelgel wird ein Kamm mit 10 Taschen zu je 50 µl Inhalt eingehängt. Dabei müssen eventuell auftretende Luftblasen entfernt werden, da diese die Ausbildung der Geltaschen negativ beeinflussen würden. Nach ausreichender Polymerisationszeit von 30 min kann der Rahmen mit dem nun festen Gel in die Elektrophoresekammer gestellt werden. Die entstandene äußere und innere Kammer wird mit dem Elektrodenpuffer aufgefüllt. Nach Entfernen des Kammes müssen die einzelnen Geltaschen sorgfältig mit Elektrodenpuffer gespült werden, bevor die Proben geladen werden können.

3.9.3 Durchführung der Gelatinzymographie

Entsprechend des Proteingehaltes werden die Pleuraergüsse 1:5 mit Aqua bidest vorverdünnt. Die Pleuralavagen werden dagegen unverdünnt gebraucht. Anschließend werden die Proben 1:1 mit Probenpuffer versetzt.

Für Pleuraergüsse werden 2 µl des Proben-Puffergemisches in die Geltaschen der gelatinehaltigen SDS-PAGE Gele aufgetragen. Für Pleuralavagen werden entsprechend des Proteingehaltes der einzelnen Proben 5-40 µl des Proben-Puffergemisches auf das Gel aufgetragen.

Zur besseren Vergleichbarkeit laufen als Kontrolle rekombinantes MMP-2 und MMP-9 als Gemisch auf den Gelen mit. Für die optimale Auftrennung des Proteingemisches ist es wichtig, eine Stromstärke von nicht mehr als 6,25 mA pro SDS-Gel bei der 3-4 h dauernden Elektrophorese anzulegen. Ein blauer Farbmarker, der im Probenpuffer enthalten ist, zeigt den Stand der Elektrophorese an. Im Anschluss an die Elektrophorese wird durch einstündiges Waschen in Triton X-100 das denatu-

rierende SDS entfernt und die katalytisch wirksame Tertiärstruktur der Proteasen wiederhergestellt. Die somit renaturierten Gele werden anschließend bei 37° Celsius für 18 h unter leichter Bewegung auf einem Schüttler im Inkubationspuffer gelagert. Nach erfolgtem Gelatineverdau können am folgenden Tag die Zonen der gelatinolytischen Aktivität durch Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blau (CBB) sichtbar gemacht werden. Zur Konservierung werden die Gele in 1 %ige Glycerollösung fixiert und luftdicht zwischen zwei Zellulosefolien eingeschweißt.

3.10 Gelatinzymographie und Proteasen-Inhibitoren

Zur weiteren Charakterisierung der gelatinolytischen Aktivität in den Zymographien werden vier identische SDS-gelatinehaltige PAGE-Gele angefertigt, die jeweils gleiche Mengen an Proben, rekombinanten MMP und Proteinstandard enthalten. Nach abgeschlossener Elektrophorese werden die einzelnen Gele für 12 h im Inkubationspuffer gelagert. Das erste Gel dient als Kontrollgel und wird ohne den Zusatz von Proteasen-Inhibitoren inkubiert. Den restlichen 3 der 4 Gele werden jeweils einer der folgenden Proteasen-Inhibitoren zum Inkubationspuffer zugesetzt:

- PMSF -irreversibler Inhibitor von Serinproteasen
- Pefabloc® -reversibler Inhibitor von Serinproteasen
- EDTA -spezifischer Inhibitor von MMP

Die Behandlung der Gele erfolgt entsprechend der Durchführung der Gelatinzymographie bis auf die variierenden Zusätze der Proteasen-Inhibitoren identisch.

3.11 „Enzyme-linked immuno sorbent assay“ (ELISA)

3.11.1 Prinzip des ELISA

Der ELISA ist eine quantitative Untersuchung. Dieser erkennt spezifisch das zu untersuchende Antigen (Ag), ein Protein, und ermöglicht eine Mengenbestimmung mit Hilfe einer photometrisch gemessenen Farbreaktion.

Die für diese Arbeit verwendeten kommerziellen ELISA-Sets basieren auf dem Prinzip der zweiseitigen „sandwich“-Technik. Die verwendete 96-Loch-Mikrotiterplatte ist mit einem spezifischen, monoklonalen Antikörper („capture“-Ak) vorbeschichtet. Zur Erstellung einer Standardkurve werden Lösungen mit bekannten Antigenmengen (Standardlösungen) aufgetragen. Während eines Inkubationsschrittes bindet sich das zu untersuchende Ag in einer zweiten Schicht mit dem Ak. Die restlichen Bestandteile der Probe werden durch einen vierfachen Waschvorgang entfernt. Dann wird ein

zweiter, ebenfalls spezifischer, polyklonaler Ak (Detektions-Ak), der an Meerrettichperoxidase gekoppelt ist, in einer dritten Schicht an das Ag gekoppelt. Durch einen weiteren vierfachen Waschschrift werden überschüssige Mengen des zweiten Ak entfernt. Die in jedem Loch gebundene Menge an Peroxidase ist somit der Menge des Ag proportional.

Nach Zugabe eines Substrates der Peroxidase entsteht ein Produkt, welches einen Farbumschlag (von farblos bis zu Schattierungen in blau) bewirkt. Unter Zuhilfenahme eines Mikroplattenlesers und eines Statistikprogramms wird anhand der bekannten Ag-Konzentrationen der Standardlösungen und der zugehörigen optischen Dichte (OD) eine Standardkurve erstellt. Diese Standardkurve verläuft in dem vom Hersteller vorgegebenen Bereich linear. Somit kann einer Probe über die Standardkurve anhand der optischen Dichte eine korrespondierende Antigenkonzentration zugeordnet werden.

Ist der Ag-Gehalt in einer Probe höher als der vom Hersteller angegebene lineare Bereich der Standardkurve, muss diese Probe verdünnt werden. Bei Verdünnung der Proben muss die Proteinkonzentration mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Bei hohen Verdünnungen (>10x) wird in Zehnerschritten bis zur Endverdünnung diluiert. Grundsätzlich werden alle Proben als Doppelbestimmungen (Dupletts) analysiert, deren Mittelwert dem endgültigen Wert entspricht. Zeigt der Mittelwert eine Standardabweichung von mehr als 10% an, wird diese Messung nicht verwendet.

3.11.2 Durchführung des ELISA

3.11.2.1 Allgemein

Die Versuche werden gemäß der Versuchsanleitung des Herstellers für Serum/Plasma-Proben durchgeführt. Für jedes zu untersuchende Ag wird eine Standardreihe erstellt. Hierfür wird eine Standardlösung mit bekannter Ag-Konzentration schrittweise mit einem Probenpuffer verdünnt. Alle Reaktionsschritte müssen zeitlich genau und bei Raumtemperatur (RT) ausgeführt werden. Zudem müssen alle Reagenzien RT erlangt haben. Die einzelnen Untersuchungen gliedern sich wie folgt auf:

3.11.2.2 Für MMP-1

Es wird eine Verdünnungsreihe der MMP-1-Standardlösung (100- 50- 25- 12,5- und 6,25 ng/ml) mit dem Verdünnungspuffer erstellt. Der Verdünnungspuffer dient der Standardreihe als Nullprobe. Von diesen Lösungen und den zu untersuchenden, unverdünnten Proben (Pleuraergüsse und Pleuralavagen) werden 100 µl/Loch als Dupletts in die Vertiefungen pipettiert und die Mikrotiterplatte mit einer Klebefolie luftdicht verschlossen. Nach einer Inkubationszeit von 2 h werden alle nicht gebundenen Bestandteile durch einen vierfachen Waschschrift entfernt: Jede Vertiefung wird mit 250 µl

eines Waschpuffers gespült, anschließend wird die Platte auf Zellstoff vorsichtig ausgeklopft, um evtl. Flüssigkeitsrückstände zu entfernen. Erneut werden zu jedem Loch 100 µl eines Antiserums (anti-MMP-1 Ak vom Hasen in Rinder-Serumalbumin) hinzu gegeben. Die Platte wird mit Folie abgedeckt und für 2 h inkubiert. Einem vierfachen Waschvorgang, wie oben beschrieben, schließt sich die Zugabe von 100 µl/Loch des Peroxidasekonjugats (Meerrettichperoxidase-Esel-Anti-Hase Ak-Konjugat) an. Die Inkubationsdauer beträgt 1 h bei abgedeckter Platte, danach wird erneut viermal gewaschen. Die Füllung der Vertiefungen erfolgt möglichst rasch mit 100 µl/Loch eines Peroxidasesubstrats. Nach einer Entwicklungszeit von 30 min. wird die Farbreaktion mit 100 µl/Loch 1 M Schwefelsäure gestoppt und innerhalb von 30 min. bei 450 nm im Mikroplattenleser gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgt mittels Statistikprogramm.

3.11.2.3 Für MMP-2

Die mit dem Verdünnungspuffer diluierte MMP-2-Standardlösung ergibt folgende Verdünnungsreihe: 24- 12- 6- 3 und 1,5 ng/ml. Die Mikrotiterplatte wird in zwei Schritten beladen: zuerst mit 100 µl/Loch von den Standardlösungen der Verdünnungsreihe, dann von dem Verdünnungspuffer und von den Proben (Ergüsse und PL), welche mit Aqua bidest auf eine Gebrauchsverdünnung von 1:250 vorbehandelt sind. Nach einer zweistündigen Inkubation bei luftdicht verschlossener Platte, erfolgt im zweiten Schritt die Zugabe von 100 µl/Loch eines Peroxidase markierten anti-MMP-2 Ak. Dieser wird für eine Stunde auf der Platte belassen. Zwischen jeweils beiden Schritten erfolgte der bereits oben beschriebene, vierfache Waschvorgang. Anschließend werden 100 µl des Peroxidasesubstrats für 30 min. in alle Vertiefungen gegeben. Der Nachweis und die Auswertung der durch die Peroxidase katalysierten Reaktion ist identisch mit dem unter 3.11.2.1 beschriebenen Vorgang.

3.11.2.4 Für MMP-9

Für die Standardkurve wird eine MMP-9-Standardlösung mit einem Verdünnungspuffer auf folgende Verdünnungsstufen diluiert: 100- 64- 32- 16- 8 und 4 ng/ml. Von diesen Standardlösungen, dem Verdünnungspuffer und den unverdünnten Proben werden 100 µl in die Vertiefungen aufgetragen. Bis auf das Duplett des Verdünnungspuffers, der als Nullprobe dient, werden 100µl eines Peroxidase markierten anti-MMP-9 Ak hinzu gegeben. Die Platte wird mit Klebefolie abgedeckt und nach einstündiger Inkubation, wie bereits oben beschrieben, viermal gewaschen. Möglichst rasch erfolgt die Zugabe von 100 µl des Peroxidasesubstrats in jede Vertiefung. Nach genau 30 min. wird die Reaktion mit 100 µl/Loch 1 M Schwefelsäure abgestoppt. Die photometrische Messung erfolgte bei 450 nm im Mikroplattenleser und die Auswertung mittels Statistikprogramm.

3.11.2.5 Für TIMP-1

Teil der Standardkurve sind Verdünnungen der TIMP-1-Standardlösung von 50, 25, 12.5, 6.25 und 3.13 ng/ml. Der Verdünnungspuffer dient wiederum als Nullprobe. Das Laden der Platte erfolgt in zwei Schritten: Zuerst werden 100 µl/Loch von den Standardlösungen, des Verdünnungspuffers und den mit Aqua bidest 1:500 verdünnten Proben aufgetragen. Die Platte wird mit einer Klebefolie bedeckt und für 2 h inkubiert. Nach dem oben beschriebenen Waschvorgang erfolgt der zweite Ladeschritt. Es werden 100 µl/Loch von dem mit Peroxidase markierten anti-TIMP-1 Ak in jede Vertiefung pipettiert und für weitere 2 h luftdicht gelagert. Die weiteren Vorgänge (Zugabe des Peroxidasesubstrats, Nachweis und Auswertung der durch die Peroxidase katalysierten Reaktion) sind mit den unter 3.11.2.1 beschriebenen identisch.

3.11.2.6 Für TIMP-2

Die Standardlösungen bestehen aus 5 Verdünnungsstufen (128, 64, 32, 16 und 8 ng/ml), wobei der Verdünnungspuffer als Nullprobe dient. Diese Lösungen und die mit Aqua bidest 1:5 verdünnten Proben werden 1:1 mit dem Peroxidase markierten anti-TIMP-2 Ak vorgemischt, bevor 100 µl/Loch von dieser Mischung auf die Mikrotiterplatte aufgetragen werden. Die Platte wird luftdicht abgedeckt und genau 2 h inkubiert. Es folgt der oben beschriebene, vierfache Waschschrift. Die Zugabe des Peroxidasesubstrats, der Nachweis und die Auswertung der peroxidasekatalysierten Reaktion sind mit den unter 3.11.2.1 beschriebenen Vorgängen identisch.

3.12 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung der Pleuralavage fand unter Verwendung des „Protein Assay Sets“ von BIO-RAD (Zürich, CH), nach einer Methode von BRADFORD (1976) und verifiziert durch SPECTOR (1978) statt. Sie basiert auf der Bindung von Coomassie-Brilliant-Blau G-250 (CBB) an ein Protein. Diese Anlagerung verursacht einen Wechsel des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nach 595 nm. Die Zunahme der Lichtabsorption kann bei 595 nm photometrisch gemessen werden.

Für den Versuch wird eine Lösung mit einer bekannten Konzentration an Rinder-Serumalbumin schrittweise mit Aqua bidest verdünnt (Verdünnungsstufen zu 25, 12.5, 6.25, 3.13 und 1.56 µg/ml). Hiervon werden jeweils 200 µl/Loch auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen. 200 µl/Loch Aqua bidest diente als Nullprobe. Die Proben werden 1:50 mit Aqua bidest verdünnt, wovon ebenfalls 200µl/Loch aufgetragen werden. Alle Messungen finden als Doppelbestimmungen statt. Anschließend erfolgt die Zugabe von 50 µl CBB. Die Platte wird mit Klebefolie luftdicht verschlossen und zur gleichmäßigen

Verteilung der Substanzen vorsichtig geschüttelt. Nach genau einer Stunde erfolgt die Messung der optische Dichte mit dem Mikroplattenleser bei 595 nm und die Auswertung mittels Statistikprogramm.

3.13 Quantitative Daten und statistische Analysen

Ein preliminärer Vergleich der Daten deutet auf eine logarithmische Verteilung der MMP- und TIMP-Isoformen hin, so dass für die statistischen Analysen die logarithmierten Werte verwendet werden. Unter der Annahme der Normalverteilung von logarithmierten Werten werden parametrische Testverfahren angewandt.

Die statistischen Analysen der ELISA-Daten werden von der Abteilung für medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität Giessen mit dem Programm SPSS durchgeführt. Beginnend mit der parametrischen, zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholung (ANOVA-Test), werden die Effekte der Isoformen, die Effekte der Diagnosen als auch die der Wechselwirkung berechnet. Eine Anpassung für Mehrfachvergleiche erfolgt mittels Bonferroni-Prozedur. Anschließend werden für die einzelnen Isoformen einfache Globalteste (einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA)) mit post-hoc Tests für multiple Paarvergleiche (Scheffé-Test) bezüglich der unterschiedlichen Pleuraergüsse oder der Pleuralavagen durchgeführt. Die Hypothesen werden auf statistisch signifikante Unterschiede innerhalb der einzelnen Gruppen überprüft. Je kleiner der p-Wert ist, desto geringer ist die Irrtumswahrscheinlichkeit über signifikante Unterschiede der Verteilungsfunktionen der Mittelwerte in den verglichenen Gruppen bezüglich der Diagnosen (Transsudate, parapneumonische, paraneoplastische Exsudate oder Pleuralavagen) und Isoformen (MMP-1, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, und TIMP-2). Ein Ergebnis wird als statistisch signifikant gewertet, wenn der p-Wert unter 0,05 liegt.

Die Rechenschritte erfordern hierbei die Logarithmen zur Basis 10 der Konzentrationen, somit anstatt des arithmetischen Mittelwerts (Mittelwert, MW) den geometrischen Mittelwert (geom. MW = $10^{\text{MW der Logarithmen}}$). Zusätzlich erfolgt die Angabe des 95%-igen Konfidenzintervalls zum geometrischen Mittelwert (95% Konf.-Int. = $10^{(\text{Mittelwert der Logarithmen}) \pm 2 \cdot (\text{Standardabweichung der Logarithmen} / \sqrt{n})}$), d.h. zu dem Intervall in dem der tatsächliche Mittelwert mit 95%iger Sicherheit liegt.

MMP- und TIMP-Konzentrationen die unter der Nachweisgrenze liegen, würden für die statistischen Rechenschritte sowie für die logarithmische Einzelwertdarstellung (s.u.) verloren gehen. Somit erfolgt die Zuweisung einer fest definierten Konzentration: üblich ist die Hälfte der unteren Nachweisgrenze, entsprechend den Herstellerangaben des jeweiligen ELISA-Sets (Sensitivität).

Zum standardisierten Vergleich von Konzentrationsangaben in biologischen Proben, werden Konzentrationen auf den gesamten Gehalt an Protein der jeweiligen Probe bezogen. Es ergibt sich die Einheit ng/mg Protein. Da für Pleuralavagen-Proben ohne messbare MMP- oder TIMP-Konzentrationen

aufgrund des geringen Proteingehaltes durch diesen Rechenschritt falsch-hohe Konzentrationsangaben errechnet würden, wird dieser Rechenschritt nicht durchgeführt. Dies betrifft alle MMP-1 und MMP-9 Messungen für die gesamten 10 Pleuralavage-Proben.

Die graphischen Einzelwertdarstellungen in logarithmischer Skalierung werden mittels Excel 5.0 erstellt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Zymographie

4.1.1 Nachweis von MMP-2 und MMP-9 in der Gelatinzymographie

Die Gelatinzymographie (s. 3.10) ist die sensitivste Methode zum Nachweis von MMP-2- und MMP-9-Aktivität (QUESADA et al. 1997). Mit ihr lassen sich diese Proteasen im Pikogrammbereich darstellen (KLEINER und STETLER-STEVENSON 1994). Unter denaturierenden und nichtreduzierenden Bedingungen wird nach elektrophoretischer Auftrennung (SDS-PAGE), Inkubation unter physiologischen Bedingungen und anschließender Coomassie-Blau-Färbung (s. 3.10.1) die gelatinolytische Aktivität der Enzyme als zwei diskrete Bande sichtbar. Ein direkter Vergleich mit dem Proteinstandard im Gel ermöglicht eine Näherung des Molekulargewichtes: Die Bande eines großen Proteins liegt bei ca. 90 kDa und die eines kleineren bei ca. 70 kDa. Werden diese Bande, mit denen der mit auf dem Gel aufgetragenen, rekombinanten Gelatinasen MMP-2 (Gelatinase A, 72 kDa Typ IV Kollagenase) und MMP-9 (Gelatinase B, 92 kDa Typ IV Kollagenase) verglichen, so ist eine Identifizierung der in den Patientenproben Gelatinolyse verursachenden Proteasen möglich. Somit kann die bei 70 kDa liegende Bande als MMP-2 und die bei 90 kDa liegende Bande als MMP-9 identifiziert werden.

MMP-2 ist in allen untersuchten Pleuraergüssen und in allen Pleuralavagen gleichmäßig und konstant vorhanden. MMP-9 variiert dagegen in Vorkommen und Ausprägung in den Pleuraergüssen unterschiedlicher Genese und fehlt in den Pleuralavagen vollständig.

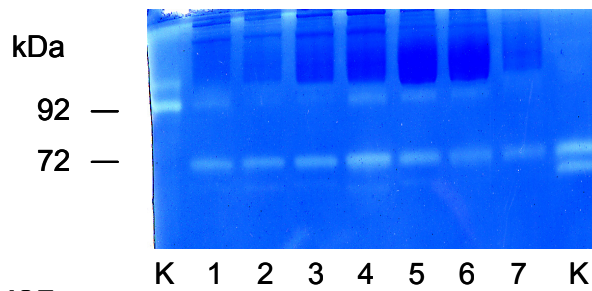
Im Zymogramm ist sowohl bei den rekombinanten Proteasen als auch bei den Ergussproben eine eng beieinander liegende Doppelbande für MMP-2 und MMP-9 erkennbar. Diese ist Ausdruck einer nur teilweise auftretenden Aktivierung durch Molekülverkürzung. Diese leichtere Isoform war bei MMP-2 und MMP-9 in den Transsudaten als auch in den parapneumonischen und paraneoplastischen Exsudaten nachweisbar. In den Pleuralavagen fehlte diese bei MMP-2 vollständig.

4.1.2 Unterscheidung gelatinolytischer Aktivität

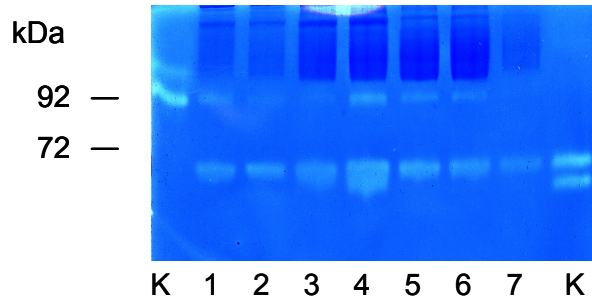
In der Gelatinzymographie muss zur Unterscheidung von verschiedenen gelatine-degradierenden Proteasen, identischen Gelen verschiedenartige spezifische Inhibitoren zugesetzt werden. Da nicht nur MMP-2 und MMP-9 sondern auch Serinproteasen gelatinolytische Aktivität besitzen, muss die Identität der Proteasen, welche für das Bandenmuster in der Zymographie verantwortlich sind, genau bestimmt werden.

Identisch angefertigte Gele (s. 3.11) werden entweder mit spezifischen Inhibitoren von Serinproteasen wie PMSF oder Pefablock® inkubiert oder mit einem spezifischen Inhibitor von MMP wie EDTA. Der Vergleich der mit PMSF oder Pefablock® inkubierten Gele (s. Abbildung 1, b und c) mit einem unbehandelten Kontrollgel (s. Abbildung 1, a) zeigt keine Veränderung im Bandenmuster. Serinproteasen scheiden somit, obwohl sie gelatinolytische Aktivität besitzen, als Ursache der Gelatinedegradation aus. Andererseits verschwinden die Bande bei der Zugabe von EDTA (s. Abbildung 1, d). EDTA ist ein Chelatbildner mit Metallionen und entzieht auf diese Weise die für die proteolytische Aktivität der MMP notwendigen Metallionen und hemmt das aktive Zentrum. Diese Daten sprechen ergänzend dafür, dass MMP die Ursache der Gelatinolyse in der Zymographie sind.

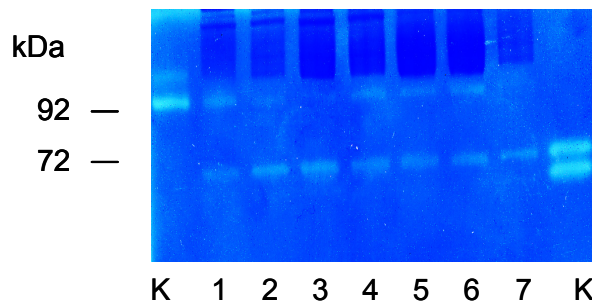
a) Kontrolle



b) + PMSF



c) + Pefabloc



d) + EDTA

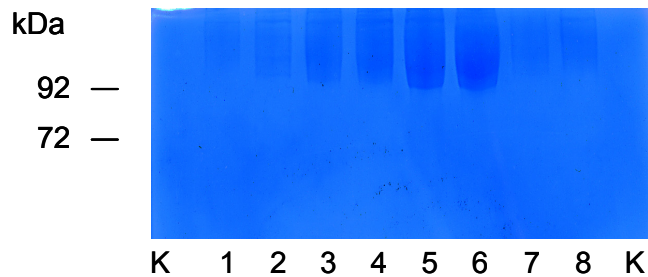
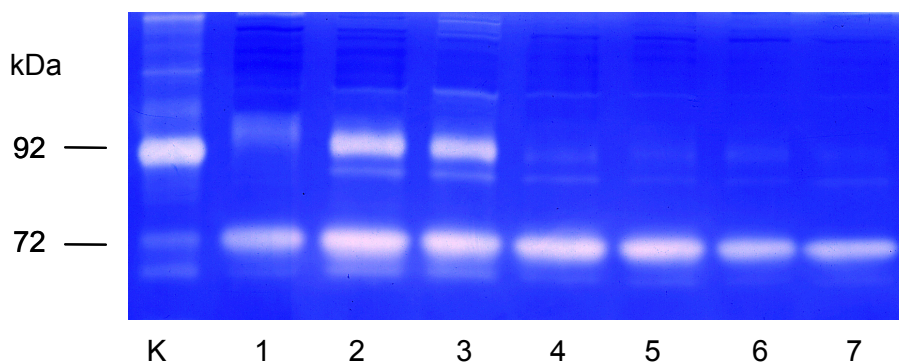


Abbildung 1 Vier Zymographien von identisch geladen und verarbeiteten Gelatin-SDS-PAGE-Gelen, wie im Methodenteil beschrieben (s. 3.9). Um die Herkunft der gelatinolytischen Aktivität zu bestimmen, erfolgt der Inkubationsschritt der Gele in (a) normalem Enzym-Puffer; oder (b) Enzym-Puffer mit 5 mM PMSF, einem irreversiblen Inhibitor von Serinproteasen; oder (c) Enzym-Puffer mit 5mM Pefabloc®, einem reversiblen Inhibitor von Serinproteasen; oder (d) Enzym-Puffer mit 5mM EDTA, einem spezifischen Inhibitor von MMP. Aufgetragen sind 7 Pleuraerguss-Proben (Nr. 1 bis 7) lediglich bei (d) wird eine Probe zusätzlich (Nr. 8) aufgetragen. Als Kontrolle (K) wird gereinigtes MMP-2- (rechts) und MMP-9-Protein (links) mit aufgetragen. Anhand eines gefärbten Proteinstandards wird das Molekulargewicht in kDa ermittelt und links angegeben.

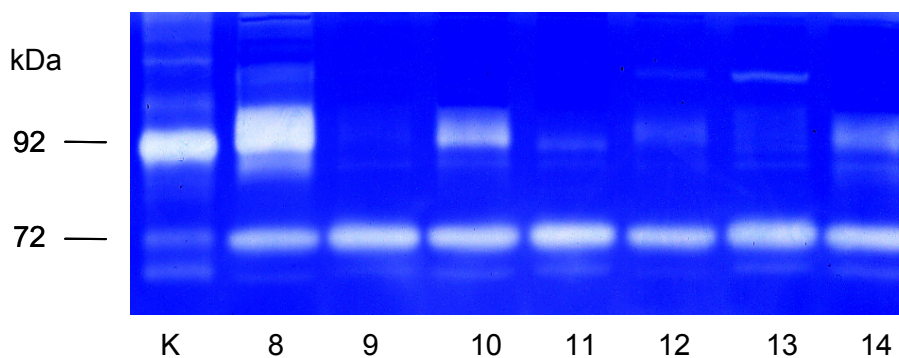
4.1.3 Gelatinzymographie von Pleuraergüssen

Bei den 96 mittels Gelatinzymographie untersuchten Ergüssen findet sich eine starke, gleichmäßige MMP-2 Aktivität (s. Abbildung 2). Diese ist zwischen Transsudaten und Exsudaten bzw. zwischen parapneumonischen und paraneoplastischen Exsudaten konstant ausgeprägt. Im Gegensatz dazu ist die Stärke und Ausprägung der Gelatinolyse durch MMP-9-Aktivität zwischen den einzelnen Diagnosegruppen unterschiedlich: Am schwächsten vorhanden ist sie bei Transsudaten. Am stärksten bei den Exsudaten, wobei eine Gewichtung der MMP-9-Aktivität zwischen parapneumonischen und paraneoplastischen Exsudaten weniger eindeutig ist. Die kleinere, aktivierte Isoform von MMP-2 und MMP-9 kann bei den meisten Proben als Doppelbande nachgewiesen werden (s. Abbildung 2).

a) Transsudate



b) Parapneumonische Ergüsse



c) Paraneoplastische Ergüsse

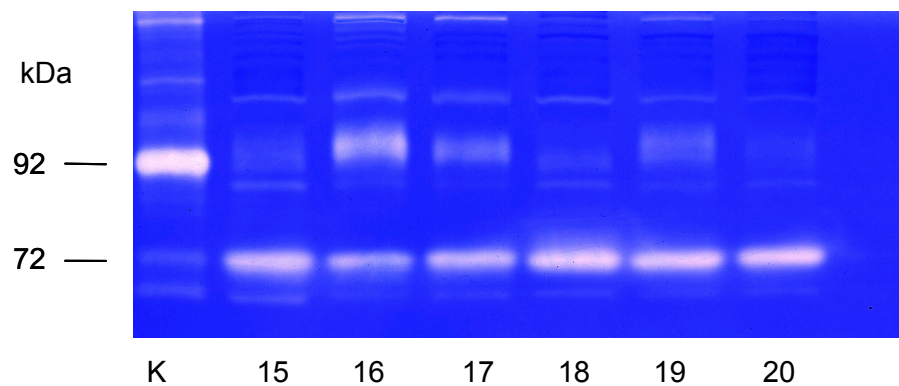


Abbildung 2 Drei Zymographien werden mit Proben von repräsentativen Transsudaten (a), repräsentativen parapneumonischen Ergüssen (b) und repräsentativen paraneoplastischen Ergüssen (c) beladen. Die Gele werden unter den gleichen Bedingungen wie im Methodenteil beschrieben (s. 3.9) geladen und verarbeitet. Anhand eines gefärbten Proteinstandards wird das Molekulargewicht in kDa ermittelt und links eingetragen. Als Kontrolle (K) wird gereinigtes MMP-2- (bei 72 kDa) und MMP-9-Protein (bei 92 kDa) mit aufgetragen. Dargestellt sind: in Spalte 1 bis 7: sieben repräsentative Transsudate (a); in Spalte 8 bis 14: sieben repräsentative parapneumonische Ergüsse (b) und in Spalte 15 bis 20 sechs repräsentative paraneoplastische Ergüsse (c).

4.1.4 Gelatinzymographie von Pleuralavagen

Es werden 10 Pleuralavagen mittels Gelatinzymographie untersucht. Eine Pleuralavage bleibt aufgrund der schon makroskopisch erkennbaren hämorrhagischen Verunreinigung (sie zeigte entsprechend des MMP-9- Gehaltes des Serums eine Bande bei ca. 90 kDa) bei folgender Auswertung unberücksichtigt (ohne Abbildung). Diese 10 Pleuralavagen besitzen konstant eine signifikante MMP-2-Aktivität (s. Abbildung 3). Einheitlich ist das Fehlen einer Doppelbande, die auf eine mit Molekülverkürzung einhergehende Aktivierung hinweisen würde (s. 4.1.1). In diesen 10 Fällen kann einheitlich keine Gelatinolyse durch MMP-9 nachgewiesen werden.

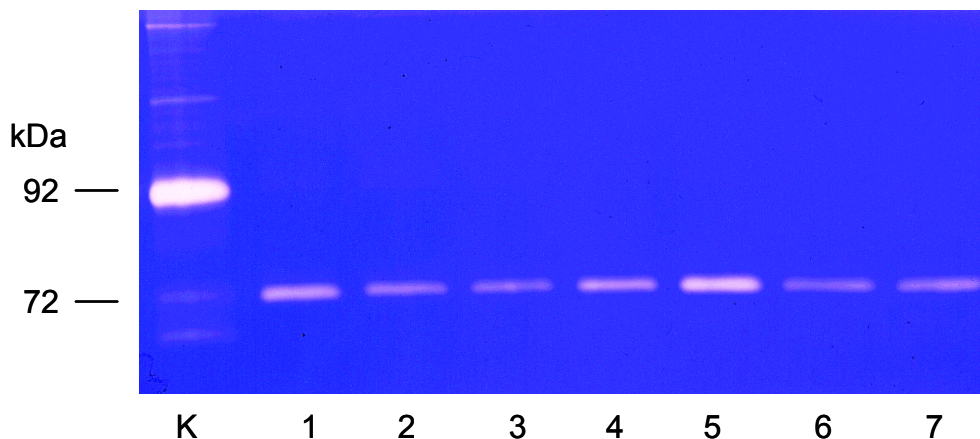


Abbildung 3 Gelatinzymographie von 7 repräsentativen Pleuralavagen (Proben 1-7). Als Kontrolle (K) ist rekombinantes MMP-2 (bei 72 kDa) und MMP-9 (bei 92 kDa) aufgetragen. Anhand des mitgelaufenen Proteinstandards wird das Molekulargewicht ermittelt und links eingetragen.

4.1.5 Vergleich der einzelnen MMP-Bandenmuster in der Gelatinzymographie

MMP-2 ist die dominante Isoform in den Pleuraergüssen. Sie ist bei allen Ergüssen (n=96) konstant nachweisbar. MMP-9 dagegen zeigt ein unregelmäßiges Expressionsmuster. Beginnend bei den Transsudaten, über die paraneoplastischen Exsudate bis hin zu den parapneumonischen Exsudaten zeigt sich für MMP-9 eine Zunahme in der Expression. Dieser Unterschied ist jedoch zwischen den Exsudaten unterschiedlicher Genese weniger deutlich als zwischen Transsudaten und Exsudaten. Für beide Isoformen ist die kleinere, aktivierte Form durchgängig als Doppelbande zu erkennen.

MMP-2 ist die alleinige Isoform in den Pleuralavagen. Sie wird konstant und deutlich in allen Proben exprimiert. Für die kleinere, aktivierte Form i.S. einer Doppelbande, gibt es keinen Hinweis. MMP-9 fehlt vollständig.

4.2 Quantitative Daten (ELISA) und Statistische Ergebnisse

In allen untersuchten Pleuraergüssen und Pleuralavagen werden mit Hilfe kommerzieller ELISA-Systeme MMP-1, MMP-2, MMP-9 und deren Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 quantitativ bestimmt (s. 3.13). Zum einen, um die Ergebnisse der funktionellen, semi-quantitativen Methode der Zymographie zu überprüfen und zum anderen, um die einzelnen MMP- und TIMP-Isoformen quantitativ korrelieren zu können.

Unter der Annahme der Normalverteilung von logarithmierten Werten, werden für die parametrischen Testverfahren (ANOVA- und Scheffé-Test) die geometrischen Mittelwerte ($10^{\text{Mittelwert der Logarithmen}}$) verwendet. Zudem wird das 95%-ige Konfidenzintervall zum Mittelwert genannt. Die Angabe von Anzahl, Median, Minimum und Maximum erfolgt in Rohwerten. Für Konzentrationen, die unter der Nachweisgrenze (Sensitivität der Methode) liegen und somit für die statistische Analyse als auch für die logarithmische Einzelwertdarstellung entfallen würden, wird eine Konzentration willkürlich definiert. Üblich ist die Zuordnung von der Hälfte der unteren Nachweisgrenze (s. 3.13). Median, Minimum und Maximum werden als absolute Werte angegeben, so dass Werte, die unter der Nachweisgrenze liegen, mit „nicht messbar“ (n.m.) angegeben werden.

4.2.1 Analyse der absoluten Werte

Die ELISA-Analyse liefert uns die absoluten Werte der einzelnen MMP- und TIMP-Isoformen. Für die Vergleichbarkeit von biologischen Proben (Pleuraergüsse vs. Pleuralavagen) ist es erforderlich, die Konzentrationsangaben der einzelnen Enzyme und Inhibitoren auf den Gehalt an Gesamtprotein der jeweiligen Probe zu beziehen („proteinkorrigierte Werte“). Somit werden die statistischen Analysen jeweils für die absoluten als auch die proteinkorrigierten Werte einzeln durchgeführt.

4.2.1.1 MMP- und TIMP-Isoformen in der Gesamtheit der Proben

Es werden 471 Paarmessungen in 96 Pleuraergüssen und 50 Paarmessungen in 10 Pleuralavagen durchgeführt, wobei für die einzelnen MMP- und TIMP-Isoformen eine unterschiedliche Anzahl von Pleuraergüssen analysiert werden (104 für MMP-1, 105 für MMP-2, 106 für MMP-9, 102 für TIMP-1 und 106 für TIMP-2). Bei folgenden Proben lagen die Werte unter der unteren Nachweisgrenze: bei Pleuraergüssen sind es sieben Proben für MMP-1, eine Probe für MMP-9 und zwei Proben für TIMP-1. Bei Pleuralavagen sind es alle Messungen für MMP-1 (n=10) und MMP-9 (n=10). Tabelle 9 zeigt die Daten der einzelnen Isoformen für die Gesamtheit der Pleuraergüsse und für alle Pleuralavagen an.

Isoformen in allen Proben					
	MMP-1	MMP-2	MMP-9	TIMP-1	TIMP-2
geom MW	3,1	537	3,01	1698	30,9
95% KI	2,6; 3,7	457; 616	2,2; 4,2	1202; 2344	25,1; 38,9
n	104	105	106	102	106
Median	4,8	1735	4,0	5909	40,3
Minimum	n.m.	1,5	n.m.	n.m.	1,1
Maximum	25,8	4999	687	32589	1762

Tabelle 9 Logarithmische Werte und Rohwerte (ng/ml) der MMP- und TIMP-Konzentrationen in der Gesamtheit aller Pleuraergüsse (n=96) unterschiedlicher Genese und in allen Pleuralavagen (n=10). (Abkürzungen: geom MW= geometrische Mittelwert, 95% KI= 95% Konfidenzintervall, n= Anzahl, n.m.= nicht messbar)

Ein Vergleich der Mittelwerte erfolgt für die Gesamtheit der Proben mittels zweifaktorieller Varianzanalyse mit Messwiederholung auf einen Faktor (ANOVA) und bei Mehrfachvergleichen eine Anpassung mittels Bonferroni-Korrektur sowie einfaktorieller Varianzanalyse bezüglich der Isoform als Faktor. Diese ergeben sowohl signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) als auch Wechselwirkungen innerhalb aller Proben. Die sich aus dieser Analyse ergebenden Effekte und p-Werte sind in Tabelle 10 aufgelistet.

Einfaktorielle ANOVA: Test der Innersubjekteffekte						
Quelle		Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Isoform	Sphärizität angenommen	501,978	4	125,495	549,145	$p < 0,001$
Isoform*Diagnose	Sphärizität angenommen	29,796	12	2,483	10,865	$p < 0,001$

Tabelle 10 Einfaktorielle Varianzanalyse mit Test der Innersubjekteffekte, Wechselwirkung (Isoform*Diagnosen) und Angabe der Signifikanzen: Mittelwertvergleich der Gesamtheit aller Proben für die Faktoren „Isoform“ ($\log_{10}(\text{MMP-1})$, $\log_{10}(\text{MMP-2})$, $\log_{10}(\text{MMP-9})$, $\log_{10}(\text{TIMP-1})$ und $\log_{10}(\text{TIMP-2})$) und „Diagnose“ (T, P, C, PL). Statistisch signifikanter Unterschied = $p < 0,05$.

Die p-Werte der Paarvergleiche (Zweifaktorielle Varianzanalyse, s.4.4) sind, unter Berücksichtigung der Isoformen als Hauptfaktor, für alle Proben in Tabelle 11 aufgeführt. Diese zeigen, dass sich alle Isoformen statistisch signifikant unterscheiden ($p < 0,05$), außer der Daten für MMP-1 und MMP-9.

Zweifaktorielle ANOVA aller Proben				
Isoformen	log10(MMP-1)	log10(MMP-2)	log10(MMP-9)	log10(TIMP-1)
log10(MMP-2)	p<0,001			
log10(MMP-9)	1	p<0,001		
log10(TIMP-1)	p<0,001	p<0,001	p<0,001	
log10(TIMP-2)	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001

Tabelle 11 Zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Anpassung für Mehrfachvergleiche mittels Bonferroni-Prozedur von allen Proben (Pleuraergüsse n=96, Pleuralavagen n=10) mit dem Hauptfaktor der logarithmierten MMP- und TIMP-Isoformen unter Angabe der p-Werte (statistisch signifikanter Unterschied: p<0,05).

4.2.1.1.1 MMP-1-Isoform

Der MMP-1-Gehalt wird mit Hilfe eines BIOTRAK™-ELISA für MMP-1 (interstitielle Kollagenase) bestimmt (s. 3.13.2.1). Nachgewiesen werden das gesamte humane MMP-1, einschließlich freiem MMP-1 sowie mit TIMP-1 komplexiertes. Zu MMP-3, -2, -9 oder TIMP-1 liegt keine signifikante Kreuzreaktivität vor. Untere und obere Grenze der Eichkurve liegen jeweils bei 6,25 und 100 ng/ml und die Nachweissensitivität bei 1,7 ng/ml.

Den Rohwerten, die 0 ng/ml betragen, wird für die logarithmische Rechenoperation sowie die Einzelwertdarstellung der Wert 0,85 ng/ml zugeordnet. Dies gilt für vier Transsudate, einen parapneumonischen und zwei paraneoplastische Exsudaten und alle 10 Pleuralavagen. In den Proben (n=104) ergibt sich eine quantitative Verteilung des MMP-1 zwischen nicht messbar und 25,8 ng/ml bei einem Median von 4,8 ng/ml. Der geometrische Mittelwert liegt bei 3,1 ng/ml mit einem 95%-igen Konfidenzintervall zwischen 2,6 und 3,7 ng/ml.

Die Konzentrationsangaben von MMP-1 sind für die einzelnen Diagnosengruppen in Tabelle 12 zusammengefasst. Die Ergebnisse der Paarvergleiche unter Anwendung der in 3.13 beschriebenen statistischen Methoden (ANOVA- und Scheffé-Test) sind in Tabelle 13 und Tabelle 14 dargestellt. Abbildung 4 gibt die logarithmische Einzelwertdarstellung wieder. Einen signifikanten Unterschied (p<0,05) zeigt der Vergleich von Transsudaten mit parapneumonischen Exsudaten und der Vergleich aller Pleuraergüsse unterschiedlicher Genese mit den Pleuralavagen.

MMP-1				
	T	P	C	PL
geom MW	3,2	7,1	4,4	0,9
95% KI	2,3; 4,4	5,1; 10	3,6; 5,9	0,5; 1,5
n	28	23	43	10
Median	4,0	7,5	4,5	n.m.
Minimum	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
Maximum	14,3	25,8	15,6	n.m.

Tabelle 12 Verteilung der MMP-1-Konzentration (ng/ml) von 94 Pleuraergüssen unterschiedlicher Genese und 10 Pleuralavagen. Bei vier Transsudaten, einem parapneumonischen zwei paraneoplastischen Exsudaten und zehn Pleuralavagen lagen die Konzentrationen unter der Nachweisgrenze und werden wie oben genannt definiert. (Abkürzungen: T= Transsudate, P= parapneumonische Exsudate, C= paraneoplastische Exsudate)

Einfaktorielle ANOVA: Übersicht der Effekte für log ₁₀ (MMP-1)					
	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	6,272	3	2,091	15,812	p<0,001
Innerhalb der Gruppen	13,223	100	0,132		
Gesamt	19,495	103			

Tabelle 13 Einfaktorielle Varianzanalyse mit Auflistung der Einzeleffekte und des Globaleffekts (p-Wert) für log₁₀(MMP-1) von 94 Pleuraergüssen und 10 Pleuralavagen. Ein p<0,05 wird als statistisch signifikanter Unterschied gewertet.

Scheffé-Test für log ₁₀ (MMP-1)			
Diagnosen	T	P	C
P	0,011		
C	0,506	0,166	
PL	0,001	p<0,001	p<0,001

Tabelle 14 Paarvergleiche mit p-Werten für die logarithmierten MMP-1-Konzentrationen in 94 Pleuraergüssen nach Diagnoseklassen gruppiert und 10 Pleuraergüssen. (Statistisch signifikanter Unterschied: p<0,05)

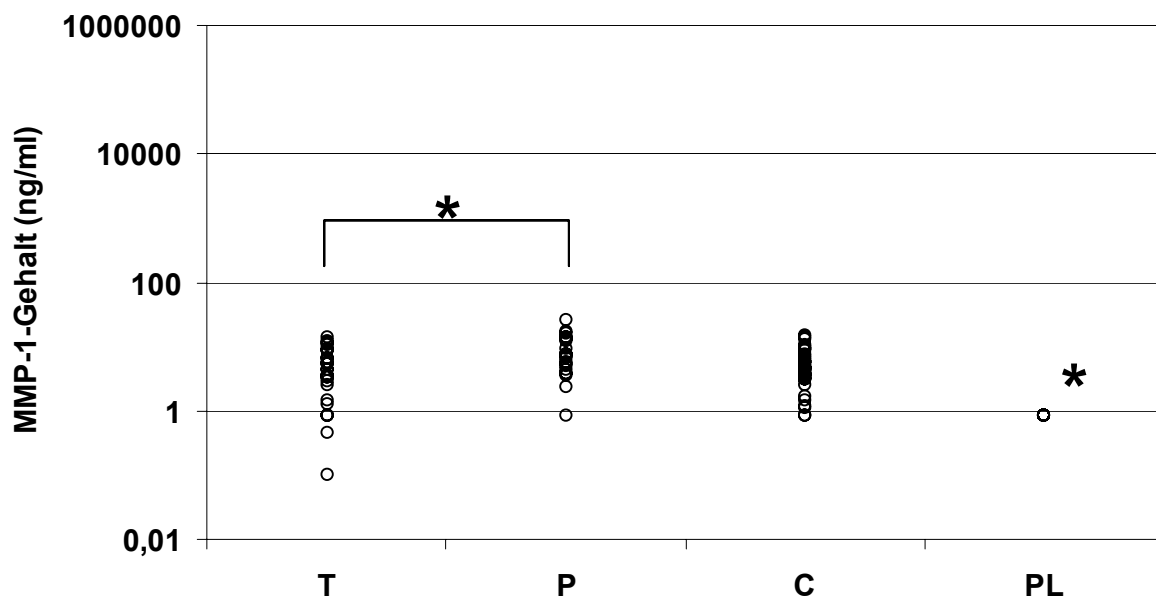


Abbildung 4 MMP-1-Gehalt (ng/ml) in logarithmischer Darstellung von 28 Transsudaten (T), 23 parapneumonischen (P) und 43 paraneoplastischen Exsudaten (C) sowie 10 Pleuralavagen (PL). Bei vier Transsudaten, einem parapneumonischen, zwei paraneoplastischen Exsudaten und zehn Pleuralavagen wird bei 0 ng/ml eine Konzentration von 0,85 ng/ml definiert. Der Paarvergleich zwischen den Diagnosegruppen ergibt einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) im MMP-1-Gehalt zwischen Transsudaten und parapneumonischen Exsudaten sowie allen Pleuraergüssen zu Pleuralavagen. (* = Statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$))

4.2.1.1.2 MMP-2-Isoform

Der quantitative Nachweis von MMP-2 (Gelatinase A, 72-kDa Typ IV Kollagenase) erfolgt mit einem BIOTRAK™-ELISA (s. 3.13.2.2). Die untere und obere Grenze der Eichkurve liegen bei 1,5 und 24 ng/ml und die Nachweissensitivität bei 0,37 ng/ml. Erkannt werden neben der Proenzymform ebenfalls die aktivierte Form von MMP-2, das heißt, die freie und die mit TIMP-2 komplexierte Pro-MMP-2-Form. Es liegt keine Kreuzreaktivität mit MMP-1, -3, -7, -8, -9 oder MT1-MMP vor.

Der Gehalt an MMP-2 in den gesamten Ergüssen ($n=95$) und den Pleuralavagen ($n=10$) liegt zwischen 151,3 und 4999 ng/ml mit einem Median von 1735 ng/ml. Der geometrische Mittelwert liegt bei 530 ng/ml mit einem 95% Konfidenzintervall von 461 bis 609 ng/ml. Die Expression von MMP-2 in den einzelnen Ergüssen ist in Tabelle 15 dargestellt. Tabelle 16 gibt die einfaktorielle Varianzanalyse, Tabelle 17 die Ergebnisse der Paarvergleiche (p -Werte) für die einzelnen Diagnosen bezüglich des MMP-2-Gehalt wieder. Die logarithmische Einzelwertdarstellung wird in Abbildung 5 wiedergegeben. Einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) im MMP-2-Gehalt zeigt sich zwischen den Pleuralavagen und

allen Pleuraergüsse unterschiedlicher Genese. Wobei jeweils zwischen den Ergüssen unterschiedlicher Genese keine statistisch signifikanten Unterschiede festzustellen sind.

MMP-2				
	T	P	C	PL
geom MW	1698	1862	1862	12,6
95% KI	1348; 2137	1412; 2398	1621; 2398	8,5; 18,6
n	28	23	44	10
Median	1643	2048	1999	15,05
Minimum	511,6	690	151,3	1,50
Maximum	3691	4100	4999	62,2

Tabelle 15 Verteilung der MMP-2-Konzentrationen (ng/ml) von 95 Pleuraergüssen unterschiedlicher Genese und 10 Pleuralavagen.

Einfaktorielle ANOVA: Übersicht der Effekte für log ₁₀ (MMP-2)					
	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	42,188	3	14,063	185,577	p<0,001
Innerhalb der Gruppen	7,654	101	0,076		
Gesamt	49,842	104			

Tabelle 16 Einfaktorielle Varianzanalyse mit Auflistung der Einzeleffekte und des Globaleffekts (p-Wert) für log₁₀(MMP-2) von 95 Pleuraergüssen und 10 Pleuralavagen.

Scheffé-Test für log ₁₀ (MMP-2)			
Diagnosen	T	P	C
P	0,976		
C	0,942	1	
PL	p<0,001	p<0,001	p<0,001

Tabelle 17 Paarvergleiche (Scheffé-Test) mit p-Werten für die logarithmierten MMP-2-Konzentrationen in 95 Pleuraergüssen nach Diagnoseklassen gruppiert und 10 Pleuraergüssen. (Statistisch signifikanter Unterschied: p<0,05)

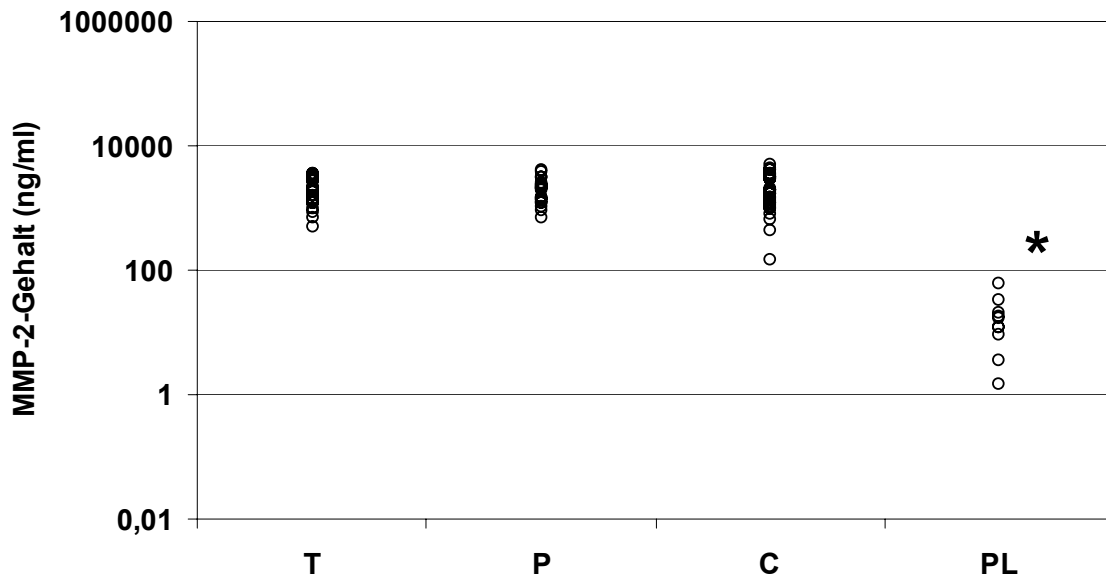


Abbildung 5 MMP-2-Gehaltes (ng/ml) in logarithmischer Darstellung von 28 Transsudaten (T), 23 parapneumonischen (P) und 44 paraneoplastischen Exsudaten (C) sowie 10 Pleuralavagen (PL). (* = Statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$))

4.2.1.1.3 MMP-9-Isoform

Mit Hilfe des BIOTRAK™-ELISA (s. 3.13.2.3) kann MMP-9 (Gelatinase B, 92 kDa Typ IV Kollagenase) mit einer Nachweissensitivität von 0,6 ng/ml bestimmt werden. Die untere und obere Grenze der Eichkurve liegen bei 4 und 128 ng/ml. Erfasst werden außerdem freie und mit TIMP-1 oder TIMP-2 komplexierte Pro-MMP-9-Form. Es gibt keine nachweisbare Kreuzreaktivität mit Pro-MMP-1, Pro-MMP-2, Pro-MMP-3, TIMP-1 oder TIMP-2.

In den gesamten Ergüssen unterschiedlicher Genese ($n=96$) und 10 Pleuralavagen ist MMP-9 in Mengen von unter der Nachweisgrenze bis 687 ng/ml mit einem Median von 3,1 ng/ml enthalten. Der geometrische Mittelwert liegt bei 3 ng/ml mit einem 95%-igen Konfidenzintervall von 2,2 bis 4,1 ng/ml. Einer Konzentration unter der Nachweisgrenze wird für die logarithmische Rechenoperation sowie die Einzelwertdarstellung der Wert 0,3 ng/ml zugeordnet. Die ist der Fall bei einem Transsudat und allen 10 Pleuralavagen. Die Expression von MMP-9 in den verschiedenen Proben stellt Tabelle 18 dar. Die Ergebnisse der einfaktoriellen Varianzanalyse zwischen den Diagnosegruppen bildet Tabelle 19 ab, die Paarvergleiche für die einzelnen Diagnosegruppen bezüglich des MMP-9-Gehalts sind in Tabelle 20 zusammengefasst. Die Paarvergleiche zwischen 96 Pleuraergüssen und 10 Pleuralavagen zeigen

signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) im MMP-9-Gehalt zwischen parapneumonischen Exsudaten und Transsudaten, zwischen parapneumonischen und paraneoplastischen Exsudaten sowie zwischen allen Pleuraergüssen unterschiedlicher Genese und den Pleuralavagen (s. Abbildung 6).

MMP-9				
	T	P	C	PL
geom MW	2,3	25,7	4,7	0,3
95% KI	1,4; 4	13,5; 44,7	3; 7,2	0,1; 0,7
n	28	24	44	10
Median	2,0	22,7	3,1	n.m.
Minimum	n.m.	2,52	0,26	n.m.
Maximum	106,4	687	397,4	n.m.

Tabelle 18 Verteilung der MMP-9-Konzentration (ng/ml) von Pleuraergüssen unterschiedlicher Genese (n=96) und Pleuralavagen (n=10). Bei einem Transsudat und allen 10 Pleuralavagen liegt diese unter der Nachweisgrenze.

Einfaktorielle ANOVA: Übersicht der Effekte für $\log_{10}(\text{MMP-9})$					
	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	29,851	3	9,95	25,015	$p < 0,001$
Innerhalb der Gruppen	40,574	102	0,398		
Gesamt	70,426	105			

Tabelle 19 Einfaktorielle Varianzanalyse mit Auflistung der Einzeleffekte und des Globaleffekts (p-Wert) für $\log_{10}(\text{MMP-9})$ von 96 Pleuraergüssen und 10 Pleuralavagen. Ein $p < 0,05$ wird als statistisch signifikanter Unterschied gewertet.

Scheffé-Test für $\log_{10}(\text{MMP-9})$			
Diagnosen	T	P	C
P	$p < 0,001$		
C	0,27	$p < 0,001$	
PL	0,003	$p < 0,001$	$p < 0,001$

Tabelle 20 Paarvergleiche mit p-Werten der logarithmierten MMP-9-Konzentrationen von 96 Pleuraergüssen nach Diagnoseklassen gruppiert und 10 Pleuralavagen. (Statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$)).

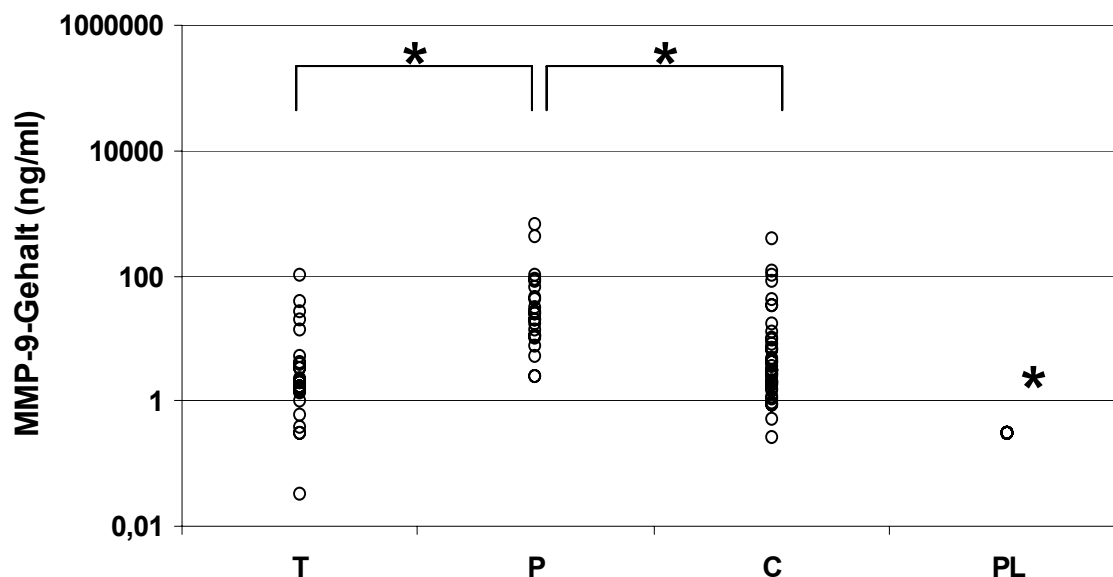


Abbildung 6 MMP-9-Konzentration (ng/ml) in logarithmischer Darstellung von 28 Transsudaten (T), 24 parapneumonischen (P) und 44 paraneoplastischen Exsudaten (C) sowie 10 Pleuralavagen (PL). Bei einem Transsudat und den Pleuralavagen wird die Konzentration mit 0,3 ng/ml definiert. (* = Signifikanter Unterschied ($p < 0,05$))

4.2.1.1.4 TIMP-1-Isoform

Der Nachweis von TIMP-1 mittels BIOTRAK™-ELISA (s.3.13.2.4) erfolgt mit einer Nachweissensitivität von 1,25 ng/ml. Die untere und obere Grenze der Eichkurve liegen bei 3,15 und 50 ng/ml. Der Nachweis ist für das gesamte humane TIMP-1 spezifisch, d.h. für freies wie für mit MMP komplexiertes. Es liegt keine Kreuzreaktivität mit TIMP-2 vor.

In den Pleuraergüssen unterschiedlicher Genese (n=92) und 10 Pleuralavagen ist TIMP-1 in Mengen von nicht nachweisbar bis 32589 ng/ml mit einem Median von 5909 ng/ml enthalten. Der geometrische Mittelwert liegt bei 1678 ng/ml mit einem Konfidenzintervall von 1194 bis 2355 ng/ml. Zwei parapneumonischen Exsudaten, deren TIMP-1-Konzentration unter der Nachweisgrenze lag, wird für die statistische Analyse und die logarithmische Einzelwertdarstellung der Wert 0,625 ng/ml zugeordnet. In Tabelle 21 ist die Expression von TIMP-1 in Ergüssen unterschiedlicher Genese und Pleuralavagen wiedergegeben. Die Varianzanalyse zwischen den Ergüssen unterschiedlicher Diagnose bezüglich ihres TIMP-1-Gehalts ist in Tabelle 22 aufgeführt, die Paarvergleiche mittels Scheffé-Teste folgen in Tabelle 23. Der TIMP-1-Gehalt von 92 Pleuraergüssen, nach Diagnoseklassen gruppiert, und 10 Pleuralavagen ist in Abbildung 7 dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) ergeben

die Vergleiche von Pleuralavagen mit jeweils allen Pleuraergüssen unterschiedlicher Genese in Bezug auf ihren TIMP-1-Gehalt.

TIMP-1				
	T	P	C	PL
geom MW	5011	3630	6165	72
95% KI	2818; 8709	1905; 6760	3801; 9772	27; 186
n	28	23	41	10
Median	5198	7583	6380	95,5
Minimum	451	n.m.	349	5
Maximum	12194	32589	30137	256

Tabelle 21 Zusammenfassung der TIMP-1-Konzentrationen (ng/ml) von 92 Pleuraergüssen geordnet nach Diagnoseklassen und 10 Pleuralavagen. Zwei parapneumonische Exsudate liegen unter der unteren Nachweisgrenze bezüglich ihres TIMP-1-Gehaltes.

Einfaktorielle ANOVA: Übersicht der Effekte für log ₁₀ (TIMP-1)					
	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	31,439	3	10,48	24,265	p<0,001
Innerhalb der Gruppen	42,324	98	0,432		
Gesamt	73,763	101			

Tabelle 22 Einfaktorielle Varianzanalyse mit Auflistung der Einzeleffekte und des Globaleffekts (p-Wert) für log₁₀(TIMP-1) von 92 Pleuraergüssen und 10 Pleuralavagen.

Scheffé-Test für log ₁₀ (TIMP-1)			
Diagnosen	T	P	C
P	0,91		
C	0,956	0,626	
PL	p<0,001	p<0,001	p<0,001

Tabelle 23 Paarvergleiche mit p-Werten der logarithmierten TIMP-1-Konzentrationen von 96 Pleuraergüssen nach Diagnoseklassen gruppiert und 10 Pleuralavagen. (Statistisch signifikanter Unterschied (p<0,05)).

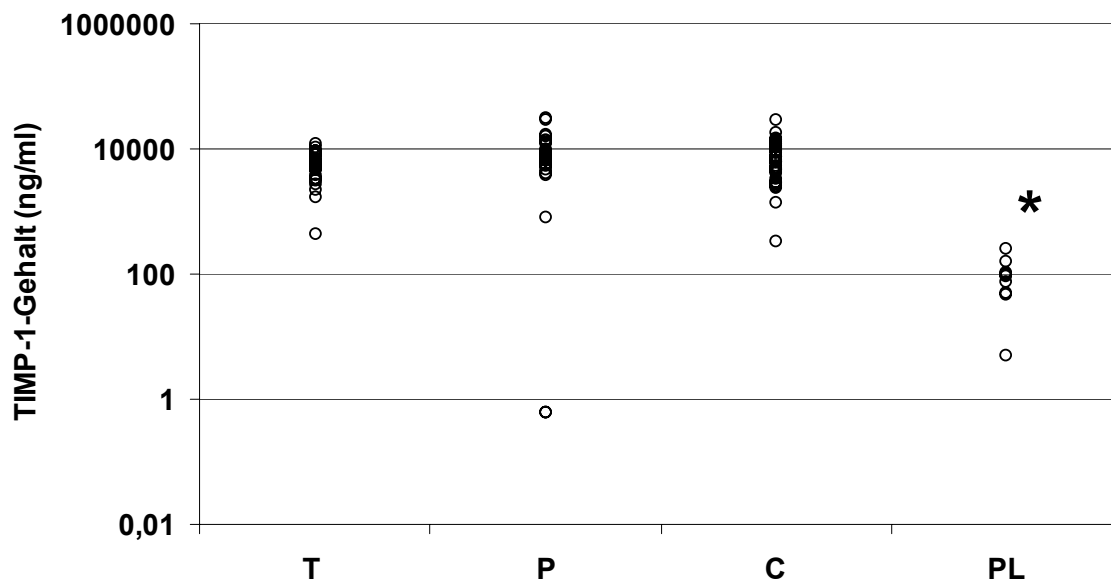


Abbildung 7 TIMP-1-Konzentration (ng/ml) in logarithmischer Darstellung von 28 Transsudaten (T), 23 parapneumonischen (P) und 41 paraneoplastischen Exsudaten (C), sowie 10 Pleuralavagen (PL). Bei zwei parapneumonischen Exsudaten wird die Konzentration mit 0,625 ng/ml definiert. (* = Signifikanter Unterschied ($p < 0,05$))

4.2.1.1.5 TIMP-2-Isoform

Der BIOTRAK™-ELISA für TIMP-2 (s. 3.13.2.5) hat eine Nachweissensitivität von 3,0 ng/ml. Die Grenzen der Eichkurve gehen von 8 bis 128 ng/ml und der Nachweis ist für freies TIMP-2 sowie für Komplexe mit aktivierten MMP spezifisch. Nicht erkannt werden TIMP-2-Komplexe mit der Proenzymform von MMP-2 (nur zu ca. 5%).

Der TIMP-2-Gehalt in den gesamten Pleuraergüssen unterschiedlicher Genese (n=96) und den Pleuralavagen (n=10) liegt zwischen 1 ng/ml und 1762 ng/ml mit einem Median von 40,3 ng/ml. Der geometrische Mittelwert liegt bei 31,1 ng/ml mit einem Konfidenzintervall von 25 bis 38,6 ng/ml. Der Gehalt an TIMP-2 ist summarisch für Pleuraergüsse unterschiedlicher Genese und Pleuralavagen in Tabelle 24 zusammengefasst. Die Ergebnisse aus der einfaktoriellen Varianzanalyse und den Paarvergleichen bezüglich der Diagnosegruppen zeigen Tabelle 25 und Tabelle 26 an. Die Konzentration an TIMP-2 in 96 Pleuraergüssen unterschiedlicher Genese und 10 Pleuralavagen ist als Einzeldarstellung in Abbildung 8 aufgeführt. Die Gruppe der Pleuralavagen weisen statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zu parapneumonischen als auch paraneoplastischen Exsudaten auf.

TIMP-2				
	T	P	C	PL
geom MW	30,9	43,7	51,3	13,2
95% KI	21,4; 44,7	28,8; 64,6	39; 70,8	7,2; 24,5
n	28	24	44	10
Median	36,14	39,3	46,26	13,8
Minimum	1,05	8,10	9	7,2
Maximum	161	1762	726,30	24,7

Tabelle 24 Zusammenfassung der TIMP-2-Konzentrationen (ng/ml) von 96 Pleuraergüssen geordnet nach Diagnoseklassen und 10 Pleuralavagen.

Einfaktorielle ANOVA: Übersicht der Effekte für log ₁₀ (TIMP-2)					
	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	3,13	3	1,043	6,049	0,001
Innerhalb der Gruppen	17,597	102	0,173		
Gesamt	20,727	105			

Tabelle 25 Einfaktorielle Varianzanalyse mit Auflistung der Einzeleffekte und des Globaleffekts (p-Wert) für log₁₀(TIMP-2) von 96 Pleuraergüssen und 10 Pleuralavagen.

Scheffé-Test für log ₁₀ (TIMP-2)			
Diagnosen	T	P	C
P	0,676		
C	0,199	0,916	
PL	0,128	0,016	0,002

Tabelle 26 Paarvergleiche mit p-Werten der logarithmierten TIMP-2-Konzentrationen von 96 Pleuraergüssen nach Diagnoseklassen gruppiert und 10 Pleuralavagen. (Statistisch signifikanter Unterschied (p<0,05)).

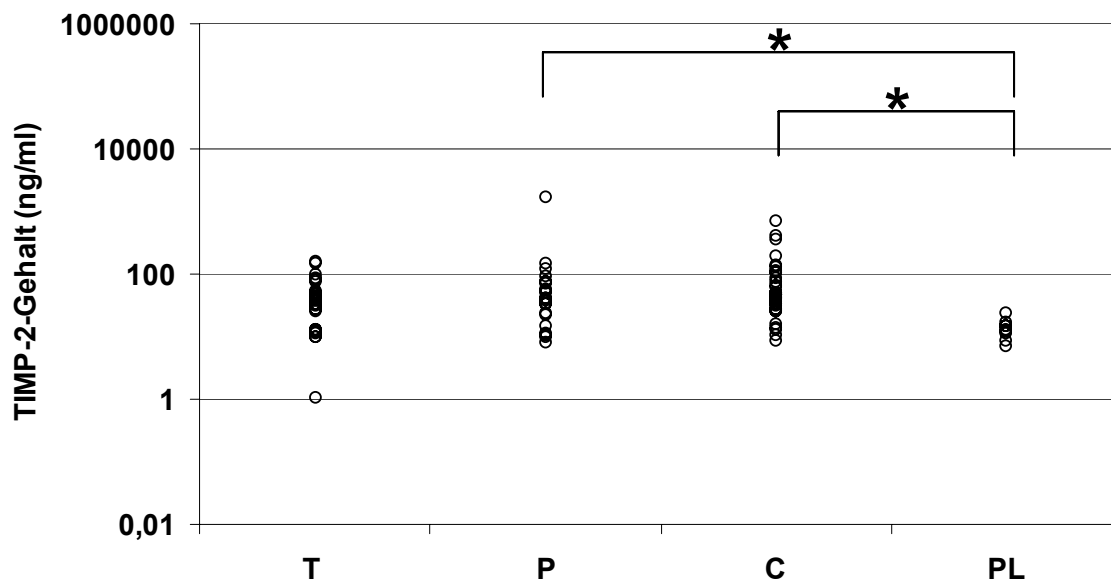


Abbildung 8 TIMP-2-Konzentration (ng/ml) in logarithmischer Darstellung von 28 Transsudaten (T), 24 parapneumonischen (P) und 44 paraneoplastischen Exsudaten (C), sowie 10 Pleuralavagen (PL). (* = Signifikanter Unterschied ($p < 0,05$))

4.2.1.2 MMP- und TIMP-Isoformen in Pleuralavagen

Eine Übersicht über die Verteilung der MMP- und TIMP-Isoformen in 10 Pleuralavagen erfolgt in Tabelle 27. Obwohl MMP-1 und MMP-9 in allen 10 Proben nicht messbar sind, wird für die statistischen Analysen ein Wert zugeordnet, üblich ist die Definition der Hälfte der unteren Nachweisgrenze des entsprechenden ELISA-Sets (somit 0,85 ng/ml für MMP-1 und 0,3 ng/ml für MMP-9). Tabelle 28 gibt die einfaktorielle Varianzanalyse mit Globaltest und Innersubjekteffekte an. Der Gruppenvergleich von MMP-1 und MMP-9 ist wegen der fehlenden Streuung in beiden Gruppen nicht möglich, hier entfällt die Berechnung in der zweifaktorieller Varianzanalyse (s. Tabelle 29).

Isoformen in allen Pleuralavagen					
	MMP-1	MMP-2	MMP-9	TIMP-1	TIMP-2
geom MW	0,85	12,6	0,3	72	13,2
95% KI	0,5; 1,4	8,5; 18,6	0,12; 0,74	27,5; 186	7,2; 24,5
n	10	10	10	10	10
Median	n.m.	15,1	n.m.	95,5	13,8
Minimum	n.m.	1,5	n.m.	5	7,2
Maximum	n.m.	62,2	n.m.	256	24,7

Tabelle 27 Zusammenfassung der Konzentrationen (ng/ml) von MMP- und TIMP-Isoformen in 10 Pleuralavagen.

Einfaktorielle ANOVA: Test der Innersubjekteffekte in Pleuralavagen					
Quelle	Quadratsumme				
	vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Isoform Sphärizität angenommen	37,691	4	923,4	117,061	p<0,001

Tabelle 28 Einfaktorielle Varianzanalyse mit Test der Innersubjekteffekte und Angabe der Signifikanz: Mittelwertvergleich der Pleuralavage-Proben für den Faktor „Isoform“ ((log₁₀(MMP-1), log₁₀(MMP-2), log₁₀(MMP-9), log₁₀(TIMP-1) und log₁₀(TIMP-2)). Statistisch signifikanter Unterschied = p<0,05.

Zweifaktorielle ANOVA aller Pleuralavagen				
Isoformen	log ₁₀ (MMP-1)	log ₁₀ (MMP-2)	log ₁₀ (MMP-9)	log ₁₀ (TIMP-1)
log ₁₀ (MMP-2)	p<0,001			
log ₁₀ (MMP-9)	-	p<0,001		
log ₁₀ (TIMP-1)	p<0,001	0,028	p<0,001	
log ₁₀ (TIMP-2)	p<0,001	1	p<0,001	0,006

Tabelle 29 Zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Anpassung für Mehrfachvergleiche mittels Bonferroni-Prozedur von allen Pleuralavagen (n=10) mit dem Hauptfaktor der logarithmierten MMP- und TIMP-Isoformen unter Angabe der p-Werte (statistisch signifikanter Unterschied: p<0,05). Wegen fehlender Streuung erfolgt keine Testung von MMP-1 zu MMP-9.

4.2.1.3 MMP- und TIMP-Isoformen in Pleuraergüssen und Pleuralavagen als Einzelwertdarstellung

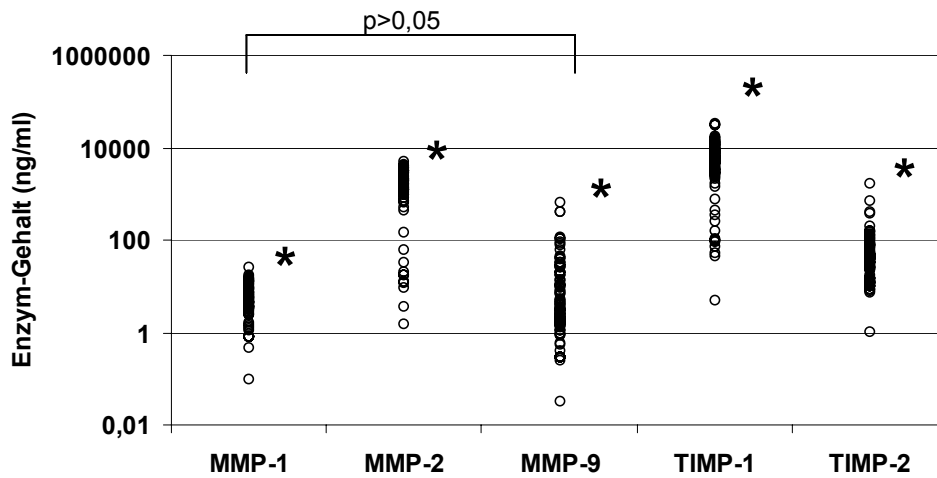


Abbildung 9 Konzentrationen von MMP- und TIMP-Isoformen (ng/ml) in logarithmischer Darstellung. Untersucht werden 96 Pleuraergüssen unterschiedlicher Genese. Bei sieben MMP-1-, einer MMP-9- und zwei TIMP-1-Messungen werden die Konzentrationen bei der Hälfte der unteren Nachweisgrenze definiert, da deren Werte nicht messbar sind. Alle Enzymkonzentrationen weisen signifikante Unterschiede (* = $p < 0,05$) auf, lediglich der Vergleich der Gruppe von MMP-1 und MMP-9 ist statistisch nicht signifikant.

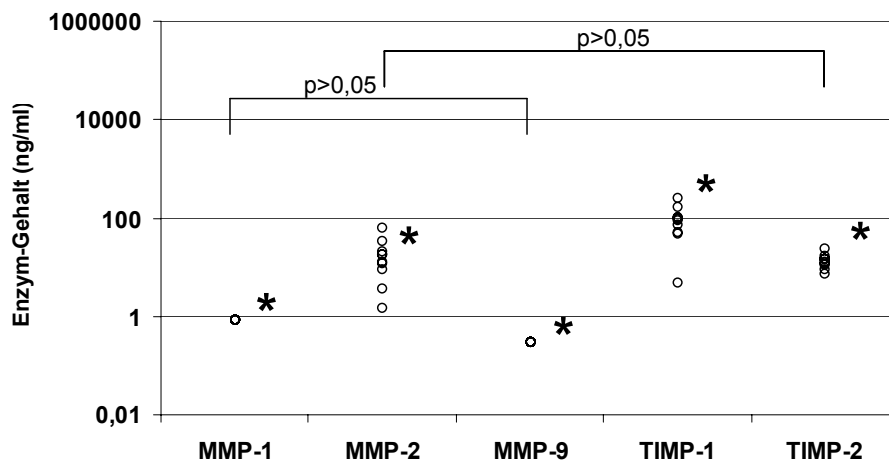


Abbildung 10 Konzentrationen von MMP- und TIMP-Isoformen (ng/ml) in logarithmischer Darstellung. Untersucht werden 10 Pleuralavagen. Nicht messbare Konzentrationen (alle MMP-1- und MMP-9-Messungen) werden mit der Hälfte der unteren Nachweisgrenze definiert. Der Vergleich von MMP-1 zu MMP-9 und von MMP-2 zu TIMP-2 ist jeweils ohne signifikanten Unterschied (* = Signifikanter Unterschied ($p < 0,05$)).

4.2.1.4 Zusammenfassung

Nach Berechnung der Varianzanalysen und der Scheffé-Teste ergeben sich für jeweils MMP-1 als auch MMP-9 signifikante Unterschiede in der Expression zwischen den Ergüssen unterschiedlicher Diagnosen:

- Verglichen mit Transsudaten ($p < 0,01$) ist MMP-1 in signifikant höheren Mengen in parapneumonischen Exsudaten zu finden.
- Der MMP-9-Gehalt in parapneumonischen Exsudaten ist signifikant höher als in Transsudaten ($p < 0,001$) oder paraneoplastischen Exsudaten ($p < 0,001$).

Für die Vergleiche unter Berücksichtigung der Pleuralavagen ergibt sich:

- Verglichen mit Pleuralavagen ist der Gehalt an MMP-1 ($p < 0,01$), MMP-2 ($p < 0,001$), MMP 9 ($p < 0,01$) und TIMP-1 ($p < 0,001$) in allen Pleuraergüssen signifikant höher.
- Der Gehalt an TIMP-2 ist in signifikant höheren Mengen nachweisbar, werden paraneoplastische Exsudate mit Pleuralavagen ($p < 0,01$) oder parapneumonische Exsudate mit Pleuralavagen ($p < 0,05$) verglichen.

Summarisch sind diese Ergebnisse in Tabelle 30 dargestellt.

Scheffé-Test aller Isoformen				
Isoform	p-Wert	statistisch signifikante Paarvergleiche		
log ₁₀ (MMP-1)	p < 0,05	T&P	-	alle PL
log ₁₀ (MMP-2)	p < 0,001	-	-	alle PL
log ₁₀ (MMP-9)	p < 0,05	T&P	C&P	alle PL
log ₁₀ (TIMP-1)	p < 0,001	-	-	alle PL
log ₁₀ (TIMP-2)	p < 0,05	-	-	P&PL, C&PL

Tabelle 30 Zusammenfassung der Paarvergleiche aus 96 Pleuraergüssen unterschiedlicher Genese und 10 Pleuralavagen. Statistisch signifikanter Unterschied bei $p < 0,05$.

4.2.2 Analyse der absoluten Werte bezogen auf den Protein-Gehalt

Zur besseren Vergleichbarkeit werden die Mengen an Proteasen und Inhibitoren auf den absoluten Proteingehalt in den jeweiligen Probe bezogen. Die absoluten Konzentrationsangaben werden wie in 4.2.1 beschrieben mittels ELISA bestimmt.

Für Pleuraergüsse wird der Wert des Proteingehaltes im Rahmen der Routinediagnostik miterfasst und ist bereits im Kapitel 2.2 aufgeführt.

Für Pleuralavagen wird eigens die Proteinbestimmung mittels „Protein Assay Sets“ von BIO-RAD (Zürich, CH), wie in 4.12 beschrieben, durchgeführt (siehe auch Kapitel 3.3.1). Der Proteingehalt der Pleuralavagen (n=10) variiert von 0,31 bis 1,19 g/l (Median bei 0,68 g/l).

Für Pleuraergüsse und für Pleuralavagen wird der absolute Wert (ng/ml) der jeweiligen Isoform (MMP oder TIMP) auf die Menge an Protein (mg/ml) bezogen. Der errechnete Konzentrationswert der MMP- und TIMP-Isoformen trägt die Einheit „ng/mg Protein“. Unter der Annahme der Normalverteilung von logarithmierten Werten werden, wie schon im Kapitel 3.13 beschrieben, die Analysen mittels ANOVA- und Scheffé-Tests für die Konzentrationsangaben bezogen auf den Gesamtprotein-Gehalt durchgeführt. Für statistisch signifikant wird ein Unterschied gewertet, wenn $p < 0,05$ ist.

Konzentrationen, die nicht messbar sind, wird die Hälfte der unteren Nachweisgrenze zugeordnet. Diese Wertdefinition wird, wie vormals beschrieben (s. 4.2), bei Pleuraergüssen durchgeführt, d.h. bei sieben Proben für MMP-1 (vier Transsudaten, einem parapneumonischen und zwei paraneoplastischen Exsudaten), einer Probe für MMP-9 (Transsudat) und zwei Proben für TIMP-1 (parapneumonische Exsudate). Für MMP-1 und MMP-9 macht diese Berechnung bei den Pleuralavagen auf Grund des geringen Proteingehaltes keinen Sinn. Dafür, dass diese Konzentrationen unter der Nachweisgrenze liegen, wäre die errechnete Enzymkonzentration unverhältnismäßig, unreal hoch. Ebenfalls ist ein statistischer Vergleich von MMP-1 und MMP-9 nicht möglich, da in diesen beiden Gruppen keine Streuung vorhanden ist.

Zur besseren Übersicht erfolgt die Auflistung folgender Charakteristika tabellarisch: geometrischer Mittelwert, 95%-ige Konfidenzintervall, Anzahl, Median-, Minimum- und Maximum, als auch der Varianzanalysen sowie der Paarvergleiche (Scheffé-Test). Die Einzelwerte werden graphisch unter Verwendung einer logarithmischen Skalierung dargestellt. Die Charakteristika der ELISA-Sets entsprechen denen wie unter 4.2.1 aufgeführt.

4.2.2.1 MMP- und TIMP-Isoformen in der Gesamtheit der Proben

Isoformen in allen Proben/Protein					
	MMP-1	MMP-2	MMP-9	TIMP-1	TIMP-2
geom MW	0,3	45,7	0,25	144	2,6
95% KI	0,22; 0,32	39,8; 51,3	0,18; 0,35	100; 204	2,14; 3,31
n	104	105	106	102	106
Median	0,2	60,2	0,1	219,1	1,4
Minimum	n.m.	3,98	n.m.	n.m.	0,0
Maximum	0,7	192,4	14,6	1040,7	50

Tabelle 31 Konzentrationsangaben bezogen auf den Proteingehalt (ng/mg Protein) der MMP- und TIMP-Isoformen von 96 Pleuraergüssen unterschiedlicher Genese und 10 Pleuralavagen. Bei Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze (für MMP-1: vier Transsudate, ein parapneumonisches und zwei paraneoplastische Exsudate; für MMP-9: ein Transsudat; für TIMP-1: zwei parapneumonische Exsudate) wird für den Rechenschritt, wie oben beschrieben, die Hälfte der unteren Nachweisgrenze zugeordnet. Bei den Pleuralavagen entfällt diese Berechnung für MMP-1 und MMP-9 vollständig.

Einfaktorielle ANOVA: Übersicht aller Effekte/Protein						
Quelle		Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Isoform	Sphärizität angenommen	501,978	4	125,495	549,145	p<0,001
Isoform*Diagnose	Sphärizität angenommen	29,796	12	2,483	10,865	p<0,001

Tabelle 32 Einfaktorielle Varianzanalyse mit Test der Innersubjekteffekte, Wechselwirkung (Isoform*Diagnosen) und Angabe der Signifikanzen: Mittelwertvergleich der Gesamtheit aller Proben für die Faktoren „Isoform“ (log₁₀(MMP-1/P), log₁₀(MMP-2/P), log₁₀(MMP-9/P), log₁₀(TIMP-1/P) und log₁₀(TIMP-2/P)) und „Diagnose“ (T, P, C, PL) nach Proteinkorrektur. Statistisch signifikanter Unterschied = p<0,05.

Zweifaktorielle ANOVA aller Proben/Protein				
Isoformen	log10(MMP-1/P)	log10(MMP-2/P)	log10(MMP-9/P)	log10(TIMP-1/P)
log10(MMP-2/P)	p<0,001			
log10(MMP-9/P)	1	p<0,001		
log10(TIMP-1/P)	p<0,001	p<0,001	p<0,001	
log10(TIMP-2/P)	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001

Tabelle 33 Zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Anpassung für Mehrfachvergleiche mittels Bonferroni-Prozedur von allen Proben (Pleuraergüsse n=96, Pleuralavagen n=10) mit dem Hauptfaktor der logarithmierten MMP- und TIMP-Isoformen unter Angabe der p-Werte (statistisch signifikanter Unterschied: p<0,05) nach Proteinkorrektur. Für MMP-1 und MMP-9 sind die Proben der Pleuralavagen (je n=10) unberücksichtigt.

4.2.2.1.1 MMP-1-Isoform

MMP-1 / Protein				
	T	P	C	PL
geom MW	0,15	0,21	0,12	-
95% KI	0,11; 0,21	0,14; 0,28	0,09; 0,15	-
n	28	23	43	10
Median	0,2	0,2	0,1	n.m.
Minimum	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
Maximum	0,7	0,7	0,4	n.m.

Tabelle 34 Werte (ng/mg Protein) der MMP-1-Konzentration von 94 Pleuraergüssen unterschiedlicher Genese und 10 Pleuralavagen, bezogen auf den Proteingehalt. Bei Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze (vier Transsudate, einem parapneumonischen und zwei paraneoplastischen Exsudaten) wird für den Rechenschritt wie oben beschrieben die Hälfte der unteren Nachweisgrenze zugeordnet.

Einfaktorielle ANOVA: Übersicht der Effekte für log ₁₀ (MMP-1/Protein)					
	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	9,723	3	3,241	24,577	p<0,001
Innerhalb der Gruppen	13,188	100	0,132		
Gesamt	22,911	103			

Tabelle 35 Einfaktorielle Varianzanalyse mit Auflistung der Einzeleffekte und des Globaleffekts (p-Wert) für log₁₀(MMP-1/Protein) von 94 Pleuraergüssen und 10 Pleuralavagen. Ein p<0,05 wird als statistisch signifikanter Unterschied gewertet.

Scheffé-Test für log ₁₀ (MMP-1/Protein)			
Diagnosen	T	P	C
P	0,757		
C	0,508	0,082	
PL	-	-	-

Tabelle 36 Paarvergleiche mit p-Werten für die logarithmierten MMP-1/Protein-Konzentrationen in 94 Pleuraergüssen nach Diagnoseklassen gruppiert. Die 10 Pleuraergüsse entfallen. (Statistisch signifikanter Unterschied: p<0,05)

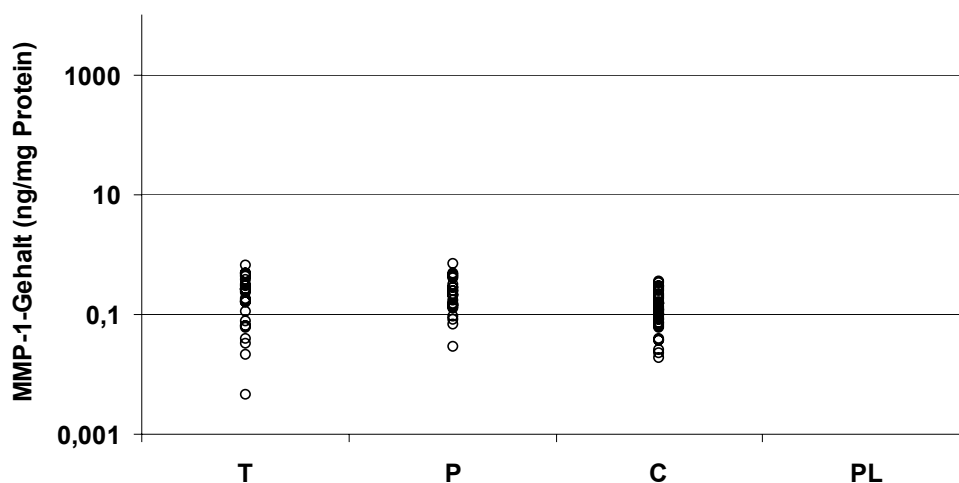


Abbildung 11 MMP-1-Gehalt (ng bezogen auf mg Protein) in logarithmischer Darstellung von 28 Transsudaten (T), 23 parapneumonischen (P) und 43 paraneoplastischen Exsudaten (C), sowie 10 Pleuralavagen (PL). Bei vier Transsudaten, einem parapneumonischen und zwei paraneoplastischen Exsudaten wird bei nicht messbarer MMP-1-Konzentration diese mit 0,85 ng/ml in der Proteinkorrektur berücksichtigt. Alle 10 Messungen für Pleuralavagen sind nicht dargestellt.

4.2.2.1.2 MMP-2-Isoform

MMP-2 / Protein				
	T	P	C	PL
geom MW	81,3	51,3	49	20
95% KI	66,1; 100	39,8; 64,6	42,7; 60,3	14,1; 28,8
n	28	23	44	10
Median	73,02	48,9	52,2	24,2
Minimum	27,8	18,9	3,98	4,9
Maximum	192,4	108,4	138,9	56,9

Tabelle 37 MMP-2-Konzentration (ng/mg Protein) bezogen auf den Gesamtprotein-Gehalt von 95 Pleuraergüssen unterschiedlicher Genese und 10 Pleuralavagen.

Einfaktorielle ANOVA: Übersicht der Effekte für log ₁₀ (MMP-2/Protein)					
	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	2,778	3	0,926	14,7	p<0,001
Innerhalb der Gruppen	6,362	101	0,063		
Gesamt	9,141	104			

Tabelle 38 Einfaktorielle Varianzanalyse mit Auflistung der Einzeleffekte und des Globaleffekts (p-Wert) für log₁₀(MMP-2/Protein) von 95 Pleuraergüssen und 10 Pleuralavagen. Ein p<0,05 wird als statistisch signifikanter Unterschied gewertet.

Scheffé-Test für log ₁₀ (MMP-2/Protein)			
Diagnosen	T	P	C
P	0,047		
C	0,005	0,992	
PL	p<0,001	0,001	0,001

Tabelle 39 Paarvergleiche mit p-Werten für die logarithmierten MMP-2/Protein-Konzentrationen in 95 Pleuraergüssen nach Diagnoseklassen gruppiert und 10 Pleuraergüssen. (Statistisch signifikanter Unterschied: p<0,05)

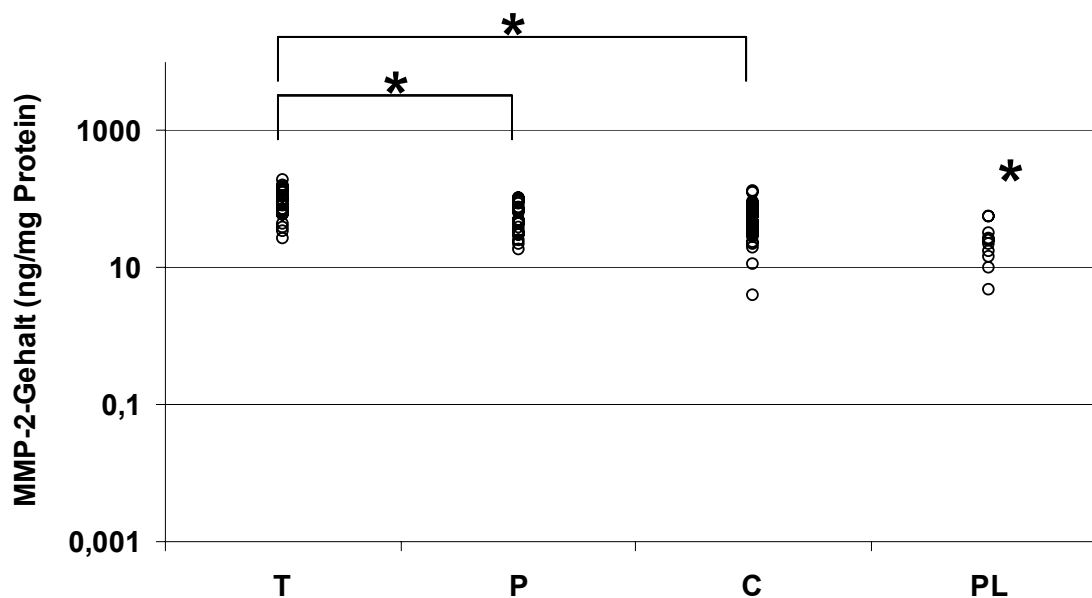


Abbildung 12 MMP-2-Gehalt (ng bezogen auf mg Protein) in logarithmischer Darstellung von 28 Transsudaten (T), 23 parapneumonischen (P) und 44 paraneoplastischen Exsudaten (C), sowie 10 Pleuralavagen (PL). (* = Statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$))

4.2.2.1.3 MMP-9-Isoform

MMP-9 / Protein				
	T	P	C	PL
geom MW	0,11	0,71	0,12	-
95% KI	0,06; 0,19	0,36; 1,23	0,07; 0,19	-
n	28	24	44	10
Median	0,1	0,6	0,1	n.m.
Minimum	n.m.	0,1	0,01	n.m.
Maximum	5,3	14,6	11,4	n.m.

Tabelle 40 MMP-9-Konzentration bezogen auf den Gehalt am Gesamtprotein (ng/mg Protein) von 96 Pleuraergüssen unterschiedlicher Genese und 10 Pleuralavagen. Bei einem Transsudat ist die Konzentration nicht messbar und es wird die Hälfte der unteren Nachweisgrenze zugeordnet und dann durch den Proteingehalt dividiert.

Einfaktorielle ANOVA: Übersicht der Effekte für log ₁₀ (MMP-9/Protein)					
	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	12,52	3	4,173	9,873	p<0,001
Innerhalb der Gruppen	43,113	102	0,423		
Gesamt	55,632	105			

Tabelle 41 Einfaktorielle Varianzanalyse mit Auflistung der Einzeleffekte und des Globaleffekts (p-Wert) für log₁₀(MMP-9/Protein) von 96 Pleuraergüssen und 10 Pleuralavagen. Ein p<0,05 wird als statistisch signifikanter Unterschied gewertet.

Scheffé-Test für log ₁₀ (MMP-9/Protein)			
Diagnosen	T	P	C
P	p<0,001		
C	0,996	p<0,001	
PL	-	-	-

Tabelle 42 Paarvergleiche mit p-Werten für die logarithmierten MMP-9/Protein-Konzentrationen in 96 Pleuraergüssen nach Diagnoseklassen. Die 10 Pleuraergüsse entfallen. (Statistisch signifikanter Unterschied: p<0,05)

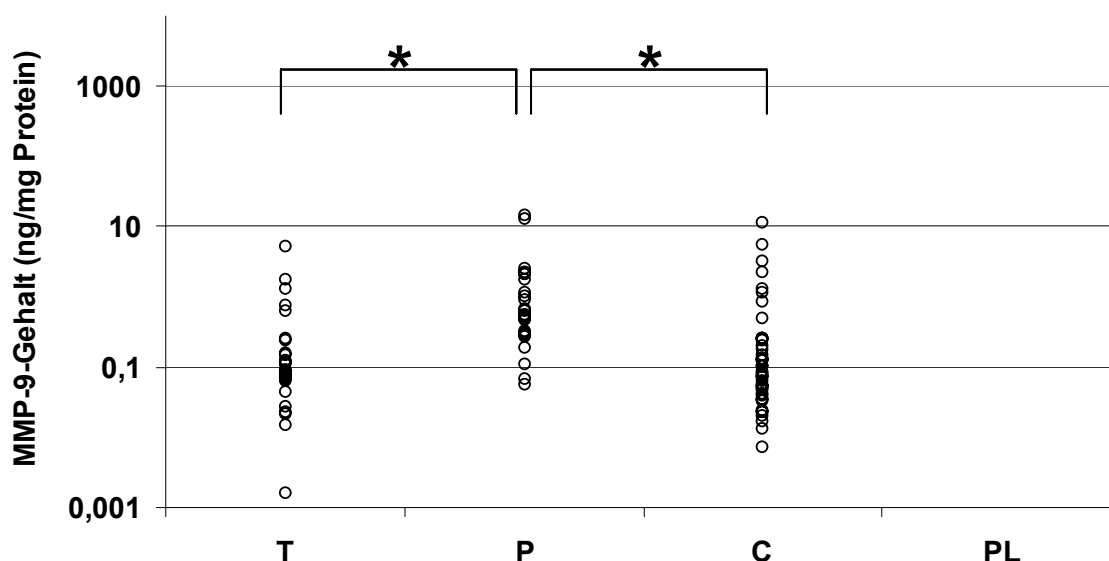


Abbildung 13 MMP-9-Gehalt (ng bezogen auf mg Protein) in logarithmischer Darstellung von 28 Transsudaten (T), 24 parapneumonischen (P) und 44 paraneoplastischen Exsudaten (C). Nicht dargestellt sind 10 Pleuralavagen (PL). Bei einem Transsudat wird bei nicht messbarer MMP-9-Konzentration diese mit 0,3 ng/ml in der Proteinkorrektur berücksichtigt. (* = Statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$))

4.2.2.1.4 TIMP-1-Isoform

TIMP-1 / Protein				
	T	P	C	PL
geom MW	234	100	155	115
95% KI	131; 417	52,5; 191	95; 251	43; 302
n	28	23	41	10
Median	254,4	225,6	156,9	141,98
Minimum	20,5	n.m.	6,7	5,6
Maximum	469,0	1040,7	861,1	297,4

Tabelle 43 Angabe der proteinkorrigierten Konzentrationswerte für TIMP-1 in (ng/mg Protein) in 92 Pleuraergüssen unterschiedlicher Genese und 10 Pleuralavagen. Bei Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze (zwei parapneumonische Exsudate) wird für den Rechenschritt, wie oben beschrieben, die Hälfte der unteren Nachweisgrenze als Konzentration zugeordnet.

Einfaktorielle ANOVA: Übersicht der Effekte für log ₁₀ (TIMP-1/Protein)					
	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	1,938	3	0,646	1,421	0,241
Innerhalb der Gruppen	44,55	98	0,455		
Gesamt	46,488	101			

Tabelle 44 Einfaktorielle Varianzanalyse mit Auflistung der Einzeleffekte und des Globaleffekts (p-Wert) für log₁₀(TIMP-1/Protein) von 92 Pleuraergüssen und 10 Pleuralavagen. Hier zeigen sich keine signifikanten Unterschiede (p>0,05), so dass weitere Paartestungen entfallen.

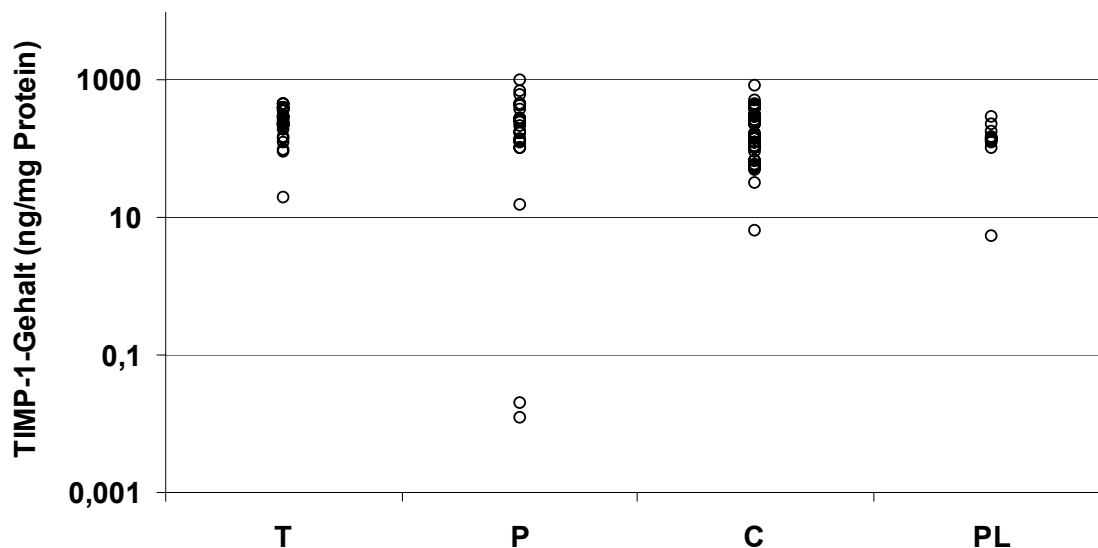


Abbildung 14 Logarithmische Einzelwertdarstellung der korrigierten TIMP-1-Konzentration (ng/mg Protein) von 28 Transsudaten (T), 23 parapneumonischen (P) und 41 paraneoplastischen Exsudaten (C), sowie 10 Pleuralavagen (PL). Bei zwei parapneumonischen Exsudaten wird bei nicht messbarer TIMP-1-Konzentration diese mit 0,625 ng/ml in der Proteinkorrektur berücksichtigt.

4.2.2.1.5 TIMP-2-Isoform

TIMP-2 / Protein				
	T	P	C	PL
geom MW	1,48	1,17	1,32	21,40
95% KI	1,01; 2,14	0,78; 1,82	0,97; 1,81	11,2; 39,8
n	28	24	44	10
Median	1,7	1,2	1,2	21,4
Minimum	0,04	0,2	0,2	9,4
Maximum	7,7	48,9	14,2	50

Tabelle 45 TIMP-2-Konzentration bezogen auf den Gehalt am Gesamtprotein (ng/mg Protein) von 96 Pleuraergüssen unterschiedlicher Genese und 10 Pleuralavagen.

Einfaktorielle ANOVA: Übersicht der Effekte für log ₁₀ (TIMP-2/Protein)					
	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	13,177	3	4,392	23,764	p<0,001
Innerhalb der Gruppen	18,854	102	0,185		
Gesamt	32,031	105			

Tabelle 46 Einfaktorielle Varianzanalyse mit Auflistung der Einzeleffekte und des Globaleffekts (p-Wert) für log₁₀(TIMP-2/Protein) von 96 Pleuraergüssen und 10 Pleuralavagen. Ein p<0,05 wird als statistisch signifikanter Unterschied gewertet.

Scheffé-Test für log ₁₀ (TIMP-2/Protein)			
Diagnosen	T	P	C
P	0,892		
C	0,979	0,978	
PL	p<0,001	p<0,001	p<0,001

Tabelle 47 Paarvergleiche mit p-Werten für die logarithmierten MMP-9/Protein-Konzentrationen in 96 Pleuraergüssen nach Diagnoseklassen gruppiert und 10 Pleuraergüssen. (Statistisch signifikanter Unterschied: p<0,05)

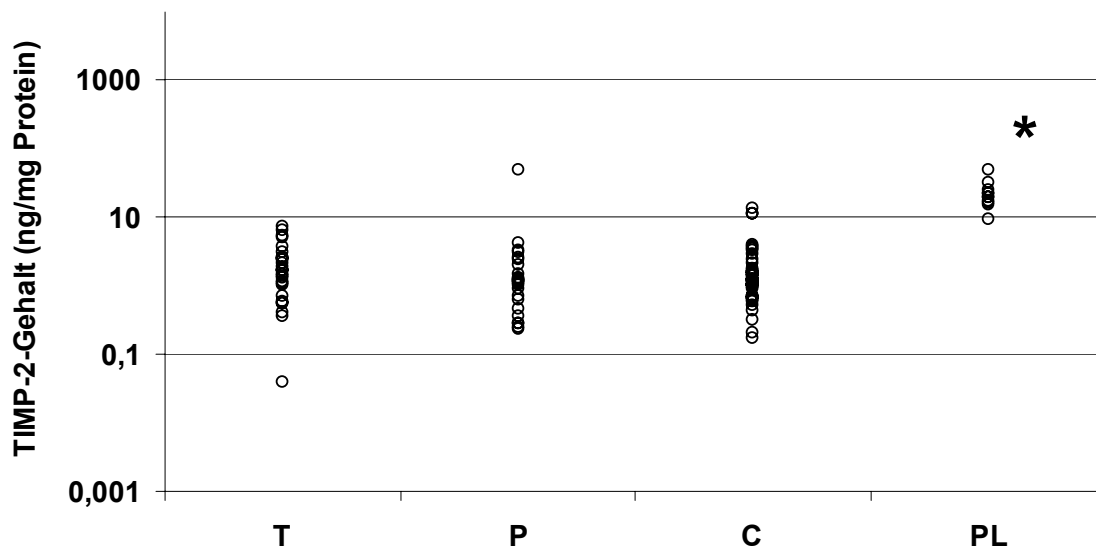


Abbildung 15 TIMP-2-Gehalt (ng bezogen auf mg Protein) in logarithmischer Darstellung von 28 Transsudaten (T), 24 parapneumonischen (P) und 44 paraneoplastischen Exsudaten (C), sowie 10 Pleuralavagen (PL). (* = Statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$))

4.2.2.2 MMP- und TIMP-Isoformen in Pleuralavagen

Isoformen in Pleuralavagen / Protein					
	MMP-1	MMP-2	MMP-9	TIMP-1	TIMP-2
geom MW	-	20,1	-	114,6	21,1
95% KI	-	12,4; 32,6	-	51,9; 253,5	15,4; 29,1
n	10	10	10	10	10
Median	n.m.	24,2	n.m.	141,98	21,4
Minimum	n.m.	4,9	n.m.	5,6	9,4
Maximum	n.m.	56,9	n.m.	297,4	50

Abbildung 16 Angabe der proteinkorrigierten Konzentrationswerte (ng/mg Protein) der MMP- und TIMP-Konzentrationen in allen Pleuralavagen (n=10). Alle Messungen für MMP-1 und MMP-9 liegen unter der unteren Nachweisgrenze und werden nicht berücksichtigt (s.o.).

Einfaktorielle ANOVA: Übersicht der Effekte für Pleuralavagen / Protein				
Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F Signifikanz
Isoform Sphärizität angenommen	3,706	2	1,853	15,514 p<0,001

Tabelle 48 Einfaktorielle Varianzanalyse mit Test der Innersubjekteffekte mit Angabe der Signifikanz: Mittelwertvergleich aller Pleuralavagen (n=10) für die Faktoren Isoform“ log₁₀(MMP-2/P), log₁₀(TIMP-1/P) und log₁₀(TIMP-2/P)) nach Proteinkorrektur. Statistisch signifikanter Unterschied = p<0,05.

Zweifaktorielle ANOVA der logarithmierten Isoformen in Pleuralavagen / Protein		
Isoformen	log ₁₀ (MMP-2/P)	log ₁₀ (TIMP-1/P)
log ₁₀ (TIMP-1/P)	0,009	
log ₁₀ (TIMP-2/P)	1	0,002

Tabelle 49 Zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Anpassung für Mehrfachvergleiche mittels Bonferroni-Prozedur von allen Pleuralavagen (n=10) mit dem Hauptfaktor der logarithmierten MMP-2, TIMP-1 und TIMP-2-Isoform unter Angabe der p-Werte (statistisch signifikanter Unterschied: p<0,05) nach Proteinkorrektur. MMP-1 und MMP-9 werden nicht um den Proteingehalt korrigiert und entfallen für diese Analyse.

4.2.2.3 MMP- und TIMP-Isoformen in Pleuraergüssen und Pleuralavagen als Einzelwertdarstellung

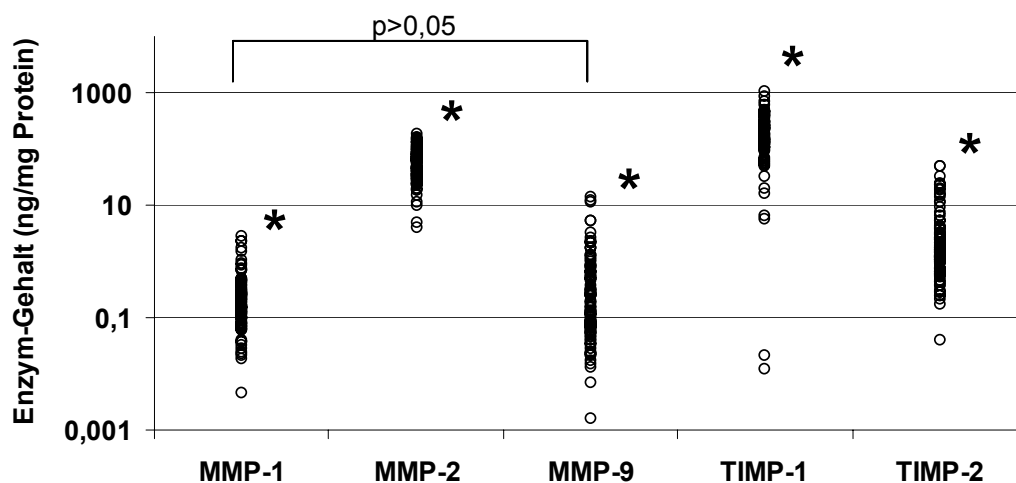


Abbildung 17 Logarithmische Einzelwertdarstellung der um den Proteingehalt korrigierten Konzentrationen (ng/mg Protein) von MMP- und TIMP-Isoformen: Untersucht sind 96 Pleuraergüsse unterschiedlicher Genese. Bei sieben MMP-1, einer MMP-9 und zwei TIMP-1 Messungen liegen die Werte unter der Nachweisgrenze und wurden, wie oben beschrieben, mit der Hälfte der unteren Nachweisgrenze definiert (* = Statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$)).

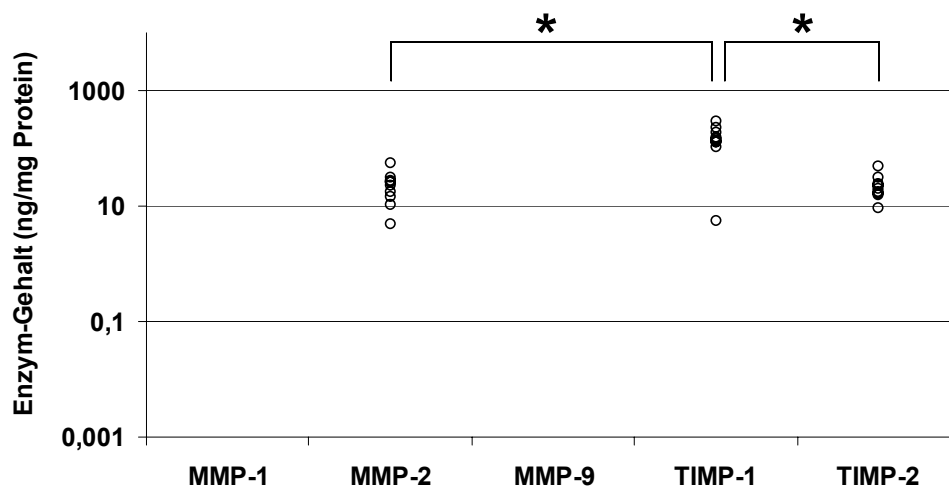


Abbildung 18 Logarithmische Einzelwertdarstellung der um den Proteingehalt korrigierten Konzentrationen (ng/mg Protein) von MMP- und TIMP-Isoformen: Dargestellt sind Analysen aus 10 Pleuralavagen. Nicht abgebildet sind die Werte von allen MMP-1- und allen MMP-9-Messungen, da diese unter der Nachweisgrenze liegen (* = Statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$)).

4.2.2.4 Zusammenfassung

Nach Berechnung der Varianzanalysen und der Scheffé-Teste ergeben sich für die Konzentrationsangaben bezogen auf den Proteingehalt von MMP-2 und MMP-9 signifikante Unterschiede in der Expression zwischen den Ergüssen unterschiedlicher Diagnosen:

- MMP-2 ist bezogen auf den Proteingehalt in signifikant höherem Maße in Transsudaten nachweisbar, verglichen mit parapneumonischen ($p < 0,05$) oder paraneoplastischen Exsudaten ($p < 0,01$).
- MMP-9 ist bezogen auf den Proteingehalt in signifikant höheren Mengen in parapneumonischen Exsudaten nachweisbar, verglichen mit Transsudaten ($p < 0,001$) oder paraneoplastischen Exsudaten ($p < 0,001$).

Für die Vergleiche unter Berücksichtigung der Pleuralavagen ergibt sich nach Proteinkorrektur:

- MMP-2 ist in allen Pleuraergüssen in signifikant höheren Mengen nachweisbar verglichen mit Pleuralavagen ($p < 0,01$).
- TIMP-2 ist nach Proteinkorrektur in signifikant höheren Mengen in Pleuralavagen nachweisbar, verglichen mit Pleuraergüssen unterschiedlicher Genese ($p < 0,001$).

Wesentlich bleibt zu berücksichtigen, dass bei diesen Vergleichen alle Messungen von MMP-1 und MMP-9 aus den Pleuralavagen entfallen, da deren Werte unter der Nachweisgrenze liegen und die Kombination aus (i) Definition der Konzentration als die Hälfte der unteren Nachweisgrenze und (ii) anschließender Proteinkorrektur, unreal hohe Werte ergibt.

Summarisch sind die Ergebnisse in Tabelle 50 dargestellt.

Scheffé-Test aller Isoformen / Protein				
Isoform	p-Wert	statistisch signifikante Paarvergleiche		
log10(MMP-1/P)	$p < 0,001$	-	-	-
log10(MMP-2/P)	$p < 0,05$	T&P	T&C	alle PL
log10(MMP-9/P)	$p < 0,001$	T&P	P&C	-
log10(TIMP-1/P)	-	-	-	-
log10(TIMP-2/P)	$p < 0,001$	-	-	alle PL

Tabelle 50 Zusammenfassung der Paarvergleiche nach Proteinkorrektur in 96 Pleuraergüssen unterschiedlicher Genese und 10 Pleuralavagen. Statistisch signifikanter Unterschied bei $p < 0,05$. Für MMP-1 und MMP-9 bleiben die Pleuralavagen unberücksichtigt.

4.3 Vergleich der Ergebnisse von Zymographie und ELISA-Analysen

Die Zymographie zeigt, dass MMP-2 in Pleuraergüssen die vorherrschende Isoform und die alleinige Isoform in den Pleuralavagen ist, verglichen mit MMP-9 und MMP-1 (s. Abbildung 2 und Abbildung 3). Zudem kann zwischen den Ergüssen unterschiedlicher Genese kein Unterschied im Bandenmuster bezüglich der Proenzymform und der aktivierten Enzymform von MMP-2 beobachtet werden. In den Pleuralavagen hingegen ist nur die Proenzymform als einfache Bande vorhanden. Die leichtere, aktivierte MMP-2-Form fehlt einheitlich.

Die konstante Expression von MMP-2 in Pleuraergüssen und Pleuralavagen in der Zymographie wird durch die ELISA-Daten bestätigt (s. Abbildung 9 und Abbildung 10). Die Konzentrationsbestimmung durch die ELISA-Analyse zeigt für die absoluten Werte MMP-2 als die vorherrschende Isoform (um ca. drei Zehnerpotenzen höher), verglichen mit MMP-1 und MMP-9. Vergleiche zwischen den Diagnosegruppen ergeben für die Pleuraergüsse unterschiedlicher Genese keine signifikanten Unterschiede, wohl aber für den Vergleich zwischen Pleuraergüssen und Pleuralavagen: dort ist die Expression von MMP-2 in den Ergüssen stärker ausgeprägt.

Nach Proteinkorrektur ist die hervorgehobene Stellung von MMP-2 unverändert. Neu hinzugekommen sind signifikante Unterschiede: verglichen mit parapneumonischen oder paraneoplastischen Exsudaten ist die Expression in Transsudaten stärker ausgeprägt. Zudem zeigt sich, wie schon für die absoluten Werte, dass MMP-2 in allen Pleuraergüssen in signifikant höheren Mengen nachweisbar ist, verglichen mit Pleuralavagen.

Die Expression von MMP-9 variiert im Gegensatz zu MMP-2 in der Zymographie stark: (i) Zum einen fehlt MMP-9 vollständig in den Pleuralavagen. Wobei die Analyse mittels Zymographie im Pikogrammbereich detektiert, im Gegensatz zum ELISA, welcher im Bereich von ng/ml nachweist. (ii) Zum anderen wechselt das Bandenmuster in Pleuraergüssen unterschiedlicher Genese deutlich: MMP-9 ist in Transsudaten am schwächsten und in parapneumonischen Exsudaten am stärksten ausgeprägt. Die Expression von MMP-9 in paraneoplastischen Exsudaten nimmt hierbei eine Mittelstellung ein, wenngleich der Unterschied zu den Transsudaten deutlicher ausgeprägt ist als zu den parapneumonischen Exsudaten (s. Abbildung 2 und Abbildung 3).

Dies bestätigt sich durch die ELISA-Daten, welche für die absoluten Werte von MMP-9 ebenfalls signifikant erhöhte Mengen in parapneumonischen Exsudaten, verglichen mit Transsudaten oder paraneoplastischen Exsudaten, aufzeigen. Die graphische Einzelwertauflistung (s. Abbildung 6) verdeutlicht die hervorgehobene Expression von MMP-9 in parapneumonischen Exsudaten. In Pleura-

lavagen liegen die Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze, welches ebenfalls einem signifikanten Unterschied entspricht.

Nach Proteinkorrektur bleiben die signifikanten Unterschiede zwischen den Diagnosegruppen der Pleuraergüsse erhalten (s. Abbildung 13). Ein Vergleich mit Pleuralavagen ist nicht sinnvoll, da aufgrund des geringen Proteingehaltes der Lavagen unrealistisch hohe Konzentrationswerte entstehen würden.

MMP-1 ist in der Gelatinzymographie nicht oder nur schlecht darstellbar, so dass für die Auswertung allein die ELISA-Daten zur Verfügung stehen. Hier zeigt sich für die absoluten Werte, dass MMP-1 in signifikant höheren Mengen in parapneumonischen Exsudaten zu finden ist, verglichen mit Transsudaten. Da der Gehalt an MMP-1 in Pleuralavagen unterhalb der Nachweisgrenze liegt, ist der Unterschied zu Pleuraergüssen unterschiedlicher Genese ebenfalls signifikant (s. Abbildung 4).

Nach Proteinkorrektur heben sich die signifikanten Unterschiede zwischen den Pleuraergüssen unterschiedlicher Genese auf (s. Abbildung 11). Ebenfalls wie bei MMP-9 ist auch hier ein Vergleich mit Pleuralavagen nicht sinnvoll, da die definierten Werte für MMP-1 (Hälfte der unteren Nachweisgrenze) nach Proteinkorrektur unrealistisch hoch wären.

Anhand der quantitativen Ergebnissen durch die ELISA-Analysen zeigt sich für TIMP-1 ein deutliches und konstantes Expressionsmuster in Pleuraergüssen und in Pleuralavagen (s. Abbildung 9 und Abbildung 10). Ausgehend von den absoluten Werten an TIMP-1, ist die Expression in Pleuraergüssen signifikant höher als in Pleuralavagen, ungeachtet der Ergussgenese. Nach Proteinkorrektur ist die Expression ohne signifikante Unterschiede, unabhängig von der Probenart.

Anhand der absoluten Werte mittels ELISA-Analyse lässt sich für TIMP-2 eine deutliche, wenn auch geringere Expression im Vergleich zu TIMP-1, in Pleuraergüssen und Pleuralavagen nachweisen (s. Abbildung 9 und Abbildung 17). Verglichen mit Pleuralavagen ist TIMP-2 in signifikant höheren Mengen in parapneumonischen und paraneoplastischen Exsudaten vorhanden.

Nach Proteinkorrektur kommt es zu einem relativem Anstieg von TIMP-2 in Pleuralavagen, verglichen mit Pleuraergüssen unterschiedlicher Ätiologie. Die hervorgehobene Expression von TIMP-2 in Pleuralavagen ist signifikant erhöht, im Vergleich zur Expression in Pleuraergüssen (s. Abbildung 8 und Abbildung 15).

4.4 Schlussfolgerung

Anhand der Expressionsmuster aus Zymographie und ELISA-Daten wird die hervorgehobene Rolle von MMP-2 und TIMP-1 deutlich. Diese sind konstant vorhanden und es stellt sich die Frage, ob es sich bei beiden Isoformen um konstitutiv exprimierte Proteine innerhalb des Kompartiments der Pleura handeln könnte.

Zur besseren Vergleichbarkeit von Ergüssen und Lavagen erfolgt die Anpassung auf den Proteingehalt. Hier zeigt sich für TIMP-2 ein Überwiegen der Expression in Pleuralavagen, verglichen mit Pleuraergüssen (im Mittel um das 14- bis 18-fache erhöht). Inwiefern es sich hierbei um einen verstärkten Verbrauch bzw. Degradation in den Pleuraerguss-Proben, und somit um einen Hinweis auf den Einfluss von TIMP-2 in der Pathophysiologie eines Ergusses handeln könnte, bleibt offen.

Anders MMP-1 und MMP-9. Diese sind mittels ELISA und Gelatinzymographie nur in Pleuraergüssen nachweisbar, mutmaßlich als Ausdruck der zugrundeliegenden Pathologie. Wobei MMP-9 die stärker exprimierte Isoform ist. Pleuralavagen besitzen keine mit den beiden Methoden detektierbaren Enzymmengen.

Es bleibt die Frage zu stellen, ob Transsudate weiterhin als Näherung von physiologischer Pleuraflüssigkeit betrachtet werden können, sind hier doch bereits MMP-1 und MMP-9, zwei potente Proteasen, nachweisbar, wenngleich auch in geringeren Mengen als in Exsudaten. Es liegt die Vermutung nahe, dass der Nachweis von MMP-1 und MMP-9 einen Hinweis auf die pathophysiologische Bedeutung dieser Isoformen bei der Entstehung eines Pleuraergusses geben kann. Dass also die zugrundeliegende Erkrankung bereits im Falle eines Transsudats Einfluss im Kompartiment des Pleura-raums genommen hat, welches eine Aktivierung von Synthese bzw. Sekretion dieser Proteasen bewirkte.

5 DISKUSSION

5.1 MMP- und TIMP-Isoformen im Kompartiment der Lunge

Zahlreiche Studien belegen, dass Matrix Metalloproteasen (MMP) und deren Inhibitoren (TIMP) grundlegend an Umbauprozessen der extrazellulären Matrix (EZM) beteiligt sind (LAURENT 1987, MATRISIAN 1990, WOESSNER 1991, DAVIES et al. 1992, MURPHY und HEMBRY 1992, BIRKEDAL-HANSEN 1995, PETERS et al. 1997, NAGASE und OKADA 1997, VISSE und NAGASE 2003). Auf die besondere Bedeutung von MMP- und TIMP-Isoformen in der Pathogenese pulmonaler und pleuraler Erkrankungen wurde mehrfach hingewiesen (HUREWITZ et al. 1992, O'CONNOR und FITZGERALD 1994, DUNSMORE und

RANNELS 1996, EICKELBERG et al. 1997, OHBAYASHI 2002, ATKINSON und SENIOR 2003, WINKLER et al. 2003).

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Vergleich von MMP- und TIMP-Isoformen in pathologischer und weitestgehend physiologischer EZM-Flüssigkeit innerhalb des Pleuraraumes. Hierbei dienen Pleuraergüsse als pathologische und Pleuralavagen als physiologische Substrate. Die Neuartigkeit dieser Arbeit ergibt sich in Bezug auf die Größe der Patientengruppe und dem vergleichenden Aspekt mit physiologischer Pleuraflüssigkeit (Pleuralavagen).

Die EZM ist einem dynamischen (situationsabhängigen) Prozess unterworfen, welcher aus gewebedegradierenden und gewebeconservierenden Vorgängen besteht. An diesen Vorgängen sind MMP und TIMP maßgeblich beteiligt. Die proteolytische Aktivität der MMP ist gegen alle Bestandteile der EZM gerichtet, wie z.B.: Kollagen, Proteoglykan, Elastin, Laminin und Fibronectin. Die Balance aus proteolytischer und antiproteolytischer Aktivität bestimmt im physiologischen Zustand die Gewebemöostase (TETLEY 1993, EICKELBERG et al. 1998). In der Lunge werden täglich bis zu 10% der gesamten Kollagenmasse degradiert und neu synthetisiert. Sie zählt somit zu den Organen mit einem hohen EZM-Umsatz (LAURENT 1987, DUNSMORE und RANNELS 1996).

Bei pathologischen Vorgängen innerhalb der EZM ist das physiologische Gleichgewicht zwischen MMP und TIMP gestört. Dies wurde bereits für verschiedene Erkrankungen untersucht, wie z.B. bei: Periodontitis (SORSA et al. 1994, EJEIL et al. 2003), rheumatoider Arthritis (HIROSE et al. 1992, MURPHY und HEMBRY 1992, ISHIGURO et al. 1996), Arteriosklerose (IKEDA und SHIMADA 2003), malignen Erkrankungen (NAWROCKI et al. 1997, OVERALL und LOPEZ-OTIN 2002, EGBLAD und WERB 2002), Asthma (CATALDO et al. 2002), chronisch obstruktiver Bronchitis (BELVISI und BOTTOMLEY 2003), pulmonaler Hypertonie (VIEILLARD-BARON und FRISDAL 2000) und Lungenfibrose (BEEH et al. 2003).

Im Kompartiment der Lunge kann ein Ungleichgewicht von MMP- und TIMP-Aktivität zur:

- Auflösung von extrazellulärer Matrix z.B. bei Bronchiektasen (SEPPER et al. 1995), Lungenemphysem (TETLEY 1997), Mukoviszidose (DELACOURT et al. 1995), oder
- Erhöhung von Kapillarpermeabilität und zu Gefäßumbau wie beim akuten Lungenversagen (ARDS) (RICOU et al. 1996, VIEILLARD-BARON et al. 2003), oder
- zu verstärkter Ablagerung von extrazellulären Proteinen, z.B. bei idiopathischer Lungenfibrose, führen (CROUCH 1990, O'CONNOR und FITZGERALD 1994, HAYASHI et al. 1996, EICKELBERG et al. 1999, RUIZ et al. 2003).

Die Netto-MMP-Aktivität entspricht demnach dem Teil aktivierter MMP, die nicht durch TIMP gebunden sind. Somit ist eine Aussage über die biologische Aktivität der MMP nur unter Berücksichtigung ihrer Inhibitoren, den TIMP, sinnvoll (EICKELBERG et al. 1997).

Besonders bei zwei Prozessen wird das grundlegende Vermögen der MMP, EZM-Proteine zu degradieren, hervorgehoben: bei Angiogenese und Tumorinvasion (LIOTTA et al. 1991, MIGNATTI und RIFKIN 1993, STETLER-STEVENSON et al. 1993, NAWROCKI et al. 1997, BURBRIDGE et al. 2002, EGEBLAD und WERB 2002, LYNCH und MATRISIAN 2002).

Grundvoraussetzung für beide Prozesse ist die Invasion von Zellen in einen festgefügtten Zellverband. Hierfür bedarf es proteolytischer Aktivität gegen die Basalmembran (besonders Kollagen IV): jener Aktivität, die charakteristisch ist für Gelatinasen (WOESSNER 1991, O'CONNOR und FITZGERALD 1994). Dass sich Zellen (z.B. Makrophagen oder neutrophile Granulozyten) bei der Migration der proteolytischen Eigenschaft von MMP bedienen, wurde schon von WRIGHT und GALLIN (1979) und von GARBISA et al. (1986) vermutet.

Aufgrund der Beobachtung von Gewebe unterschiedlichster Tumore, welche den Nachweis erheblich gesteigerter MMP-Expression erbrachte, folgte die Herstellung von synthetischen MMP-Inhibitoren. Ihre Effektivität konnte anhand von präklinischen Studien unter Beweis gestellt werden, so dass z.B. zwei dieser Wirkstoffe, Batimastat und Marimastat, Phase I bis Phase III der klinischen Erprobung durchliefen (WOJTOWICZ-PRAGA et al. 1997, MACAULAY et al. 1999). Leider mit enttäuschendem Erfolg. Die klinischen Studien mussten eingestellt werden. Neuere Ansätze konzentrieren sich auf unterschiedliche Regulationsebenen von MMP (auf der Ebene von Genaktivierung bis hin zur schrittweisen Enzymaktivierung) bei der Suche nach neuen Therapiestrategien in der Behandlung von Krebserkrankungen (OVERALL und LOPEZ-OTIN 2002, COUSSENS et al. 2002).

5.2 MMP und Pleuraergüsse

HUREWITZ et al. (1992) wiesen erstmalig zwei MMP-Isoformen, MMP-2 (Gelatinase-A) und MMP-9 (Gelatinase-B), mit Hilfe der Gelatinzymographie in 32 Pleuraergüssen nach. Die Zymographie ergab zwei prominente Lysezonen bei 66 und 92 kDa. Mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern wurde diese Aktivität in der Western Blot-Analyse als MMP-2 und MMP-9 identifiziert. Die quantitative Analyse mittels ELISA-Technik ergab für MMP-2 signifikant hohe Konzentrationen in Pleuraergüssen, verglichen mit den Serumwerten (zwei- bis fünffach erhöht). Im Gegensatz zu MMP-9, denn diese Isoform war die vorherrschende im Serum und ließ sich nur in niedrigen Konzentrationen in Pleuraflüssigkeit

nachweisen. So äußerten die Autoren die Vermutung, dass der Grund jener unterschiedlichen Verteilung von MMP-2 in Serum und Pleuraergüssen vielmehr in einer Produktion durch residente Zellen (pleurale Mesothelzellen), als in einer Filtration aus dem Blutplasma zu suchen sei. Eine Korrelation der MMP-Expressionsmuster mit der Ätiologie der Ergüsse war negativ und eine Analyse von MMP-Inhibitoren, den TIMP, wurde nicht vorgenommen.

MARSHALL et al. (1993) zeigten *in vitro*, dass humane, pleurale Mesothelzellen MMP und TIMP bilden, wobei MMP-2 (Gelatinase-A) eine konstitutive Expression zeigte. MMP-2 ließ sich weder durch Phorbol-Myristatacetat (PMA) oder Lipopolysaccharide (LPS), beides übliche Stimulanzen der Zellkultur, beeinflussen. MMP-9 (Gelatinase-B) war hingegen im Medium unstimulierter Zellen nicht nachweisbar, jedoch durch PMA induzierbar.

EICKELBERG et al. (1997) fanden in 88 untersuchten Pleuraergüssen ebenfalls eine hohe MMP-2-Expression. Diese war in Exsudaten und in Transsudaten einheitlich, obwohl Transsudate allgemein als Plasmafiltrate gelten. Sie kamen zu der Hypothese, dass *in vivo* MMP-2 (Gelatinase-A) konstant in Pleuraergüssen unterschiedlicher Ätiologie vorhanden sei und somit auch konstitutiv exprimiert werde. Dies entsprach den *in vitro* Ergebnissen von MARSHALL et al. (1993). Im Gegensatz zu MMP-2 ergab sich für MMP-9 (Gelatinase-B) ein unterschiedliches Expressionsmuster: in Exsudaten, führend bei paraneoplastischen, wurden hohe Konzentrationen an MMP-9 gefunden und in 81% der Transsudate blieb dieser Nachweis negativ.

Eine weitere Untersuchung von HUREWITZ et al. (1993) geht auf die Aktivitätshemmung (>75%) intrapleuraler MMP durch Tetrazykline ein. Als Folge der Inhibition entsteht eine ungehinderte Ablagerung von Kollagen und Fibrin im Pleuraspalt, eine chemisch induzierte Pleurodese. Die Hemmung der MMP-Aktivität mittels Tetrazyclin kann auf zwei Wirkungen beruhen: eine Direkte (Chelation des Metallions: des Zn^{2+}) und eine Indirekte (zytotoxischer Effekt auf pleurale Mesothelzellen und so Hemmung der Bioaktivität und zellulären MMP-Synthese). Dies weist erneut darauf hin, dass MMP zur Auflösung von Verklebungen und Fibrosierungen (als Folge einer Verletzung der Pleura, durch z.B. inflammatorische Prozesse) und somit zur Unversehrtheit, zur physiologischen Homöostase des Pleuraspalts entscheidend beitragen.

Anzufügen bleibt, dass WOESSNER (1999) den hemmenden Effekt von Tetrazyklinen auf MMP vielmehr der Unterdrückung von messenger RNA- und Protein-Expression zuschreibt, als der Komplexbildung des Metallions.

5.3 Ziel dieser Arbeit: Analyse der MMP- und TIMP-Isoformen in der Flüssigkeit von Pleuraergüssen und Pleuralavagen

Es wird deutlich, dass eine genaue Charakterisierung der bei Erkrankungen der Pleura beteiligten MMP- und TIMP-Isoformen wichtig ist, um sowohl pathologische als auch physiologische Zustände im Pleuraspalt, stellvertretend für die extrazelluläre Matrix, zu verstehen.

Das Ziel dieser Arbeit liegt zum einen in einer genauen Charakterisierung der MMP- und TIMP-Isoformen in Pleuraergüssen und Pleuralavagen (qualitativ und quantitativ) und einem Vergleich dieser Ergebnisse mit der Ätiologie der zugrunde liegenden Diagnose. Zum anderen in der Überprüfung, ob sich eine Einteilung in konstitutive und induzierbare MMP- und TIMP-Isoformen durch den Vergleich mit physiologischer Pleuraflüssigkeit, den Pleuralavagen, ermöglichen lässt. Das hierfür schrittweise Vorgehen gliedert sich wie folgt:

5.4 Serinproteasen und MMP in der Gelatinzymographie

Mit Hilfe der Gelatinzymographie können Proben der Pleuraergüsse und der Pleuralavagen auf gelatinolytische Aktivität untersucht werden (Gelatine als Substrat macht dieses Assay deswegen so interessant, weil Gelatine ein Abbauprodukt von interstitiellem und Basalmembran-Kollagen ist). Hierfür kommen zwei Gruppen von Proteasen in Frage, die eine zentrale Bedeutung im extrazellulären Raum des menschlichen Körpers einnehmen (DUNSMORE und RANNELS 1996): Serinproteasen und Matrix Metalloproteasen.

Serinproteasen bilden die Gruppe unter den Proteasen mit der bisher größten Anzahl. Zur Namensgebung trug der Serin-Rest am katalytischen Zentrum bei (DAVIES et al. 1992). Viele der Serinproteasen nehmen an der Degradation der extrazellulären Matrix teil, entweder direkt oder durch Aktivierung von MMP-Proenzymen. Gehemmt werden sie durch spezifische Inhibitoren, der großen Familie der SERPINE (z.B. α_1 -Antitrypsin, Plasminogenaktivator-Inhibitor-1 und -2, Aprotinin etc.). Die Serinproteasen kommen entweder extrazellulär (z.B. Plasminogenaktivator, Plasmin etc.) oder intrazellulär, in der Granula basophiler Granulozyten (z.B. neutrophile Elastase, Kathepsin G etc.), vor (NAGASE und OKADA 1997).

Zur Unterscheidung, welche der beiden Proteasenfamilien die in der Zymographie sichtbare gelatinolytische Aktivität verursacht, werden vier identische, gelatinhaltige SDS-PAGE-Gele angefertigt und jeweils mit einem unterschiedlichen Proteasen-Inhibitor inkubiert (s. 4.1.2, Abbildung 1): jeweils zwei Gele mit jeweils einem spezifischen Inhibitor für Serinproteasen (PMSF oder Pefabloc®), ein Gel mit einem spezifischen Inhibitor für MMP (EDTA) und ein unbehandeltes Kontrollgel. Bei dem unbehandelten Kontrollgel und den beiden mit den Inhibitoren für Serinproteasen (PMSF oder

Pefabloc®) behandelten Gelen ist ein charakteristisches Bandenmuster der aufgetragenen Proben und der gereinigten, rekombinanten MMP zu erkennen. Bei dem vierten Gel, welches mit dem spezifischen MMP-Inhibitor (EDTA) behandelt wurde, ist kein Bandenmuster sichtbar.

Dies weist auf eine Hemmung der gelatinolytischen Aktivität durch EDTA hin. Folglich sind MMP für das gelatinolytische Bandenmuster in der Zymographie verantwortlich.

5.5 Identifizierung der MMP- und TIMP-Isoformen

Die Methodik der Zymographie wurde bereits von KLEINER und STETLER-STEVENSON 1993 sowie ergänzend von QUESADA et al. 1997 auf ihre Exaktheit im Nachweis von MMP untersucht. Es zeigte sich, dass die Gelatinzymographie einen ausgesprochen sensitiven Nachweis von gelatinolytischer Aktivität erbringen kann. Dieser liegt im Pikogrammbereich.

Für das Themengebiet innerhalb der Pleura und der extrazellulären Matrix beschäftigten sich HUREWITZ et al. 1992 und 1993 sowie EICKELBERG et al. 1997 eingehend mit der Frage, welche der MMP-Isoformen funktionell mittels Gelatinzymographie und auf der Proteinebene mittels Western Blot-Analyse nachgewiesen werden können.

Diese Erfahrungen berücksichtigend, lassen sich die Ergebnisse dieser Arbeit wie folgt zusammenfassen:

- Die entsprechenden Bande der Proben laufen in der Zymographie auf der gleichen Höhe wie rekombinantes MMP-2 bzw. rekombinantes MMP-9 (s. 4.1).
- Die charakteristischen Expressionsmuster in der Zymographie von MMP-2 und MMP-9 in Pleuraergüssen unterschiedlicher Genese (s. Abbildung 2) und Pleuralavagen (s. Abbildung 3) werden durch die quantitativen ELISA-Daten (s. 4.2) bestätigt.
- Statistische Analysen der ELISA-Daten ergeben sowohl signifikante Unterschiede zwischen einzelnen MMP- und TIMP-Isoformen als auch zwischen Proben unterschiedlicher Diagnose bezüglich einer Isoform.
- Die Proteinkorrektur der absoluten Werte ermöglicht eine bessere Vergleichbarkeit von Pleuraergüssen mit Pleuralavagen.

Da der Nachweis für MMP-1 mittels Caseinzytographie nicht eindeutig war, wurde diese Isoform genauer durch die ELISA-Analyse bestimmt. Die Verteilung der mittels Gelatinzymographie nicht nachweisbaren TIMP-1- und TIMP-2-Isoform konnte ebenfalls durch die quantitativen Daten in Pleuraergüssen und Pleuralavagen bestimmt werden.

5.5.1 Eigenschaften und Charakterisierung der MMP-1-Isoform

MMP-1 (interstitielle Kollagenase, Fibroblasten- Kollagenase) ist mit 55 kDa leichter als die beiden Gelatinasen. MMP-1 degradiert Kollagen Typ I, II, III, VII, VIII, X und Gelatine, wobei der Schwerpunkt bei Kollagen Typ III liegt. MMP-1 wird hauptsächlich von Bindegewebszellen (Fibroblasten, Keratinozyten, Endothelzellen, Osteoblasten, Chondrozyten, Hepatozyten) als Proenzymform sezerniert. Die Aktivierung wird wesentlich durch MMP-3 getriggert, ein erneutes Beispiel für die synergistische Wirkungsweise von MMP-Isoformen (O'CONNOR und FITZGERALD 1994).

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass in 93% der Pleuraergüsse (bei 87 von 94 Proben) MMP-1 exprimiert wird. Ein signifikanter Unterschied besteht in den absoluten Konzentrationsbestimmungen zwischen Transsudaten und parapneumonischen Exsudaten. Nach Proteinkorrektur ist dieser nicht mehr vorhanden.

Auffällig ist das konstante Vorkommen von MMP-1 in Transsudaten, verglichen mit einem konstant fehlenden Nachweis in Pleuralavagen, ähnlich der MMP-9-Isoform. Dies deutet bereits bei Transsudaten auf eine durch pathologische Veränderungen innerhalb des Pleuraraumes induzierte Bildung und Sekretion von MMP-1 hin und würde somit gegen eine konstitutive Expression dieser Isoform sprechen.

5.5.2 Eigenschaften und Charakterisierung der MMP-2-Isoform

MMP-2 (Gelatinase-A, 72 kDa Typ IV Kollagenase) ist die kleinere der beiden Gelatinasen. Sie wird als Proenzym überwiegend aus mesenchymalen Zellen, jedoch auch aus T-Lymphozyten und Makrophagen sezerniert (BIRKEDAL-HANSEN 1995). Pro-MMP-2 wird interessanterweise nicht durch Serinproteasen oder die Plasminkaskade aktiviert, sondern durch Bildung eines ternären Komplexes mit MT1-MMP und TIMP-2 (SATO et al. 1994, STRONGIN et al. 1995). Somit entsteht die proteolytische Aktivität von MMP-2 zelloberflächengebunden. Die Substrate von MMP-2 sind fibrilläres Kollagen (Gelatine), Kollagen Typ IV, V, VII, X, Fibronectin und Elastin (Woessner 1991). Zusätzlich vermag MMP-2 die Proenzymform von MMP-9 zu aktivieren, welches bei ähnlicher Substratspezifität die Degradation von EZM-Bestandteilen potenziert (FRIDMAN et al 1995).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass MMP-2 in allen 96 untersuchten Ergüssen und in allen 10 Pleuralavagen regelmäßig und konstant vorhanden ist. Zwischen Transsudaten und Exsudaten findet sich in den absoluten Konzentrationsbestimmungen kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des MMP-2-Gehaltes, wohl aber nach Proteinkorrektur: Hier zeigt sich die Menge an MMP-2 in Transsudaten signifikant erhöht, verglichen mit parapneumonischen oder paraneoplastischen Exsudaten. Der Gehalt von MMP-2 in Pleuralavagen ist im Vergleich zu den Pleuraergüssen signifikant

unterschiedlich, d.h. bei den absoluten Werten als auch bei den Werten welche auf den Proteingehalt bezogen sind.

Anders als MMP-1 oder MMP-9 weisen Pleuralavagen MMP-2-Konzentrationen auf, wenngleich in geringeren Mengen als in Pleuraergüssen. Auch ohne pathologische Stimuli, wie z.B. inflammatorische oder maligne Prozesse, wird MMP-2 sezerniert. Dies spricht für eine gleichmäßige und konstitutive Expression der MMP-2 Isoform.

Diese Ergebnisse bestätigen die *in vitro*-Daten von MARSHALL et al. von 1993. Dieser konnte zeigen, dass MMP-2 von pleuralen Mesothelzellen konstitutiv sezerniert wird. Übliche Stimulanzen der Zellkultur, wie Lipopolysaccharide (LPS) oder Phorbol-Myristatessigsäure (PMA), hatten hierauf keinen Einfluss.

Somit scheint die Expression von MMP-2 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine konstitutive Funktion der pleuralen Mesothelzellen zu sein.

5.5.3 Eigenschaften und Charakterisierung der MMP-9-Isoform

MMP-9 (Gelatinase-B) bildet mit MMP-2 (Gelatinase-A) die Gelatinasen-Untergruppe der MMP und ist mit 92 kDa die bisher größte MMP-Isoform. MMP-9 wird, wie die Mehrzahl der MMP, als inaktives Proenzym sezerniert, hauptsächlich von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen aber auch von Zellen malignen Ursprunges (GARBISA et al. 1986, MATRISIAN 1992). Wenn MMP-9 in die extrazelluläre Matrix sezerniert wird, entscheiden Aktivierung und Inhibition über Stärke und Ort der katalytischen Aktivität. Aktiviert wird MMP-9 durch verschiedene chemische, proteolytische Prozesse und andere MMP, z.B. MMP-2 (FRIDMAN et al. 1995), wobei aktiviertes MMP-3 als der Hauptaktivator *in vivo* gilt (OGATA 1992, ITOH und NAGASE 1995). Inhibiert wird sowohl latentes als auch aktiviertes MMP-9 bevorzugt durch TIMP-1 (GOMEZ et al. 1997, VIEILLARD-BARON et al. 2003, BEEH et al. 2003, RUIZ et al. 2003).

Anfänglich wurde angenommen, dass die Hauptaufgabe der Gelatinasen lediglich der Verdau von denaturierten Kollagenfibrillen (Gelatine) sei. Später konnte gezeigt werden, dass Gelatinasen auch andere Kollagen-Typen degradieren (O'CONNOR und FITZGERALD 1994). So weist MMP-9 eine besondere Substratpräferenz für Kollagen III, IV und V, sowie für Proteoglykane, Elastin und Fibronectin auf (VISSE und NAGASE 2003).

Die Degradation von Kollagen IV, einem strukturgebenden Hauptbestandteil der Basalmembran, durch Gelatinasen und besonders durch MMP-9 ist hierbei von besonderem Interesse (LYONS et al. 1991). In der Lunge bildet die Basalmembran, im Zusammenspiel mit den übrigen Bestandteilen der extrazellulären Matrix, ein grundlegendes Stütz- und Strukturelement der Alveolen

und entscheidet durch den Grad ihrer Unversehrtheit über Ausmaß und Verlauf von Erkrankungen. Eine intakte Basalmembran gewährleistet den Erhalt der ursprünglichen Alveolararchitektur und ist ein essentieller Leit- und Migrationspfad für effektive Reparaturprozesse (O'CONNOR und FITZGERALD 1994). Überschießende Reparaturprozesse z.B. bei chronisch entzündlichen Prozessen können zu einer irreversiblen Zerstörung der Basalmembran und somit zu einer bleibenden Schädigung des Gewebes führen. So z.B. beim Lungenemphysem (RUIZ et al. 2003), dem ARDS (DECLAUX et al. 1997), der idiopathischen Lungenfibrose (BEEH et al. 2003) als auch bei Pleuraerkrankungen (HUREWITZ et al. 1992). WINKLER et al. (2002) zeigten anhand von Analysen aus Trachealsekret, dass bereits in der kindlichen Lunge der Nachweis von MMP, so auch von MMP-9, krankheitsbedingt 5- bis 6-fach erhöht ist. Zudem stieg die Konzentration und Aktivität von MMPs bei respiratorischem Versagen deutlich an, welches Hinweise auf die pathophysiologische Beteiligung gibt.

Degradation von Kollagen IV und der Basalmembran ist eine Grundvoraussetzung bei Prozessen wie Gefäßneubildung oder Extra- und Intravasation von hämatopoetischen Zellen oder Karzinomzellen z.B. bei Angiogenese, entzündlicher Zellwanderung, Tumordinvasion und Metastasierung (NAGASE und OKADA 1997, EGEBLAD und WERB 2002).

Für maligne Tumore unterschiedlicher Herkunft konnte in zahlreichen Studien eine direkte Korrelation zwischen einem invasiven, metastasierenden Phänotyp maligner Tumorzellen und der Expression von MMP, speziell von Gelatinasen, nachgewiesen werden (LIOTTA et al. 1991, STETLER-STEVENSON et al. 1993). Dies zeigten z.B.: KOSSAKOWSKA et al. (1998) in Tonsillengewebe von Non-Hodgkin-Lymphom-Patienten, NAWROCKI et al. (1997) in Lungengewebe von Bronchialkarzinom-Patienten, SUSSKIND et al. (2003) durch Verlaufswerte im Plasma von Bronchialkarzinom- und Mammakarzinom-Patienten unter strahlentherapeutischer Behandlung, JUNG et al. (1997) im Plasma von Prostatakarzinom-Patienten, LYONS et al. (1991) in Mammakarzinomzellen von der Ratte und SREENATH et al. (1992) in transformierten Zell-Linien von der Ratte.

Die aktuelle Sichtweise in der Bedeutung von MMP bei Karzinomkrankungen beschränkt sich nicht mehr nur auf die gewebedegradierende Fähigkeit, z.B. der Basalmembran, sondern geht von vielschichtigen Prozessen aus, welche durch MMP, besonders MMP-2 und MMP-9, unterhalten werden. Zu nennen sind neben Tumorprogress und Invasion, auch maligne Entartung, Zelltod, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und tumorinduzierte Angiogenese. Bei der Analyse, wie eine schnelle und präzise Zellantwort bei Tumorwachstum und Metastasierung reguliert wird, tritt die Aktivität von MMP gegen

Nicht-Gewebebestandteile immer mehr in den Vordergrund. So z.B. gegen Zytokine, Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, Adhäsionsmoleküle oder Apoptose-Mediatoren (COUSSENS et al. 2002).

NELSON et al. (2000) konnten zeigen, dass die Induktion und Aktivierung von MMP stattfindet, bevor ein maligner Phänotyp, d.h. Zerstörung der Basalmembran und Invasion, erkennbar wird. Dieses weist auf die komplexe Funktion von MMP, zusätzlich zur EZM-Degradation hin.

NAWROCKI et al. (1997) wiesen eine erhöhte Konzentration von MMP-9 nicht nur in Karzinomzellen, sondern auch in angrenzenden Bindegewebszellen nach. MMP werden somit in Gewebezellen induziert, welche in der Nachbarschaft von Karzinomzellen liegen. Diese Interaktion zwischen Karzinomzellen und gesundem Gewebe deutet auf eine elegante Tumor-Wirt-Kommunikation hin, welche das umliegende Gewebe i.S. einer Wirt-Reaktion mit einbezieht (STERNLICHT und WERB 2001, LYNCH und MATRISIAN 2002).

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass in Pleuraergüssen unterschiedlicher Genese die MMP-9-Isoform die stärkste Variabilität aufweist, wobei Exsudate die höchsten Mengen an MMP-9 enthalten. Interessanterweise ist MMP-9 in allen Pleuraergüssen (n=96) zu 99% nachweisbar, in Transsudaten zu 96 % (in 27 von 28 Proben), wohingegen MMP-9 in allen Pleuralavagen fehlt. Üblicherweise gelten Transsudate als Plasmafiltrate, sie sind charakterisiert durch eine erhaltene Proteinschranke und werden stellvertretend für die physiologischen Eigenschaften der Pleuraflüssigkeit betrachtet (BURGESS et al. 1995). Da die Konzentration und Aktivität von MMP-9 in Pleuraergüssen (speziell in Transsudaten) verglichen mit den Pleuralavagen, nachweisbar ist, könnte dies ein Hinweis auf durchlaufene Veränderungen sein. Hier wird deutlich, dass bereits bei Transsudaten eine Alteration und folglich eine pathologische Induktion der MMP-9-Sekretion stattgefunden hat.

In vitro gelang MARSHALL et al. 1993 der Nachweis, dass pleurale Mesothelzellen im unstimulierten Zustand kein MMP-9 in das Medium abgeben. Durch Stimulation mittels Phorbol-Myristatessigsäure (PMA) kann die Sekretion von MMP-9 induziert werden. Diese *in vitro*-Ergebnisse und der Vergleich mit den Pleuralavagen weisen auf eine induzierte Sekretion von MMP-9 in pathologischen Situationen hin. Nicht nur bei infektiösen oder malignen Veränderungen des Pleuraraumes, sondern bereits bei transsudativen Pleuraergüssen.

Interessanterweise unterscheiden sich diese Ergebnisse deutlich zum endobronchialen Vorkommen von MMP-2 und MMP-9. So untersuchten REICHENBERGER et al. (2001) das Vorkommen von MMP in bronchoalveolären Lavagen (BAL) bei Patienten mit Bronchialkarzinom sowie einer gesunden Kontrollgruppe. Es zeigte sich, dass die beiden MMP-Isoformen in BAL-Proben im umgekehrten Verhältnis zu Pleuraergüssen vorhanden waren: in BAL-Proben war MMP-9 die konstant

exprimierte Isoform, während MMP-2 nur bei Patienten mit Bronchialkarzinom nachweisbar war und somit als die induziert sezernierte Isoform anzusehen ist. Die Verteilung von Gelatinasen A zu Gelatinase B im alveolären Kompartiment verglichen mit dem Pleuraraum ist deutlich unterschiedlich.

5.5.4 Eigenschaften und Charakterisierung der TIMP-Isoformen

Die Aktivität von Proteasen wird präzise durch endogene Inhibitoren kontrolliert. Sie sind ubiquitär im Gewebe, Plasma und anderen Körperflüssigkeiten vorhanden. Mengenmäßig übersteigen die Inhibitoren gewöhnlich die Anzahl ihrer Substrate, so sind ca. 10 % aller Plasmaproteine Proteasen-Inhibitoren. Mit der Ausnahme von α_2 -Makroglobulin, sind Inhibitoren spezifisch für einzelne Proteasen-Familien (NAGASE und OKADA 1997).

Für eine Beurteilung der funktionellen Bedeutung der MMP ist die Berücksichtigung ihrer spezifischen Inhibitoren, den TIMP, unerlässlich. TIMP sind natürliche Proteasen-Inhibitoren, die im Gleichgewicht mit den MMP die physiologische Balance zwischen Auf- und Abbau der extrazellulären Matrix erhalten. Wird dieses Proteasen-Antiproteasen-Gleichgewicht durch z.B. inflammatorische oder maligne Erkrankungen gestört, führt dies zu den charakteristischen pathologischen Veränderung der EZM (WOJTOWICZ-PRAGA et al. 1997).

Zur Zeit sind vier TIMP-Isoformen bekannt, wovon die beiden wichtigsten *in vivo*-Inhibitoren hier untersucht wurden: TIMP-1 und TIMP-2. Sie werden sowohl in Mesenchymzellen als auch in Makrophagen gebildet. Sie inhibieren die aktive Form der meisten MMPs über eine N-terminale Bindung, ähnlich eines Chelatbildners. Zudem bindet TIMP-2 über die C-terminale Domäne fest mit dem Proenzym von MMP-2 und kann dieses oberflächennah in einen Aktivierungskomplex mit MT1-MMP einbringen (WOESSNER 1999).

Immunologisch handelt es sich bei TIMP-1 und TIMP-2 um eigenständige Moleküle. Auch ihre Regulation ist somit unterschiedlich: hemmenden Einfluss auf die Bildung von TIMP-1 haben Wachstumsfaktoren (EGF, TNF- α , TGF- β), Zytokine (IL-1, IL-6, IL-11, Onkostatin M), Phorbolster, Retinoide und Glukokortikoide, wohingegen die Expression von TIMP-2 durch TGF- β herunterreguliert wird und auf Phorbolster ohne Reaktion bleibt (BIRKEDAL-HANSEN 1993, BORDEN und HELLER 1997). So zeigten EICKELBERG et al. (1999) anhand primärer Fibroblasten der Lunge, dass durch TGF- β 1 und TGF- β 3 die Sekretion von TIMP-1 erhöht und von TIMP-2 erniedrigt wurde. Beide, auf unterschiedliche Wirkungsweise, hatten eine erhöhte Ablagerung von extrazellulärer Matrix zur Folge.

TIMP-1, ein 28,5 kDa großes Glykoprotein, kommt ubiquitär in der EZM vieler Organe vor. Die Substratspezifität der TIMP ist nicht auf einzelne MMP beschränkt. Es bestehen jedoch unterschiedlich

hohe Affinitäten zu den einzelnen MMP-Isoformen. TIMP-1 hat z.B. eine besondere Affinität zu MMP-3 und MMP-9 (MURPHY und DOCHERTY 1991). Es inhibiert diese MMP-Isoformen im Verhältnis 1:1 und ist somit ein wichtiger Faktor in der physiologischen Kontrolle überschießender EZM-Degradation (GOMEZ et al. 1997).

Die Bedeutung von TIMP-1 in physiologischen und pathologischen Situationen wurde in verschiedenen Untersuchungen gezeigt. MINOO et al. (1993) untersuchten hierzu bei Schimpansen die Lungen von Föten und Jungtieren kurz nach der Geburt. Es zeigte sich, dass TIMP-1 in hohen Mengen im postnatalen Lungengewebe synthetisiert wird, im Unterschied zu signifikant niedrigeren Werten pränatal. Die Autoren postulierten, dass TIMP-1 eine essentielle Aufgabe in der sich entwickelnden, postnatalen Lunge zukommt. Sowohl bei erwachsenen Patienten mit verschiedenen inflammatorischen oder malignen Erkrankungen als auch bei gesunden Kontrollpersonen wurde die konstante Expression von TIMP-1 in Lungengewebe und BAL-Flüssigkeit bestätigt (HAYASHI et al. 1996, REICHENBERGER et al. 2001, FINLAY et al. 1997). BEEH et al. (2003) deuteten auf ein Ungleichgewicht von MMP-9/ TIMP-1 im induzierten Sputum bei Patienten mit chronisch obstruktiver Bronchitis und idiopathischer Lungenfibrose hin.

VIEILLARD-BARON et al. (2000) untersuchten Ratten in einem hypoxieinduzierten Modell für pulmonale Hypertonie. Den Ratten wurde vor Hypoxieexposition ein humaner TIMP-1-Adenovirus endotracheal instilliert. Verglichen mit der Kontrollgruppe zeigten sich bei den transfizierten Ratten erhöhte Pulmonalarteriendrucke sowie eine Zunahme der Rechtsherzhypertrophie, welche mit verstärkter Ablagerung von Kollagen und Verbreiterung der Muskelschicht in den distalen Arterien assoziiert war und für eine Verschlechterung der pulmonalen Hypertonie sprach. 2003 untersuchten Vieillard-Baron et al. ein anderes Modell für pulmonale Hypertonie: TIMP-1 transfizierten Ratten, wie in der Studie von 2000, wurde Monokrotaline subkutan injiziert. Erstaunlicherweise war bei diesem Modell, der monokrotaline induzierten pulmonalen Hypertonie, durch die Transfektion eine Begrenzung der Erkrankung zu beobachten: die Rechtsherzhypertrophie und die Gefäßveränderungen waren weniger ausgeprägt als in der Kontrollgruppe. Die entgegengesetzten Beobachtungen wurden den unterschiedlichen Charakteristika der beiden Modelle zugeschrieben.

Eine Eigenschaft von besonderem Interesse ist die antineoplastische Wirkung von TIMP-1, welche *in vitro* und *in vivo* von verschiedenen Autoren beschrieben worden ist. Diese Eigenschaft beruht zu einem wesentlichen Teil auf der Inhibition von Tumor-Angiogenese, einer Hemmung des metastatischen Phenotyps von malignen Zellen sowie Hemmung von Gewebeinvasion (ALVAREZ et al. 1990, SIPOS et al. 1994):

Bereits 1990 berichteten ALVAREZ et al. bei Nacktmäusen, dass die *in vivo*-Gabe von TIMP-1 die hämatogene Metastasierung von malignen Zellen in die Lunge verhindert. Entscheidend bei der Reduzierung des metastatischen Potentials sei die hemmende Wirkung auf die MMP-Aktivität, besonders MMP-2, und somit die Hemmung der Kollagen Degradation. DE CLERCK et al. (1992) konnten ebenfalls im Tierversuch zeigen, dass Metastasierung und Wachstum der Tumorzellen durch Transfektion mit TIMP-1 inhibiert wird. In einer weiteren *in vitro*-Untersuchung beschrieben JOHNSON et al. (1994) die Inhibition von Tumor-induzierter Angiogenese durch TIMP-1. Interessanterweise blockte TIMP-1 die endotheliale Zellantwort auf bekannte angiogene Faktoren. Die Autoren erklären dies durch eine TIMP-1-vermittelte Migrationshemmung von Endothelzellen. Ein Hinweis auf die kontrovers erscheinende und vielschichtige Wirkung von TIMPs erbrachten 1992 und 1994 HAYAKAWA et al.. Sie zeigten anhand von humanen, bovinen und Mauszellen, dass jeweils TIMP-1 und TIMP-2 wachstumsstimulierende Eigenschaften besitzen. Diese zeigten sich unabhängig zu der MMP-inhibitorischen Wirkung und wurde durch Bindung an die korrespondierende Gelatinase-Proenzymform aufgehoben. Die Autoren vermuten das Vorhandensein von Oberflächenrezeptoren, welche für die jeweilige TIMP-Isoform spezifisch sei und die wachstumsstimulierende Wirkung übertrage.

TIMP-2, ein 21 kDa großes Glykoprotein, gilt als spezifischer Inhibitor von MMP-2 (HOWARD et al. 1991). Wobei TIMP-2, nicht an MT1-MMP gebunden, die Autoaktivierung von Pro-MMP2 als auch aktiviertes MMP-2 hemmt. Die Anwesenheit von TIMP-2 im Komplex mit MT1-MMP ist eine wesentliche Voraussetzung für die Aktivierung von MMP-2 (STRONGIN et al. 1995). Wohingegen BERNADO und FRIDMAN (2003) auf die regulierende Funktion von TIMP-2 bezüglich Aktivierung und Hemmung von Pro-MMP2 bzw. MMP-2 hinwiesen.

Die Bedeutung von TIMP-2 bei Tumorwachstum wurde in der Literatur überwiegend anhand von *in vitro*-Untersuchungen gezeigt: Bereits 1992 wurde von MURPHY et al. vermutet, dass TIMP-2 eine entscheidende Rolle bei der Bildung neuer Blutgefäße über die Regulation der MMP-2-Aktivität habe. MONTGOMERY et al. (1994) wiesen mittels humaner maligner Melanomzellen in immunsupprimierten Mäusen ein durch TIMP-2 induzierbares, deutlich reduziertes Tumorwachstum nach. Die Metastasierung in Lunge und Lymphknoten wurde von TIMP-2 jedoch nicht beeinflusst. Die Autoren formulierten die These, dass Tumorzellen infolge der erhöhten TIMP-2-Konzentration durch interstitielles Kollagen eingeschlossen werden. RAY und STETLER-STEVENSON gehen 1994 auf die differenzierte Wirkung der TIMP-2-Überexpression ein. Erhöht sich nach genetischer Manipulation humaner Melanomzellen die TIMP-2-Produktion, so schränkt dies nicht nur die Fähigkeit der Tumorzellen zur Gewebedegradation ein, sondern auch die Adhäsion an EZM-Bestandteilen sowie

deren Motilität. Schließlich beschrieben VALENTE et al. 1998 ebenfalls an Melanomzellen, dass Transfektion mit TIMP-2 invasives Wachstumsverhalten und Angiogenese reduziert und vor Apoptose schützt. Hierauf aufbauend schilderten BURBRIDGE et al. (2003) eine Hemmung der Angiogenese anhand eines synthetischen MMP-Inhibitors, Marimastat. Im Gegensatz hierzu stellten SEO et al. (2003) *in vitro* eine MMP-unabhängige Hemmung der Endothelzellproliferation, Hemmung der Angiogenese, durch TIMP-2 dar. Anhand von Ratten konnte MULLIGAN et al. (1993) *in vivo* zeigen, dass TIMP-2 auch ein potenter Hemmstoff von entzündlicher Aktivität ist: sie untersuchten die hemmende Wirkung auf Proteasen aus neutrophilen Granulozyten.

Es wird deutlich, dass TIMPs eigene biologische Funktionen in komplexen Prozessen besitzen, wobei die einzelnen Vorgänge erst ansatzweise verstanden werden (BRINCKERHOFF und MATRISIAN 2002). Zudem heben diese Studien die Bedeutung von TIMP bei entzündlichen und malignen Erkrankungen, ihren entscheidenden Einfluss bei infiltrierendem Wachstum, Metastasierung und tumorinduzierter Angiogenese hervor und weisen auf einen möglichen Nutzen dieser Antiproteasen im therapeutischen Rahmen hin. Diesem steht allerdings die kurze biologische Halbwertszeit der TIMP entgegen (WOJTOWICZ-PRAGA et al. 1997).

In Pleuraergüssen sind TIMP bisher nicht quantitativ analysiert worden. MARSHALL et al. (1993) konnten zwar zeigen, dass Pleuramesothelzellen *in vitro* in der Lage sind, nachweisbare Mengen von TIMP in das Kulturmedium zu sezernieren, eine Charakterisierung der einzelnen TIMP-Isoformen fand aber nicht statt. Qualitative Analysen von EICKELBERG et al. (1997) zeigten, dass TIMP-1 in Pleuraergüssen unterschiedlicher Genese konstant vorhanden war, während die TIMP-2-Expression abhängig von der Genese des Pleuraergusses unterschiedlich ausgeprägt war. Dies veranlasste die Autoren zu der Schlussfolgerung, dass es sich *in vivo* um konstitutiv bzw. induziert exprimierte Isoformen handele.

Interessant ist darüber hinaus das Verhältnis zwischen Protease und Antiprotease. So beschrieben DELACOURT et al. (1995) ein Missverhältnis zwischen MMP-9 und TIMP im Sputum von Patienten mit Mukoviszidose. VIGNOLA et al. (1998) korrelierten das Verhältnis von MMP-9 und TIMP-1 in Sputumasservaten mit der Atemwegobstruktion bei chronischer Bronchitis und Asthma bronchiale. Das MMP-9/TIMP-1-Missverhältnis unter Berücksichtigung der Atemwegobstruktion sprach für eine pathologische Atemwegsentzündung bei o.g. Erkrankungen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass TIMP-1 sowohl in allen Pleuraergüssen, unabhängig von der Genese, als auch in den Pleuralavagen in gleichmäßiger Form sezerniert wird. In

den proteinkorrigierten Werten ergeben sich keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung von TIMP-1 bezüglich der verschiedenen Proben. Das deutliche Vorkommen von TIMP-1 weist auf eine dominante Rolle in der Homöostase des Pleuraspalts hin. Die Annahme, dass TIMP-1 die dominante Antiprotease sowohl im Kompartiment der Pleura, als auch in der Lunge zu sein scheint, wird durch verschiedene Autoren gestützt. So fanden FINLAY et al. (1996) bei Patienten mit Emphysem, DELACOURT et al. (1995) bei Patienten mit Mukoviszidose und REICHENBERGER et al. 2001 bei Patienten mit Bronchialkarzinom eine konstante Sekretion von TIMP-1 in der Lunge, sowohl bei erkrankten Patienten als auch bei der Kontrollgruppe.

Ähnlich wie TIMP-1, lässt sich auch TIMP-2 konstant in allen Pleuraergüssen unterschiedlicher Genese und in allen Pleuralavagen nachweisen, jedoch mit einer um den Faktor 50 bzgl. der Pleuraergüsse und um den Faktor 5 bzgl. der Pleuralavagen geringeren Expression im Vergleich zu TIMP-1. Für die proteinkorrigierten Werte auffällig ist das signifikant erhöhte Vorkommen in den Pleuralavagen, verglichen mit den einzelnen Pleuraergüssen unterschiedlicher Genese. Die Menge an TIMP-2 ist bei pathologischen Zuständen reduziert vorhanden, ganz im Gegensatz zu TIMP-1. Dies könnte auf eine ursächliche Bedeutung von TIMP-2 bei der Entstehung von Pleuraergüssen hinweisen. Auch endobronchial lässt sich eine unterschiedliche Expression beider Antiproteasen nachweisen: REICHENBERGER et al. zeigten 2001, dass auf Proteinebene TIMP-1 in allen Proben vorhanden war, während TIMP-2 konstant fehlte.

5.6 Ergebnisse anhand der MMP- und TIMP-Expressionsmuster

Diese Arbeit bestätigt zu großen Teilen die Ergebnisse von HUREWITZ et al. 1992, HUREWITZ et al. 1993 und EICKELBERG et al. 1997. Zudem eröffnet diese Arbeit eine neue Nachweisqualität durch die quantitative Bestimmung der einzelnen Isoformen (MMP-1, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 und TIMP-2) in Pleuralavagen (n=10) als physiologische Vergleichsgruppe, im Vergleich zu Pleuraergüssen (n=96) (s. 4.2):

- MMP-2 und TIMP-1 werden, verglichen mit den übrigen Isoformen (MMP-1, MMP-9 und TIMP-2), konstant und in deutlich erhöhten Konzentrationen (ca. 100- bis 1000-fach für die absoluten Werte, bzw. ca. 10- bis 100-fach für die proteinkorrigierten Werte) in Pleuraergüssen unterschiedlicher Genese exprimiert.
- TIMP-2 ist konstant vorhanden, wenngleich auch in ca. 50-fach geringerer Konzentration als TIMP-1 in Pleuraergüssen (bzw. ca. 5-fach geringerer Konzentration als TIMP-1 in Pleuralavagen), unabhängig von absoluten oder proteinkorrigierten Werten.

- verglichen mit Pleuraergüssen ist TIMP-2 in Pleuralavagen signifikant erhöht werden die proteinkorrigierten Werte zugrunde gelegt.
- MMP-2, TIMP-1 und TIMP-2 sind die vorherrschenden Isoformen in der physiologischen Pleuraflüssigkeit, den Pleuralavagen.
- MMP-1 und MMP-9 fehlen in den Pleuralavagen vollständig, bzw. sind mit den angewandten Methoden nicht nachweisbar.
- MMP-9 ist die Isoform, deren Expression in den Pleuraergüssen die breiteste Streuung aufweist. Der Gehalt an MMP-9 ist in parapneumonischen Exsudaten jeweils im Vergleich zu Transsudaten oder paraneoplastischen Exsudaten signifikant erhöht.
- MMP-1 ist für die absoluten Werte in parapneumonischen Exsudaten, verglichen mit Transsudaten, signifikant erhöht. Dieser Unterschied hebt sich nach Proteinkorrektur auf.

5.7 Beurteilung

Unter Berücksichtigung der Physiologie des Pleuraraumes gilt bei einem transsudativen Pleuraerguss die Intaktheit der Mesothelschicht und somit der funktionellen Proteinschranke zwischen Kapillar- und Pleuraraum. Bisher wurden die Eigenschaften von Transsudaten stellvertretend für den physiologischen Zustand betrachtet.

In den vorliegenden Analysen finden sich Übereinstimmungen zwischen Transsudaten (aber auch Pleuraergüssen allgemein) und Pleuralavagen. Wobei Pleuralavagen stellvertretend für unversehrte Pleuraflüssigkeit analysiert wurden. MMP-2, TIMP-1 und TIMP-2 sind konstant und in hohen Konzentrationen vorhanden (s. 4.2). Zudem sind diese alleinig in den Pleuralavagen nachzuweisen. Dies spricht für eine konstitutive Expression dieser Isoformen und deutet auf ihre spezielle Bedeutung für die Homöostase des Pleuraraumes hin (MARSHALL et al. 1993, EICKELBERG et al. 1997, LÖRX et al. 1998).

Bei der Analyse von Pleuraergüssen und Pleuralavagen zeigen sich auch Unterschiede in der Verteilung von MMP- und TIMP-Isoformen: TIMP-2 ist im Vergleich zu TIMP-1 in deutlich geringerer Menge in Pleuraergüssen vorhanden. In Pleuralavagen ist die Menge bezogen auf den Proteingehalt um das ca. 15-fache höher als bei Pleuraergüssen. Da TIMP-2 ein Enzym-Inhibitor-Komplex im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 mit MMP-2 eingeht, müsste somit im physiologischen Zustand ein Großteil von MMP-2 ungebunden vorliegen. Zusätzlich nimmt die Menge von TIMP-2 anhand der proteinkorrigierten Werte von Pleuralavagen hin zu den Pleuraergüssen signifikant ab, so als würde die Menge an TIMP-2 in pathologischen Situationen reduziert, verbraucht werden. Eine Betrachtung der molaren Verhältnisse von MMP- und TIMP-Isoformen zeigt unabhängig von absoluten oder

proteinkorrigierten Werten ein Überwiegen der Inhibitoren, der Antiproteolyse. Folglich scheint das Zusammenspiel von TIMP-1, TIMP-2 und des relativen MMP-2-Überschusses notwendig für den Erhalt von Gewebemöostase und Integrität des Pleuraspalts.

Interessanterweise haben BORDEN und HELLER (1997) anhand von Analysen zur Genexpression TIMP-2 und MMP-2 als konstitutive und MMP-9 und TIMP-1 als induzierbare Enzyme eingestuft. Bezüglich TIMP-1 lässt sich diese Aussage anhand der vorliegenden Daten jedoch nicht bestätigen.

In zukünftigen Analysen wäre der direkte Nachweis, ob TIMP-2 der bevorzugte Bindungspartner von MMP-2 ist, oder ob TIMP-1 aufgrund der deutlicheren Expression eine größere Bedeutung in der Komplexbildung und Kontrolle der proteolytischen Aktivität zukommt, wünschenswert. Welche Rolle TIMP-1 im Pleuraraum einnimmt, ob mehr die MMP-inhibitorischen oder andere, und ob hierzu verschiedene biologische Funktionen im Vordergrund stehen, wäre für weitergehende Studien interessant. Die Analyse mittels Koimmunopräzipitation des Inhibitor-Enzym-Komplexes könnte hier weitere Aussagen ermöglichen und zusätzlich für die Quantifizierung der proteolytischen Aktivität hilfreich sein.

Interessanterweise finden sich in den vorliegenden Ergebnissen deutliche Unterschiede zwischen Pleuralavagen und transsudativen Ergüssen. So sind MMP-1 und MMP-9 nur in transsudativen Ergüssen vorhanden, nicht aber in Pleuralavagen. Dies steht im Widerspruch zu der allgemein anerkannten Meinung, dass innerhalb von transsudativen Ergüssen noch keine Alteration des Pleuraraumes stattgefunden habe, folglich wären hier ähnliche Ergebnisse zu erwarten gewesen. Die Annahme, dass Transsudate stellvertretend für die physiologische Pleuraflüssigkeit analysiert werden können, ist anhand vorliegender Daten in Frage zu stellen, beziehungsweise unter Vorbehalt zu betrachten.

MMP-9 ist die Isoformen, welche in exsudativen Pleuraergüssen die stärkste Variation gemäß der Genese des Ergusses aufweisen. MMP-1 und MMP-9 sind nur in pathologischen Situationen, welche mit Zerstörung der Mesothelzellen und Aufhebung der Schrankenfunktion einhergehen, im Pleuraraum zu finden. Sie stellen somit die induzierten Isoformen dar. Der stärkste Stimulus wären nach vorliegenden Daten parainfektiose Prozesse. EICKELBERG et al. (1997) kamen abweichend zu dem Schluss, dass maligne Ergüsse die MMP-9-Expression, stärker noch als parainfektiose Prozesse, stimuliert. Dies muss kein direkter Widerspruch sein, da die Aussagen von EICKELBERG et al. (1997) auf semiquantitative Daten (Zymographie und Western Blot) beruhen. MMP-9 wird hauptsächlich von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen sezerniert. Eine Korrelation mit der Zellzahl wäre somit zusätzlich aufschlussreich.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Matrix-Metalloproteasen (MMP) und deren Inhibitoren, die Tissue Inhibitors of Metalloproteases (TIMP) spielen eine grundlegende Rolle in der Zusammensetzung der Extrazellulären Matrix (EZM). In physiologischen und pathologischen Situationen ist die Kontrolle des Gleichgewichtes zwischen proteolytischer Aktivität (MMP) und antiproteolytischer Aktivität (TIMP) von eminenter Wichtigkeit. So beobachtet man bei degradativen Prozessen oft ein Überwiegen der proteolytischen Aktivität, wohingegen es bei fibrotischen Prozessen oft zu einem Überschuss der antiproteolytischen Aktivität kommt.

Der Pleuraraum ist eng begrenzt durch Pleura parietalis und Pleura visceralis. Im physiologischen Zustand ermöglicht die leichte Verschieblichkeit der Pleurablätter gegeneinander die Atemmechanik, so dass der Zusammensetzung der EZM des Pleuraraumes eine entscheidende Rolle zuteil wird. Entzündliche Prozesse der Pleura können als Folge Verschwartungen und Verklebungen und somit restriktive Ventilationsstörungen der Lunge nach sich ziehen. Da diese erfreulicherweise selten entstehen, weist dies auf eine hohe Heilungstendenz und somit hohe Expression von Proteasen hin. Folglich ist die genaue Betrachtung des Proteasen-Antiproteasen-Verhältnisses im Pleuraraum von grundlegender Bedeutung für eine Aussage über die enzymatische Aktivität der MMP.

In dieser Arbeit wurden 96 Pleuraergüsse unterschiedlicher Genese auf die Anwesenheit von MMP und TIMP untersucht, dieses Profil wurde verglichen mit 10 Pleuralavagen, welche eine normale Kontrollgruppe darstellen. Der Nachweis der gelatinolytischen Aktivität von MMP-2 und MMP-9 erfolgte mittels Gelatinzymographie. Darüber hinaus wurden die Konzentrationen von MMP-1, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 und TIMP-2 mittels ELISA-Technik („enzyme-linked immuno sorbent assay“) bestimmt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass MMP-2, TIMP-1 und TIMP-2 in hohen Konzentrationen im Pleuraraum vorhanden sind, wobei eine deutliche Dominanz von MMP-2 und TIMP-1 ersichtlich ist. MMP-2, TIMP-1 und TIMP-2 waren in allen Proben (Pleuraergüssen, Transsudaten und Pleuralavagen) nachweisbar. MMP-1 und MMP-9 hingegen konnten nicht in Pleuralavagen nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den Pleuralavagen liegt also bereits bei Transsudaten eine Veränderung vor, die mit einer Induktion der Expression von MMP-1 und MMP-9 einhergeht. Der oft genomene Vergleich von Transsudaten mit physiologischer Pleuraflüssigkeit ist somit zurückhaltend zu gebrauchen.

Darüber hinaus ist der MMP-9 Gehalt in parapneumonischen Exsudaten signifikant erhöht, verglichen mit Transsudaten oder paraneoplastischen Exsudaten. Somit würde eine von Transsudaten über paraneoplastische Exsudaten bis hin zu parapneumonische Exsudaten zunehmende Expression von MMP-9 für eine zunehmende Zerstörung der funktionellen Proteinschranke zwischen Kapillar- und

Pleuraraum sprechen. Pathologische Veränderungen im Pleuraspalt spiegeln sich somit am Vorkommen der MMP-1 und MMP-9-Isoformen wider. Mittels Gelatinzymographie waren in allen Pleuraergüssen die aktivierte Form von MMP-2 und MMP-9 als Doppelbande nachweisbar. Auffällig war das Fehlen der Doppelbande, der aktivierten Form, in allen Pleuralavagen.

Weiterhin konnten wir eine signifikante Abnahme des TIMP-2 Gehaltes in allen pathologischen Proben beobachten (Transsudate und Exsudate), verglichen mit den Pleuralavagen. Ob es sich bei der Reduktion um einen Verbrauch der Antiprotease handelt, kann nur spekuliert werden. Ergibt die nähere Betrachtung von MMP-2 mit ihrem korrespondierendem Inhibitor, TIMP-2, ein Überwiegen der proteolytischen Seite, so zeigt interessanterweise die Analyse von MMP-1, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 und TIMP-2 ein Überwiegen der antiproteolytischen Seite an.

Anhand der Messungen der MMP- und TIMP-Isoformen in Pleuraergüssen und Pleuralavagen ließen sich MMP-2, TIMP-1 und TIMP-2 als konstitutive Isoformen einteilen, wohingegen MMP-1 und MMP-9 als induzierte Isoformen gelten dürften. Eine Analyse von MMP- und TIMP-Isoformen ist daher hilfreich bei der Unterscheidung zwischen Transsudat und Exsudat, aber als alleinige Parameter sind diese nicht ausreichend. Die signifikanten Unterschiede einzelner MMP- und TIMP-Isoformen geben interessante Auskünfte über die Pathophysiologie der Pleuraergüsse und –transsudate. In zukünftigen Studien wäre es daher von hohem Interesse, ob eine induzierte Verschiebung des MMP/TIMP Gleichgewichtes in der Pleura mit einer Ergussentwicklung einhergeht.

7 SUMMARY

The matrix metalloproteases (MMP) and their endogenous inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteases (TIMP), are key enzymes controlling the turnover of the extracellular matrix (ECM). A balanced control of proteolytic and antiproteolytic activities by MMP and TIMP, respectively, is of ultimate importance for homeostasis of the ECM. In the lung, dysregulated MMP/TIMP activity has been shown to contribute to many pathophysiological situations: Increased proteolytic activity is frequently associated with degradative processes (COPD), whereas increased antiproteolytic activity has often been associated with fibrotic processes (lung fibrosis, asthma).

The pleural space is confined by the visceral and the parietal pleural. Under physiological conditions, a small amount of pleural fluid between these two pleural layers facilitates the movement of the lungs against the thorax, and as such, enables breathing. The distinctive composition of the pleural fluid, especially with regard to the expression of proteolytic and antiproteolytic enzymes is therefore of fundamental interest, as inflammation within the pleural space can lead to restrictive ventilation due to interpleural adhesions or pleural fibrosis. To make any conclusions about the enzymatic activity of

MMPs in the pleural space, an accurate and quantitative analysis of the protease-antiprotease-balance within pleural liquid and effusions are thus required.

In the current study, we investigated the expression of MMPs and TIMPs in 96 pleural effusions of different origins by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs), which quantitate the concentrations of MMP-1, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2. The MMP- and TIMP-profile from pleural effusions was then compared to 10 pleural lavages, which represents the healthy control group. In addition to ELISAs, the gelatinolytic activity of MMP-2 and MMP-9 was also examined by gelatin-zymography.

In all samples analyzed (pleural effusions, transudates, and pleural lavages), MMP-2, TIMP-1, and TIMP-2 were detectable at high concentrations, with MMP-2 and TIMP-1 being the dominant isoforms. In contrast, MMP-1 and MMP-9 were expressed in pleural effusions, but could not be detected at all in pleural lavages. Compared to pleural lavages, transudates were already altered with respect to the expression of MMP-1 and MMP-9. Thus, the frequently used designation of transudates as a representative to physiological pleural fluid has to be used carefully.

With respect to MMP expression in pleural effusions of different origin, the concentration of MMP-9 in parapneumonic exudates is significantly increased compared to transudates or paraneoplastic exudates. Thus, an increased expression of MMP-9 in parapneumonic exudates may provide compelling evidence of the enhanced breakdown of the physiological protein barrier between capillary and pleural space. As a consequence, pathologic alterations within the pleural space are likely represented by the detection of MMP-1 and MMP-9. The active forms of MMP-2 and MMP-9 was observed in all pleural effusions as a double band, shown by gelatin zymography. Interestingly, however, no active forms of MMP-2 and MMP-9 were detected in all pleural lavages. With respect to TIMP expression, a significant decrease of TIMP-2 in all pathological samples (transudates and exudates) compared to the pleural lavages was detected.

Our data provide compelling evidence that MMP-2, TIMP-1 and TIMP-2 serve as constitutively expressed isoforms in pleural liquid, the physiological function of which is probably to guarantee homeostasis of pleural liquid. In contrast, MMP-1 and MMP-9 are induced by pathophysiological conditions. The determination of MMP- and TIMP-isoforms may therefore be helpful in differentiating transudates from exudates. The significant differences of the MMP- and TIMP-isoform pattern may explain the pathology represented in pleural effusions and transudates. In further animal studies, it would be interesting to show if an induced shift of the MMP/TIMP balance in the pleural space would be sufficient to produce pleural effusions.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Alvarez OA, Carmichael DF, DeClerck YA (1990): Inhibition of collagenolytic activity and metastasis of tumor cells by a recombinant human tissue inhibitor of metalloproteinases, *J Natl Cancer Inst* 82, 589-595
- Antony VB, Godbey SW, Kunkel SL, Hott JW, Hartman DL, Burdick MD, Strieter RM (1993): Recruitment of inflammatory cells to the pleural space, *J Immunol* 151, 7216-7223
- Antony VB (2002): Drawing the line: differentiating transudates from exudates. *Respiration* 69, 198
- Atkinson JJ, Senior RM (2003): Matrix metalloproteinase-9 in lung remodelling, *Am J Respir Cell Biol* 28, 12-24
- Beeh KM, Beier J, Kornmann O, Buhl R (2003): Sputum matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinases-1, and their molar ratio in patients with chronic obstructive pulmonary disease, idiopathic pulmonary fibrosis and healthy subjects, *Respir Med* 97, 634-639
- Belvisi MG, Bottomley KM (2003): The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a therapeutic role for inhibitors of MMPs?, *Inflamm Res* 52, 95-100
- Berkman N, Kramer MR (1993): Diagnostic tests in pleural effusion- an update, *Postgrad Med J* 69, 12-18
- Bernardo MM, Fridman R (2003): TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinases-2) regulates MMP-2 (matrix metalloproteinases-2) activity in the extracellular environment after pro-MMP-2 activation by MT1 (membrane type 1)-MMP, *Biochem J* 374, 739-745
- Birkedal-Hansen H (1993): Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases, *J Periodontol* 64, Suppl 474-484
- Birkedal-Hansen H (1995): Proteolytic remodeling of extracellular matrix, *Curr Opin Cell Biol* 7, 728-735
- Bitterman PB (1992): Pathogenesis of fibrosis in acute lung injury, *Am J Med* 92, Suppl 6A, 39S-43S
- Bond M, Murphy G, Bennett MR, Newby AC, Baker AH (2002): Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 induces a Fas-associated death domain-dependent type II apoptotic pathway, *J Biol Chem* 277, 13787-13795
- Borden P, Heller RA (1997): Transcriptional control of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 7, 159-178
- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 72, 248-254
- Brinckerhoff CE, Matrisian LM (2002): Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince, *Nature Rev Moll Cell Bio* 3, 207-214
- Burbridge MF, Coge F, Galizzi JP, Boutin JA, West DC, Tucker GC (2002): The role of the matrix metalloproteinases during in vitro vessel formation, *Angiogenesis* 5, 215-226
- Burgess LJ, Maritz FJ, Taljaard JJF (1995): Comparative analysis of the biochemical parameters used to distinguish between pleural transudates and exudates, *Chest* 107, 1604-1609
- Cataldo DD, Bettiol J, Noel A, Bartsch P, Foidart JM, Louis R (2002): Matrix metalloproteinases-9, but not tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1, increases in the sputum from allergic asthmatic patients after allergen challenge, *Chest* 122, 1553-1559

- Ceyhan BB, Demiralp E, Karakurt ZL, Karakurt S, Sungur M (2003): Transforming growth factor beta-1 level in pleural effusion, *Respirology* 8, 321-325
- Chang JC, Wysocki A, Tchou-Wong K-M, Moskowitz N, Zhang Y, Rom WN (1996): Effect of *Mycobacterium tuberculosis* and its components on macrophages and the release of matrix metalloproteinases, *Thorax* 51, 306-311
- Classen M, Diehl V, Kochsiek K: Innere Medizin; hrsg. v. Classen M, Diehl V, Kochsiek K; Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore 1993, 1438
- Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM (2002): Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations, *Science* 295, 2387-2392
- Crouch E (1990): Pathobiology of pulmonary fibrosis, *Am J Physiol* 259, L159-L184
- Davies M, Martin J, Thomas GJ, Lovett DH (1992): Proteinases and glomerular matrix turnover, *Kidney International* 41, 671-678
- Declaux C, d'Ortho MP, Delacourt C, Lebagry F, Brun-Buisson C, Brochard L, Lemaire F, Lafuma C, Harf A (1997): Gelatinases in epithelial lining fluid of patients with adult respiratory distress syndrome, *Am J Physiol* 272, L442-451
- DeClerck YA, Yean T-D, Ratzkin BJ, Lu HS, Langley KE (1989): Purification and characterisation of two related but distinct metalloproteinase inhibitors secreted by bovine aortic endothelial cell, *J Biol Chem* 264, 17445-17453
- DeClerck YA, Yean T-D, Lu HS, Ting J, Langley KE (1991): Inhibition of autoproteolytic activation of interstitial procollagenase by recombinant metalloproteinase inhibitor MI/TIMP-2, *J Biol Chem* 266, 3893-3899
- DeClerck YA, Perez N, Shimada H, Boone TC, Langley KE, Taylor SM (1992): Inhibition of invasion and metastasis in cell transfected with an inhibitor of metalloproteinases, *Cancer Res* 52, 701-708
- Delacourt C, Bourgeois ML, D'Ortho M-P, Doit C, Scheinemann P, Navarro J, Harf A, Hartmann DJ, Lafuma C (1995): Imbalance between 95 kda type IV collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases in sputum of patients with cystic fibrosis, *Am J Respir Crit Care Med* 152, 765-774
- Dunsmore SE, Rannels DE (1996): Extracellular matrix biology in the lung, *Am J Physiol* 270, L3-L27
- Egeblad M, Werb Z (2002): New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression, *Nat Rev Cancer* 2, 161-174
- Eickelberg O, Sommerfeld CO, Wyser C, Tamm M, Reichenberger F, Bardin PG, Solèr M, Roth M, Perruchoud A P (1997): MMP and TIMP expression pattern in pleural effusions of different origins, *Am J Respir Crit Care Med* 156, 1987-1992
- Eickelberg O, Roth M, Perruchoud AP (1998): Matrix Metalloproteasen und deren Inhibitoren in der Pleura, *Pneumologie* 52, 526-530
- Eickelberg O, Köhler E, Reichenberger F, Bertschin S, Woodtli T, Erne P, Perruchoud AP, Roth M (1999): Extracellular matrix deposition by primary human lung fibroblasts in response to TGF-beta1 and TGF-beta3, *Am J Physiol* 276, 814-824
- Ejeil AL, Igondjo-Tchen S, Ghomrasseni S, Pellat B, Godeau G, Gogly B (2003): Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in healthy and diseased human gingiva, *J Periodontol* 74, 188-195

- Fata JE, Leco KJ, Moorehead RA, Khokha R (2000): Cellular turnover and extracellular matrix remodelling in female reproductive tissues: functions of metalloproteinases and their inhibitors, *Cell Mol Life Sci* 57, 77-95
- Finlay GA, Russell KJ, McMahon KJ, D'arcy EM, Masterson JB, FitzGerald MX, O'Connor CM (1997): Elevated levels of matrix metalloproteinases in bronchoalveolar lavage fluid of emphysematous patients, *Thorax* 52, 502-506
- Fridman R, Toth M, Peña D, Mobashery S (1995): Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP-2), *Cancer Res* 55, 2548-2555
- Fujimoto N, Ward RV, Shinya T, Iwata K, Yamashita K, Hayakawa T (1996): Interaction between tissue inhibitor of metalloproteinases-2 and progelatinase A: immunoreactivity analysis, *Biochem J* 313, 827-833
- Garbisa S, Ballin M, Daga-Gordini D, Fastelli G, Naturale M, Negro A, Semenzato g, Liotta LA (1986): Transient expression of type IV collagenolytic metalloproteinase by human mononuclear phagocytes, *J Biol Chem* 261, 2369-2375
- Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP (1997): Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions, *EJCB* 74, 111-122
- Granelli-Piperno A, Reich E (1978): A study of proteases and protease-inhibitor complexes in biological fluids, *J Exp Med* 148, 223-234
- 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, 30375-30380
- Gross J, Lapièr CM (1962): Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay, *Proc Natl Acad Sci USA* 48, 1014-1022
- Hamm H, Light RW (1997): The pleura: the outer space of pulmonary medicine, *Eur Respir J* 10, 2-3
- Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, Uchijima E, Iwata K (1992): Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum, *FEBS Lett* 298, 29-32
- Hayakawa T, Yamashita K, Ohuchi E, Shinagawa A (1994): Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2), *J Cell Sci* 107, 2373-2379
- Hayashi T, Stetler-Stevenson WG, Fleming MV, Fishback N, Koss MN, Liotta LA, Ferrans VJ, Travis WD (1996): Immunohistochemical study of metalloproteinases and their tissue inhibitors in the lung of patients with diffuse alveolar damage and idiopathic pulmonary fibrosis, *Am J Pathol* 149, 1241-1256
- Herrler A, von Rango U, Beier HM (2003): Embryo-maternal signalling: how the embryo starts talking to its mother to accomplish implantation, *Reprod Biomed Online* 6, 244-256
- Heussen C, Dowdle EB (1980): Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates, *Anal Biochem* 102, 196-202
- Hirose T, Reife RA, Smith GN, Stevens RM, Mainardi CL, Hasty KA (1992): Characterization of type V collagenase (gelatinase) in synovial fluid of patients with inflammatory arthritis, *J Rheumatol* 19, 593-599
- Howard EW, Bullen EC, Banda MJ (1991): Regulation of the autoactivation of human 72-kDa progelatinase by tissue inhibitor of metalloproteinases-2, *J Biol Chem* 266, 13064-13069

- Howard EW, Bullen EC, Banda MJ (1991): Preferential inhibition of 72 and 92-kDa gelatinases by tissue inhibitor of metalloproteinases-2, *J Biol Chem* 266, 13070-13075
- Hurewitz AN, Zucker S, Manusco P, Wu CL, Dimassimo B, Lysik RM, Moutsiakis D (1992): Human pleural effusions are rich in Matrix Metalloproteinases, *Chest* 102, 1808-1814
- Hurewitz AN, Wu CL, Mancuso P, Zucker S (1993): Tetracycline and Doxycycline inhibit pleural fluid metalloproteinases, *Chest* 103, 1113-1117
- Idell S, Girard W, Koenig KB, McLarty J, Fair DS (1991): Abnormalities of pathways of fibrin turnover in the human pleural space, *Am Rev Respir Dis* 144, 187-194
- Ikeda U, Shimada K (2003): Matrix metalloproteinases and coronary artery diseases, *Clin Cardiol* 26, 55-59
- Ishiguro N, Ito T, Obata K-I, Fujimoto N, Iwata H (1996): Determination of stromelysin-1, 72 and 92 kDa type collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1), and TIMP-2 in synovial fluid and serum from patients with rheumatoid arthritis, *J Rheumatol* 23, 1599-1604
- Itho Y, Nagase H (1995): Preferential inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 that is bound to the precursor of matrix metalloproteinase 9 (progelatinase B) by human neutrophil elastase, *J Biol Chem* 270, 16518-16521
- Johnson MD, Kim H-RC, Chesler L, Tsao-Wu G, Bouck N, Polverini P (1994): Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinases, *J Cell Physiol* 160, 194-202
- Jung K, Nowak L, Lein M, Priem F, Schnorr D, Loening SA (1997): Matrix metalloproteinases 1 and 3, tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 and the complex of metalloproteinases-1/ tissue inhibitor in plasma of patients with prostate cancer, *Int J Cancer* 74, 220-226
- Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG (1993): Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases, *Anal Biochem* 218, 325-329
- Knox JB, Sukhova GK, Whittemore AD, Libby P (1997): Evidence for altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in human aortic diseases, *Circulation* 95, 205-212
- Kossakowska A E, Hinek A, Edwards DR, Lim M S, Zhang C-L, Breitman DR, Prusinkiewicz C, Stabber AL, Urbanski L S, Urbanski SJ (1998): Proteolytic activity of human non-Hodgkin's lymphomas, *Am J Pathol* 152, 565-576
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685
- Langton KP, Barker MD, McKie N (1998): Localization of the functional domains of human tissue inhibitor of metalloproteinases-3 and the effects of a Sorsby's fundus dystrophy mutation, *J Biol Chem* 275, 27027-27031
- Laurent GJ (1987): Dynamic state of collagen: pathways of collagen degradation in vivo and their possible role in regulation of collagen mass, *Am J Physiol* 252, C1-C9
- 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, 9352-9360
- Li Z, Li L, Zielke R, Cheng L, Xiao R, Crow MT, Stetler-Stevenson WG, Froehlich J, Lakatta EG (1996): Increased expression of 72-kd type IV collagenase (MMP-2) in human aortic atherosclerotic lesions, *Am J Pathol* 148, 121-128

- Light RW, Macgregor MI, Luchsinger PC, Ball WC (1972): Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates, *Ann Intern Med* 77, 507-513
- Light RW: Pleural diseases. 3 rd ed.; hrsg. v. Relford DC, Millet KC (eds); Williams & Wilkins, Baltimore 1995, 7-15, 83-91, 208-216, 219-222, 224-238
- Light R W (1997): Diagnostic principles in pleural disease, *Eur Respir J* 10, 476-481
- Liotta LA, Stegg PS, Stetler-Stevenson WG (1991): Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negativ regulation, *Cell* 64, 327-336
- Lohi J, Wilson CL, Roby JD, Parks WC (2001): Epilysin, a novel human matrix metalloproteinases (MMP-28) expressed in testis and kerartinocytes and in response to injury, *J Biol Chem* 276, 10134-10144
- Lörx R, Eickelberg O, Reichenberger F, Wyser C, Tamm M, Roth M, Solér M, Perruchoud AP (1998): Quantitative Analyse von Matrix Metalloproteasen und deren Inhibitoren, TIMP, in Pleuraergüssen, *Pneumologie* 52, S 76
- Lörx R, Eickelberg O, Tamm M, Bihl M, Roth M, Habicht J, Ulmer E, Wyser C, Solér M, Perruchoud AP (1998): Vascular endothelial growth factor (VEGF) is highly expressed in pleural effusions, *Eur Respir J* 12, Suppl 28, 422s
- Lund LR, Romer J, Bugge TH, Nielsen BS, Frandsen TL (1999): Funktional overlap between two classes of matrix-degrading proteases in wound healing, *EMBO J* 18, 4645-4656
- Lynch CC, Matrisian LM (2002): Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication, *Differentiation* 70, 561-573
- Lyons JG, Birkedal-Hansen B, Moore WGI, O'Grady RL, Birkedal-Hansen H (1991): Characteristics of a 95-kDa matrix metalloproteinases produced by mammary carcinoma cells, *Biochemistry* 30, 1449-1456
- Macaulay VM, O'Byrne KJ, Saunders MP, Braybrooke JP, Long L, Gleeson F, Mason CS, Harris AL, Brown P, Talbot DC (1999): Phase I study of intrapleural batismastat (BB-94), a matrix metalloproteinases inhibitor, in the treatment of malignant pleural effusions, *Clin Cancer Res* 5, 513-520
- Marshall BC, Santana A, Xu Q-P, Petersen MJ, Campbell EJ, Hoidal JR, Welgus HG (1993): Metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in mesothelial cells, *J Clin Invest* 91, 1792-1799
- Martignetti JA, Al Aqeel A, Al Sewaire W, Boumah CE, Kambouris M (2001): Matrix metalloproteinase 2 gene (MMP-2) mutations cause a multicentric osteolysis and arthritis syndrom, *Nat Genet* 28, 261-265
- Massowa I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S (1998): Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification, *FASEB J* 12, 1075-1095
- Matrisian LM (1990): Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling, *Trends Genet* 6, 121-125
- Matrisian LM (1992): The matrix degrading metalloproteinases, *BioEssays* 14, 455-463
- Mignatti P, Rifkin DB (1993): Biology and biochemistry of proteases in tumor invasion, *Physiol Rev* 73, 161-195
- Minoo P, Penn R, deLemos DM, Coalson JJ, deLemos R (1993): Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 mRNA is specifically induced in lung tissue after birth, *Pediatr Res* 34, 729-734

- Miserocchi G (1997): Physiology and pathophysiology of pleural fluid turnover, *Eur Respir J* 10, 219-225
- Mohan R, Chintala SK, Jung JC, Villar WV, McCabe F, Russo LA, Lee Y, McCarthy BE, Wollenberg KR, Jester JV, Wang M, Welgus HG, Shipley JM, Senior RM, Fini ME (2002): Matrix metalloproteinase B (MMP-9) coordinates and effects epithelial regeneration, *J Biol Chem* 277, 2065-2072
- Montgomery A MP, Mueller BM, Reisfeld RA, Taylor SM, DeClerck YA (1994): Effect of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-2 expression on the growth and spontaneous metastasis of human melanoma cell line, *Cancer Res* 54, 5467-5473
- Müller W: Ultraschall-Diagnostik; in: Pleura-Erkrankungen; hrsg. V. Rühle KH; Verlag W Kohlhammer, Stuttgart, Berlin, Köln 1997, 31-44
- Mulligan MS, Desrochers PE, Chinnaiyan AM, Gibbs DF, Varani J, Johnson KJ, Weiss SJ (1993): In vivo suppression of immune complex-induced alveolitis by secretory leukoproteinase inhibitor and tissue inhibitor of metalloproteinases 2, *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 11523-11527
- Murphy G, Docherty AJP (1992): The matrix metalloproteinases and their inhibitors, *Am J Respir Cell Mol Biol* 7, 120-125
- Murphy G, Hembry RM (1992): Proteinases in rheumatic arthritis, *J Rheumatol* 19, 61-64
- Murphy G, Willenbrock F, Crabbe T, O'Shea M, Ward R, Atkinson S, O'Connell J, Docherty A: Regulation of matrix metalloproteinase activity; in: Inhibition of matrix metalloproteinases: therapeutic potential; hrsg. v. Greenwald RA, Golub LM (eds.); *Ann NY Acad Sci* 732, New York 1994, 31-41
- Nagase H, Okada Y: Proteinases and matrix degradation, in: textbook of rheumatology; Kelly WN, Harris EDJr, Ruddy S, Sledge CB (eds.), Philadelphia, PA: Saunders 1997, 323-341
- Nawrocki B, Polette M, Marchand V, Monteau M, Gillery P, Tournier J-M, Birembaut P (1997): Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human bronchopulmonary carcinomas: quantitative and morphological analyses, *Int J Cancer* 72, 556-564
- Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM (2000): Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications, *J Clin Oncol* 18, 1135-1149
- O'Connor CM, FitzGerald MX (1994): Matrix metalloproteinases and lung disease, *Thorax* 49, 602-609
- Ogata Y, Enghild JJ, Nagase H (1992): Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9, *J Biol Chem* 267, 3581-3584
- Ohbayashi H (2002) Matrix metalloproteinases in lung diseases, *Curr Protein Pept Sci* 3, 409-421
- Onisto M, Garbisa S, Caenazzo C, Freda MP, Di Francesco C, Nitti D, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG (1993): Reverse transcription-polymerase chain reaction phenotyping of metalloproteinases and inhibitors involved in tumor matrix invasion, *Diagn Mol Pathol* 2, 74-80
- Opendakker G, Nelissen I, Van Damme J (2003): Functional role and therapeutic targeting of gelatinase B and chemokines in multiple sclerosis, *Lancet Neurol* 2, 747-756
- Otha S, Imai K, Yamashita K, Matsumoto T, Azumano I, Okada Y (1998): Expression of matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) in human osteoarthritic cartilage, *Lab Invest* 78, 79-87
- Overall CM, Lopez-Otin C (2002): Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era, *Nat Rev Cancer* 2, 657-672

- Park JS, Kim YS, Jee YK, Myong NH, Lee Ky (2003): Interleukin-8 production in tuberculous pleurisy: a role of mesothelial cells stimulated by cytokine network involving tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta, *Scan J Immunol* 57, 463-469
- Pavloff N, Staskus PW, Kishnani NS, Hawkes SP (1992): A new inhibitor of metalloproteinases from chicken: ChIMP-3, *J Biol Chem* 267, 17321-17326
- Peters CA, Freeman MR, Fernandez CA, Shepard J, Wiederschain DG, Moses M (1997): Dysregulated proteolytic balance as the basis of excess extracellular matrix in fibrotic disease, *Am J Physiol* 272, R1960-R1965
- Philip-Joët F, Alessi M-C, Philip-Joët C, Aillaud M, Barriere J-R, Arnaud A, Juhan-Vague I (1995): Fibrinolytic and inflammatory processes in pleural effusions, *Eur Respir J* 8, 1352-1356
- Quesada AR, Barbacid M M, Mira E, Fernández-Resa, Marquez G, Aracil M (1997): Evaluation of fluorometric and zymographic methods as activity assays for stromelysins and gelatinases, *Clin Exp Metastasis* 15, 26-32
- Ray JM, Stetler-Stevenson WG (1994): The role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumor invasion, metastasis and angiogenesis, *Eur Respir J* 7, 2062-2072
- Reichenberger F, Eickelberg O, Wyser C, Perruchoud AP, Roth M, Tamm M (2001): Distinct endobronchial expression of matrix-metalloproteinases (MMP) and their endogenous inhibitors in lung cancer, *Swiss Med Wkly* 131, 273-279
- Ricou B, Nicod L, Lacraz S, Welgus H G, Suter PM, Dayer J-M (1996): Matrix metalloproteinases and TIMP in acute respiratory distress syndrome, *Am J Respir Crit Care Med* 154, 346-352
- Ruiz V, Ordonez RM, Berumen J, Ramirez R, Uhal B, Becerril C, Pardo A, Selman M (2003): Unbalanced collagenases/TIMP-1 expression and epithelial apoptosis in experimental lung fibrosis, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285, L1026-1036
- Sahn SA (1988): The pleura, *Am Rev Respir Dis* 138, 184-234
- Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M (1994): A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells, *Nature* 370, 61-65
- Seeger W: Erkrankungen der Pleura; in: *Innere Medizin*; hrsg. v. Zöllner N, Gresser U, Hehlmann R; Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1991, 116-119
- 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, 171-180
- Sepper R, Konttinen YT, Sorsa T, Koski H (1994): Gelatinolytic and type IV collagenolytic activity in bronchiectasis, *Chest* 106, 1129-1133
- Sepper R, Konttinen YT, Ding Y, Takagi M, Sorsa T (1995): Human neutrophil collagenase (MMP-8), identified in bronchiectasis BAL fluid correlates with severity of disease, *Chest* 107, 1641-1647
- Sispos EP, Tamargo RJ, Weingart JD, Brem H: Inhibition of tumor angiogenesis; in: *Inhibition of matrix metalloproteinases: therapeutic potential*; hrsg. v. Greenwald RA, Golub LM (eds.); *Ann NY Acad Sci* 732, New York 1994, 263-272
- Sorsa T, Ding Y, Salo T, Lauhio A, Teronen O, Ingman T, Ohtani H, Andoh N, Takeha S, Konttinen YT: Effects of tetracyclines on neutrophil, gingival, and salivary collagenases; in: *Inhibition of matrix metalloproteinases: therapeutic potential*; hrsg. v. Greenwald RA, Golub LM (eds.); *Ann NY Acad Sci* 732, New York 1994, 112-131

- Spector T (1978): Refinement of the coomassie blue method of protein quantitation, *Anal Biochem* 86, 142-146
- Springman EB, Angelton EL, Birkedal-Hansen H, Van Wart HE (1990): Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys⁷³ active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation, *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 364-368
- Sreenath T, Matrisian LM, Stetler-Stevenson W, Gattoni-Celli S, Pozzatti RO (1992): Expression of matrix metalloproteinase gene in transformed rat cell lines of high and low metastatic potential, *Cancer Res* 52, 4942-4947
- Sternlicht MD, Werb Z (2001): How matrix metalloproteinases regulate cell behavior, *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 463-516
- Stetler-Stevenson W G, Liotta LA, Kleiner DE (1993): Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis, *FASEB J* 7, 1434-1441
- Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI (1995): Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase, *J Biol Chem* 270, 5331-5338
- Stryer L: *Biochemie*; hrsg. v. Stryer L; Spektrum Akad.-Verlag, Heidelberg, Berlin, New York 1991, 272-291
- Susskind H, Hymowitz MH, Lau YH, Atkins HL, Hurewitz AN, Valentine ES, Meek AG, Zucker S (2003): Increased plasma levels of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in lung and breast cancer are altered during chest radiotherapy, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 56, 1161-1169
- Tetley TD (1993): Protein imbalance: its role in lung disease, *Thorax* 48, 560-565
- Tetley TD (1997): Matrix metalloproteinases: a role in emphysema?, *Thorax* 52, 495
- Valente P, Fassina G, Melchiorri A, Masiello L, Cilli M, Vacca A, Onisto M, Santi L, Stetler-Stevenson WG, Albini A (1998): TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis, *Int J Cancer* 75, 246-253
- Vallon R, Müller R, Moosmayer D, Gerlach E, Angel P (1997): The catalytic domain of activated collagenase I (MMP-1) is absolutely required for interaction with its specific inhibitor; tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1), *Eur J Biochem* 244, 81-88
- Van de Louw A, Jean D, Frisdal E, Cerf C, d'Ortho MP, Baker AH, Lafuma C, Duvaldestin P, Harf A, Delclaux C (2002): Neutrophil proteinases in hydrochloric acid- and endotoxin-induced acute lung injury: evaluation of interstitial protease activity by in situ zymography, *Lab Invest* 82, 133-145
- Van Wart HE, Birkedal-Hansen H (1990): The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family, *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 5578-5582
- Vieillard-Baron A, Frisdal E, Eddahibi S, Deprez I, Baker AH, Newby AC, Berger P, Levame M, Raffestin B, Adnot S, d'Ortho MP (2000): Inhibition of matrix metalloproteinases by lung TIMP-1 gene transfer or doxycycline aggravates pulmonary hypertension in rats, *Circ Res* 87, 418-425
- Vieillard-Baron A, Frisdal E, Raffestin B, Baker AH, Eddahibi S, Adnot S, D'Ortho MP (2003): Inhibition of matrix metalloproteinases by lung TIMP-1 gene transfer limits monocrotaline-induced pulmonary vascular remodeling in rats, *Hum Gene Ther* 14, 861-869
- Vignola AM, Riccobono L, Mirabella A, Profita M, Chanez J, Bellia V, Mautino G, D'Accardi P, Bousquet J, Bonsignore G (1998): Sputum metalloproteinases-9/ tissue inhibitor of metalloproteinases-1 ratio

- correlates with airflow obstruction in asthma and chronic bronchitis, *Am J Resp Crit Care Med* 158, 1945-1950
- Visse R, Nagase H (2003): Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases, *Circ Res* 92, 827-839
- Werb Z, Chin JR (1998): Extracellular matrix remodelling during morphogenesis, *Ann N Y Acad Sci* 857, 110-118
- Will H, Atkinson SJ, Butler GS, Smith B, Murphy G (1996): The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autolytic activation, *J Biol Chem* 271, 17119-17123
- Winkler MK, Foldes JK, Bunn RC, Fowlkes JL (2003): Implications for matrix metalloproteinases as modulators of pediatric lung disease, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284, L557-565
- Woessner JF (1989): Connective tissue breakdown in ovulation, *Steroids* 54, 491-499
- Woessner JF (1991): Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodelling, *FASEB J* 5, 2145-2154
- Woessner JF: The family of matrix metalloproteinases; in: Inhibition of matrix metalloproteinases: therapeutic potential; hrsg. v. Greenwald RA, Golub LM (eds.); *Ann NY Acad Sci* 732, New York 1994, 11-21
- Woessner JF (1999): Matrix metalloproteinases inhibition, from the Jurassic to the third millennium, *Ann N Y Acad Sci* 878, 388-403
- Wojtowicz-Praga SM, Dickson RB, Hawkins MJ (1997): Matrix metalloproteinase inhibitor, *Invest New Drugs* 15, 61-75
- Wright DG, Gallin JI (1979): Secretory responses of human neutrophils: exocytosis of specific (secondary) granules by human neutrophils during adherence in vitro and during exudation in vivo, *J Immunol* 123, 285-294

9 DANKSAGUNG

Sehr herzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Oliver Eickelberg für die Vergabe des Themas, die Bereitstellung der Materialien und des Arbeitsplatzes, die exzellente Betreuung und ausgezeichnete Hilfe während der gesamten Arbeit, insbesondere für die konstruktive Diskussion der Ergebnisse, sowie die hervorragende Unterstützung und dem beständigen Interesse an einem wissenschaftlichen Gedankenaustausch bedanken. Sein nachhaltiges Interesse hat wesentlich zur Vollendung dieser Arbeit beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. Werner Seeger für die Förderung und freundliche Unterstützung, welche Grundvoraussetzung für das Entstehen dieser Arbeit waren.

Herrn Prof. Dr. med. A. P. Perruchoud, Abteilung Pulmologie des Universitätsklinikums Basel, Schweiz, danke ich sehr für die Überlassung der Materialien und des Arbeitsplatzes und die sehr freundliche und interessierte Unterstützung in vielfältiger Weise.

Vielen Dank auch an Dr. med. Christiane Eickelberg, die mir mit besonderem Verständnis auf ganz persönliche Art und Weise geholfen hat, die wesentlichen Dinge nicht aus den Augen zu verlieren. Einen Dank an die Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen des Labors von Dr. med. Oliver Eickelberg für die gute Unterstützung und die abwechslungsreichen Stunden im Labor.

Dem Hochschulrechenzentrum, insbesondere Herrn Wolfgang Pabst, gilt mein Dank für die geduldige Hilfe bei der statistischen Auswertung der vorliegenden Arbeit.

Danken möchte ich auch besonders Priv.-Doz. Dr. phil. nat. Michael Roth und Dr. phil. nat. Michel Bihl aus dem Forschungslabor der Abteilung Pulmologie des Universitätsklinikums Basel, Schweiz, für die allzeit unermüdliche Bereitschaft zur Hilfe, die zahlreichen Aufmunterungen und die vielen Tipps und Ideen, ohne die ich nicht so weit gekommen wäre.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern des Zentrum für Lehre und Forschung des Universitätsklinikums Basel, welche mich sowohl fachlich als auch persönlich auf sehr warme und menschliche Art und Weise unterstützten.

Einen ganz großen Dank möchte ich Vic Bruce aussprechen, die es verstand, mit ihrer Energie und ihrem fachlichem Enthusiasmus immer wieder überraschende Verbindungen zu knüpfen.

Einen besonderen Dank an Silke Banehr für ihre Geduld und ihren germanistischen Sachverstand bei der Korrektur.

Danke an Henri für seine unschätzbar herzliche und zugewandte Art.

Einen besonderen Dank an meine Eltern, die mich in jeder Hinsicht unterstützt haben.

Danke Tina, für Alles.

10 LEBENS LAUF

Name Rainer Lörx
Geburtsdatum 05.07.1969
Geburtsort Berlin-Charlottenburg

Allgemeine Hochschulreife

1988 Gymnasium Himmelsthür, Hildesheim

Hochschulstudium

1989-1996 Georg-August-Universität, zu Göttingen, Studiengang
Humanmedizin

Praktisches Jahr

1996- 1997 -Innere Medizin und Chirurgie im Lehrkrankenhaus der
Universität Göttingen, Alfeld / Leine
-Psychosomatik im Landeskrankenhaus Tiefenbrunn bei Göttingen
Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung 1997

Wissenschaftlicher Angestellter

1997- 1998 Forschungslabor der Abteilung Pulmologie, Universitätsklinikum
Basel, Schweiz, Prof. Dr. med. A. P. Perruchoud

Arzt im Praktikum

1999-2000 Innere Medizin, Krankenhaus Großhansdorf, Hamburg,
Zentrum für Pneumologie und Thoraxchirurgie, Prof. Dr. med. H. Magnussen

Assistenzarzt

2000- 2003 Inneren Medizin- Pneumologie, Zentralklinik Emil von Behring,
Department Lungenklinik Heckeshorn, Abteilung Pneumologie II, Berlin,
Prof. Dr. med. R. Loddenkemper
seit 2004 Innere Medizin- Gastroenterologie, Krankenhaus Grossburgwedel,
Region Hannover, Abteilung Medizinische Klinik
Dr. med. Chr. Merseburger-Schönborn

Promotionsstipendium

2003- 2004 Medizinische Klinik und Poliklinik II, Universitätsklinikum Giessen,
Labor Dr. med. O. Eickelberg,
Prof. Dr. med. W. Seeger

11 Patientendaten- Pleuraergüsse

E.-Nr.	Nr.	Pat.	DGG	Geb. Dat.	Punkt. Dat.	Alter	Diagnose	Maligne Zellen	Prot.-S. (g/l)	Prot.-E. (g/l)	Quot. Prot.	LDH-E. (U/l)
17	1	L.H.	T	09.29.54	06.06.96	42	Niereninsuffizienz	0	65	24	0,37	178
25	2	F.K.	T	03.20.14	05.14.96	82	Herzinsuffizienz bei KHK, Kardiomegalie	0	67	23	0,34	75
42	3	J.M.	T	10.16.10	10.13.96	86	Herzinsuffizienz	0	64	21	0,33	88
50	4	F.B.	T	06.29.20	10.04.96	76	Herzinsuffizienz bei KHK u. HHK	0	69	25	0,36	177
56	5	M.E.	T	10.13.11	10.11.96	85	Herzinsuffizienz bei KHK	0	62	26	0,42	175
57	6	H.Y.	T	02.02.55	10.22.96	42	Reizerguss nach Abdominal-OP	0	67	27	0,40	176
63	7	J.G.	T	02.17.26	10.23.96	71	dekomp. Herzinsuffizienz	0	66	30	0,45	238
65	8	H.H.-R.	T	05.06.25	11.06.96	72	Erguss bei Colitis Ulcerosa	0	59	22	0,37	89
69	9	H.A.	T	10.09.12	11.14.96	84	Herzinsuffizienz, chr. NI	0	81	16	0,20	135
73	10	D.E.	T	03.04.12	11.22.96	85	Herzinsuffizienz	0	64	19	0,30	66
78	11	K.E.	T	06.16.30	12.09.96	67	Niereninsuffizienz	0	68	22	0,32	89
81	12	F.H.	T	05.12.42	12.20.96	55	Herzinsuffizienz	0	69	19	0,28	187
93	13	L.J.	T	12.11.03	01.23.97	93	dekomp. Herzinsuffizienz	0	58	21	0,36	142
96	14	B.H.	T	07.17.12	01.28.97	85	Herzinsuffizienz	0	56	26	0,46	319
100	15	S.U.	T	05.12.28	02.07.97	69	Herzinsuffizienz	0	61	26	0,43	211
101	16	B.H.	T	07.17.12	02.10.97	85	Herzinsuffizienz.	0	66	21	0,32	256
107	17	H.P.	T	11.09.45	03.07.97	51	Herzinsuffizienz	0	46	20	0,43	220
111	18	H.J.	T	02.23.18	03.15.97	79	Niereninsuffizienz	0	59	24	0,41	188
113	19	N.M.	T	10.26.15	03.19.97	81	Herzinsuffizienz bei KHK	0	72	22	0,31	133
116	20	H.J.	T	02.23.18	03.26.97	79	Niereninsuffizienz	0	69	21	0,30	154
117	21	R.C.	T	10.14.15	04.02.97	82	Herzinsuffizienz	0	74	20	0,27	189
118	22	M.E.	T	07.06.32	04.02.97	65	Niereninsuffizienz	0	68	20	0,29	122
120	23	L.J.	T	12.11.03	04.02.97	93	Herzinsuffizienz	0	63	21	0,33	132
123	24	T.A.	T	01.20.21	04.04.97	76	Herzinsuffizienz	0	78	21	0,27	115
125	25	Z.M.	T	02.01.26	04.14.97	71	Herzinsuffizienz	0	60	22	0,37	134
130	26	vD.W.	T	06.05.38	05.11.97	59	akute Niereninsuffizienz bei Rhabdomyolyse	0	48	15	0,31	328

E.-Nr.	Nr.	Pat.	DGG	Geb. Dat.	Punkt. Dat.	Alter	Diagnose	Maligne Zellen	Prot.-S. (g/l)	Prot.-E. (g/l)	Quot. Prot.	LDH-E. (U/l)
138	27	G.J.R.	T	09.18.12	05.22.97	85	Herzinsuffizienz	0	-	14	-	115
139	28	W.I.	T	09.25.12	05.23.97	85	Herzinsuffizienz bei KHK	0	73	13	0,18	128
5	29	D.R.	P	10.22.14	02.12.96	81	Pneumonie	0	71	44	0,62	1288
6	30	G.F.	P	10.28.18	02.16.96	77	Pneumonie	0	69	36	0,52	422
13	31	S.W.	P	09.25.27	03.20.96	69	Pneumonie, Z.n. ARDS	0	58	30	0,52	643
16	32	H.B.	P	08.16.29	05.29.96	67	Pneumonie	0	66	39	0,59	228
21	33	S.A.	P	01.22.06	06.11.96	90	Pneumonie	0	72	30	0,42	1309
22	34	D.M.	P	10.20.20	05.08.96	76	Pneumonie, Hyperthyreose	0	56	27	0,48	432
23	35	G.F.	P	12.26.28	05.17.96	67	Pneumonie	vereinzelt Kernatypien	72	55	0,76	269
26	36	D.M.	P	10.20.20	05.14.96	76	Pneumonie, Hyperthyreose	0	56	31	0,55	566
27	37	R.E.	P	05.06.50	06.04.96	46	Pneumonie	0	69	33	0,48	297
32	38	W.P.	P	05.07.18	07.11.96	78	Pneumonie	0	62	35	0,56	433
45	39	W.E.	P	12.01.40	09.20.96	56	Pneumonie, Z.n. ARDS	0	76	46	0,61	405
51	40	F.M.	P	04.23.11	10.04.96	86	Pneumonie	0	75	49	0,65	321
52	41	S.Y.	P	06.14.34	10.07.96	62	Pneumonie	0	58	28	0,48	567
54	42	W.E.	P	12.01.40	10.03.96	56	Pneumonie, Z.n. ARDS	0	69	36	0,52	255
61	43	S.L.	P	06.15.19	10.23.96	77	Pneumonie	0	68	29	0,43	467
80	44	S.I.	P	08.12.12	12.18.96	84	Pneumonie	0	65	21	0,32	154
109	45	S.H.	P	02.22.14	03.07.97	83	Pneumonie	0	74	47	0,64	2147
112	46	M.E.	P	10.02.26	03.24.97	71	Pneumonie	0	70	36	0,51	534
122	47	S.A.	P	02.11.25	04.03.97	72	Pneumonie	0	68	51	0,75	972
132	48	R.K.	P	07.27.13	05.13.97	84	Aspirationspneumonie	0	51	52	1,02	599
135	49	B.D.	P	02.28.23	05.20.97	74	Pneumonie	0	65	30	0,46	700
146	50	L.R.	P	08.02.44	06.19.97	53	Pneumonie	0	48	30	0,63	389
149	51	S.P.	P	09.09.41	06.11.97	56	Pneumonie	0	66	51	0,77	602
157	52	K.R.	P	03.03.30	08.14.97	67	sept. Pleuritis u. sept. Lungenembolie	0	56	35	0,63	256
1	53	S.K.	C	12.30.20	01.29.96	75	NSCL, Plattenepithel	0	74	39	0,53	560
2	54	C.B.	C	11.03.38	01.31.96	57	Mamma-Ca	vereinzelt Kernatypien	79	47	0,59	760
3	55	J.H.	C	01.11.44	02.06.96	52	Mamma-Ca	einige Adeno-Ca Zellen	69	49	0,71	351
8	56	S.P.	C	10.30.63	02.22.96	32	Pleuramesotheliom	0	82	35	0,43	5520

E.-Nr.	Nr.	Pat.	DGG	Geb. Dat.	Punkt. Dat.	Alter	Diagnose	Maligne Zellen	Prot.-S. (g/l)	Prot.-E. (g/l)	Quot. Prot.	LDH-E. (U/l)
9	57	M.M.	C	09.25.15	03.07.96	81	met. Adeno-Ca, Colon	vereinzelt Adeno-Ca	63	41	0,65	587
10	58	L.L.	C	01.10.29	03.11.96	67	Mamma-Ca	massenhaft Mamma-Ca	70	46	0,66	357
11	59	F.P.	C	04.29.45	03.12.96	51	Mamma-Ca	massenhaft Mamma-Ca	85	52	0,61	469
14	60	K.A.-R.	C	07.16.27	03.29.96	69	Pleuramesotheliom	0	67	31	0,46	221
19	61	H.D.	C	12.26.41	04.25.96	54	met. Adeno-Ca, Colon	0	70	32	0,46	338
29	62	M.A.	C	04.14.27	05.02.96	69	Mamma-Ca	ganz vereinzelt V.a. Ca	71	40	0,56	365
36	63	R.H.	C	08.24.24	08.07.96	72	NSCLC, Plattenepithel, pancoast	0	62	36	0,58	469
44	64	L.H.	C	11.17.29	09.11.96	67	NSCLC, Plattenepithel	massenhaft hochmaligne Zellen	55	36	0,65	10410
47	65	C.Y.	C	11.24.40	09.27.96	56	NHL	massenhaft Lymphomzellen	71	36	0,51	1646
48	66	Z.A.	C	06.29.38	09.01.96	58	Plasmozytom	Plasmozytomzellen	77	51	0,66	4800
53	67	S.M.	C	11.11.17	10.01.96	79	met. Endometriumsarkom	0	64	45	0,70	1166
55	68	B.A.	C	07.12.09	10.08.96	87	cb-B-NHL	nb-B-NHL-Zellen	67	37	0,55	10100
60	69	O.B.	C	01.12.53	10.21.96	44	Mamma-Ca	massenhaft Ca-Zellen	66	40	0,61	522
66	70	W.S.	C	08.26.50	01.01.96	45	NSCLC, Adeno-Ca	massenhaft Adeno-Ca	66	38	0,58	275
68	71	S.M.	C	11.11.17	11.15.96	79	met. Endometriumsarkom	0	72	48	0,67	1079
70	72	G.M.	C	03.29.15	11.18.96	82	Mamma-Ca	einige Ca-Zellen	77	47	0,61	162
79	73	D.B.	C	11.25.18	12.20.96	78	met. Adeno-Ca, Niere	hellzelliges Nierenzell-Ca	69	43	0,62	680
83	74	V.E.	C	04.07.21	01.15.97	76	met. Angiosarkom; Z.n.Mamma-Ca	0	52	35	0,67	299
86	75	A.B.	C	12.13.54	01.01.97	42	met. Hämangioperizytom	0	52	22	0,42	934
87	76	M.B.	C	06.04.14	01.14.97	83	NSCLC, grosszellig	zahlreich undiff. gross/riesenzelliges Ca.	57	25	0,44	313
88	77	D.B.	C	11.25.18	01.01.96	77	met. Adeno-Ca, Niere	0	69	43	0,62	581
91	78	W.E.	C	02.13.35	01.01.97	62	met. Adeno-CA, Colon	massenhaft Adeno-Ca	74	51	0,69	443
92	79	G.T.	C	10.31.41	01.21.97	55	met. Adeno-Ca, Ovar	sekretbildenes Adeno-Ca	64	37	0,58	818
95	80	S.R.	C	09.16.35	01.27.97	61	Pleuramesotheliom	einige Ca-Zellen	72	44	0,61	268
97	81	K.L.	C	04.18.45	02.03.97	52	SCLC, oat cell	0	69	38	0,55	213
98	82	V.C.	C	07.18.38	02.04.97	59	NSCLC, Adeno-Ca	0	70	44	0,63	396
102	83	S.R.	C	12.22.27	02.13.97	69	NSCLC, Plattenepithel	0	72	46	0,64	232
103	84	I.W.	C	07.02.28	02.20.97	69	SCLC	einige Ca-Zellen	80	58	0,73	644

E.-Nr.	Nr.	Pat.	DGG	Geb. Dat.	Punkt. Dat.	Alter	Diagnose	Maligne Zellen	Prot.-S. (g/l)	Prot.-E. (g/l)	Quot. Prot.	LDH-E. (U/l)
105	85	V.H.	C	08.09.14	03.04.97	83	met. NSCLC, Adeno-Ca	einige Ca-Zellen	66	49	0,74	523
108	86	S.M.	C	10.30.09	03.07.97	87	Mamma-Ca	0	63	31	0,49	200
110	87	S.M.	C	10.30.09	03.15.97	87	Mamma-Ca	0	50	29	0,58	192
114	88	M.B.	C	01.14.05	03.25.97	92	cb B-NHL	massenhaft Ca-Zellen	53	28	0,53	1652
119	89	H.K.	C	07.21.19	04.02.97	78	NSCLC, Adeno-Ca; CLL	vereinzelt Kernatypien	57	35	0,61	732
121	90	J.E.	C	05.23.37	04.03.97	60	NSCLC, Adeno-Ca	einige Ca-Zellen	65	36	0,55	475
124	91	L.C.	C	05.25.23	04.11.97	74	NSCLC, grosszellig	massenhaft Ca-Zellen	65	44	0,68	244
129	92	S.E.	C	05.16.16	08.08.96	80	met. NSCLC, Plattenepithel	grosse Ca-Zellen	58	32	0,55	1912
137	93	W.K.	C	09.13.15	05.20.97	82	met. Adeno-Ca, Niere	0	65	38	0,58	695
140	94	E.H.	C	07.30.39	05.26.97	58	NSCLC, Adeno-Ca	0	78	52	0,67	711
148	95	F.M.	C	10.26.36	06.23.97	61	met. SCLC, oat cell	einige Ca-Zellen	64	38	0,59	2270
153	96	H.A.	C	01.18.23	07.03.97	75	met. NSCLC, Adeno-Ca	einige Adeno-Ca Zellen	70	21	0,30	468

E.-Nr.	Nr.	Pat.	DGG	MMP-1 (ng/ml)	MMP-2 (ng/ml)	MMP-9 (ng/ml)	TIMP-1 (ng/ml)	TIMP-2 (ng/ml)	MMP-1 (ng/mg Prot)	MMP-2 (ng/mg Prot)	MMP-9 (ng/mg Prot)	TIMP-1 (ng/mg Prot)	TIMP-2 (ng/mg Prot)
17	1	L.H.	T	10,89	3563	1,67	5786	13,34	0,45	148,5	0,07	241,1	0,56
25	2	F.K.	T	8,63	3104	40,06	9643	33,65	0,38	135,0	1,74	419,3	1,46
42	3	J.M.	T	5,54	2688	2,37	2719	51,13	0,26	128,0	0,11	129,5	2,43
50	4	F.B.	T	11,85	2064	1,99	5404	42,83	0,47	82,6	0,08	216,2	1,71
56	5	M.E.	T	6,49	1661	1,67	4992	1,05	0,25	63,9	0,06	192,0	0,04
57	6	H.Y.	T	8,57	3691	3,42	10921	9,96	0,32	136,7	0,13	404,5	0,37
63	7	J.G.	T	3,29	1185	2,04	8246	155,10	0,11	39,5	0,07	274,9	5,17
65	8	H.H.-R.	T	3,49	1588	1,93	8885	86,25	0,16	72,2	0,09	403,9	3,92
69	9	H.A.	T	4,33	3079	4,16	4743	11,82	0,27	192,4	0,26	296,4	0,74
73	10	D.E.	T	4,47	1235	2,23	7089	48,41	0,24	65,0	0,12	373,1	2,55
78	11	K.E.	T	0,47	1397	5,28	2201	12,41	0,02	63,5	0,24	100,0	0,56
81	12	F.H.	T	2,99	1198	1,46	1758	50,23	0,16	63,1	0,08	92,5	2,64
93	13	L.J.	T	5,54	1850	1,78	4832	39,98	0,26	88,1	0,08	230,1	1,90
96	14	B.H.	T	12,53	1812	20,25	12194	28,03	0,48	69,7	0,78	469,0	1,08
100	15	S.U.	T	0	724	0,40	3783	79,93	0	27,8	0,02	145,5	3,07

E.-Nr.	Nr.	Pat.	DGG	MMP-1 (ng/ml)	MMP-2 (ng/ml)	MMP-9 (ng/ml)	TIMP-1 (ng/ml)	TIMP-2 (ng/ml)	MMP-1 (ng/mg Prot)	MMP-2 (ng/mg Prot)	MMP-9 (ng/mg Prot)	TIMP-1 (ng/mg Prot)	TIMP-2 (ng/mg Prot)
101	16	B.H.	T	14,32	1422	28,13	6168	25,01	0,68	67,7	1,34	293,7	1,19
107	17	H.P.	T	5,84	2937	106,40	9157	33,52	0,29	146,9	5,32	457,9	1,68
111	18	H.J.	T	6,54	2673	3,94	8530	10,21	0,27	111,4	0,16	355,4	0,43
113	19	N.M.	T	3,63	1625	3,28	3295	32,70	0,16	73,9	0,15	149,8	1,49
116	20	H.J.	T	9,19	3426	1,50	8097	12,41	0,44	163,1	0,07	385,6	0,59
117	21	R.C.	T	3,70	1289	0,03	9254	43,73	0,18	64,5	0,00	462,7	2,19
118	22	M.E.	T	1,52	2275	1,59	4866	26,77	0,08	113,8	0,08	243,3	1,34
120	23	L.J.	T	0,10	2106	0,60	6449	55,31	0,00	100,3	0,03	307,1	2,63
123	24	T.A.	T	1,33	1257	13,71	4986	161,00	0,06	59,9	0,65	237,4	7,67
125	25	Z.M.	T	0	1008	1,00	451	38,63	0	45,8	0,05	20,5	1,76
130	26	vD.W.	T	2,58	511,6	1,36	3330	98,17	0,17	34,1	0,09	222,0	6,54
138	27	G.J.R.	T	0	871	0,30	3191	76,80	0	62,2	0,02	227,9	5,49
139	28	W.I.	T	0	1328	0	3452	13,30	0	102,2	0	265,5	1,02
5	29	D.R.	P	5,66	2158	2,59	6466	148,50	0,13	49,0	0,06	147,0	3,38
6	30	G.F.	P	7,69	3748	43,11	9877	33,32	0,21	104,1	1,20	274,4	0,93
13	31	S.W.	P	13,97	1939	19,99	13694	38,19	0,47	64,6	0,67	456,5	1,27
16	32	H.B.	P	3,60	1260	11,14	4812	78,29	0,09	32,3	0,29	123,4	2,01
21	33	S.A.	P	5,01	3252	31,91	6769	126,30	0,17	108,4	1,06	225,6	4,21
22	34	D.M.	P	7,54	2558	46,88	7583	32,99	0,28	94,7	1,74	280,9	1,22
23	35	G.F.	P	3,80	4100	10,48	7355	40,57	0,07	74,5	0,19	133,7	0,74
26	36	D.M.	P	4,39	1517	19,82	4226	95,16	0,14	48,9	0,64	136,3	3,07
27	37	R.E.	P	6,88	2296	419,40	5659	8,10	0,21	69,6	12,71	171,5	0,25
32	38	W.P.	P	17,09	1396	91,72	16046	10,12	0,49	39,9	2,62	458,5	0,29
45	39	W.E.	P	9,28	1389	5,13	8477	11,76	0,20	30,2	0,11	184,3	0,26
51	40	F.M.	P	7,05	2158	28,05	12470	54,70	0,14	44,0	0,57	254,5	1,12
52	41	S.Y.	P	3,82	2202	7,88	17055	10,60	0,14	78,6	0,28	609,1	0,38
54	42	W.E.	P	25,78	3107	2,52	9316	22,41	0,72	86,3	0,07	258,8	0,62
61	43	S.L.	P	12,19	1356	25,88	30181	34,30	0,42	46,8	0,89	1040,7	1,18
80	44	S.I.	P	5,35	2048	11,16	8204	51,80	0,25	97,5	0,53	390,7	2,47
109	45	S.H.	P	13,14	1185	687,00	32589	72,68	0,28	25,2	14,62	693,4	1,55
112	46	M.E.	P	14,69	2476	11,34	3814	1762	0,41	68,8	0,32	105,9	48,94

E.-Nr.	Nr.	Pat.	DGG	MMP-1 (ng/ml)	MMP-2 (ng/ml)	MMP-9 (ng/ml)	TIMP-1 (ng/ml)	TIMP-2 (ng/ml)	MMP-1 (ng/mg Prot)	MMP-2 (ng/mg Prot)	MMP-9 (ng/mg Prot)	TIMP-1 (ng/mg Prot)	TIMP-2 (ng/mg Prot)
122	47	S.A.	P	16,40	1545	25,34	804	59,60	0,32	30,3	0,50	15,8	1,17
132	48	R.K.	P	13,00	2370	17,60	5579	15,30	0,25	45,6	0,34	107,3	0,29
135	49	B.D.	P	0	690	14,37	13312	78,24	0	23,0	0,48	443,7	2,61
146	50	L.R.	P	2,40	1059	64,50	0	40,40	0,08	35,3	2,15	0	1,35
149	51	S.P.	P	7,70	966	107,50	0	24,30	0,15	18,9	2,11	0	0,48
157	52	K.R.	P	-	-	81,60	-	37,60	-	-	2,33	-	1,07
1	53	S.K.	C	4,41	1497	2,85	4169	41,13	0,11	38,4	0,07	106,9	1,05
2	54	C.B.	C	7,34	3607	1,17	7626	49,58	0,16	76,7	0,02	162,3	1,05
3	55	J.H.	C	4,77	3318	2,61	3407	195,80	0,10	67,7	0,05	69,5	4,00
8	56	S.P.	C	12,91	843,7	17,91	30137	411,60	0,37	24,1	0,51	861,1	11,76
9	57	M.M.	C	14,00	3443	4,24	6546	49,67	0,34	84,0	0,10	159,7	1,21
10	58	L.L.	C	3,79	4138	3,59	2862	74,67	0,08	90,0	0,08	62,2	1,62
11	59	F.P.	C	4,18	3707	0,90	2589	127,30	0,08	71,3	0,02	49,8	2,45
14	60	K.A.-R.	C	5,05	1746	1,96	2914	48,92	0,16	56,3	0,06	94,0	1,58
19	61	H.D.	C	3,92	3014	8,36	4601	45,94	0,12	94,2	0,26	143,8	1,44
29	62	M.A.	C	5,34	3219	33,90	13123	39,11	0,13	80,5	0,85	328,1	0,98
36	63	R.H.	C	3,57	4999	0,26	10819	40,27	0,10	138,9	0,01	300,5	1,12
44	64	L.H.	C	8,99	2859	40,95	6110	118,40	0,25	79,4	1,14	169,7	3,29
47	65	C.Y.	C	3,60	1691	9,20	10979	108,60	0,10	47,0	0,26	305,0	3,02
48	66	Z.A.	C	3,55	1008	10,33	5362	726,30	0,07	19,8	0,20	105,1	14,24
53	67	S.M.	C	4,64	3233	1,45	11081	46,12	0,10	71,8	0,03	246,2	1,02
55	68	B.A.	C	4,52	2887	4,98	8635	26,52	0,12	78,0	0,13	233,4	0,72
60	69	O.B.	C	6,23	1927	0,54	5139	26,90	0,16	48,2	0,01	128,5	0,67
66	70	W.S.	C	2,49	1076	4,70	4352	138,50	0,07	28,3	0,12	114,5	3,64
68	71	S.M.	C	4,83	2102	1,11	6032	10,42	0,10	43,8	0,02	125,7	0,22
70	72	G.M.	C	5,85	1980	1,93	2676	87,65	0,12	42,1	0,04	56,9	1,86
79	73	D.B.	C	6,70	1395	3,14	6746	28,53	0,16	32,4	0,07	156,9	0,66
83	74	V.E.	C	7,89	1244	397,40	17799	42,80	0,23	35,5	11,35	508,5	1,22
86	75	A.B.	C	3,26	679,8	121,40	9060	49,00	0,15	30,9	5,52	411,8	2,23
87	76	M.B.	C	4,70	1735	33,22	6292	13,34	0,19	69,4	1,33	251,7	0,53
88	77	D.B.	C	1,09	2018	2,41	2929	13,58	0,03	46,9	0,06	68,1	0,32

E.-Nr.	Nr.	Pat.	DGG	MMP-1 (ng/ml)	MMP-2 (ng/ml)	MMP-9 (ng/ml)	TIMP-1 (ng/ml)	TIMP-2 (ng/ml)	MMP-1 (ng/mg Prot)	MMP-2 (ng/mg Prot)	MMP-9 (ng/mg Prot)	TIMP-1 (ng/mg Prot)	TIMP-2 (ng/mg Prot)
91	78	W.E.	C	3,75	2029	1,81	11972	31,64	0,07	39,8	0,04	234,7	0,62
92	79	G.T.	C	5,79	1274	6,75	9592	43,20	0,16	34,4	0,18	259,2	1,17
95	80	S.R.	C	1,67	986,4	1,59	2361	40,66	0,04	22,4	0,04	53,7	0,92
97	81	K.L.	C	1,44	151,3	3,10	4738	25,60	0,04	4,0	0,08	124,7	0,67
98	82	V.C.	C	3,13	1821	2,09	6380	65,26	0,07	41,4	0,05	145,0	1,48
102	83	S.R.	C	4,47	2034	0,96	14293	34,16	0,10	44,2	0,02	310,7	0,74
103	84	I.W.	C	15,64	4477	3,09	7502	34,96	0,27	77,2	0,05	129,3	0,60
105	85	V.H.	C	9,74	3191	2,01	11153	50,84	0,20	65,1	0,04	227,6	1,04
108	86	S.M.	C	1,21	1178	4,10	4664	367,90	0,04	38,0	0,13	150,5	11,87
110	87	S.M.	C	6,03	2027	3,05	7469	47,98	0,21	69,9	0,11	257,6	1,65
114	88	M.B.	C	3,32	1697	7,29	12665	109,10	0,12	60,6	0,26	452,3	3,90
119	89	H.K.	C	9,88	3065	3,12	15498	15,66	0,28	87,6	0,09	442,8	0,45
121	90	J.E.	C	10,87	3133	1,87	13954	45,14	0,30	87,0	0,05	387,6	1,25
124	91	L.C.	C	0	1506	6,70	1440	61,10	0	34,2	0,15	32,7	1,39
129	92	S.E.	C	9,65	4066	104,30	4852	49,00	0,30	127,1	3,26	151,6	1,53
137	93	W.K.	C	3,40	1259	85,40	-	46,40	0,09	33,1	2,25	-	1,22
140	94	E.H.	C	3,20	3128	12,50	349	9,00	0,06	60,2	0,24	6,7	0,17
148	95	F.M.	C	0	430	0,90	-	48,00	0	11,3	0,02	-	1,26
153	96	H.A.	C	-	1213	2,70	-	35,90	-	57,8	0,13	-	1,71

12 Patientendaten- Pleuralavagen

PL-Nr	Nr	Pat	DGG	Geb Dat	Punkt Dat	Alter	Diagnose	Maligne Zellen	Prot (g/l)
PL1	97	S.S.	PL	01.30.17	10.14.97	81	2 Gefäß-KHK	0	0,475
PL2	98	P.F.	PL	11.25.39	07.18.97	58	1 Gefäß-KHK	0	0,561
PL3	99	M.W.	PL	04.02.24	07.29.97	73	valv. + 2/3 Gefäß-KHK	0	0,306
PL4	100	G.H.	PL	04.29.44	10.28.97	54	3 Gefäß-KHK	0	1,093
PL5	101	H.K.	PL	01.26.46	11.24.97	52	2 Gefäßt-KHK, Z.n. Myokardinfarkt	0	0,9
PL6	102	G.H.	PL	07.21.28	08.27.97	69	valv. + 2 Gefäß-KHK	0	0,965
PL7	103	S.E.	PL	01.16.35	01.16.98	63	1 Gefäß-KHK	0	0,813
PL8	104	T.W.	PL	11.12.26	09.10.97	71	2 Gefäß-KHK	0	0,358
PL9	105	I.E.	PL	08.13.39	09.22.97	58	3 Gefäß-KHK, Z.n. rez. Myokardinfarkt	0	0,359
PL10	106	B.F.	PL	02.28.35	09.22.97	63	3 Gefäß-KHK	0	1,186

PL-Nr	Nr	Pat	DGG	MMP-1 (ng/ml)	MMP-2 (ng/ml)	MMP-9 (ng/ml)	TIMP-1 (ng/ml)	TIMP-2 (ng/ml)	MMP-1 (ng/mg Prot)	MMP-2 (ng/mg Prot)	MMP-9 (ng/mg Prot)	TIMP-1 (ng/mg Prot)	TIMP-2 (ng/mg Prot)
PL1	97	S.S.	PL	0	12,5	0	74	15,10	0	26,3	0	155,8	31,79
PL2	98	P.F.	PL	0	18,1	0	105	12,80	0	32,3	0	187,2	22,82
PL3	99	M.W.	PL	0	1,5	0	91	15,30	0	4,9	0	297,4	50,00
PL4	100	G.H.	PL	0	62,2	0	256	24,70	0	56,9	0	234,2	22,60
PL5	101	H.K.	PL	0	20,8	0	5	14,80	0	23,1	0	5,6	16,44
PL6	102	G.H.	PL	0	17,6	0	100	17,50	0	18,2	0	103,6	18,13
PL7	103	S.E.	PL	0	12	0	103	12,40	0	14,8	0	126,7	15,25
PL8	104	T.W.	PL	0	3,7	0	47	7,20	0	10,3	0	131,3	20,11
PL9	105	I.E.	PL	0	9,1	0	52	9,00	0	25,3	0	144,8	25,07
PL10	106	B.F.	PL	0	33	0	165	11,20	0	27,8	0	139,1	9,44