

Untersuchungen zu Isoenzymen der
Matrix-Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9
bei adulten Patienten mit cystischer Fibrose

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

vorgelegt von
Christian Wenzel
aus Berlin

Gießen 2012

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin

Medizinische Klinik II und Poliklinik

Leiter: Prof. Dr. med. Werner Seeger

Schwerpunkt Gastroenterologie

Leiterin: Prof. Dr. med. Elke Roeb

der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH

Standort Gießen

1. Gutachter: Frau Professorin Dr. med. Elke Roeb

2. Gutachter: Frau PD Dr. med. Kerstin Herzer

Tag der Disputation: 06.06.2013

Publikationen

Ergebnisse der Arbeit wurden bereits unter folgenden Titel veröffentlicht:

Roderfeld M, Rath T, Schulz R, Seeger W, Tschuschner A, Graf J and Elke Roeb, Serum matrix metalloproteinases in adult CF patients: Relation to pulmonary exacerbation. Journal of Cystic Fibrosis Volume 8, Issue 5, September 2009, Pages 338-347.

Rath T, Roderfeld M, Güler C, **Wenzel C**, Graf J, Beitinger F, Roeb E, Zachoval R. YKL-40 and transient elastography, a powerful team to assess hepatic fibrosis. Scandinavian Journal of Gastroenterology. 2011 46(11):1369-80.

Timo Rath, Katrin Menendez, Marion Kügler, Richard Schulz, **Christian Wenzel**, Jürgen Graf, Lutz Nährlich, Elke Roeb, Martin Roderfeld. TIMP-1/-2 and transient elastography allow non invasive diagnosis of cystic fibrosis associated liver disease. Digestive and Liver Disease 2012 Sep; 44(9):780-7.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Die cystische Fibrose.....	3
1.1.1	Epidemiologie.....	3
1.1.2	Pathogenese und mukoziliäre Clearance	3
1.1.3	CFTR und klinische Ausprägung	4
1.1.4	Chronische Inflammation	5
1.1.5	Neutrophile Granulozyten	6
1.1.6	Akute pulmonale Exazerbation.....	7
1.1.7	Therapieoptionen	8
1.1.8	Hepatische Beteiligung.....	9
1.2	Die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs).....	10
1.2.1	Domänenstruktur der MMPs	10
1.2.2	Regulation der MMPs.....	12
1.2.3	Die Bedeutung von MMP-2 und MMP-9.....	13
1.2.4	Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs).....	15
1.3	Die Rolle der MMP Isoenzyme bei der cystischen Fibrose	17
1.3.1	Exazerbation	18
2	Zielsetzung und Hypothese	19
2.1	Quantitative Zymographie.....	19
2.2	MMP-2 und MMP-9 Isoenzyme	19
2.3	Akute Exazerbation und intravenöse Therapie	20
3	Material und Methoden.....	21
3.1	Material und Chemikalien	21
3.2	Klinische Daten	22
3.3	Materialgewinnung.....	23
3.4	Zymographie	23
3.4.1	Herstellung der Zymographiegele	24
3.4.2	Vorbereitung der Proben.....	25
3.4.3	Auftrennung der Proteine und Entwicklung der Zymographie	25
3.4.4	Puffer und Lösungen.....	26
3.4.5	Auswertung.....	27
3.5	ELISA.....	29

3.5.1	MMP-9.....	29
3.5.2	TIMP-1	30
3.5.3	Auswertung.....	30
3.6	Western Blot.....	31
3.6.1	Vorbereitung der Proben.....	31
3.6.2	Durchführung des Western Blots.....	31
3.6.3	Proteindetektion.....	32
3.7	Statistik und Textverarbeitung	33
4	Ergebnisse und Auswertung	34
4.1	Validierung der Zymographie	34
4.1.1	Gegenüberstellung der Densitometrie Programme.....	34
4.1.2	Reproduzierbarkeit der densitometrischen Daten.....	34
4.1.3	Homogenität serumgleicher Gele	35
4.1.4	Vergleichbarkeit aller Gele.....	36
4.1.5	Western Blot.....	38
4.2	Deskriptive Statistik der klinischen Daten	39
4.2.1	Patienten der Studie	39
4.2.2	Alter der Patienten	39
4.2.3	Geschlechtsverteilung.....	40
4.2.4	Einteilung der CF-Patienten	40
4.3	Klinische Befunde und Laborwerte.....	42
4.3.1	Lungenfunktionsparameter	42
4.3.2	Entzündungsparameter	43
4.3.3	Leberbeteiligung.....	44
4.3.4	Pankreasbeteiligung.....	46
4.4	Zymographische Gelatinase-Aktivität.....	47
4.4.1	Verteilung der Isoenzyme.....	48
4.4.2	Die aktivierten MMP-9 Monomere	50
4.4.3	Verhältnis von aktivem zu latentem MMP-9.....	50
4.4.4	Lungenfunktionsparameter	51
4.4.5	Isoenzyme bei akuter Exazerbation	52
4.5	ELISA: MMP-8, MMP-9 und TIMP-1	53
4.5.1	Korrelation der MMPs mit inflammatorischen Parametern	55
4.6	MMPs bei medikamentöser Therapie.....	56

4.6.1	Dauerhafte antibiotische und antiinflammatorische Therapie.....	56
4.6.2	Patienten vor und nach intravenöser antibiotischer Therapie.....	57
5	Diskussion.....	60
5.1	Kritische Diskussion der Methoden.....	60
5.1.1	Rekrutierung der CF-Patienten und der Kontrollgruppe.....	60
5.1.2	Materialgewinnung.....	60
5.1.3	Bedeutung der Zymographie.....	61
5.1.4	Verifizierung der proteolytischen Banden.....	62
5.2	Diskussion der Ergebnisse.....	63
5.2.1	MMP-9 Gesamtkonzentration.....	63
5.2.2	Gesamtkonzentration aller aktivierter MMP-9 Isoformen.....	64
5.2.3	Aktiviertes MMP-9 Monomer.....	65
5.2.4	Neutrophile MMP-9 Sekretion.....	67
5.2.5	Aktive neutrophile Gelatinase assoziiert an Lipocalin.....	69
5.2.6	Das MMP-9 Homodimer.....	69
5.2.7	TIMP-1 sowie MMP-9/TIMP-1 Quotient.....	70
5.2.8	MMP-2.....	71
5.2.9	Leberwerte.....	73
5.3	Akute Exazerbation und antibiotische Therapie.....	74
5.3.1	Akute Exazerbation.....	74
5.3.2	Intravenöse antibiotische Therapie.....	75
5.4	Schlussfolgerung.....	76
5.5	Ausblick für die Zukunft.....	77
6	Zusammenfassung.....	79
7	Summary.....	81
8	Abkürzungsverzeichnis.....	83
9	Abbildungsverzeichnis.....	86
10	Tabellenverzeichnis.....	87
11	Literaturverzeichnis.....	88
12	Eidesstattliche Erklärung.....	105
13	Danksagung.....	106

1 Einleitung

Die cystische Fibrose (CF, Synonym: Mukoviszidose) ist die häufigste angeborene Stoffwechselerkrankung im europäischen Raum und der kaukasischen Bevölkerung Nordamerikas [1, 2]. Genetische Mutationen eines zellulären Chloridkanals führen zu Störungen im Wasserhaushalt und fördern die Produktion von zähem Schleim. Betroffen sind dabei vor allem die Lunge und die Leber, aber auch die Haut und das Pankreas [3–5]. In den Atemwegen stellt die Störung der mukoziliären Clearance eine Grundlage für vermehrte Infektionen dar, bei denen es durch die entzündliche Komponente zu einer verstärkten Einwanderung von neutrophilen Granulozyten kommt. In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass diese Immunzellen durch Ausschüttung von Matrix Metalloproteinasen (MMPs), vor allem MMP-8 und MMP-9, mit am strukturellen Umbau der Atemwege und des Lungenparenchyms beteiligt sind [6, 7].

Die MMPs gehören zu einer Familie zinkabhängiger Endoproteasen, die ihre Bedeutung besonders beim Um- und Abbau extrazellulärer Strukturen finden. Bei chronischen Erkrankungen, wie der chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [8, 9], der Sarkoidose [10], der Pneumonie [11] oder dem Asthma [12] kommt es zu dauerhaft erhöhten Konzentrationen an MMPs im Serum, in der bronchoalveolären Lavage und im Sputum [13]. Auch bei der CF konnte im Serum [14] sowie im Sputum [6, 7, 15–17] eine gesteigerte Enzymkonzentration im Vergleich zu nicht erkrankten Probanden beobachtet werden. Dieser Unterschied fand sich einerseits bei klinisch stabilen CF-Patienten [7, 15] und verstärkte sich andererseits unter Exazerbation deutlich [6, 14]. Die gleichzeitige Korrelation der MMPs mit der pulmonalen Parenchymdestruktion [16] unterstreicht die Bedeutung dieser Proteasen im Prozess des chronisch pulmonalen Remodeling. Das Wissen über die Funktion und Zusammenhänge der MMPs könnte neue diagnostische und therapeutische Wege in der Behandlung der cystischen Fibrose eröffnen.

Um diesen Aspekten nachzugehen, werden in der vorliegenden Studie die serologischen MMP-2 und MMP-9 Isoenzyme von 58 adulten Patienten mit CF untersucht und mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen. Ältere Studien beschreiben ausschließlich die Gesamtkonzentration an MMP-2 und MMP-9. Aus anderen Arbeiten, vor allem zur Untersuchung der Tumorgenese, sind jedoch eine Vielzahl von Isoenzymen bekannt, die bisher weder bei der CF noch bei anderen chronischen Lungenerkrankungen untersucht wurden.

Ein Ziel dieser Arbeit ist zunächst die unterschiedlichen Isoenzyme zymographisch darzustellen, da eine getrennte Bestimmung der Isoenzyme durch den klassischen ELISA noch nicht möglich ist. Die Zymographie, bisher eine hauptsächlich qualitative oder semiquantitative Nachweismethode von Proteasen, soll dabei so angepasst werden, dass eine Quantifizierung der Enzymkonzentration möglich ist. Der Nachweis der unterschiedlichen Banden erfolgt mittels Gelatinasestandard, Molekulargewicht und Western Blot. Eine Verifizierung der quantitativen Zymographie soll durch eine zusätzliche ELISA Bestimmung der MMP Gesamtkonzentration erfolgen. Im Weiteren sollen die gewonnen Ergebnisse der MMP Isoenzyme untereinander und mit laborchemischen sowie klinischen Parametern in Bezug gesetzt werden. Eine Besonderheit dieser longitudinal angelegten Studie stellt die Bestimmung der MMP Konzentration bei neun CF-Patienten zu zwei Zeitpunkten dar: zum Zeitpunkt einer akuten Exazerbation und nach erfolgter intravenöser antibiotischer Therapie.

Mit der vorliegenden Arbeit sollen die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 im Blut von CF-Patienten untersucht werden, um vor dem Hintergrund der pulmonalen Pathogenese deren prognostische Bedeutung als Biomarker zu entschlüsseln. Das Verständnis über die Regulation und das Verhalten der Isoenzyme könnte deren Bedeutung als Biomarker unterstreichen, die zur Exazerbationsdiagnostik und/oder zur Verlaufskontrolle nach antibiotischer Therapie eingesetzt werden können. Darüber hinaus könnten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur Etablierung neuer therapeutischer Optionen in der Modulation der MMPs bei CF beitragen.

1.1 Die cystische Fibrose

1.1.1 Epidemiologie

Die Prävalenz der cystischen Fibrose (CF), im deutschsprachigen Raum auch unter Mukoviszidose bekannt, variiert in Europa zwischen 1:2500-3300 Lebendgeburten in Abhängigkeit regionaler und ethnischer Bevölkerungsgruppen [1, 2, 18]. Während 1938, im Jahre der Erstbeschreibung, noch von der CF als eine reine Kinderkrankheit gesprochen wurde, da die Patienten schon in sehr jungen Jahren verstarben, ist heutzutage das Erreichen der Adoleszenz keine Seltenheit mehr [4]. Zukünftig wird die durchschnittliche Lebenserwartung von CF-Patienten dank der Weiterentwicklung therapeutischer Maßnahmen auf 45 bis 50 Jahre geschätzt [19]. Dennoch bleibt die CF bisher eine unheilbare Erkrankung, die gerade durch das stetig wachsende Lebensalter der Patienten die Medizin vor neue Aufgaben stellt. Rezidivierende und progrediente Exazerbationen fördern die pulmonale Destruktion und steigern das Risiko am akuten Lungenversagen zu sterben [20].

1.1.2 Pathogenese und mukoziliäre Clearance

Die Ursache für CF ist ein molekulargenetischer Defekt auf dem langen Arm des Chromosoms 7 (Locus 7q31.2). Das betroffene Gen codiert das CFTR-Protein (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), ein aus 1480 Aminosäuren bestehendes Protein, das in der Zellmembran von vorwiegend epithelialen Zellen als Chloridkanal fungiert [1, 18]. Durch den Defekt, des zur ABC (ATP-binding-cassette) Familie zählenden Proteins, ist die transmembranäre Transportfunktion gestört und es kommt zu einem Ausfall des Chloridionenflusses [21]. Am respiratorischen Epithel wird neben dem aktiven Chloridtransport aus der Zelle auch die Regulation anderer Ionenkanäle, wie dem „epithelial sodium channel“ (ENaC), dessen Expression in Gegenwart von CFTR reduziert wird oder dem „outwardly rectifying chloride channel“ ORCC, beeinflusst [22]. Die verminderte Chloridsekretion über CFTR und ORCC sowie eine gesteigerte Natriumresorption durch ENaC reduziert das epitheliale Flüssigkeitsvolumen bei gleichbleibender Osmolarität und Elektrolytzusammensetzung („isotonic, low-volume-Hypothese“) [23, 24]. Die Folgen sind ein verminderter periziliärer Flüssigkeitsfilm sowie eine vermehrte Produktion visköseren Sekretes mit Beeinträchtigung der mukoziliären Clearance bei CF-Patienten [25–27].

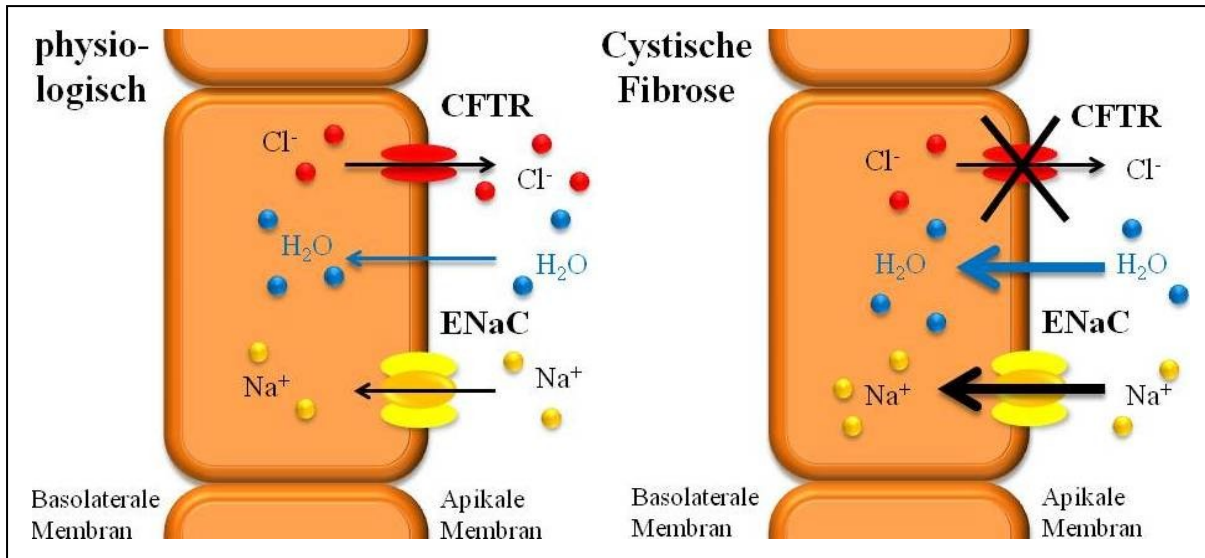


Abbildung 1: Osmotische Dysregulation durch defekten Chloridkanal, modifiziert nach [28].
Links: Physiologischer Ionentransport in der Zelle. *rechts:* Pathophysiologisch vermehrter Natrium- und Wassertransport in die Zelle durch defekten Chloridkanal bei CF.

1.1.3 CFTR und klinische Ausprägung

Bis heute sind über 1700 verschiedene Mutationen des CFTR-Gens identifiziert worden [29, 30]. Die häufigste Mutation, die in Deutschland zu etwa 70% auftritt, trägt den Namen $\Delta F508$ und bezeichnet das Fehlen der Aminosäure Phenylalanin (= F) an der Position 508 im CFTR-Protein. Homozygote Mutationsträger zeigen in 95% der Fälle spezifische Symptome der CF, deren klinische Ausprägungen jedoch stark variieren können [26]. Einerseits manifestieren sich bestimmte Mutationstypen unterschiedlich ausgeprägt an verschiedenen Organen. So lassen sich abhängig vom Phänotyp insgesamt sechs verschiedene Mutationsklassen finden, wobei eine CFTR-Mutation auch mehreren Klassen zugeordnet werden kann [2, 18, 31]. Andererseits können bei eher schwach ausgeprägten Mutationen, die beispielsweise noch eine Restfunktion des CFTR-Proteins aufweisen, weniger schwere Lungenveränderungen oder gastrointestinale Beeinträchtigungen beobachtet werden [26, 32] (Auswirkungen unterschiedlicher CFTR-Mutationen, siehe Tabelle 1). Auch können Patienten mit exakt der gleichen Mutation im CFTR-Gen einen sehr unterschiedlichen Krankheitsverlauf aufweisen. Grund hierfür sind neben Umweltfaktoren so genannte „modifier genes“ [33]. Heterozygote Genträger können ein erhöhtes Risiko für die allergische bronchopulmonale Aspergillose (ABPA), für eine Pankreatitis oder eine Sinusitis zeigen, bleiben jedoch bezüglich der CF meist klinisch asymptomatisch [4].

Tabelle 1: Auswirkungen unterschiedlicher CFTR-Mutationen

- Völliges Fehlen der CFTR-Proteinbiosynthese
- Reifungsstörung des CFTR-Proteins
- Geringere CFTR-Konzentrationsdichte in der Zelle
- Einschränkungen der Ionenleitfähigkeit
- Regulationsdefekt des CFTR-Ionenkanals

1.1.4 Chronische Inflammation

Die CF ist eine Multisystemerkrankung mit Befall aller sekretorischen Organe. Der primäre Defekt des epithelialen Elektrolyttransportes führt nicht nur in der Lunge, sondern auch an Leber, Pankreas und Reproduktionstrakt durch Bildung von viskösem Sekret zu einer obstruierenden kanalikulären Passagestörung [3]. Die progressiv obstruktive Lungenerkrankung stellt dabei jedoch die Hauptursache für Morbidität und Mortalität bei Patienten mit CF dar [1, 34]. Das Krankheitsgeschehen ist, beginnend bei der Geburt, mit einer histologisch weitgehend unauffälligen Lunge bis zur völligen Zerstörung der pulmonalen Struktur, vielschichtig und weitgehend ungeklärt [35].

Die Pathogenese der CF resultiert aus der angeborenen CFTR-Mutation, die zu einer reduzierten pulmonalen Immunabwehr durch eine primär eingeschränkte mukoziliäre Clearance sowie einer exzessiven aber ineffektiven Immunantwort führt [36]. Eine von den neutrophilen Granulozyten dominierende Atemwegsinfammation beginnt mit den ersten Lebenstagen und erfährt einen stetigen Progress vom Kindes- in das Erwachsenenalter. Welchen Einfluss dabei primär pulmonale Infektionen haben, wird kontrovers diskutiert. Studien Mitte der 90iger Jahre bei Säuglingen mit CF zeigten eine signifikante pulmonale Entzündungsreaktion ohne vorausgegangene mikrobielle Infektion [37, 38]. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass erst eine primäre, endogene Gewebsschädigung die initiale Keimbeseidlung ermöglicht [37]. Auf der anderen Seite wird vermutet, dass die unphysiologische oder fehlende CFTR-Aktivität zu Veränderungen der mukoziliären Clearance und einer Dehydratation der Atemwege mit Viskositätszunahme des Bronchialsekrets führt, die eine primäre Infektion mit pathogenen Keimen beschleunigt [23, 39]. Während in der gesunden Lunge inhalierte Bakterien rasch und ohne Entzündungsreaktion eliminiert werden, kommt es bei der CF zu einer Erregerpersistenz. Durch eine Vielzahl endogener Faktoren, basierend auf der CFTR-Mutation, sind zelluläre

Abwehrmechanismen ineffektiv und erschweren eine gezielte Erregerelimination. Hierzu zählen unter anderem eine Störung in der lipoxinregulierten Aktivierung neutrophiler Granulozyten [40] oder die CFTR modulierte Interleukin 1 β Ausschüttung [41]. Eine zusätzliche Vermehrung des epithelialen Asialo-GM1 (Gangliosid M1) Rezeptors der Atemwege ermöglicht eine gesteigerte Adhäsion von *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* und anderer, meist gramnegativer, Keime [42]. Es folgt eine chronische bakterielle Infektion, die eine anhaltende Inflammation unterhält und im späteren Krankheitsstadium rezidivierend akute Exazerbationen triggert. Der Zeitpunkt und das Ausmaß der Keimbesiedlung sowie die speziellen Adaptationsmechanismen der Bakterien, Ausbildung von Antibiotikaresistenz und Organisation in einem Biofilm, sind dabei entscheidend für die Prognose der CF [43, 44]. Die Folgen der dauerhaften Inflammation sind makro- und mikroskopische Bronchiektasien, Stenosen und Fibrosierungen der kleinen Atemwege, Atelektasen und Emphyseme [7, 45, 46], die durch sekundäre Beeinträchtigung der mukoziliären Clearance eine weitere bakterielle Retention begünstigen [47]. Die durch bakterielle Stimuli anhaltende Aktivierung und Rekrutierung inflammatorischer Zellen, insbesondere neutrophiler Granulozyten, fördern die Freisetzung proteolytischer und zytokiner Substanzen [48, 49]. Zellprodukte wie die neutrophile Elastase induzieren in bronchialen Epithelzellen die Expression von IL-8 [50], das eine chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten besitzt [51]. Es folgt ein Circulus vitiosus mit zunehmender und exzessiver Steigerung einer ineffektiven, neutrophilen Granulozyten dominierenden Erregerabwehr.

1.1.5 Neutrophile Granulozyten

Die initiale Entzündungsreaktion in den Atemwegen beginnt durch eine Interaktion von Makrophagen und bronchialen Epithelzellen mit bakteriellen Oberflächenstrukturen. Es folgt die Freisetzung einer Vielzahl von proinflammatorischen Zytokinen, wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), IL-1 β , IL-6 und IL-8, die daraufhin eine komplexe Inflammationskaskade in Gang setzen [52]. Am Ende steht die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten, die mit ihrer weiteren Ausschüttung von Zytokinen und Proteasen neben der eigentlichen bakteriellen Bekämpfung auch die extrazelluläre Matrix der Atemwege und des Lungenparenchyms zerstören. Der progrediente Funktionsverlust der Lunge ist damit, weniger durch bakterielle Exotoxine, als vielmehr mit der gesteigerten neutrophilen Granulozyten dominierenden Entzündungsreaktion assoziiert [49, 53–56].

Die destruierende Wirkung entfalten die neutrophilen Granulozyten dabei durch Freisetzung von Wasserstoffperoxid, Hypochlorsäure, neutrophile Elastase, Cathepsin G und Metalloproteinasen (MMPs) [51]. Insbesondere MMP-2 und MMP-9 werden eine zentrale Rolle in der chronisch pulmonalen Parenchymdestruktion zugeschrieben [7, 12, 57–59].

Die gesteigerte und anhaltende neutrophile Stimulation bei der CF ist Folge einer Dysregulation der Zytokinexpression. So liegen, verglichen mit anderen chronischen Lungenerkrankungen oder gesunden Probanden, die Interleukine IL-6, IL-8 und IL-1 β , die eine neutrophile Chemotaxis unterhalten, bei CF-Patienten in höheren Sputum- oder BAL-Konzentrationen vor [60, 61]. Das Interleukin 10 hingegen, welches in neutrophilen Granulozyten die Apoptose einleitet und damit die Entzündungsreaktion kontrolliert, ist in der Expression bronchialer Epithelzellen reduziert [62]. Ursächlich für diese Fehlregulation der Zytokine ist eine gesteigerte Aktivität des nuklearen Transkriptionsfaktors κ B (NF- κ B) [63, 64], der durch das Fehlen des CFTR-Gens beeinflusst wird [17, 36]. Neben dem direkten Einfluss der CFTR-Mutation auf die chronische Inflammation führt der Zerfall neutrophiler Granulozyten mit Freisetzung von DNA und konsekutiver Steigerung der Sekretviskosität zu einer sekundären Reduktion der mukoziliären Clearance, die chronische und akute bakterielle Infekte beschleunigt [47].

1.1.6 Akute pulmonale Exazerbation

Die anhaltende Rekrutierung sowie die gesteigerte Überlebensdauer der neutrophilen Granulozyten im pulmonalen Kompartiment unterhalten den chronisch infektiösen und inflammatorischen Prozess. Eine akute Entgleisung dieser Homöostase mit einer gesteigerten endobronchialen Proliferation bakterieller Erreger, im Besonderen durch *Pseudomonas aeruginosa*, mit gleichzeitiger systemischer Entzündungsreaktion wird als pulmonale Exazerbation bezeichnet. Die Vielzahl unterschiedlicher Symptome im Verlauf einer akuten Exazerbation erschwert eine einheitliche Definition, was die Differenzierung von Studienergebnissen beeinträchtigt. Die standardisierte Erhebung von klinischen Symptomen oder Untersuchungsbefunden stellt den Versuch dar, einen einheitlichen Bewertungsstandard der akuten pulmonalen Exazerbation von CF-Patienten festzulegen [65–67]. Obwohl alle drei Arbeiten gute Übereinstimmungen untereinander zeigen, unterliegen klinische Symptome jedoch dem subjektiven Eindruck des Untersuchenden. Darüber hinaus ergeben sich Schwierigkeiten bei der klinischen Abgrenzung einer therapiebedürftigen bakteriell bedingten akuten Exazerbation von einer Virusinfektion. Die Etablierung eines laborchemischen

Parameters könnte hierbei zur Objektivierung der Krankheitsintensität beitragen. Nachweislich führen rezidivierende Infektexazerbationen zu einem starken und irreparablen Remodeling des Lungenparenchyms [68, 69]. CF-Patienten profitieren daher bei drohender Exazerbation von einer frühzeitigen intravenösen antibiotischen Therapie.

1.1.7 Therapieoptionen

Häufige und langwierige Lungeninfekte können auf Dauer zu einem Cor pulmonale und einer Lungeninsuffizienz führen [19]. Atemnot und chronischer Sauerstoffmangel sind die Folge und bilden bei einem Teil der betroffenen Patienten Uhrglasnägel und Trommelschlegelfinger [70]. Therapeutisch versucht man schon frühzeitig bakterielle Infektionen mit oralen Antibiotika zu behandeln [43]. Mit höherem Lebensalter nehmen Infektion mit chemotherapeutisch resistenten und biofilmproduzierenden Keimen, wie MRSA und *Pseudomonas aeruginosa*, zu und erschweren eine wirksame antibakterielle Therapie [44, 71]. Eine frühzeitige Suppression oder Eradikation kann nachweislich die Langzeitprognose der CF-Patienten verbessern [2, 72]. Neben dem Freihalten der Atemwege mittels Physiotherapie, Expektoranzien oder Sekretolytika, ist ein weiterer wesentlicher Bestandteil die antiinflammatorische Therapie mit oralen oder inhalativen Glukokortikoiden, hoch dosiertem Ibuprofen oder Fischölen [46]. Zunehmend wird auch der Einsatz von synthetischen Proteaseinhibitoren zur Erhaltung der Homöostase geprüft [73]. Als letzter Ausweg, bei deutlich eingeschränkter Lungenfunktion durch häufige Entzündungen, bleibt bislang nur die Lungentransplantation [74].

<p style="text-align: center;">Sekretelimination</p> <p style="text-align: center;">Physiotherapie: Autogene Drainage; Thoraxmobilisation</p>	<p style="text-align: center;">Antiobstruktive/ antiinflammatorische Therapie</p> <p style="text-align: center;">Inhalative Kortikosteroide</p>
<p style="text-align: center;">Inhalationstherapie</p> <p style="text-align: center;">Beta-2-Sympathomimetika zur Dilatation der Bronchien</p>	<p style="text-align: center;">Antibiotische Behandlung</p> <p style="text-align: center;">Orale Langzeittherapie wirksam gegen Staphylokokken; intravenöse Therapie bei Exazerbation: kalkuliert bzw. entsprechend Antibioogramm</p>

Abbildung 2: Die vier Säulen der pulmonalen Therapie bei CF-Patienten

1.1.8 Hepatische Beteiligung

Mit höherem Lebensalter erwachsener CF-Patienten findet sich neben der pulmonalen Erkrankung eine zunehmende klinische Manifestation anderer Organe. Die hepatobiliäre Beteiligung nimmt dabei nach der Lungenfunktionsstörung und Transplantationskomplikationen die dritthäufigste zum Tode führende Ursache bei CF-Patienten ein [75, 76]. Identisch mit der pulmonalen Dysfunktion beginnt die Lebererkrankung zu einem frühen Zeitpunkt, wird aber aufgrund fehlender oder unspezifischer Symptome im Krankheitsverlauf zumeist erst spät diagnostiziert [77–79]. Ein unvorhersehbarer Erkrankungsprogress von Leberzirrhose und pulmonaler Hypertonie macht eine frühzeitige Diagnose jedoch unverzichtbar [79]. Die Ursachen der Lebermanifestation sind dabei vielfältig. Colombo et al. beschreiben neben spezifischen Veränderungen direkt am CFTR-Gen, auch iatrogene Schädigungen, z.B. durch chronische Medikamenteneinnahme oder Funktionsstörungen außerhalb des Leberparenchyms [80, 81]. Das defekte CFTR-Protein, lokalisiert im Gallenblasenepithel sowie in der apikalen Membran von Cholangiozyten der Gallengänge, führt durch Sekretionsstörung zu einem visköseren Gallensaft mit lokalem Gallenstau (Cholestase) [22]. Die Folge ist eine Retention toxischer Gallensäuren sowie eine Hochregulation von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Peroxiden [81], die durch Aktivierung hepatischer Sternzellen eine periduktale Fibrose induzieren [82, 83]. Die Progression von der Cholestase über eine fokale (zentrale) bis hin zu einer multilobulären biliären Zirrhose kann Jahre oder Jahrzehnte dauern und wird als ein stetiger Prozess angesehen [77, 84]. Das Auftreten einer hepatobiliären Manifestation ist dabei neben dem männlichen Geschlecht, einem bekannten Mekoniumileus oder einer Pankreasinsuffizienz häufiger mit spezifischen CFTR-Mutationen assoziiert [78].

1.2 Die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)

Die Matrix-Metalloproteinasen gehören zur Familie der zinkabhängigen Endopeptidasen, die die Fähigkeit besitzen, Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) zu spalten. Derzeit unterscheidet man 26 MMPs und unterteilt diese bezüglich ihrer Substratspezifität und ihres Molekulargewichtes [85]. Eine wichtige Rolle spielen sie bei physiologischen und pathophysiologischen Um- und Abbauprozessen der EZM. Man findet sie bei einer Vielzahl von menschlichen Erkrankungen, einschließlich der Arthritis [86], kardiovaskulären Erkrankungen [87] sowie der Tumorausbreitung und -metastasierung [88–90]. Eine entscheidende Rolle spielen die MMPs zudem bei Entzündungsreaktionen [91], Reparationsvorgängen [92], der Zellwanderung [93] und der Angiogenese [94]. Verschiedene Zellen der EZM, Fibroblasten, Entzündungszellen, Endothel- und Epithelzellen, exprimieren die MMPs. Im besonderen Maße konnte bei chronischen Entzündungen eine vermehrte Expression der MMPs, insbesondere MMP-8 und MMP-9, aus neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden [6, 36, 95].

1.2.1 Domänenstruktur der MMPs

Der strukturelle Proteinaufbau der MMPs besteht, bis auf wenige Ausnahmen, beginnend vom N-terminalen Ende aus einem Signalpeptid, einem Propeptid, einer katalytischen Einheit mit einer hochkonservierten zinkbindenden Region und einer Hämopexindomäne, deren Funktion in der Substratbindung besteht [96]. Letztere ist mit der katalytischen Domäne über die Hinge-Region verbunden. Die membranständigen MMPs besitzen zusätzlich am C-terminalen Ende eine transmembrane und zytoplasmatische Domäne, die eine Verankerung in der Zellmembran ermöglicht [97, 98]. Während das Signalpeptid den intrazellulären Transport zur Plasmamembran ermöglicht, an der die MMPs zumeist inaktiv sezerniert werden, ist das Propeptid entscheidend für die extrazelluläre Aktivierung. Die proteolytische Aktivität der einzelnen MMPs ist selektiv für ein Spektrum von Proteinen der EZM, wie bspw. Kollagen, Fibronectin, Laminin, Proteoglykane, Elastin, Vitronectin, Entaktine und Aggrekan, zusätzlich besteht eine überlappende Substratspezifität [96, 97].

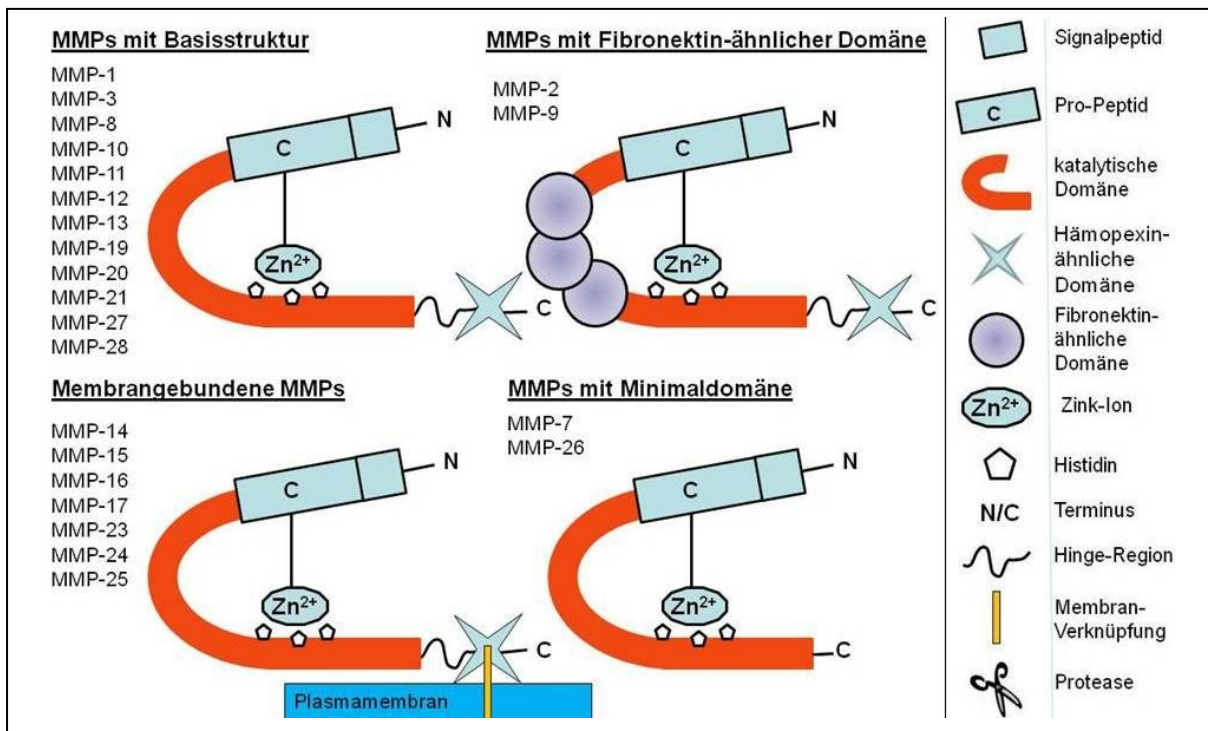


Abbildung 3: Schematischer Aufbau der MMPs, modifiziert nach [99]. Schematische Darstellung von vier im Aufbau unterschiedlichen MMP-Gruppen. Alle MMPs weisen eine katalytische Einheit mit einem Zinkion, einem Signalpeptid und einem cysteinhaltigen Propeptid auf. Die einzelnen Untergruppen besitzen zusätzliche Einheiten; die Gelatinasen beispielsweise das Fibronectin vom Typ II oder die membrangebundenen MMPs eine Transmembrandomäne. Die MMPs mit Minimaldomäne weisen weder eine Hinge-Region noch eine Hämopexin-ähnliche Domäne auf.

Neben der strukturellen Klassifikation werden die MMPs nach ihrer Substratspezifität in sieben Hauptgruppen unterteilt. Die *interstitiellen Kollagenasen* (MMP-1, MMP-8, MMP-13 und MMP-18) degradieren das native fibrilläre Kollagen durch Spaltung von Kollagen Typ I, II, III und V. Die daraus entstandenen kleineren Peptidfragmente werden durch andere MMPs weiter abgebaut. Hierzu zählen unter anderem die *Gelatinasen A und B* (MMP-2 und MMP-9), die zusätzlich selektiv Kollagen Typ IV spalten können. Die dritte Gruppe bilden die *Stromelysine* (MMP-3, MMP-10 und MMP-11). Sie degradieren vor allem die nicht kollagenen Domänen des Kollagen Typs IV, Fibronectin und Laminin. MMP-12 bildet die eigenständige Gruppe der *Metalloelastasen* und besitzt, wie sich aus dem Namen ableiten lässt, als Hauptsubstrat das Elastin. Einige MMPs zeichnen sich durch eine zusätzliche transmembranäre Domäne aus. Sie unterscheiden sich von den löslichen MMPs und werden in die Gruppe der *membrangebundenen MMPs* oder auch MT-MMPs (membran type matrix metalloproteinase) zusammengefasst. *Matrilysin* (MMP-7) degradiert verschiedenste

Proteoglykane, wie Laminin, Fibronectin und Vitronectin und bildet eine eigene Gruppe. Die *nicht klassifizierten MMPs* werden in einem letzten Kollektiv zusammengefasst [96].

1.2.2 Regulation der MMPs

Die Aktivität der MMPs kann auf unterschiedliche Weise reguliert werden. Auf zellulärer Ebene erfolgt diese Regulation transkriptionell sowie posttranskriptionell. Extrazellulär müssen inaktive Vorläuferstufen der MMPs, so genannte proMMPs, erst durch Abspaltung ihres Propeptids aktiviert werden [97, 98]. Die transkriptionell gesteuerte Proteinsynthese unterliegt einer komplexen Regulation aus induzierenden und supprimierenden Faktoren. Wachstumsfaktoren aus Epithelzellen (EGF), Fibroblasten (β -FGF) oder Thrombozyten (PDGF) sowie Zytokine, wie der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin 1 (IL-1) sowie IL-6, aktivieren die Proteinsynthese der MMPs. Auch freie Sauerstoffradikale bewirken eine direkte Aktivierung der Transkription. Heparine, Retinoide und Kortikosteroide weisen hingegen eine inhibitorische Wirkung auf [97].

Tabelle 2: Beeinflussung der Transkription von MMPs, modifiziert nach [97]

Induktoren	Suppressoren
Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)	Heparine
Interleukin 1 und 6 (IL-1 und IL-6)	Retinoide (Vitamin A)
Wachstumsfaktoren (EGF, β -FGF, PDGF)	Kortikosteroide
Freie Sauerstoffradikale	Tetrazykline
Prostaglandine (PG) F2 α	Antrazykline

Eine weitere Regulierungsebene ergibt sich in der vesikulären Speicherung der MMPs, vor allem in polymorphkernigen Granulozyten (PMN). Entzündliche Prozesse triggern durch chemotaktische Faktoren, wie beispielsweise IL-8, Komplementfaktoren oder bakterielle Antigene ihre Freisetzung [97]. Extrazellulär erfolgt ein weiterer Kontrollmechanismus durch die inaktiv sezernierten MMPs (proMMPs). Das Propeptid enthält eine hochkonservierte Sequenz mit einem ungepaarten Cysteinrest (PRCGVPD), der das Zinkion der katalytischen Domäne bindet. Erst Proteolyse, Oxidation oder andere Einflüsse am Propeptid können eine Konformationsänderung der 3D-Struktur bewirken, die das Zinkion vom Cystein freilegt

(cystein switch). Die Initialproteolyse kann beispielsweise durch Trypsin, Plasmin, bakterielle Proteinasen, Elastase, andere MMPs oder aber durch einen autoproteolytischen Vorgang, anhängig von pH-Wert und Temperatur, ausgelöst werden. Das intermediäre Molekül wird erst durch die vollständige Abspaltung des Propeptids aktiviert [96–98, 100]. Neben ihrer Fähigkeit die EZM zu degradieren, greifen MMPs durch Freisetzung von Mediatoren entscheidend in extrazelluläre Signalwege ein und wurden zudem auch im Zellkern nachgewiesen [101].

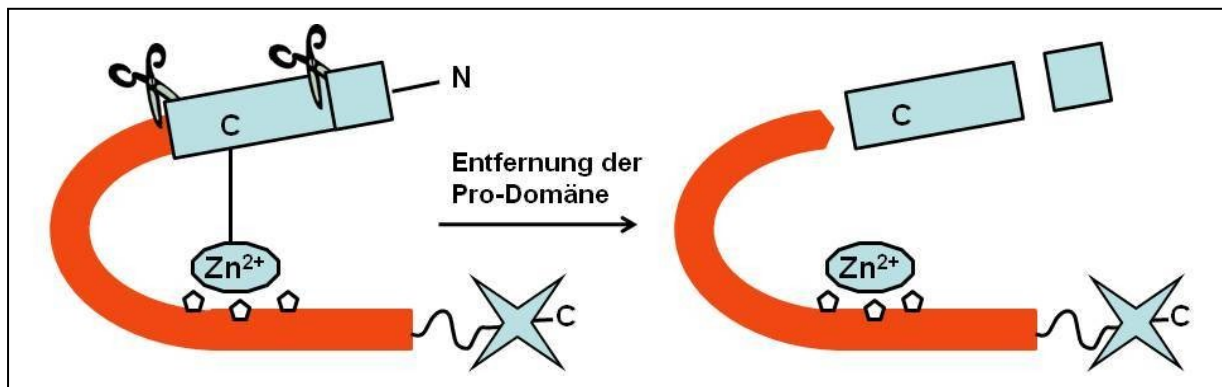


Abbildung 4: Aktivierung durch Abspaltung der Prodomäne, modifiziert nach [99]. Der Cysteinrest des Propeptids bindet an das Zinkion der katalytischen Domäne. Diese Cystein-Zink-Bindung maskiert das aktive Zentrum. Erst durch proteolytische Abspaltung des Propeptids erfolgt die Aktivierung der MMPs (Cystein-switch).

1.2.3 Die Bedeutung von MMP-2 und MMP-9

Die Gelatinasen MMP-2 (Gelatinase A) und MMP-9 (Gelatinase B) stellen mit ihrer besonderen Primärstruktur innerhalb der MMP Familie eine eigene Untergruppe dar. Beide Proteasen tragen drei Fibronectin Typ II Module innerhalb der katalytischen Domäne, die die enzymatische Interaktion mit kollagenen Bestandteilen begünstigen [97, 102]. Am C-terminalen Ende ermöglicht die Hämopexindomäne beider MMPs mit den Gewebsinhibitoren (TIMPs) zu interagieren [103].

Gelatinase A (MMP-2) ist eine Protease, die in der latenten Form ein Molekulargewicht von ~72kDa und in der aktiven Form von 62kDa besitzt. Fibroblasten, Endothel- und Tumorzellen stellen dabei die hauptsächlichen Expressionsorte dar. Ihre Substrate sind vielzählig und neben Kollagen vom Typ IV, welches die Hauptkomponente der Basalmembran darstellt, finden sich auch Kollagen Typ V, VII, X und XI sowie Laminin, Fibronectin und Elastin [103]. Während die meisten proMMPs über lösliche Faktoren aktiviert werden, findet die

Aktivierung von proMMP-2 über einen zelloberflächengebundenen MT1-MMP-TIMP-2-Komplex statt [104].

Tabelle 3: Die Matrix-Metalloproteinasen 2, 8 und 9, modifiziert nach [97].

MMP	Synonyme	Bildungsorte	Matrixsubstrate
2	Gelatinase A, 72kDa- Gelatinase	Fibroblasten, Endothelzellen, Tumorzellen (Lunge, Ovarien, Pankreas, Kolon, Prostata)	Kollagen des Typs I, IV, V, VII, X, XI, XIV sowie Laminin, Fibronectin, Tenascin C, α 1-Proteinase-Inhibitor, Myelinbase-Protein, Elastin, Laminin, Aggrecan, B Amyloid, Versican, Gelatin, MMP-9, MMP-13
8	Neutrophile Kollagenase, PMN- Kollagenase	Neutrophile Granulozyten, Tumorzellen (Mamma)	Kollagene Typ I, II, III, V, VII, VIII, X, Aggrecan, Gelatine, Fibronectin, α 2-Antiplasmin
9	Gelatinase B 92kDa- Gelatinase	Neutrophile Granulozyten, Endothel- und Epithel- zellen, Tumorzellen (Lunge, Pankreas, Kolon, Rektum, Mamma, Ovar)	Kollagene Typ IV, V, VII, X, XIV, Gelatine, Elastin, Aggrecan, Versican, Nidogen, Fibronectin, Vitronectin, α 1-Proteinase-Inhibitor, Plasminogen

Die Gelatinase B (MMP-9) besitzt im Unterschied zur MMP-2 eine zusätzliche prolinreiche Kollagen Typ V ähnliche Aminosäuresequenz (54 Aminosäuren) zwischen der katalytischen und der Hämoexindomäne, deren Funktion bisher unbekannt ist. Ein Schutz vor Degradation wird diskutiert [105]. Die posttranslationale Glykosidierung von Oligosacchariden der Prodomäne führt zu einem MMP-9 Monomer von ungefähr 92kDa. Weiterhin kann MMP-9 in mehreren Komplexen, im Folgenden als Isoenzyme bezeichnet, vorliegen. Die kovalente Bindung zweier Monomere über eine Disulfidbrücke bildet ein MMP-9 Homodimer mit ungefähr 220kDa. Beide Formen besitzen trotz unterschiedlicher Molekülmasse identische Eigenschaften und spalten kollagene Substrate mit ähnlicher Effizienz [106]. Neben Tumorzellen, Endo- und Epithelzellen, sind es vor allem die Entzündungszellen, die vermehrt MMP-9 exprimieren. Kollagen-Typ II, IV und V werden genauso gespalten, wie Gelatin,

Galektin-3 und Elastin [107]. Ein weiteres MMP-9 Isoenzym besitzt ein Molekulargewicht von ungefähr 125-130kDa. Hierbei handelt es sich um einen heterodimeren Komplex aus MMP-9 und Lipocalin, einem 25kDa großen Protein, welches spezifisch durch neutrophile Granulozyten sekretiert wird. Dieser MMP-9/NGAL Komplex ist ebenso wie das Homodimer über eine Disulfidbrücke verbunden [106, 107]. Häufiger bildet MMP-9 jedoch mit seinem endogenen Inhibitor TIMP-1 (siehe Kapitel 1.2.4) einen Komplex über die Hämopexindomäne [108]. Diese nicht kovalente Bindung zwischen den beiden Molekülen unterbindet die degradierende Eigenschaft von MMP-9. Zusammen ergeben sie eine Molekülmasse von ca. ~175kDa. Das inaktive Monomer von ca. 92kDa wird nach Abspalten der Prodomäne, bspw. durch Stromelysin-1, in die aktive Form von ca. 78kDa überführt [103, 106, 109]. Neben der Aktivierung des Monomers wird auch die Existenz eines aktivierten MMP-9 Homodimers mit ca. 200kDa sowie eines aktivierten MMP-9/NGAL Heterodimers mit ca. 115kDa diskutiert [110].

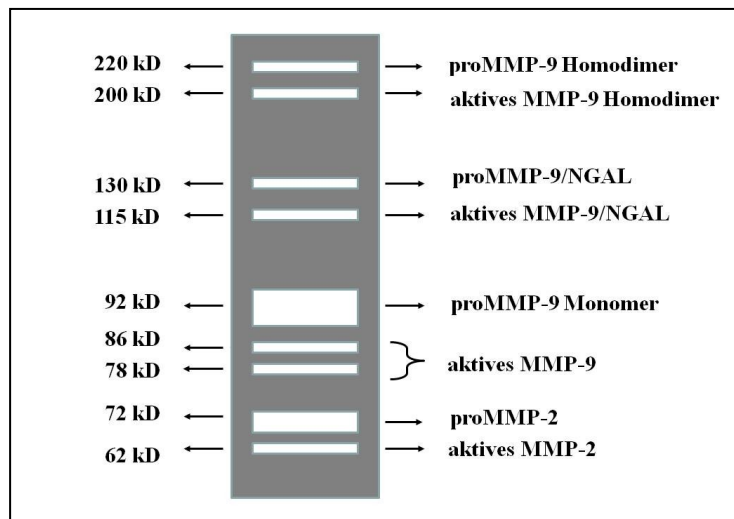


Abbildung 5: Schematische Darstellung der zymographischen MMP-2/9 Isoenzyme. Dargestellt sind alle MMP-2 und MMP-9 Isoenzyme mit Angabe der ungefähren Molekülmassen.

1.2.4 Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs)

Den MMPs kommen im ganzen Körper zahlreiche physiologische Aufgaben zu. So sind sie unersetzlich bei der Abwehrfunktion [91], der Wundheilung [92] und Gefäßneubildung [94]. Bei chronischen Entzündungen kann es jedoch zu einer Überexpression der aktivierten Proteinases kommen, die eine vermehrte Degradation körpereigener Strukturen zur Folge hat. Zum Schutz der EZM vor einer überschießenden Aktivität der MMPs existieren, zusätzlich

zur Regulierung durch Transkription, Translation und lokalen Aktivierung, spezifische und unspezifische Inhibitoren. Zu den unspezifischen Inhibitoren zählt man unter anderem das α 2-Makroglobulin, die Familie der „tissue inhibitors of matrix metalloproteinases“ (TIMPs) bildet die Gruppe der spezifischen Inhibitoren. Entscheidend ist das Zusammenspiel von MMPs und TIMPs für das „tissue remodeling“. Ein Übermaß der MMPs verstärkt die Degradation der EZM [111], eine Dominanz der TIMPs ist mit einer verstärkten Fibrosierung assoziiert [112–114]. Erst ein ausgewogenes Gleichgewicht zwischen Protease und Antiprotease ermöglicht eine koordinierte Gewebemöostase [115].

Derzeit sind vier verschiedene TIMPs bekannt: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 und TIMP-4 [107]. Eine Vielzahl von Bindegewebszellen, wie Fibroblasten und Chondrozyten oder auch Makrophagen sind in der Lage TIMPs zu bilden. Über das C-terminale Ende binden sie an das aktive Zentrum latenter und aktiver MMPs im Verhältnis 1:1 und entfalten so ihre inhibitorische Wirkung [116]. Unterschiedliche Wachstumsfaktoren und Zytokine steuern je nach TIMP-Subtyp die Expression [117, 118]. Eine primäre Aktivierung der Inhibitoren wie bei den MMPs besteht nicht. Zusätzlich zur natürlichen Gegenregulation der MMP Aktivität besitzen TIMPs eine gut belegte Antitumorwirkung [89]. Auch eine MMP unabhängige, wachstumsfördernde und antiapoptotische Eigenschaft wird diskutiert [119]. Obwohl die vier bekannten Vertreter der TIMPs durch ihre ähnlichen strukturellen Eigenschaften unspezifisch an allen MMPs binden können, zeigen sich höhere Affinitäten zu bestimmten Reaktionspartnern. Dies findet eine besondere Bedeutung im therapeutischen Einsatz bei Tumoren [89, 90, 110] oder auch bei chronischen Lungenerkrankungen [120]. TIMP-1 inhibiert bevorzugt MMP-1 oder MMP-9, wohingegen TIMP-2 eher mit MMP-2 eine Bindung eingeht [103, 107].

TIMP-1, der erste entdeckte spezifische MMP Inhibitor hat ein Molekulargewicht von ca. 28,5–31kDa und kann außer MMP-14 und MMP-19 alle MMPs in ihrer Wirkung hemmen. Bei MMP-9 kann TIMP-1 mit der monomeren und mit der homodimeren Form einen Komplex bilden, wobei es mit dem Monomer ein stöchiometrisches Verhältnis von 1:1 eingeht. Beim Homodimer liegen zwei hochaffine Bindungsstellen im Bereich der Hämopexindomäne vor, so dass zwei TIMP-1 gebunden werden können [106]. Wichtige Produktionsorte für TIMP-1 sind neben Monozyten, Makrophagen und Synovialzellen auch Fibroblasten und humane Hepatozyten [118]. Eine Steigerung der TIMP-1 Expression konnte durch TGF- β 1, IL-6, IL-11, CNTF und andere Zytokine gezeigt werden [121]. IL-1 und TNF- α wirken im Gegensatz dazu hemmend auf die TIMP-1 Expression [107].

1.3 Die Rolle der MMP Isoenzyme bei der cystischen Fibrose

Die chronischen pulmonalen Infekte der CF-Patienten sorgen auf unterschiedlichste Weise für eine inflammatorische Reaktion im Respirationstrakt. Angelockt von einer Vielzahl von Zytokinen und Mediatoren verlassen inflammatorische Zellen, allen voran die neutrophilen Granulozyten, das pulmonale Kapillarbett und wandern ins alveoläre Gewebe. Dabei müssen sie die sonst undurchlässige Basalmembran, eine dichte Schicht aus Kollagen und anderen Komponenten der EZM, passieren [122]. Für die Diapedese stehen den neutrophilen Granulozyten in Vesikeln gespeicherte Enzyme zur Verfügung. Hierbei handelt es sich unter anderem um MMP-8 (neutrophile Kollagenase), MMP-9 und die neutrophile Elastase.

In mehreren Studien über entzündliche Lungenerkrankungen zeigte sich eine Erhöhung dieser MMPs, beispielsweise beim acute respiratory distress syndrom (ARDS) [57], beim Asthma [123] oder bei der chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [9, 12, 124]. Andere Arbeiten über chronische Lungenentzündungen [11, 125], idiopathische pulmonale Fibrose [8] oder Bronchiektasien [126] demonstrierten zudem, dass eine Überexpression an MMP-9 in Zusammenhang mit Strukturschäden der Lunge steht. Auch bei CF-Patienten konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass vor allem die Gesamtkonzentrationen an MMP-8 und MMP-9 im Sputum oder der bronchoalveolären Lavage (BAL) hochreguliert sind und mit einer Reduktion der Lungenfunktion einhergehen [6, 7, 16, 127-129]. Ob und in wie weit sich diese lokalen Ergebnisse des bronchopulmonalen Systems auch im Blut bei adulten CF-Patienten widerspiegeln, wurde bisher nicht untersucht. Eine systemische Hochregulation der MMPs unter einer akuten pulmonalen Exazerbation, könnte damit unter Umständen auch einen pathogenen Einfluss auf andere Organe, beispielsweise die Leber, haben. Auch bleibt bisher unberücksichtigt wie sich die unterschiedlichen MMP-2 oder MMP-9 Isoenzyme bei CF-Patienten verhalten. In den bisherigen Untersuchungen wurde entweder mit Hilfe des ELISAs alleinig die MMP-9 Gesamtkonzentration bestimmt [7, 128] oder ein rein qualitativer Nachweis von aktiviertem MMP-9 Monomer, MMP-9/NGAL Heterodimer oder MMP-9 Homodimer in Sekreten von CF-Patienten bestätigt [6, 15, 127]. Semiquantitativ demonstrierten Delacourt und Mitarbeiter bei CF-Kindern mit Exazerbation die erhöhte Expression einer aktiven 88kDa Gelatinase, die mit kollagenen Abbauprodukten assoziiert war. Die Autoren kamen zum Schluss, dass das Verhältnis der 95/88kDa Gelatinase eine entscheidende Rolle in der pulmonalen Pathogenese bei der CF spielen könnte. Eine quantitative Untersuchung mehrerer MMP-2 und MMP-9 Isoenzyme, insbesondere vor dem Hintergrund, dass einige Isoenzyme erst in wenigen Arbeiten über Tumorgewebe [130] oder

Angiogenese [110] beschrieben wurden, existiert für die CF oder andere chronische Lungenerkrankungen nicht.

1.3.1 Exazerbation

Im Rahmen akut pulmonaler Inflammation kommt es zu einer vermehrten Rekrutierung neutrophiler Granulozyten aus der Blutbahn in das alveoläre Kompartiment. Für die Diapedese der immunologischen Zellen durch die Basalmembran spielen die Gelatinasen MMP-8 und MMP-9 eine entscheidende Rolle [131]. Erst die proteolytische Degradierung von Elastin, Fibronectin und weiterer Bestandteile der Basalmembran durch MMP-9 ermöglicht die Diapedese der neutrophilen Granulozyten in das extravaskuläre Gewebe [132]. Torii und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die MMP-9 Konzentration mit dem 7S-Kollagen, einem Marker für die Zerstörung der Basalmembran, korreliert [133]. Delclaux und Mitarbeiter konnten im Weiteren demonstrieren, dass die Inhibition von MMP-9 durch TIMP-1 die Zellmigration von neutrophilen Granulozyten unterbindet [55]. Der Einsatz des synthetisch hergestellten MMP-Inhibitors Batimastat reduzierte auf diese Weise die alveolokapilläre Destruktion [53].

Auch auf anderen Wegen kann das Lungengewebe dauerhaft geschädigt werden. So kann MMP-9 indirekt durch Wechselwirkungen mit regulatorischen Proteinen eine pulmonale Destruktion bewirken. Hierzu zählt beispielsweise die α 1-Antiproteinase. Deren physiologische Funktion ist es, freie Radikale oder eine überschießende Enzymreaktion in der Lunge zu inhibieren. Wird die α 1-Antiproteinase durch eine erhöhte MMP-9 Konzentration im Serum verstärkt abgebaut, entfällt diese Inhibition. Interleukin 8 kann zudem von MMP-9 in eine noch aktivere Form überführt werden, die wiederum zu einer höheren Konzentration an MMP-9 führt [134]. Auch die neutrophile Elastase aus Granulozyten, die bei Exazerbation freigesetzt wird, führt zu verstärkter Gewebsschädigung durch Inhibition von TIMP-1 und Aktivierung von MMP-9 [135]. Dieser circulus vitiosus bewirkt eine weitere Inaktivierung der wichtigen Inhibitoren. Schlussendlich resultiert ein Ungleichgewicht von Proteasen und Inhibitoren mit einer immer weiter ansteigenden proteolytischen Aktivität. Die chronische Zerstörung der EZM und die alveolokapillären Schäden führen über Jahre zu einem Remodeling der Lunge, an deren Ende die Lungeninsuffizienz steht.

2 Zielsetzung und Hypothese

Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und deren spezifische Inhibitoren (TIMPs) eine wichtige Rolle im Krankheitsprozess bei Patienten mit cystischer Fibrose (CF) spielen. Insbesondere konnte eine Erhöhung der Gesamtkonzentration von MMP-2 und MMP-9 im Serum von CF-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden beobachtet werden [14, 136]. Die unterschiedlichen Konzentrationen der einzelnen Isoenzyme von MMP-2 und MMP-9 hingegen, wurde bisher weder für die CF noch für andere chronische Atemwegserkrankungen untersucht. Das Verständnis der Regulationsmechanismen von MMPs sowie deren Funktion beim Remodeling der Atemwege könnten wichtige Hinweise über die zukünftigen Therapiemöglichkeiten der CF aufzeigen. Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist die quantitative Analyse aller Isoenzyme, welche in weiteren Schritten in Bezug zu klinischen und weiteren laborchemischen Parametern gesetzt werden soll.

2.1 Quantitative Zymographie

Für die Bestimmung der MMP-2 und MMP-9 Isoenzyme kann die herkömmliche Analyse mit dem ELISA nicht eingesetzt werden, da aktuelle Messverfahren für diese Fragestellung nicht zur Verfügung stehen. Das Verfahren der Zymographie, bisher auf den qualitativen oder semiquantitativen Enzymnachweis beschränkt, soll dabei so angepasst werden, dass eine quantitative zymogene Proteasenbestimmung, äquivalent zum ELISA, möglich ist. Die ELISA Ergebnisse von Roderfeld et al. [14] sollen mit der vorliegenden Arbeit zunächst anhand der Gesamtkonzentrationen von MMP-2 und MMP-9 bestätigt werden.

2.2 MMP-2 und MMP-9 Isoenzyme

Nach Verifizierung der Isoenzyme mit Western Blot und Massenspektrometrie sollen insbesondere folgende Fragen bei klinisch stabilen CF-Patienten untersucht werden:

- Welche Aktivitätsunterschiede lassen sich zwischen den einzelnen Isoenzymen finden und ergeben sich dadurch Hinweise auf den Expressionsort?

- Zeigen sich Gemeinsamkeiten zwischen den im Serum bestimmten Isoenzymen und den organspezifischen Blutparametern, wie dem CRP, den neutrophilen Granulozyten oder den Leberwerten?
- Wie korrelieren die klinischen Parameter, wie beispielsweise die Lungenfunktion, mit den Isoenzymen?
- Die spezifischen Inhibitoren der MMPs, die TIMPs, sind entscheidend für ein ausgeglichenes Protease/Antiprotease Verhältnis. Welcher gegenseitige Einfluss von TIMP-1 und den Isoenzymen lässt sich beobachten und gibt es ggf. Hinweise auf ein Ungleichgewicht von Proteasen und Inhibitoren?

2.3 Akute Exazerbation und intravenöse Therapie

Im Rahmen von akuten Exazerbationen kommt es bei CF-Patienten zu einem sprunghaften Anstieg von MMP-9 [6, 14, 16]. Neben der Fragestellung, wie sich die einzelnen Isoenzyme in ihrer Aktivität bei einer akuten Exazerbation verhalten, stehen die aktivierten MMPs, die mit einer erhöhten Zerstörung des Lungenparenchyms assoziiert werden, im Mittelpunkt des Interesses [16]. Die Hypothese der vorliegenden Arbeit ist, dass die aktivierten MMPs als serologischer Biomarker zur Diagnostik einer akuten Exazerbation oder der Erkrankungsschwere dienen können. Weiterhin wird der Frage nachgegangen, ob nach intravenöser antibiotischer Therapie eine Reversibilität der Isoenzyme erreicht werden kann.

3 Material und Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurde zum qualitativen und quantitativen Nachweis von MMP-2 und MMP-9 die Zymographie angewandt. Damit war es nicht nur möglich das Vorliegen der Gelatinasen nachzuweisen, sondern auch deren Konzentrationen in einer Probe zu untersuchen. Eine zusätzliche quantitative Bestimmung der MMP-2, MMP-8 und MMP-9 Gesamtkonzentration wurde mit Hilfe von ELISA Assays durchgeführt und mit den Werten der Zymographie verglichen. Ein besonderer Schwerpunkt wurde hierbei auf den Vergleich von Serumproben gelegt, die vor und nach antibiotischer Therapie bei Patienten mit CF abgenommen wurden.

3.1 Material und Chemikalien

Für die Zymographie wurden folgende Materialien verwendet: Eppendorf-Pipetten, Eppendorf-Tubes mit Halter, Wasserbad, Gelkammer mit Kämmen, Gießstände, Färbewanne, feine Pipettenspitzen zum Beladen der Gele, Laborglas und Spannungsgeber. Die Chemikalien für die Zymographie wurden von der Firma Merck, der Stoff Acrylamid (KMR-Gefahrenstoff) von der Firma Appli-Chem bezogen. Als Zymographie-Marker wurde ein humaner Gelatinase-Zymographiestandard für MMP-2 und MMP-9 mit der Katalog-Nr. CC073 der Firma Chemicon[®] International, für die Proteingrößenabschätzung bei der Zymographie wurde der Proteinstandard SeeBlue[®]Plus2 (Katalog-Nr. LC5925) der Firma Invitrogen verwendet. Zur quantitativen Bestimmung von aktiven MMP-9 wurde ein Aktivitäts-Assay mit dem Namen Fluorokine E[©], für die Bestimmung von humanem TIMP-1 Quantikine[©] und für die Gesamtkonzentration an MMP-2, MMP-8 und MMP-9 Fluorokine MAP multiplex[©] für humane MMPs gewählt. Alle drei Assays stellte die Firma R&D-Systems aus Wiesbaden zur Verfügung. Die Durchführung der Assays erfolgte entsprechend den Anweisungen des Herstellers.

3.2 Klinische Daten

Die Daten für diese Studie wurden von 58 CF-Patienten gewonnen, die sich im Zeitraum von Februar 2006 bis März 2007 regelmäßig in der pulmonologischen Ambulanz der Universitätsklinik Gießen vorgestellt haben. Die Kontrollwerte kommen dabei von 40 gesunden Personen, die sich ebenfalls im oben angegebenen Zeitraum im Klinikum vorstellten. Keiner der Freiwilligen zeigte zum Abnahmezeitpunkt des Blutes Infektions- oder Entzündungszeichen der Lunge. Personen mit Asthma in der Vergangenheit oder Raucher wurden ausgeschlossen. Alle CF- und Kontrollpatienten gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Verwendung der gewonnenen Untersuchungsmaterialien und Daten, nachdem sie ausführlich über die Studie aufgeklärt wurden. Die Datenerhebung und -auswertung sowie die Einverständnis- und Aufklärungsbögen zu dieser prospektiven Studie wurden von der Ethik-Kommission genehmigt (AZ 70/07).

Die Patienten stellten sich alle drei Monate zu regelmäßigen Kontrollen vor. Kürzere Abstände ergaben sich bei Patienten mit besonderen Beschwerden. Bei jeder Vorstellung erfolgte eine ausführliche Anamnese und körperliche Untersuchung. Diese schloss eine Lungenfunktionsprüfung mit der Bestimmung von Blutgasen und der Einsekundenkapazität sowie die Untersuchung von Blut- und Sputumproben ein. Im Blut wurden bei allen Patienten die Leukozyten, ein Differentialblutbild, CRP und Procalcitonin bestimmt. Die Lungenparameter wurden mit Hilfe eines Bodyplethysmographen (MasterScreen V4.6) der Firma VIASYS Healthcare GmbH, Hoechberg, erstellt. Für die Blutgase wurde das Ohr mit Finalgon[®] (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH) zur Förderung der Durchblutung eingerieben, mit einer Lanzette angestochen und das Blut mit einer Glaskapillare aufgezogen. Die Auswertung erfolgte mit dem AVL-OMNI-Modular System der Firma Roche Diagnostics, Penzberg.

Andere Untersuchungen, wie Sonographie oder Endoskopie sowie auch bildgebende oder histologische Ergebnisse, konnten den Patientenakten entnommen werden. Der diagnostische Nachweis der cystischen Fibrose erfolgte bei den Patienten schon in früher Kindheit durch den Schweißtest und wurde später mit genetischen Methoden bestätigt. Dabei zeigte sich bei 38 der 58 CF-Patienten (rund 70%) eine $\Delta F508$ Mutation.

3.3 Materialgewinnung

Für die zymographischen Untersuchungen wurden insgesamt 176 Serumproben von 58 CF-Patienten und 40 Kontrollpatienten verwendet. Das venöse Blut der Probanden wurde vormittags in der pulmonologischen Ambulanz in Gießen abgenommen und zeitnah weiterverarbeitet, um mögliche Fehlerquellen oder Verfälschungen der Werte zu reduzieren. Zur Blutaufarbeitung wurden je ein Serum- und ein Plasmaröhrchen der Probanden bei 2000-3000 Umdrehungen/min für zehn Minuten zentrifugiert, anschließend das Zentrifugat auf 20 Eppi-Tubes (Eppendorf-Reaktionsgefäß) aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

3.4 Zymographie

Die Zymographie stellt eine Variation der klassischen SDS-Gelelektrophorese dar, die zur Aktivitätsanzeige zusätzlich Gelatine im Gel enthält. Das Grundprinzip der Gelelektrophorese sieht folgendermaßen aus [137]:

Zur Trennung einer Proteinmischung wird standardmäßig ein SDS-Polyacrylamidgel (Sodium dodecyl sulfat) eingesetzt. Nach dem Auftragen der Probenlösung und Anlegen einer Spannung in der Elektrophoresekammer werden die zu untersuchenden Proteine in Abhängigkeit ihres Molekulargewichtes sowie der Gelporengröße und der Stromstärke aufgetrennt. Eine Temperatur von 4°C verhindert eine vorzeitige Aktivierung der MMPs. Im Gegensatz zur herkömmlichen SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) inkubiert das Zymographiegel nach der Proteintrennung sowie nach erfolgter SDS Auswaschung über Nacht bei 37°C. In dieser Zeit erfolgt die Autoaktivierung der latenten MMPs. In der sich anschließenden Färbung des Gels mit Coomassie Brilliant Blue bleiben an den Stellen helle Banden zurück, an denen die aktivierten Gelatinasen enzymatisch aktiv wurden [138]. Anhand zweier Zymographiemarker, einem Molekularmassen- und einem Gelatinasestandard (Katalog-Nr. CC073), kann die Proteingröße abgeschätzt werden und eine qualitative Aussage zum untersuchten Protein erfolgen. Quantitativ lässt sich die Proteinkonzentration über die Bandenintensität sowie die Bandengröße berechnen.

3.4.1 Herstellung der Zymographiegele

Die Herstellung des Zymographiegels unterteilt sich in Trenn- und Sammelgel. Das Trenngel, entscheidend für die Auftrennung der Proteine, unterscheidet sich durch Zusatz von Gelatine und dem Acrylamidanteil vom Sammelgel (Zusammensetzung siehe Tabelle 4). In den Gießstand, zwei durch einen Spacer (Gummiband) getrennte Glasplatten, wird die zehnpromzentige Trennlösung nach Zugabe der Katalysatoren Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethylendiamin (TEMED) gegossen und mit Isopropanol überschichtet.

Tabelle 4: Zusammensetzung des Trenngels

Trenngel (10% Acrylamid, 0,1% Gelatine)	1x	4x
30% Acrylamid	2,5 ml	7,2 ml
Gelatine + Aqua dest.	7,5 mg + 2,95 ml	30 mg + 11,8 ml
1,5 M Tris pH 8,8 Puffer	1,9 ml	7,6 ml
20%ige SDS	37,5 µl	150 µl
TEMED	6 µl	24 µl
20%ige APS-Lösung	37,5 µl	150 µl

Die Polymerisation des Trenngels benötigt bei Raumtemperatur ca. 20 Minuten. Nach Abgießen des Alkohols, Spülung mit Wasser und Trocknung kann das Sammelgel aufpipettiert werden. Zur Vermeidung späterer Laufartefakte sollten Luftpfeinschlüsse vermieden werden. Für die spätere Probenaufnahme wird ein Kamm mit der gewünschten Taschenanzahl in das Gel eingeführt. Nach ca. 30 Minuten ist das Sammelgel polymerisiert, Kamm und Spacer werden entfernt und das Zymographiegel in die Elektrophoresekammer eingebaut. Oberer und unterer Kammerteil sollten blasenfrei und vollständig mit Pufferlösung bedeckt sein, bevor das Zymographiegel mit den Proben gefüllt werden kann.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Sammelgels

Sammelgel (5% Acrylamid, ohne Gelatine)	1x	4x
30% Acrylamid	635 µl	1540 µl
Aqua dest.	4 ml	16 ml
2 M Tris pH 6,8	313 µl	1252 µl
20%ige SDS	25 µl	100 µl
TEMED	5 µl	20 µl
20%ige APS-Lösung	40 µl	160 µl

3.4.2 Vorbereitung der Proben

Die bei -80 °C eingefrorenen Proben wurden aufgetaut, im Verhältnis 1:4 mit Probenpuffer nach Lämmli gemischt und 5 µl mit einer feinen Kanüle in die vorgesehenen Vertiefungen (Kammern 3 bis 13) des Sammelgels gegeben. Eine vorzeitige Aktivierung der MMPs wurde durch permanente Kühlung unterbunden. Der Gelatinasestandard mit einer Ausgangskonzentration von 0,1 mg/ml wurde im Verhältnis von 1:640, Standard zu Puffer, verdünnt und 5 µl in die erste Vertiefung pipettiert. Die zweite Kammer wurde ausgelassen, um ein Vermischen von Standard und Probe zu vermeiden. Für die Bestimmung der Molekülmasse wurden 5 µl des Markers SeeBlue® Plus2 im Verhältnis 1:5 verwendet, der bekannte Proteine mit definierten Molekulargrößen von 4 bis 250kDa enthält.

3.4.3 Auftrennung der Proteine und Entwicklung der Zymographie

Nach Beladen aller Sammelgelvertiefungen wurde eine Stromstärke von 31 mA angelegt und als obere Begrenzung eine Spannung von 130 Volt eingestellt. Diese Werte gelten für zwei parallel laufende Kammern. Nach einer Laufzeit von 5 Stunden mit kontinuierlicher Temperierung der Elektrophoresekammer bei 4°C, wurde das Sammelgel vom Trenngel entfernt und verworfen. Zur Entfernung des denaturierenden SDS und Entfaltung der Enzyme wurde das Gel in einer Wanne mit einem Waschpuffer (siehe Tabelle 6) zweimalig 15 Minuten schwenkend gewaschen. Im Anschluss wurde durch mehrmaliges gründliches Spülen mit Wasser der Waschpuffer wieder entfernt. Das Gel mit den aufgetrennten MMPs wurde im Folgenden im Inkubationspuffer, einer kalziumhaltigen, leicht alkalischen Lösung, für 24 Stunden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Während andere Studien sich oft auf 18 Stunden beschränkten, wurde bewusst eine 24 stündige Inkubationszeit gewählt, um insbesondere schwächere Banden, bspw. von aktiviertem MMP-9, hervorzuheben.

Tabelle 6: Zusammensetzung des Wasch- und Inkubationspuffers

Waschpuffer	Inkubationspuffer
50 ml Triton pur 50 ml 2M Tris/HCL 2 ml 5 M CaCl ₂	50 ml 2 M Tris/HCl 1 ml 5 M CaCl ₂
mit aqua dest. auf zwei Liter auffüllen und pH auf 7,5 einstellen	

Die in der Elektrophorese aufgetrennten MMP Isoenzyme werden durch die im Puffer enthaltenen Kalziumionen enzymatisch aktiv und spalten die Gelatine im Gel. Nach erfolgter Inkubation wurde der Inkubationspuffer entfernt und mit Coomassie Brilliant Blue auf dem Schüttler für eine Stunde gefärbt. Zur optimalen Abzeichnung der weißen Banden gegenüber dem blauen Hintergrund wurden die Gele anschließend zweimalig mit klarem Wasser aufgeköcht und für zwei Stunden auf dem Schüttler belassen. Die Verteilungsmuster der Gele wurden mit Hilfe eines CanoScan LiDE 60 Scanners (Canon) digitalisiert und gespeichert.

3.4.4 Puffer und Lösungen

Die Puffer und Lösungen wurden nach Standardprotokollen und den gebräuchlichen molekularbiologischen Techniken hergestellt.

Tabelle 7: Puffer und Lösungen

	Zusammensetzung	Zusätze
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl pH 6,8 0,4% SDS ad 250 ml Aqua dest.	mit 5M HCl auf pH 6,8 einstellen
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl pH 8,8 0,4% SDS ad 1000 ml Aqua dest.	mit 5M HCl auf pH 8,8 einstellen
Coomassie Brilliant Blue (0,5%)	2,5g Coomassie Brilliant Blue 40% Methanol, 10% Eisessig	ad 500 ml Aqua dest. lösen und abfiltrieren
Laufpuffer-Stammlösung	25 mM Tris base (2,9g) 0,192 M Glycin (14,4g) 1% SDS	ad 1000 ml Aqua dest. pH sollte 8,3 betragen
Lämmli-Puffer	40% Glycerin, 8% SDS 250 mM Tris/HCl pH 6.8 0,4% Bromphenolblau	ad 10 ml Aqua dest. aliquotieren und bei -80°C lagern

3.4.5 Auswertung

Für die quantitative Auswertung der Zymographiegele wurde von der Firma Biometra das Computerprogramm **BioDocAnalyze 3.0** (Whatman Biometra GmbH, Göttingen, D) verwendet. Diese Software erkennt und umrandet die einzelnen Banden der eingescannten Gele automatisch und analysiert diese densitometrisch. Eine geringfügige Schwankung in der Peak-Bestimmung bei mehrmaliger Auswertung wurde durch die Berechnung des Mittelwertes von drei verschiedenen Messungen reduziert. Die Banden, die das Programm nicht erkannte, wurden manuell nachgezogen. Um einen rein subjektiven Fehler auszuschließen, erfolgte die Auswertung mit weiteren Densitometrie-Programmen, wie bspw. dem LumiAnalyze 3.0 und der Image J Software. Diese bestätigten die Daten der **BioDocAnalyze 3.0** Auswertungen. Die absoluten Differenzen der Einzelwerte fielen jedoch weniger deutlich aus, so dass die Auswertung im Weiteren mit dem **BioDocAnalyze 3.0** Programm durchgeführt wurde.

Um zufällige Fehler durch die manuelle Bearbeitung zu reduzieren, wurde die Auswertung eines Gels dreimalig, mit anschließender Berechnung des Mittelwertes, durchgeführt. Zur Validierung der Zymographie durften die einzelnen densitometrischen Messungen nur geringfügig voneinander abweichen. Die Homogenität der drei Messungen wurde mit der Maßzahl Cronbachs α (Alpha) berechnet, welche das Maß an interner Konsistenz einer Skala in der multivariaten Statistik angibt. Jedes Item der gleich aufgebauten Stichproben, in diesem Fall die einzelnen Banden der drei Messungen, wird miteinander verglichen und anschließend die durchschnittliche Korrelation bestimmt. Anders als mit der reinen Korrelation, die immer nur zwei Stichproben miteinander vergleicht, erhält man bei Cronbachs α auch bei größeren Stichproben immer nur einen Wert. Cronbachs α kann Werte annehmen zwischen minus unendlich und 1, wobei nur Werte für $\alpha > 0,7$ aussagekräftig sind. Je höher Cronbachs α ist, desto höher ist die proportionale Varianz zwischen den Stichproben [139, 140].

$$\alpha = \frac{N \cdot \bar{r}}{1 + (N - 1) \cdot \bar{r}}$$

N entspricht der Anzahl der Items (Banden), \bar{r} ist die durchschnittliche Korrelation zwischen den Items

Das Programm erkennt die optische Dichte der einzelnen Banden und definiert den Hintergrund als Bezugsdichte. Die Differenz aus der Dichte des Hintergrundes und der gemessenen Bande ergibt einen Absolutwert. Um alle 40 Gele und damit auch die einzelnen Banden untereinander vergleichen zu können, konnten die Absolutwerte nicht herangezogen werden, da identische Farbhintergründe der einzelnen Gele nicht reproduzierbar waren. Eine leichte Farbschwankung bei der Gelherstellung sowie bei der Gelbearbeitung konnte nicht vermieden werden.

Um dieses Problem zu beheben, wurde auf jedes Gel ein Zymographiestandard aufgetragen, dessen Enzymkonzentration bekannt war. Hierfür wurde ein aus gleichen Teilen gemischter MMP-2/MMP-9-Gelatinasestandard verwendet (Katalognummer CC073, Chemicon[®] International), dessen gesamte Enzymkonzentration mit 0,1 mg/ml angegeben wurde. Bei einer Verdünnung von 1:640 und einem aufgetragenen Volumen von 5 µl ergab sich eine Gesamtzymmenge pro Standard-Lane von 0,78 ng, entsprechend für MMP-2 und MMP-9 je 0,39 ng. Diese Unterscheidung war notwendig, da MMP-2 und MMP-9 unterschiedliche enzymatische Aktivitäten aufweisen, die sich in Helligkeitsunterschieden zwischen den Banden niederschlagen [107, 141]. Eine Gleichsetzung aus Addition der Helligkeitswerte aller Banden mit der gesamten Enzymmenge der Standard-Lane war somit nicht möglich. MMP-2 und MMP-9 mussten getrennt voneinander betrachtet werden.

Neben der latenten Form von MMP-2 und dem MMP-9 Monomer fanden sich zusätzlich auch die dazugehörigen aktivierten Formen im Standard. So ließen sich insgesamt vier verschiedene zymographische Banden voneinander abgrenzen. Eine prozentuale Unterteilung in latente und aktivierte MMPs konnte jedoch wegen der Autoaktivierung nicht sicher festgesetzt werden. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit jeweils die Helligkeitswerte der latenten und aktivierten Bande von MMP-2 bzw. MMP-9 addiert und mit der Hälfte der gesamten Enzymmenge (0,39 ng) gleichgesetzt. Durch Dreisatzberechnung konnte damit die Enzymmenge der zu untersuchenden Probenbanden berechnet werden.

3.5 ELISA

Zusätzlich zur quantitativen Gelatinezymographie wurden im ELISA die Werte der Gesamtkonzentration an MMP-2, MMP-8 und MMP-9, der Anteil an aktiver MMP-9 und der spezifische Inhibitor TIMP-1 im Serum der CF-Patienten und Kontrollprobanden bestimmt.

3.5.1 MMP-9

Für die Bestimmung der absoluten und aktiven MMP-9 Konzentration aus dem Serum von CF-Patienten wurde der Enzym-Aktivitäts-Assay Fluorokine[®] E der Firma R&D-Systems verwendet und entsprechend den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Es handelt sich dabei um einen so genannten Sandwich-ELISA. Die 96 Wells der Mikrotiterplatte sind an der Oberfläche mit Antikörpern gegen humanes MMP-9 beschichtet. Zunächst wurde aus dem mitgelieferten MMP-9 Standard eine Verdünnungsreihe von 16 ng/ml bis 0.25 ng/ml hergestellt, die als Doppelbestimmung einpipettiert wurde. Der Verdüner stellte dabei den Nullwert dar. Die auf Raumtemperatur gebrachten Proben wurden in einem Verhältnis von 1:100 verdünnt und jeweils 50 µl in die Wells gegeben. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Flüssigkeit aus jedem Well entfernt und die Platte mit einem Waschpuffer dreimalig gewaschen. Für die Bestimmung des gesamten MMP-9 war es erforderlich die latente in die aktive Form zu überführen, da nur aktives MMP-9 die anschließende Fluoreszenz-Reaktion auslöst. Diese Aktivierung erfolgte durch Zugabe von p-aminophenylmercuric acetate (APMA). Bei Bestimmung der aktiven MMP-9 Ausgangskonzentration entfällt der Aktivator. Nach Zugabe einer Substratlösung und einer Inkubationszeit von 17-20 Stunden kann mit Hilfe eines Fluoreszenz-Platten-Lesers die Substratumsetzung photometrisch bei 450 nm gemessen werden. Die MMP-9 Konzentrationen sind proportional zur ermittelten Farbtintensität. Die Sensitivität des Tests beträgt im Mittel 5 pg/ml.

Für die quantitative Bestimmung der Gesamtkonzentration an MMP-2 und MMP-8 wurde der Fluorokine MAP multiplex[®] für humane MMPs der Firma R&D-Systems aus Wiesbaden verwendet. Die Vorgaben des Herstellers wurden eingehalten, weswegen an dieser Stelle auf die ausführliche Beschreibung der Firma R&D-Systems verwiesen wird.

3.5.2 TIMP-1

Bei der Quantifizierung von humanem TIMP-1 wurde das Quantikine[®] ELISA Kit ebenfalls von der Firma R&D Systems aus Wiesbaden verwendet. Auch hierbei handelt es sich um einen Sandwich-ELISA, der dem Prinzip des MMP-9 ELISAs entspricht. Die Böden der Mikrotiterplatten sind mit monoklonalen Mäuse-Antikörpern gegen TIMP-1 beschichtet. Die optimale Verdünnung des Serums wurde auf 1:100 festgelegt. In Doppelbestimmung wurden jeweils 50 µl Standard oder Probe in die Wells gegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach anschließendem Waschen und Zugabe von 200 µl eines anti-TIMP-1-Peroxidase-Konjugates wurden die Wells erneut eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert. Unter Lichtschutz erfolgte eine halbstündige Substratumsetzung, die im Anschluss photometrisch bestimmt werden konnte (s.o.). Die Sensitivitätsgrenze dieses Tests liegt bei weniger als 0,08 ng/ml.

3.5.3 Auswertung

Aus der Standardlösung des ELISA Kits wurde eine Verdünnungsreihe erstellt und photometrisch gemessen. Die gewonnenen Fluoreszenzwerte wurden in Abhängigkeit der Enzymkonzentration in ein Koordinatensystem aufgetragen und mit allen Punkten in einer linearen Regression eine Ausgleichsgerade berechnet und in das Diagramm eingetragen. Die photometrisch erhobenen Probandaten wurden auf dieser Geraden gesucht und die dazugehörige Enzymkonzentration auf der Ordinate abgelesen.

3.6 Western Blot

Die in der Zymographie detektierten Gelatinasen wurden mit Hilfe eines Western Blots identifiziert. Für die Darstellung von MMP-9/NGAL-Komplexen kamen humane MMP-9 Antikörper (der Firma R&D; MAP 911) in der Verdünnung 1:250 zum Einsatz.

3.6.1 Vorbereitung der Proben

Die Durchführung des Western Blots benötigt eine möglichst reine Proteinsuspension, um Wechselwirkungen mit anderen Proteinen zu vermeiden. Die Aufreinigung der Gelatinasen von den restlichen Serumbestandteilen wurde mit Hilfe einer Gelatine Sepharose durchgeführt. Hierzu wurden 700 µl Serum von verschiedenen CF-Patienten mit 700 µl Tris-HCl-Nativpuffer und 100 mg Gelatine Sepharose über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler (Thermomixer comfort der Firma Eppendorf AG, Hamburg) bei 300 rpm inkubiert. Die Gelatinasen binden an die Gelatine und können durch Waschen mit dem Tris-HCl-Nativpuffer von den restlichen Serumbestandteilen getrennt werden. Erst die Zugabe einer gesättigten (ca. 8 molaren) Harnstofflösung mit Lämmli-Puffer ohne β-Mercaptoethanol (100 µl) löst die MMPs von der Gelatine Sepharose. Der Nachweis der aufgereinigten Gelatinasen aus dem Lysat erfolgte mittels Zymographie.

3.6.2 Durchführung des Western Blots

Der Ablauf des Western Blots ähnelt im ersten Schritt dem der Zymographie. Das Proteingemisch wird zunächst in der Gelelektrophorese anhand der unterschiedlichen Molekülgrößen aufgetrennt. Bis auf die Gelatine gleicht die Zusammensetzung der Trägermatrix der des Zymographiegels und auch die Versuchsdurchführung ist identisch mit der Zymographie (Zusammensetzung und Konzentrationen siehe oben). Die Proteinlösung wurde unverdünnt in den Volumina 5 µl, 15 µl und 25 µl aufgetragen. Nach Auftrennung der Proteine wurde senkrecht zum Polyacrylamidgel ein elektrisches Feld mit einer Stromstärke von 100 mA angelegt, das einen Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine Membran aus Nitrozellulose (PVDF-Membran) ermöglicht. Für diesen Vorgang, dem sogenannten „Blotten“ wurde eine Mini Trans Blot Cell Kammer der Firma Bio Rad Laboratories GmbH aus Karlsruhe verwendet. Durch hydrophobe Wechselwirkungen an der Membranoberfläche binden die Proteine in dem Muster der elektrophoretischen Auftrennung und stehen nach dem Auswaschen von SDS für weitere Untersuchungsmethoden zur Verfügung.

3.6.3 Proteindetektion

Für die Proteinbestimmung können einerseits die membrangebundenen Proteine unspezifisch über bestimmte Farbstoffe, wie beispielsweise Coomassie, markiert werden, andererseits identifizieren monoklonale oder polyklonale Antikörper passende Proteinbanden auf der Membran mit einer sehr hohen Spezifität. Die Vorbereitung der Nitrozellulosemembran erfolgte durch eine einstündige Inkubation in einer drei prozentigen Milchpulverlösung (TBS-NP40, siehe Tabelle 8) bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Hierdurch werden unspezifische Bindungsstellen blockiert.

Tabelle 8: Zusammensetzung des TBS-NP40-Puffers

TBS-NP40	20 mM Tris pH 7,5 137 mM NaCl ₂ + 0,1% NP-40 → pH auf 7,5 einstellen
-----------------	---

Im Anschluss wurde die Nitrozellulosemembran mit einem spezifischen MMP-9 Antikörper (human-MMP-9 Antikörper, R&D; MAB911) über Nacht im Kühlschrank bei 4°C inkubiert (Antikörper zu Milchpulver 1:250). Nach zweimaligem Waschen mit dem TBS-N-Puffer zur Entfernung ungebundener Antikörper erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper (anti-goat-mouse, DAKO, PO447). Dieser bindet spezifisch auf den ersten Antikörper und visualisiert vorhandenes MMP-9. Ein ebenfalls durchgeführter Nachweis auf Lipocalin (Antikörper zu Milchpulver 1:500, R&D, AF 1857) fiel durch einen geringen Gelatinasenanteil zu schwach aus. Für die weitere Bestimmung der Banden wurden die im Western Blot erkannten Proteinbanden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in der Massenspektrometrie untersucht.

Tabelle 9: Zusammensetzung der Anoden- und Kathodenpuffer im Western Blot

Anodenpuffer 1	Anodenpuffer 2	Kathodenpuffer
0,3 M Tris base	25 mM Tris base	40 mM ε-Aminocapronsäure
20% Methanol + ad 1000 ml Aqua dest.		

3.7 Statistik und Textverarbeitung

Für die statistische Auswertung wurden zunächst alle Daten auf Normalverteilung hin überprüft. Bei Berechnungen unter 50 Items wurde der Shapiro-Wilk-Test und für mehr als 50 Items der Kolmogorov-Smirnov-Test verwendet. Bei Erfüllung der Kriterien für die Normalverteilung (Werte von 0,05 bis 0,2) wurde zur Unterscheidung der Mittelwerte der t-Test angewandt. Bei drei oder mehr Versuchsgruppen wurden die Unterschiede zwischen Mittelwerten anhand der „einfachen ANOVA“ (ordinary measures of analysis of variance) und anschließend mit dem post hoc Testverfahren auf Signifikanz geprüft. Der Vergleich von Mittelwerten mit einer Kontrollgruppe erfolgte anhand der Prozedur nach Dunnett. Zum Vergleich von Mittelwerten aller Stichproben untereinander wurde das Verfahren nach Tukey und Kramer angewandt. Alle nicht normalverteilten Daten wurden mit einem nicht-parametrischen Test untersucht. Hierbei kam der Mann-Whitney U Test für unverbundene Stichproben und der Wilcoxon Rang Test für verbundene Stichproben zur Anwendung. Ein Zusammenhang zwischen den Daten wurde nach Spearman für die nichtparametrische Rangkorrelation durchgeführt. Kleine nominale oder ordinale Stichproben wurden mit Chi-Quadrat geprüft. Soweit nicht anders angegeben, wurde für die Darstellung der Daten in den Abbildungen der arithmetische Mittelwert \pm mit einfacher Standardabweichung (SD) aus den Einzelmesswerten gebildet. Für ordinal verteilte Werte wurde der Median gewählt. Der Stichprobenumfang der Versuche ist der jeweiligen Legende zu den Abbildungen zu entnehmen.

Die graphische Darstellung des Datenmaterials erfolgte anhand von Balkendiagrammen und in Boxplots. Der Bereich einer Box stellt dabei die mittleren 50% der gemessenen Stichproben dar, wobei der Median durch einen dicken schwarzen Balken hervorgehoben wird. Die obere Begrenzung entspricht der 75% und die untere die der 25% Marke. Die Streuung der übrigen Werte wird durch die von der Box abgehenden Striche, die maximal 1,5fache Boxenlänge haben, dargestellt. Extremwerte werden mit einem Kreis (o), Ausreißer werden als Einzelpunkte markiert (*). Die Nullhypothese wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\leq 5\%$ verworfen und der Unterschied damit als statistisch signifikant angesehen. Im Folgenden sind die Signifikanzschwellen mit Sternchen (*) markiert, wobei für * $p < 0,05$ (signifikant) sowie ** $p < 0,01$ (hochsignifikant) gilt [140]. Die statistische Auswertung erfolgte auf den Berechnungsgrundlagen des Programmes SPSS Version 14.0 (SPSS Inc., IL, USA). Die Niederschrift und das Layout der Arbeit erfolgten mit dem Textverarbeitungsprogramm WORD 2007 (Microsoft[©]).

4 Ergebnisse und Auswertung

4.1 Validierung der Zymographie

4.1.1 Gegenüberstellung der Densitometrie Programme

In den Vorüberlegungen wurden insgesamt drei Software Programme, Image-J, BioDocAnalyze 3.0 und LumiAnalyze 3.0 zur densitometrischen Auswertung der Zymographie in Erwägung gezogen. Zielparameter war eine möglichst hohe Korrelation mit den Werten des ELISAs. Zusätzlich floss auch die Art der Bearbeitung und die Reproduzierbarkeit der Daten in die Wahl des Auswertungsprogrammes mit ein. Image-J und LumiAnalyze 3.0 zeigten eine gute Korrelation zu den ELISA-Werten, **BioDocAnalyze 3.0** betonte darüber hinaus auch die absoluten Differenzen der Einzelwerte (siehe Abbildung 6).

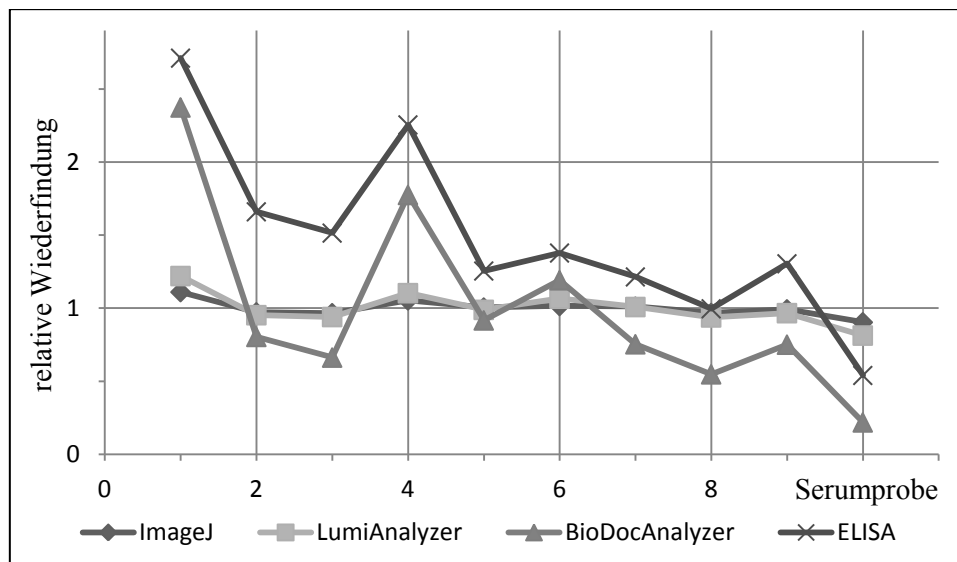


Abbildung 6: Gegenüberstellung der Befunde unterschiedlicher Densitometrie Programme. Die Enzymkonzentrationen der ersten 10 Serumproben wurden mit drei verschiedenen Programmen, Image-J, LumiAnalyze und BioDocAnalyze untersucht. Eine optimale Übereinstimmung der relativen minimalen und maximalen Konzentrationen mit den ELISA-Daten fand sich dabei bei dem BioDocAnalyze 3.0.

4.1.2 Reproduzierbarkeit der densitometrischen Daten

Die in der Zymographie erstellten Banden wurden mit dem BioDocAnalyze Densitometrie Programm der Firma Biometra ausgewertet. Die automatisch erkannten Banden zeigten dabei eine geringfügige Variation in Form und Größe. Dieser systematische Fehler sollte durch die

dreimalige Messung der Gele reduziert werden. Hierbei ergab sich zwischen den drei Auswertungen eine mittlere Homogenität nach Cronbach $\alpha = 0,982 \pm 0,0015$ ($\pm 0,04$). Das Gel mit der größten Abweichung innerhalb der drei Messungen (P1) zeigte dabei einen Wert von $\alpha = 0,965$. Die größte Homogenität zwischen den einzelnen Messungen fand sich mit $\alpha = 0,995$ im Gel D2. Die ausgesprochen hohe Übereinstimmung zwischen den wiederholten Auswertungen eines Gels betont die Reproduzierbarkeit der Werte mit dem BioDocAnalyse 3.0 Programm und spricht für die Auswahl der gewählten Software.

4.1.3 Homogenität serumgleicher Gele

Für die Vergleichbarkeit aller durch die Zymographie gewonnenen Daten war eine Standardisierung der Gelherstellung, der Probenbehandlung sowie der Versuchsbedingungen Voraussetzung. Eine geringfügige Schwankung ließ sich jedoch in der Anfärbung der Gele nicht vollständig vermeiden, so dass als Index für jedes Gel ein Enzymstandard mit bekannter Konzentration mitgeführt wurde. Die gewonnenen Bandenpeaks jedes Gels wurden mit Hilfe des Gelindexes im Dreisatzverfahren auf die gesuchten Enzymkonzentrationen umgerechnet. Die Richtigkeit dieser Überlegungen konnte im ersten Schritt durch den Vergleich der beiden in Doppelbestimmung angefertigten Gele überprüft werden. Die Korrelation dieser serumgleichen Gele (z.B. A1/A2: $r = 0,989$) ist in Tabelle 10 wiedergegeben. Aus allen Korrelationswerten serumgleicher Gele berechnete sich ein Mittelwert von $r = 0,969 \pm 0,0035$. Dieser hohe Korrelationsgrad spricht für die Homogenität der serumgleichen Gele.

Tabelle 10: Korrelation serumgleicher Gele

Gel A ₁ /A ₂	$r = 0,989$	Gel I ₁ /I ₂	$r = 0,963$
Gel B ₁ /B ₂	$r = 0,953$	Gel J ₁ /J ₂	$r = 0,965$
Gel C ₁ /C ₂	$r = 0,983$	Gel K ₁ /K ₂	$r = 0,941$
Gel D ₁ /D ₂	$r = 0,977$	Gel L ₁ /L ₂	$r = 0,973$
Gel E ₁ /E ₂	$r = 0,980$	Gel M ₁ /M ₂	$r = 0,946$
Gel F ₁ /F ₂	$r = 0,969$	Gel N ₁ /N ₂	$r = 0,987$
Gel G ₁ /G ₂	$r = 0,964$	Gel O ₁ /O ₂	$r = 0,982$
Gel H ₁ /H ₂	$r = 0,968$	Gel P ₁ /P ₂	$r = 0,962$

Die Serumproben wurden auf insgesamt 16 Gele in Doppelbestimmung aufgetragen. Serumgleiche Gele zeigten eine hohe Übereinstimmung in den gemessenen Enzymkonzentrationen. Angegeben ist der Korrelationswert, wobei $r = 1$ einer Übereinstimmung von 100% gleichzusetzen ist.

4.1.4 Vergleichbarkeit aller Gele

Im zweiten Schritt zur Validierung der quantitativen Zymographie sollten, neben der Gelhomogenität serumgleicher Proben, alle Gele und damit auch alle Serumproben untereinander vergleichbar sein. Als ungefähre Orientierungspunkte für die berechneten Zymographiekonzentrationen sollten die MMP-9 Gesamtkonzentrationen der standardisierten ELISA Auswertung dienen. Hierzu standen 126 ELISA-Werte, von 58 Patienten (86 Werte) und von 40 Kontrollprobanden (40 Werte) zur Verfügung.

Der verwendete Enzym-Aktivitäts-Assay Fluorokine E der Firma R&D-Systems bestimmte die Gesamtkonzentration an MMP-9 in der Serumprobe unabhängig von der Zusammensetzung der Isoformen. Ein Großteil der Enzymkonzentration, rund 80%, wurde dabei durch das proMMP-9 Monomer präsentiert. Dieses zymogene MMP-9 Monomer korrelierte im hohen Maße mit den ELISA-Werten ($r = 0,857$; $p < 0,001$). Die Enzymkonzentration im ELISA setzt sich jedoch aus der Summe der Isoformen zusammen, dem aktiven und latenten MMP-9 Homodimer (jeweils in doppelter Konzentration, da ein Enzym aus zwei Monomeren aufgebaut ist), dem aktiven und latenten MMP-9/NGAL Heterodimer sowie dem latenten und aktiven MMP-9 Monomer. Die Summierung aller zymographischen MMP-9 Isoenzyme erreichte hierbei mit den ELISA Werten eine Übereinstimmung von $r = 0,882$ ($p < 0,001$).

Tabelle 11: Korrelation der Enzymkonzentration von ELISA und Zymographie (126 Werte)

Verfahren	proMMP-9 Monomer	MMP-9 Gesamtkonzentration
Korrelation nach Pearson	0,857**	0,882**
Signifikanz (2-seitig)	< 0,001	< 0,001

Ähnlich wie für die Gesamtkonzentration an MMP-9 ergab sich auch bei isolierter Betrachtung für die aktivierten MMP-9 Isoenzyme (aktives MMP-9 Homodimer, aktives MMP-9 Heterodimer und aktives MMP-9 Monomer) eine signifikante Korrelation zwischen dem ELISA und der Zymographie ($r = 0,566$; $p < 0,001$). Die Kontrollgruppe zeigte im ELISA sowie in der Zymographie im Mittel geringere Enzymkonzentrationen als die CF-Gruppe, das sich graphisch in der dichten Punktwolke in Abbildung 7B (Kreise) widerspiegelt. Die MMP-2 Enzymkonzentration zwischen ELISA und Zymographie ergab

eine negative Korrelation ($r = -0.437$; $p < 0,001$). Während im ELISA die Kontrollgruppe eher hohe Werte und die CF-Patienten niedrigere MMP-2 aufwiesen, verhielten sich die Daten in der Zymographie genau entgegengesetzt.

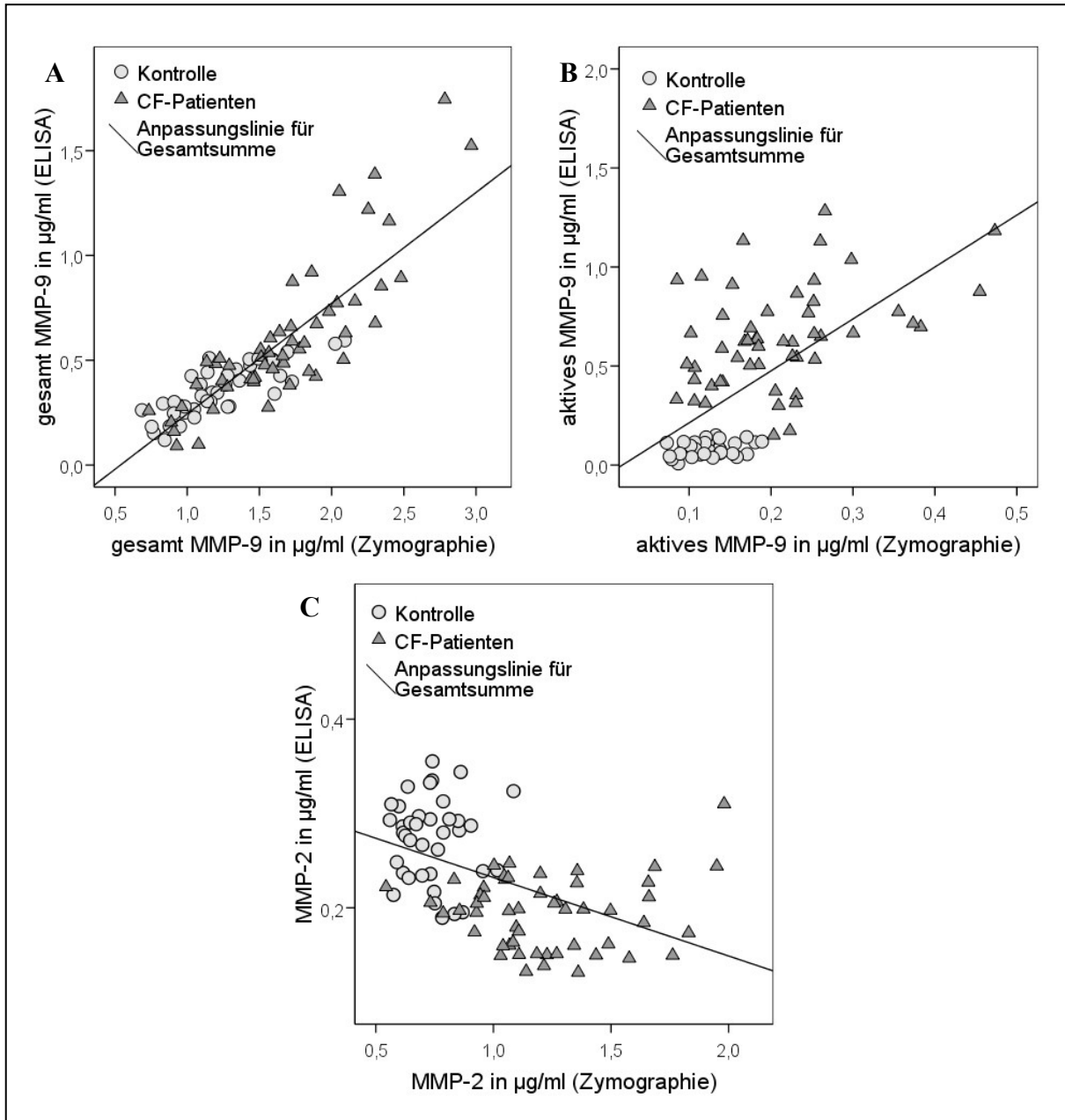


Abbildung 7: Lineare Beziehung zwischen ELISA und Zymographie. Jedem ELISA Wert der 58 CF-Patienten und 40 Kontrollprobanden wurde ein zymographischer Wert der Gesamtkonzentration an gesamtMMP-9 (A), aktiven MMP-9 (B) und MMP-2 (C) zugeordnet. Der lineare Zusammenhang, insbesondere zwischen beiden gesamtMMP-9 Werten, spricht für eine hohe Korrelation und damit für eine gute Vergleichbarkeit der beiden Messmethoden.

4.1.5 Western Blot

Die elektrophoretische Auftrennung des Gelatine Sepharose Lysats mit anschließender polyklonaler MMP-9 Antikörper Inkubation detektierte drei Banden: das MMP-9 Homodimer (~220kDa), den MMP-9/NGAL Komplex (~130kDa) und das MMP-9 Monomer (~92kDa). In Abbildung 8 sind die unterschiedlichen MMP-9 Banden des Western Blots vergleichend mit den Ergebnissen der Zymographie und einem kDa-Standard dargestellt.

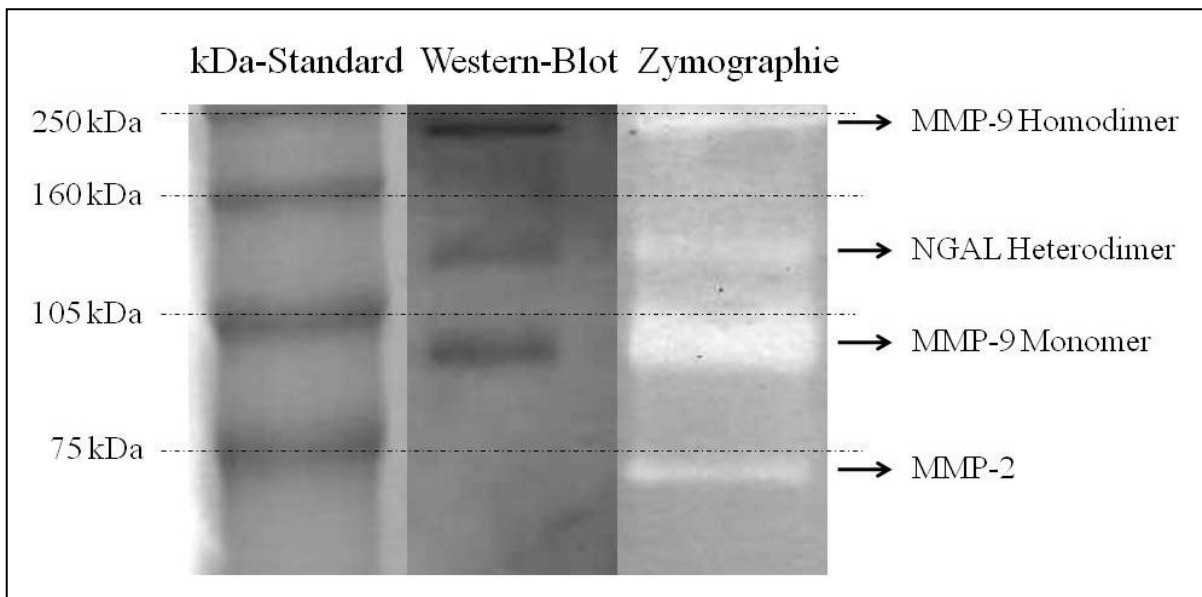


Abbildung 8: Proteinbanden im Western Blot. Im Western Blot (mittlere Spalte) konnten drei Banden mit dem humanen MMP-9 Antikörper MAB911 detektiert werden; MMP-9 Homodimer, NGAL/MMP-9 Heterodimer und MMP-9 Monomer. Diese Banden fanden sich auch in der zymographischen Darstellung (*rechts*). Zum Abschätzen der Molekülgröße wurde ein kDa-Standard gegenübergestellt (*links*).

4.2 Deskriptive Statistik der klinischen Daten

4.2.1 Patienten der Studie

Die vorliegende Studie, die sich aus Daten von insgesamt 98 Probanden zusammensetzte, wurde in Kooperation mit der pulmonologischen Ambulanz der Universitätsklinik Gießen im Zeitraum von Februar 2006 bis März 2007 erhoben. Das Gesamtkollektiv wurde in zwei Gruppen eingeteilt (siehe Tabelle 12). Zum einen die Gruppe der CF-Patienten (rund 60%), die sich mindestens einmal alle drei Monate zu regelmäßigen Kontrollen in der Ambulanz vorstellten, bzw. bei besonderen Beschwerden auch in kürzeren Abständen. Von einigen Patienten existierte nur eine einzige Blutentnahme, bei anderen hingegen bis zu fünf Blutproben von unterschiedlichen Zeitpunkten. Insgesamt ergaben sich 136 Blutproben von 58 Patienten. Bei allen 40 gesunden Probanden wurde nur einmalig Blut entnommen. Einschlusskriterium der Freiwilligen war, dass zum Abnahmezeitpunkt keinerlei Anzeichen auf Asthma oder Entzündungszeichen der Lunge vorlagen. Insgesamt wurden 176 Serumproben bearbeitet.

Tabelle 12: Studienkollektiv

	Probanden	Proben
Cystische Fibrose	58	136
Kontrollgruppe	40	40
Summe	98	176

4.2.2 Alter der Patienten

Die Patienten der Studie waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme zwischen 18 und 50 Jahre alt, dies entsprach einem Mittelwert von 31 Jahren und einem Median von 32 Jahren (SD 6,9). Bei der Kontrollgruppe zeigte sich ein Mittelwert von 26 Jahren (SD 5,6) mit einer Streuung von 20 bis 41 Jahren. Damit war das mittlere Alter der Kontrollgruppe signifikant jünger als das der CF-Gruppe ($p < 0,001$). Der Altersverlauf entsprach bei den CF-Patienten einer Normalverteilung, nicht jedoch bei der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 9).

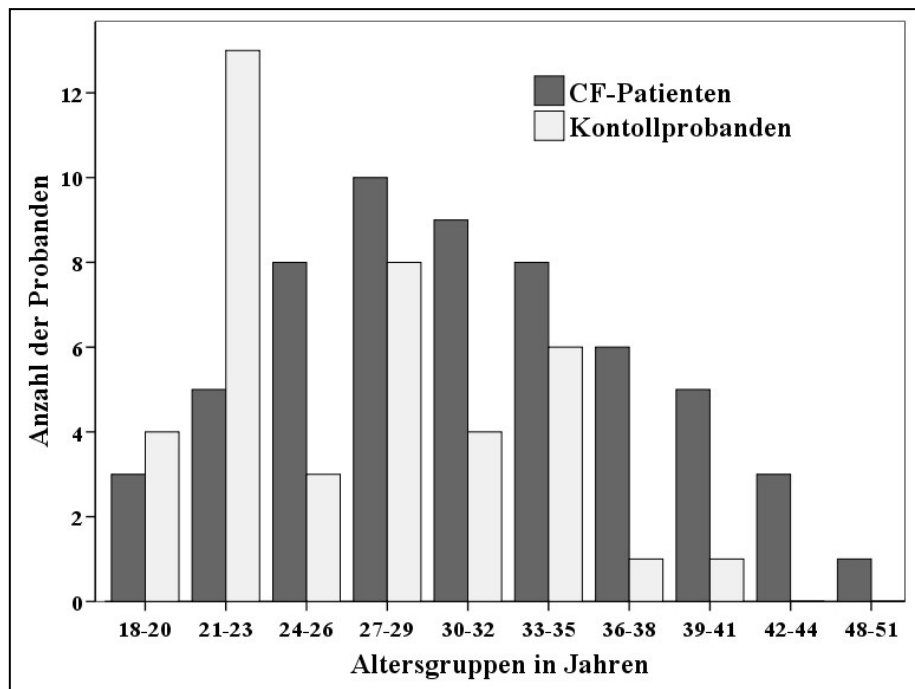


Abbildung 9: Altersverteilung der CF-Patienten und der Kontrollgruppe. Altersverteilung der 58 CF-Patienten (dunkel) und 40 gesunden Kontrollprobanden (hell). Eine Normalverteilung ist bei den CF-Patienten ($p = 0,163$) gegeben, nicht jedoch bei der Kontrollgruppe ($p = 0,004$) (signifikante Abweichung von der Normalverteilung).

4.2.3 Geschlechtsverteilung

Die 58 CF-Patienten der Studie waren zur Hälfte weiblich und männlich mit jeweils einem Mittelwert von 31 Jahren. Auch die Kontrollgruppe teilte sich zu gleichen Teilen in beide Geschlechter mit jeweils 20 Personen auf, wobei die weiblichen Probanden im Durchschnitt mit 24,2 Jahren etwas jünger waren als die männlichen Probanden mit 29,3 Jahren.

4.2.4 Einteilung der CF-Patienten

Die CF-Patienten wurden nach dem Infektionsgrad in zwei Gruppen unterteilt. Als Unterscheidungskriterium diente ein Exazerbationsindex der Lunge, der von Rosenfeld 2001 etabliert wurde [67]. Ihm zugrunde liegen insgesamt sechs klinische Befunde, die bei einer akuten Lungeninfektion auftreten können und mit Punktwerten eine unterschiedlich starke Gewichtung finden. So wird dem Befund der geringeren körperlichen Belastbarkeit ein Indexwert von 1,8 zugesprochen, vermehrter Husten oder vermehrter Auswurf je einen Wert von 1,5. Ein krankheitsbedingtes Fernbleiben von Schule oder Arbeit addiert den Wert 1,6 hinzu. Zusätzliche auskultatorische Befunde, wie vermehrtes Rasseln, Giemen oder Brummen

in der Lunge, erhalten den Index 1,2. Als letzter Wert fließt in die Berechnung mit 1,1 ein vermindertes Hungergefühl ein. Von einer pulmonalen Exazerbation spricht man, wenn der sogenannte PEx-Score (pulmonale Exazerbation) einen Punktwert von 2,6 überschreitet [67, 98]. Von den 58 Patienten, die sich ambulant innerhalb eines Jahres vorstellten, zeigten 18 bei ihrem erstmaligen Besuch nach o.g. Kriterien eine pulmonale Exazerbation (PEx). Die 18 CF-Patienten mit PEx bildeten ein mittleres klinisches Symptombild nach dem Rosenfeld-Wert von 4,5 Punkten. Bei den CF-Patienten ohne PEx ergab sich ein mittlerer Wert von 0,48. Beide Gruppen unterschieden sich damit hochsignifikant voneinander ($p < 0,001$).

Tabelle 13: Zusammensetzung der Kontroll- und Patientengruppe

	Kontroll- gruppe	CF-Patienten	
		ohne PEx	mit PEx
Anzahl	40	40	18
mittleres Lebensalter (\pm SD)	26,8 \pm 5,6	32,2 \pm 7,4	31,3 \pm 6,0
Median (Jahre)	26,5	32,4	32,2
Geschlecht (m/w)	20/20	23/17	6/12
Dauerhafte medikamentöse			
Anti-Inflammatorische Therapie	0	33	17
Antibiotische Therapie	0	31	17
Rosenfeld-Score		0,48 \pm 0,68	4,19 \pm 1,9**

Demographische Daten und medikamentöse Therapie der Kontrollgruppe und der CF-Patienten. Die Patienten mit cystischer Fibrose wurden noch einmal unterteilt in Patienten mit pulmonaler Exazerbation (mit PEx) und ohne PEx.

4.3 Klinische Befunde und Laborwerte

Die Einteilung klinischer Symptome, wie sie im Rosenfeld-Score zur Anwendung kommen, unterliegt subjektiven Befunden. Objektive Aussagen über den Krankheitsprozess können hingegen biochemische Untersuchungsparameter aus Blut, Sputum und Urin oder funktionelle Untersuchungen, wie die Bodyplethysmographie, geben.

4.3.1 Lungenfunktionsparameter

Die Lungenfunktionsparameter, wie das forcierte Einsekunden-Expirationsvolumen (FEV1 in %) und die Vitalkapazität (VC in %), zeigten eine signifikante Verschlechterung bei den CF-Patienten mit PEx gegenüber den Patienten ohne PEx.

Tabelle 14: Lungenfunktionsparameter und Blutgase

Parameter	CF-Patienten	
	ohne PEx	mit PEx
VC (%)	77,95 ± 18,71	55,79 ± 14,21**
FEV1 (%)	64,33 ± 21,97	40,03 ± 13,97**
O ₂ (mmHg)	76,9 ± 9,09	70,1 ± 11,14*
CO ₂ (mmHg)	37,6 ± 3,8	38,8 ± 9,1

Lungenfunktionsparameter und Blutgase von 40 CF-Patienten ohne Lungenexazerbation (ohne PEx) und 18 Patienten mit PEx.

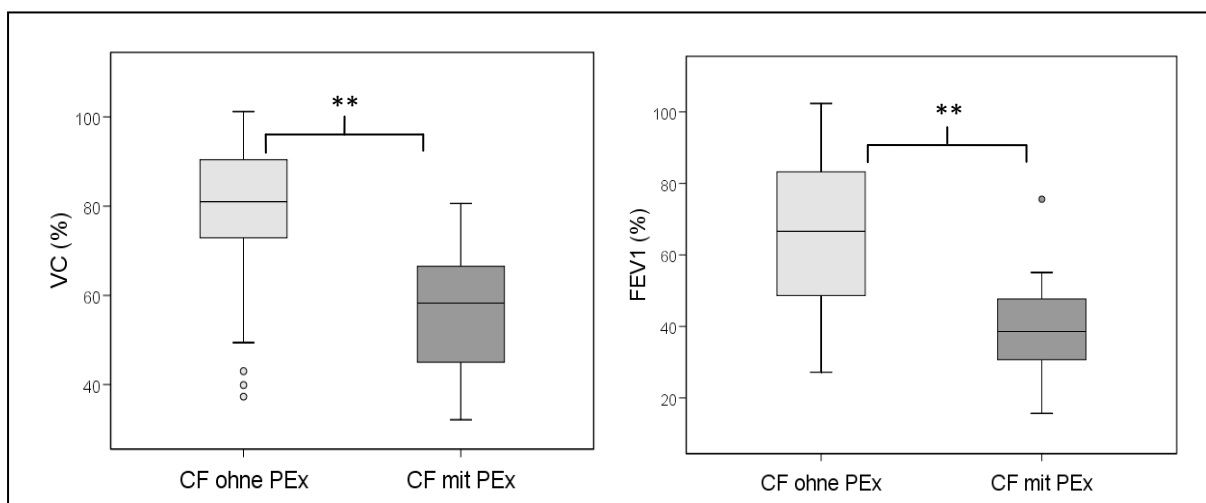


Abbildung 10: Vitalkapazität und FEV1 bei CF-Patienten ohne und mit PEx. Die VC und die FEV1 stellen Funktionsparameter der Lunge in Abhängigkeit des Alters und des Geschlechts dar.

4.3.2 Entzündungsparameter

Die serologischen Entzündungsparameter, wie das C-reaktive-Protein (CRP) ($p < 0,001$), die neutrophilen Granulozyten ($p = 0,028$) sowie die Monozyten ($p = 0,022$) unterschieden sich signifikant zwischen CF-Patienten ohne und mit Exazerbation (siehe Tabelle 15). Auch die Thrombozyten ($p < 0,001$) lagen bei CF-Patienten mit Exazerbation in höherer Konzentration vor als bei Patienten ohne PEx.

Tabelle 15: Entzündungsparameter bei CF-Patienten mit und ohne PEx

Laborwerte	CF-Patienten		p
	ohne PEx	mit PEx	
CRP (mg/l)	6,27 ± 5,44	39,3 ± 39,8	< 0,001**
Leukozyten ($10^9/l$)	7,4 ± 2,21	10,15 ± 4,22	0,022*
Neutrophile ($10^9/l$)	5,18 ± 2,07	7,7 ± 4,0	0,028*
Eosinophile ($10^9/l$)	0,16 ± 0,11	0,17 ± 0,14	0,762
Basophile ($10^9/l$)	0,03 ± 0,23	0,031 ± 0,24	0,898
Monozyten ($10^9/l$)	0,54 ± 0,21	0,72 ± 0,32	0,022*
Thrombozyten ($10^9/l$)	251 ± 87	334 ± 88	0,005**

Entzündungsparameter von 40 CF-Patienten ohne Lungenexazerbation (ohne PEx) und 18 CF-Patienten mit PEx. Insbesondere das CRP und die neutrophilen Granulozyten als Inflammationsmarker, lagen bei CF-Patienten mit PEx in höheren Konzentrationen vor.

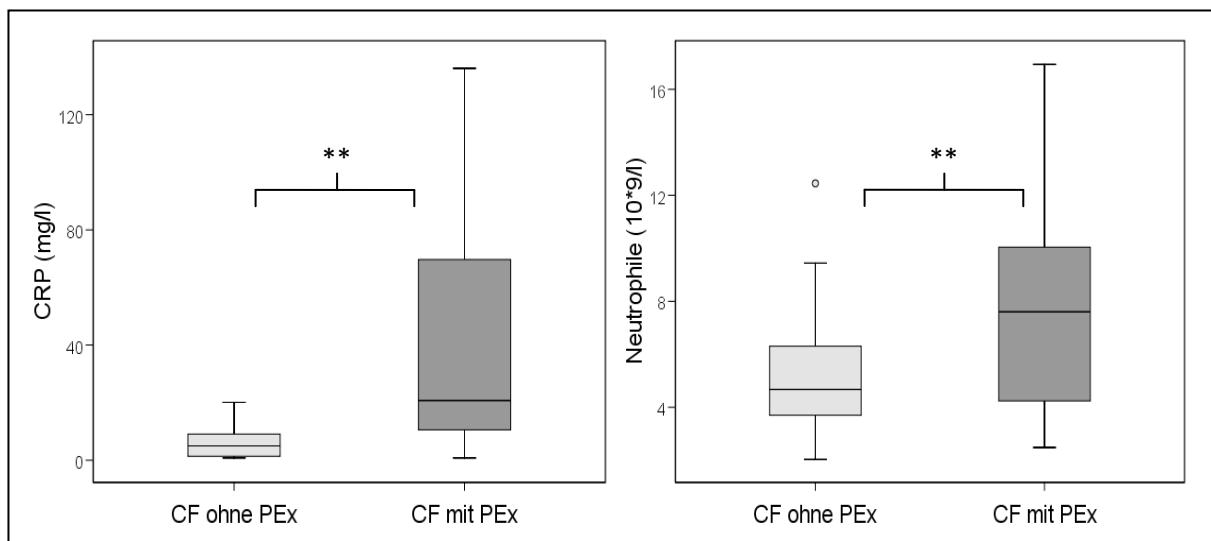


Abbildung 11: CRP und neutrophile Granulozyten bei CF-Patienten ohne und mit PEx. Graphische Darstellung der Entzündungswerte: CRP (*links*) und der neutrophilen Granulozyten (*rechts*) bei CF-Patienten ohne und mit Exazerbation (PEx).

4.3.3 Leberbeteiligung

Die Leber ist nach der Lunge das Organ, das am häufigsten mit einer erhöhten Morbidität unter CF-Patienten assoziiert ist. Das Alter, das Geschlecht und andere Komorbiditäten, wie zusätzliche Erkrankungen des Pankreas und/oder der Lunge, zeigen einen erheblichen Einfluss auf den Krankheitsverlauf. In der vorliegenden Untersuchung fanden sich 32 Patienten (55%) mit einer Erkrankung der Leber. Kriterien für eine Leberbeteiligung waren eine chronische Persistenz von erhöhten Transaminasen (für mindestens 6 Monate), wie der Aspartat-Aminotransferase (AST) und der Alanin-Aminotransferase (ALT), eine sonographisch oder computertomographisch nachgewiesene Leberverfettung sowie eine Hepatomegalie. Es zeigte sich eine leichte Erhöhung der Leberbeteiligung bei den Patienten über 30 Jahren, die nicht signifikant ausfiel. Patienten mit zusätzlicher Leberbeteiligung hatten jedoch eine signifikante Reduktion der Thrombozyten ($p = 0,009$) (keine Abbildung). Während sich die prozentuale Leberbeteiligung beim weiblichen Geschlecht ungefähr gleich verteilte, zeigte sich innerhalb der Gruppe der männlichen Studienteilnehmer eine höhere Erkrankungsrate der Leber (62%).

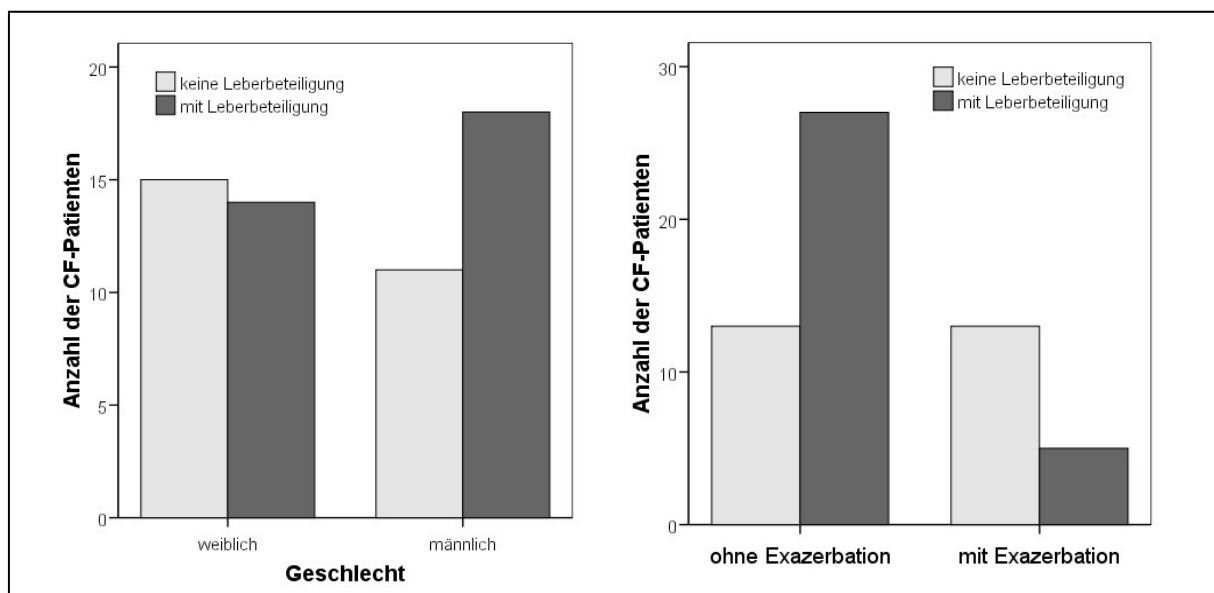


Abbildung 12: Leberbeteiligung in Abhängigkeit von Geschlecht und Exazerbation. *Links:* Von den 29 CF-Männern der Studie wiesen 62% eine Leberbeteiligung auf, unter den Frauen (29) zeigte sich in etwa eine gleich starke Verteilung mit und ohne Leberbeteiligung. *Rechts:* CF-Patienten mit einer Lebererkrankung zeigten signifikant weniger pulmonale Exazerbationen (PEX) als CF-Patienten ohne eine Leberbeteiligung ($p = 0,009$).

Tabelle 16: Exazerbation und Leberbeteiligung

Anzahl	CF-Patienten		Gesamt
	ohne PEx	mit PEx	
Ohne Leberbeteiligung	13	13	26
Mit Leberbeteiligung	27	5	32
Gesamt	40	18	58

Ein Fünftel der CF-Patienten mit einer Leberbeteiligung entwickelte eine pulmonale Exazerbation, während diese bei den CF-Patienten ohne Leberbeteiligung bei 50% lag.

Die CF-Patienten mit Leberbeteiligung zeigten bezüglich der Transaminasen AST und ALT eine signifikante Enzymerhöhung im Vergleich zu der Gruppe ohne Lebererkrankung (AST: $p = 0,019$), (ALT: $p = 0,005$). Die CF-Patienten mit PEx wiesen dabei geringere AST und ALT Konzentrationen auf als die Patienten ohne klinische Infektsymptomatik (AST: $p = 0,004$), (ALT: $p = 0,001$). Das bedeutet, dass CF-Patienten ohne Leberbeteiligung deutlich häufiger eine Lungenexazerbation zeigten, wohingegen sich bei CF-Patienten mit einer Erhöhung der Transaminasen seltener ein pulmonaler Infekt fand ($p = 0,009$).

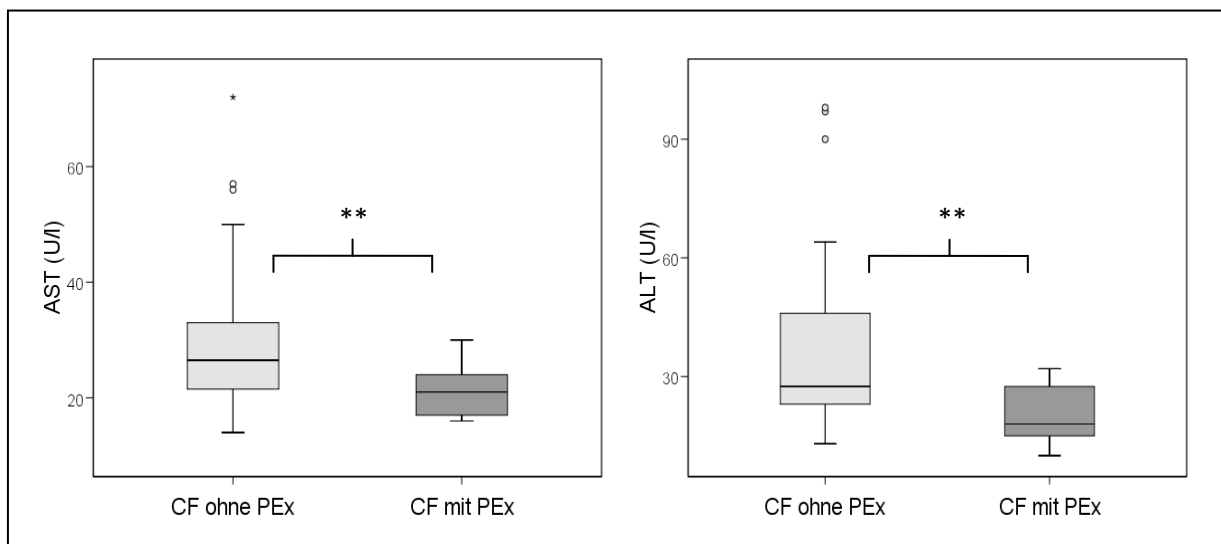


Abbildung 13: Transaminasen bei CF-Patienten mit und ohne PEx. Die Transaminasen (*links*: AST, *rechts*: ALT) in Units pro Liter (U/l) lagen in einer signifikant geringeren Konzentration bei CF-Patienten mit pulmonaler Exazerbation (mit PEx) vor als bei den CF-Patienten ohne PEx.

4.3.4 Pankreasbeteiligung

Von den 58 CF-Patienten der Studie zeigten 33 CF-Patienten eine rein exokrine Erkrankung des Pankreas. Kriterien hierfür waren Verdauungsstörungen, Gewichtsverlust oder Fettstühle in der Vergangenheit sowie eine Elastase unter 200 µg/g Stuhl. Eine zusätzliche endokrine Pankreasinsuffizienz fand sich bei 17 Patienten, definiert durch eine Substitutionstherapie mit Insulin. Bei acht CF-Patienten lag keine Pankreasbeteiligung vor. Mit höherem Lebensalter konnte in der vorliegenden Untersuchung eine Zunahme der Pankreasbeteiligung bei CF-Patienten beobachtet werden, ohne jedoch signifikant auszufallen. In ähnlicher Weise nahm auch die Kombination von Leber- und Pankreaserkrankung mit dem Alter zu. Auffällig war hierbei, dass mit Vorliegen einer Leberbeteiligung nahezu in jedem Fall eine Pankreasinsuffizienz einherging.

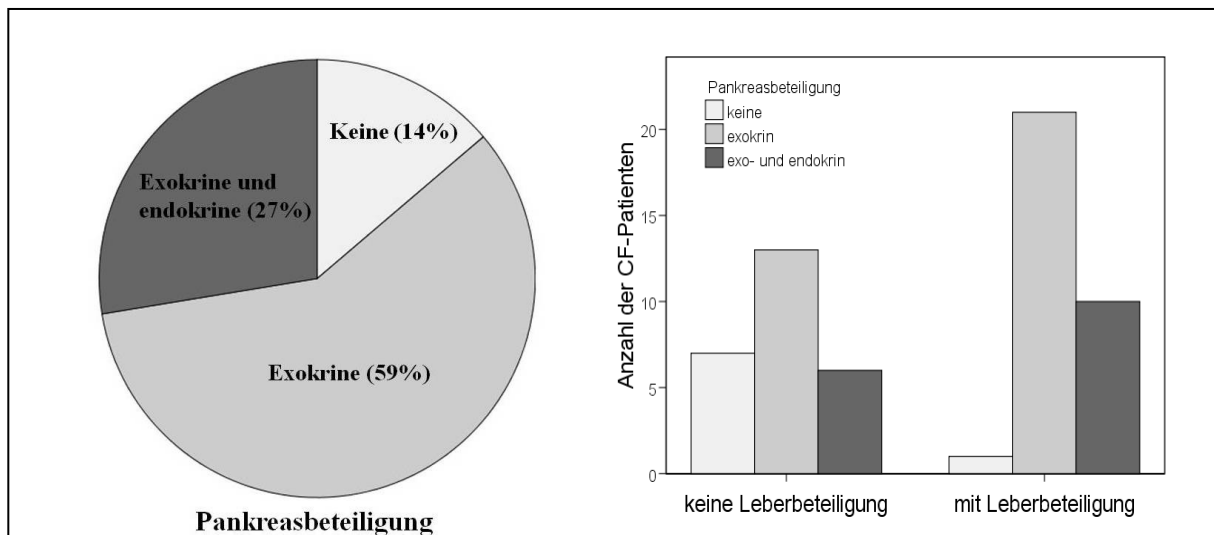


Abbildung 14: Pankreaserkrankung. Dargestellt sind die Anzahl der CF-Patienten mit unterschiedlicher Pankreasbeteiligung (*links*) sowie das Verhältnis von Pankreasinsuffizienz zu Leberbeteiligung (*rechts*).

4.4 Zymographische Gelatinase-Aktivität

Mit der quantitativen Zymographie wurden 136 Seren von 58 Patienten und 40 Kontrollprobanden untersucht. Die Serumproben, aufgetragen auf insgesamt 36 Zymographiegele, zeigten jeweils in unterschiedlicher Konzentration acht verschiedene, nach ihrem spezifischen Molekulargewicht aufgetrennte Gelatinasen. Ein repräsentatives Zymographiegel findet sich in Abbildung 15.

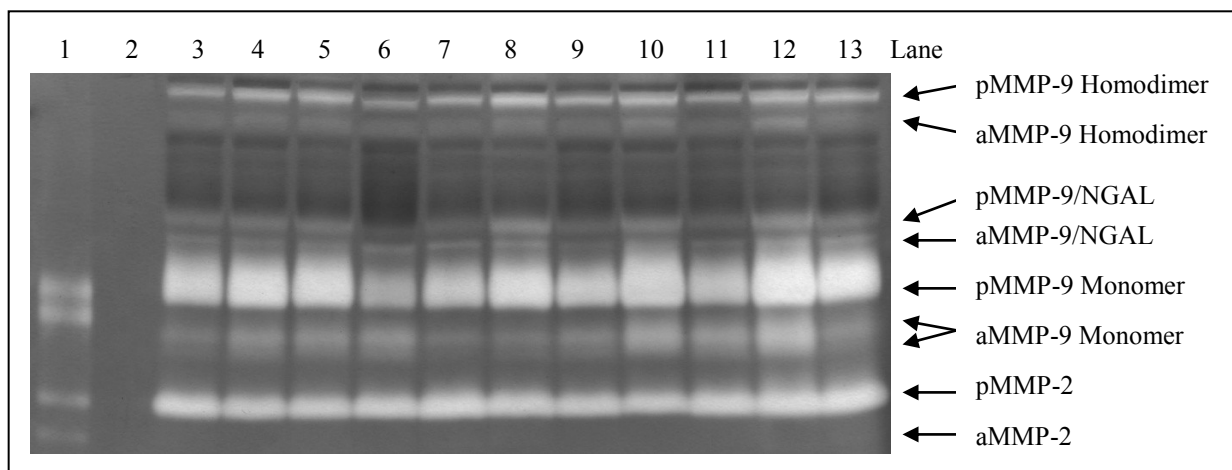


Abbildung 15: Repräsentatives Zymographiegel. Dargestellt ist eines der 36 Zymographiegele. In der ersten Lane ist der Gelatinasestandard (pMMP-9, aMMP-9, pMMP-2 und aMMP-2) aufgetragen. Die Lanes 3-13 enthalten die unterschiedlichen proteolytischen Banden von insgesamt elf verschiedenen CF-Patienten (a = aktives, p = pro-Enzym).

Der Gelatinasestandard enthält vier proteolytische Banden entsprechend dem proMMP-9 Monomer (pMMP-9 bei 92kDa), dem aktiven MMP-9 Monomer (aMMP-9 bei 86kDa), dem proMMP-2 (pMMP-2 bei 72kDa) und dem aktiven MMP-2 (aMMP-2 bei 68kDa). Vier weitere proteolytische Banden im Bereich der Proteine mit höherem Molekulargewicht konnten durch Abschätzung der Molekularmasse durch einen kDa-Standard sowie mit Hilfe des Western Blots bestimmt werden. Die oberste Bande wurde als inaktives MMP-9 Homodimer (~220kDa), die schwächere Bande direkt unterhalb davon, als das aktivierte MMP-9 Homodimer bestimmt. Die beiden Lipocalin-positiven Banden bei ~135 und ~115kDa wurden als inaktives und aktives MMP-9/NGAL Heterodimer identifiziert. Alle Banden fanden sich in unterschiedlicher Ausprägung bei den CF-Patienten und den gesunden Probanden. Das proMMP-9 Monomer lag dabei in allen Fällen in der höchsten Konzentration vor. Einzig ein aktivierte MMP-2 wurde nur bei wenigen Patienten beobachtet und war so schwach ausgeprägt, dass eine quantitative Auswertung nicht erfolgen konnte.

4.4.1 Verteilung der Isoenzyme

Die acht zymographischen Banden jeder Probe wurden getrennt voneinander densitometrisch ausgewertet und die jeweilige Enzymkonzentration berechnet. Hierbei fanden sich zwischen den CF-Patienten und der Kontrollgruppe signifikante Unterschiede. Alle Isoenzyme von MMP-9 und das latente MMP-9 waren bei den CF-Patienten in einer höheren Enzymkonzentration exprimiert. Das aktive MMP-9 Homodimer sowie das latente MMP-9/NGAL Heterodimer lagen dabei in doppelter Konzentration im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe vor.

Tabelle 17: Verteilung der Isoenzyme bei Kontrollgruppe und CF-Patienten

MMPs (in µg/ml)	Mittelwerte		p
	Kontrollgruppe	CF-Patienten	
proMMP-9 Homodimer	0,19 ± 0,08	0,27 ± 0,1	< 0,001**
aktives MMP-9 Homodimer	0,027 ± 0,012	0,056 ± 0,02	< 0,001**
proMMP-9/NGAL Heterodimer	0,035 ± 0,016	0,068 ± 0,03	< 0,001**
aktives MMP-9/NGAL Heterodimer	0,046 ± 0,017	0,055 ± 0,0233	< 0,03*
proMMP-9 Monomer	0,84 ± 0,26	1,04 ± 0,37	< 0,03*
aktives MMP-9 Monomer	0,096 ± 0,024	0,151 ± 0,078	< 0,001**
proMMP-2	0,736 ± 0,125	1,177 ± 0,343	< 0,001**

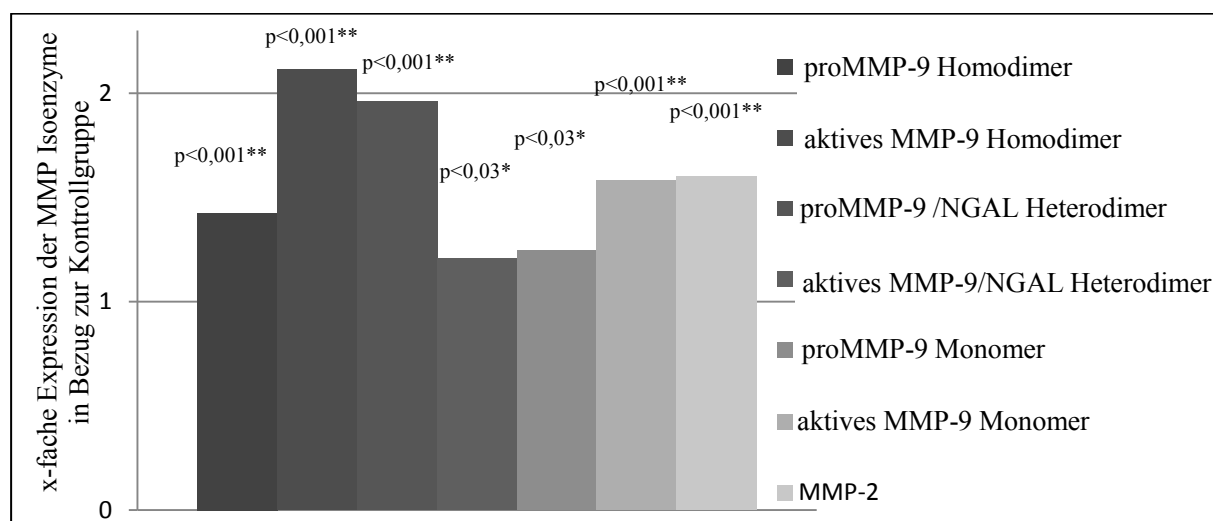


Abbildung 16: Überexpression der Isoenzyme bei CF-Patienten. Die Mittelwerte der zymographischen Enzymkonzentrationen jedes Isoenzymes wurden für die Kontrollgruppe gleich eins gesetzt. Die Graphik zeigt dazu die gesteigerte Expression der einzelnen Isoenzyme bei den CF-Patienten im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe.

Alle zymographischen Isoenzyme, bis auf das aktive MMP-9/NGAL Heterodimer, korrelierten positiv und signifikant untereinander ($p < 0,001$). Dar. Die Zusammensetzung der einzelnen Isoenzyme an der MMP-9 Gesamtkonzentration variierte jedoch zwischen jeder Serumprobe. Den größten prozentualen Anteil stellte das latente MMP-9 Monomer mit $64,3\% \pm 7,7\%$ dar. Die minimalen und maximalen prozentualen Werte bewegten sich dabei von 38% bis 77%. Das MMP-9 Homodimer bildete mit $16,1\% \pm 4,7\%$ die prozentual zweitgrößte Enzymkonzentration am Gesamtanteil. Hier variierte der Anteil von 6,7% bis 40,8% im Serum. Die dritthäufigste Komponente stellte mit einem Mittelwert von $9,0\% \pm 3,7\%$ das aktive MMP-9 Monomer dar. Die prozentualen Enzymkonzentrationen schwankten von 2,0% bis 23,4%.

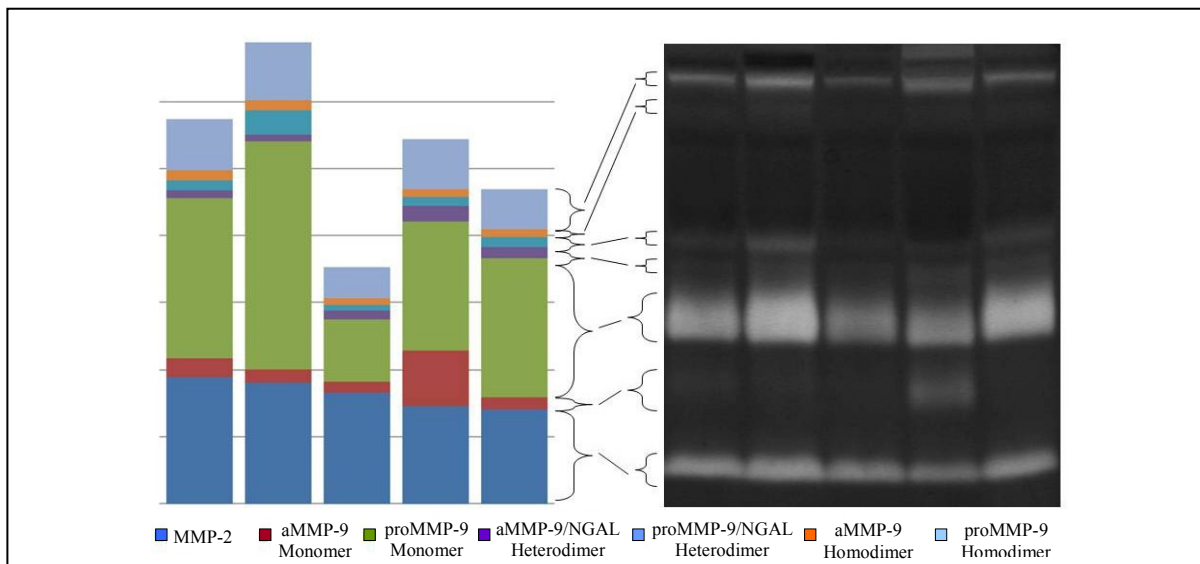


Abbildung 17: Verhältnis der Enzymkonzentration von MMP-9 und MMP-2.
Links: Im Balkendiagramm sind die Enzymkonzentrationen der einzelnen MMP Isoenzyme (siehe Legende) von fünf CF-Patienten dargestellt. *Rechts:* Das zymographische Korrelat zum Balkendiagramm. Die Helligkeitswerte und Größe der Banden entsprechen den Enzymkonzentrationen.

Die prozentuale Verteilung der Isoenzyme unterschied sich signifikant zwischen der Kontroll- und der CF-Patientengruppe. Die Anteile vom aktiven MMP-9 Homodimer und latenten MMP-9/NGAL Heterodimer waren bei den CF-Patienten stärker, das proMMP-9 Monomer signifikant schwächer ausgeprägt als bei der Kontrollgruppe (siehe Tabelle 18). Innerhalb der CF-Patientengruppe zwischen PEx und nicht PEx zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den prozentualen Anteilen.

Tabelle 18: Prozentuale MMP-9 Verteilung

MMPs	prozentuales Enzymverhältnis		p
	Kontrollgruppe	CF-Patienten	
proMMP-9 Homodimer	15,12 ± 3,39	16,81 ± 5,43	→
aktives MMP-9 Homodimer	2,40 ± 1,43	3,48 ± 1,06	↑ < 0,001**
proMMP-9/NGAL Heterodimer	2,67 ± 0,75	4,07 ± 1,16	↑ < 0,001**
aktives MMP-9/NGAL Heterodimer	4,17 ± 2,32	3,75 ± 2,18	→
proMMP-9 Monomer	67,34 ± 5,65	62,38 ± 8,30	↓ < 0,002**
aktives MMP-9 Monomer	8,15 ± 2,26	9,51 ± 4,35	→

Die prozentualen Anteile an aktivem MMP-9 Homodimer und MMP-9/NGAL Heterodimer waren bei den CF-Patienten signifikant stärker ausgeprägt als bei der Kontrollgruppe (↑). Das proMMP-9 Monomer hingegen zeigte einen signifikant geringeren prozentualen Anteil (↓). → bedeutet keine signifikante Veränderung.

4.4.2 Die aktivierten MMP-9 Monomere

Die Literatur beschreibt verschiedene Banden für das aktive MMP-9 Monomer, abhängig davon, wie sie aktiviert werden [142]. In der Zymographie zeigten sich unterhalb des proMMP-9 Monomers zwei nahe zusammenliegende Banden (~86kDa und ~80kDa). Um eine eventuelle Schwankung dieser beiden aktivierten MMP-9 Monomere mit zu erfassen, wurden sie getrennt voneinander bestimmt. Beide Enzymkonzentrationen waren in der CF-Gruppe deutlich gegenüber der Kontrollgruppe hochreguliert ($p < 0,001$). In der weiteren Betrachtung zeigte die prozentuale Verteilung zwischen den beiden aktiven MMP-9 Monomeren bei der Kontrollgruppe eine erhöhte Gewichtung von 70% auf die obere Bande. In der CF-Gruppe fiel die untere Bande im Vergleich zu der Kontrollgruppe stärker aus, so dass sich beide Gruppen signifikant in der prozentuale Verteilung beider aktiven MMP-9 Monomere unterschieden ($p < 0,001$).

4.4.3 Verhältnis von aktivem zu latentem MMP-9

Physiologisch liegt der Großteil der MMPs in der inaktiven Form vor. Nur ein kleiner Anteil hat seine Prodomäne abgespalten und kann EZM degradieren. Ein erhöhter Quotient aus aktivem zu inaktivem MMP-9 spricht damit für ein akutes oder chronisches Entzündungsgeschehen [95]. Um diese Annahme zu untersuchen, wurde das Verhältnis von der Summe aller aktiven zu der Summe aller latenten MMP-9 Isoenzyme bestimmt. Für die

Gruppe der CF-Patienten ergab sich nach der Enzymkonzentration des ELISAs ein mittlerer aktiv/inaktiv Quotient über Eins. Die Kontrollgruppe mit Werten kleiner als 0,5 unterschied sich damit signifikant ($p < 0,001$). Auch zymographisch bestätigte sich eine erhöhte Enzymkonzentration an aktiviertem MMP-9 bei den CF-Patienten im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe ($p = 0,005$). Im Rahmen einer akuten pulmonalen Exazerbation zeigte sich noch einmal ein höherer Serumspiegel an aktiviertem MMP-9, der sich jedoch nicht signifikant von dem der CF-Patienten ohne Exazerbation unterschied.

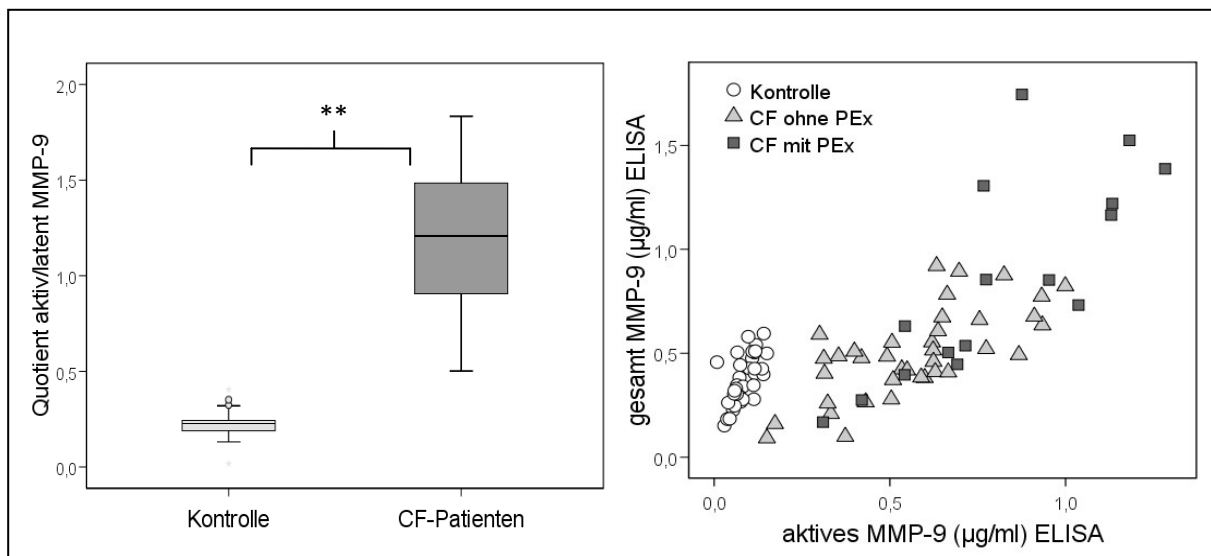


Abbildung 18: Verhältnis von aktiviertem zu latenter MMP-9. *Links:* Dargestellt ist das Verhältnis der Gesamtkonzentration von aktiviertem zu latenter MMP-9 von 58 CF-Patienten und 40 Kontrollprobanden. *Rechts:* Streudiagramm der Gesamtkonzentration von aktiviertem MMP-9 und latentem MMP-9 im ELISA für die Kontrollgruppe sowie für CF-Patienten mit und ohne PEx.

4.4.4 Lungenfunktionsparameter

Unter den 58 CF-Patienten fand sich eine inverse Korrelation zwischen dem forcierten Expirationsvolumen innerhalb einer Sekunde (FEV1) und der zymographischen MMP-9 Gesamtkonzentration ($r = - 0,409$; $p = 0,002$). Mit Abfall der forcierten Einsekundenkapazität stiegen die Konzentrationen aller MMP-9 Isoenzyme, beispielhaft sei hier das aktive MMP-9 mit einer Korrelation von $r = - 0,417$ ($p = 0,002$) genannt. Auch das im ELISA bestimmte MMP-8 ($r = - 0,519$; $p < 0,001$) wies signifikant erhöhte Enzymspiegel mit Abfall des FEV1 auf. Eine Korrelation von FEV1 und TIMP-1 hingegen konnte nicht beobachtet werden.

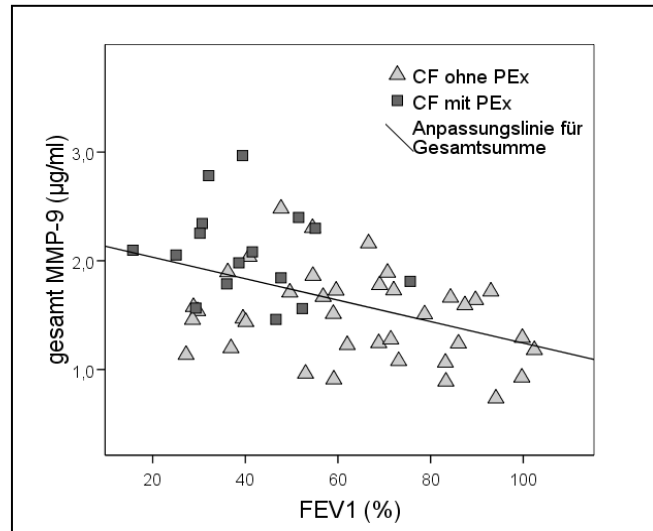


Abbildung 19: FEV1 und MMP-9 bei pulmonaler Exazerbation. CF-Patienten mit pulmonaler Exazerbation (mit PEx) zeigten signifikant geringere FEV1 Werte ($p = 0,001$) mit gleichzeitig erhöhter MMP-9 Konzentration als die CF-Patienten ohne PEx.

4.4.5 Isoenzyme bei akuter Exazerbation

Tabelle 19: MMP-Expression in der Kontroll- und Patientengruppe

MMPs (µg/ml)	Kontroll- gruppe	p ₁	CF-Patienten		
			ohne PEx	p ₂	mit PEx
proMMP-9 Homodimer	0,191	< 0,001	0,261	> 0,1	0,295
aktives MMP-9 Homodimer	0,027	< 0,001	0,053	0,09	0,065
proMMP-9/NGAL Heterodimer	0,035	< 0,001	0,062	0,07	0,077
aktives MMP-9/NGAL Heterodimer	0,046	0,03	0,056	> 0,1	0,057
proMMP-9 Monomer	0,835	> 0,1	0,926	< 0,001	1,32
aktives MMP-9 Monomer	0,096	0,001	0,128	0,005	0,209
proMMP-2	0,736	< 0,001	1,16	> 0,1	1,205
Gesamt MMP-9	1,229	0,003	1,487	< 0,001	2,022

Die drei Gruppen (40 Kontrollprobanden, 40 CF-Patienten ohne Exazerbation, 18 CF-Patienten mit PEx) unterschieden sich in der Expression der einzelnen MMP Isoformen. Signifikanz zwischen: p₁: Kontrollprobanden und CF-Patienten ohne PEx, p₂: CF-Patienten ohne und mit PEx.

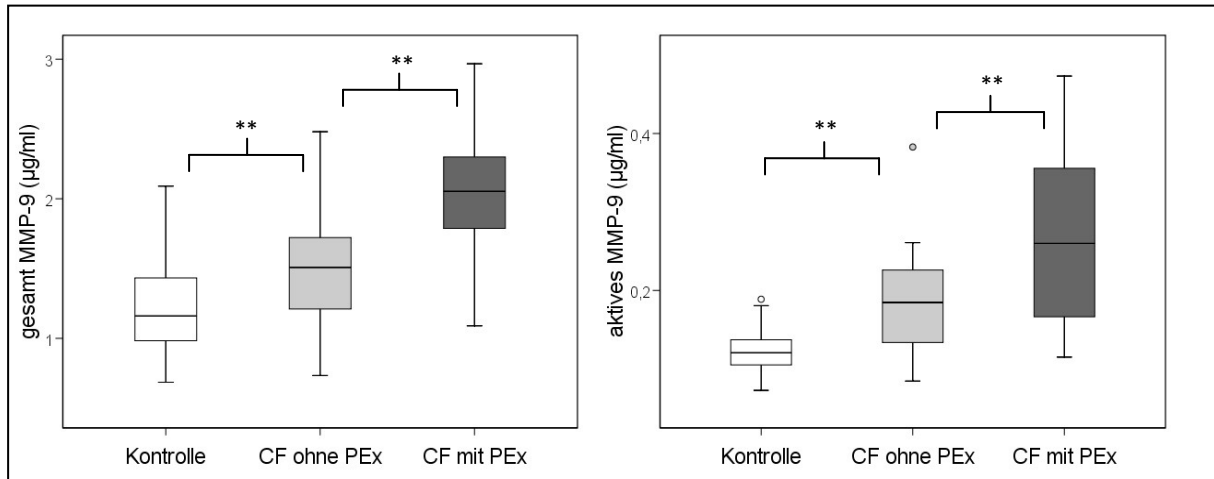


Abbildung 20: MMP-9 Expression in der Kontroll- und Patientengruppe. Stellvertretend für alle MMPs sind die MMP-9 Gesamtkonzentration (*links*) sowie die Summe aller aktivierten MMP-9 (aMMP-9 Homodimer, aMMP-9 Monomer-1 und aMMP-9 Monomer-2) (*rechts*) dargestellt. Die Enzymkonzentrationen nahmen von den Kontrollprobanden über die CF-Patienten ohne PEx bis zu den CF-Patienten mit PEx signifikant zu.

4.5 ELISA: MMP-8, MMP-9 und TIMP-1

Die Serumproben der CF-Patienten sowie der gesunden Probanden wurden mit dem ELISA auf die Gesamtkonzentration von MMP-8, MMP-9 und TIMP-1 untersucht. MMP-8 und MMP-9 lagen in signifikant höheren Enzymkonzentrationen bei CF-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe vor. Innerhalb der CF-Gruppe fand sich bei den CF-Patienten mit Exazerbation noch einmal eine höhere MMP-8 und MMP-9 Expression als bei den CF-Patienten ohne Exazerbation.

Tabelle 20: MMP-8, MMP-9, TIMP-1 und MMP-9/TIMP-1 Quotient im ELISA

Enzym in ng/ml	Kontrollgruppe	p ₁	CF-Patienten		
			ohne PEx	p ₂	mit PEx
MMP-8	20,34 ± 16,7	< 0,001	42,3 ± 26,75	0,001	125,51 ± 113,5
MMP-9	357,36 ± 123,26	0,002	499,55 ± 210,55	0,006	841,75 ± 483,1
TIMP-1	248,99 ± 40,16	> 0,1	251,45 ± 65,76	0,018	295,56 ± 78,91
MMP9/TIMP-1	1,48 ± 0,48	0,002	2,02 ± 0,86	0,021	3,11 ± 1,45

ELISA Werte von 40 gesunden Probanden und 52 CF-Patienten, unterteilt in 37 CF-Patienten ohne pulmonale Exazerbation (ohne PEx) und 15 CF-Patienten mit PEx. Signifikanz zwischen: p₁: Kontrollprobanden und CF ohne PEx, p₂: CF-Patienten ohne und mit PEx.

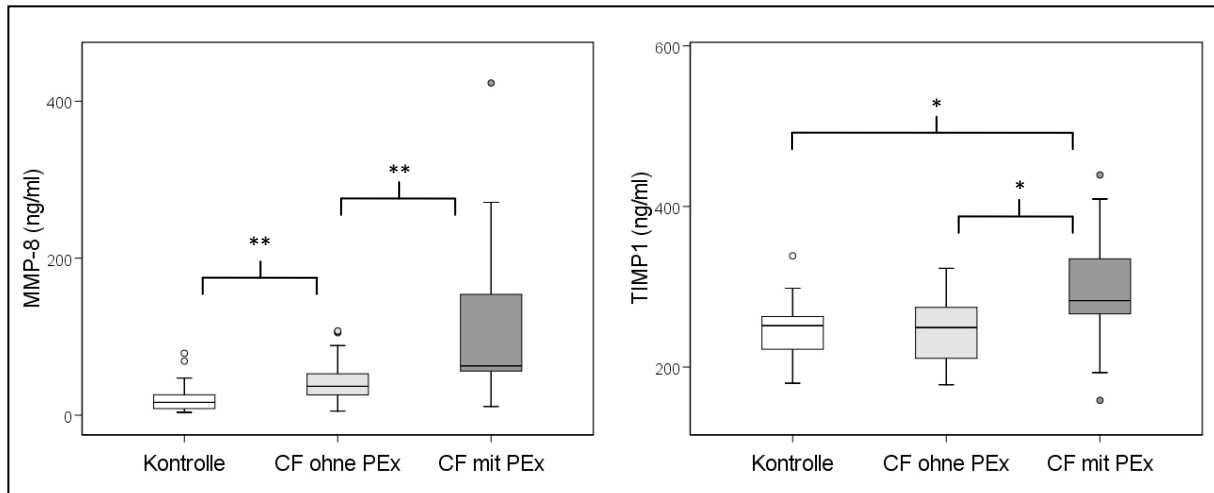


Abbildung 21: MMP-8 und TIMP-1. Enzymkonzentration von MMP-8 und TIMP-1 bei der Kontrollgruppe, CF-Patienten ohne PEx und CF-Patienten mit PEx. Die Expression von TIMP-1 war in allen Gruppen annähernd konstant.

Bezüglich der TIMP-1 Expression unterschied sich die Gesamtgruppe der CF-Patienten nicht von der Kontrollgruppe. Dem im Rahmen einer akuten Exazerbation nur leichten TIMP-1 Anstieg ($p = 0,018$) stand eine stark gesteigerte MMP-9 Expression gegenüber, was sich an einem erhöhten MMP-9/TIMP-1 Quotient widerspiegelte.

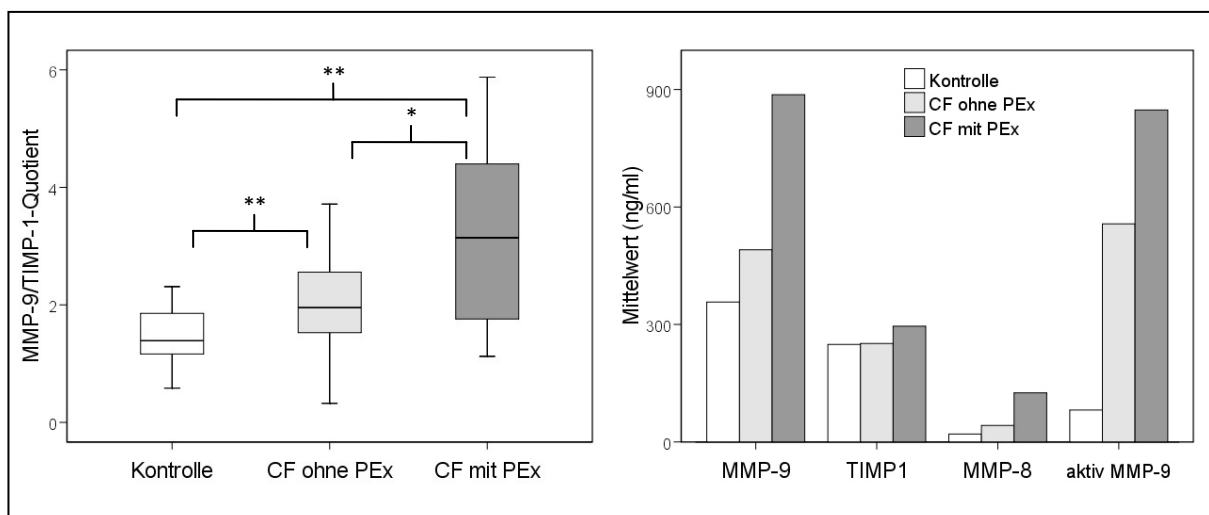


Abbildung 22: MMP-9/TIMP-1-Quotient. Bei den CF-Patienten, insbesondere bei den CF-Patienten mit Exazerbation, fand sich eine gesteigerte Expression von MMP-9 bei nur geringfügigem Anstieg der TIMP-1 Expression. Die Folge war ein erhöhter MMP-9/TIMP-1 Quotient.

4.5.1 Korrelation der MMPs mit inflammatorischen Parametern

Die Leukozyten, Anzahl aller Entzündungszellen, korrelierten mit der im Blut zirkulierenden MMP-8 ($p < 0,001$), der gesamten und der aktiven MMP-9 Konzentration ($p < 0,001$) sowie dem Gewebehinhibitor TIMP-1 ($p < 0,001$) hoch signifikant. Nach Differenzierung der Leukozyten ergaben sich ähnlich signifikante Veränderungen der MMPs für die neutrophilen Granulozyten sowie die Monozyten. Insbesondere MMP-8 und MMP-9 zeigten zusätzlich zur jeweiligen hohen Korrelation mit den Leukozyten eine auffällig starke Assoziation untereinander ($r = 0,856$; $p < 0,001$).

Tabelle 21: Korrelation der MMPs und TIMP-1 mit inflammatorischen Zellen

	Leukozyten	Neutrophile	Basophile	Eosinophile	Monozyten	Lymphozyten
MMP-8	$r = 0,649$ $p < 0,001^{**}$	$r = 0,607$ $p < 0,001^{**}$	$r = 0,323$ $p = 0,032^*$	$r = -0,148$ $p > 0,1$	$r = 0,449$ $p < 0,001^{**}$	$r = 0,343$ $p = 0,014^*$
gesamt MMP-9	$r = 0,558$ $p < 0,001^{**}$	$r = 0,566$ $p < 0,001^{**}$	$r = 0,277$ $p > 0,1$	$r = -0,109$ $p > 0,1$	$r = 0,317$ $p = 0,021^*$	$r = 0,284$ $p = 0,038^*$
aktives MMP-9	$r = 0,493$ $p < 0,001^{**}$	$r = 0,527$ $p < 0,001^{**}$	$r = 0,126$ $p > 0,1$	$r = -0,057$ $p > 0,1$	$r = 0,304$ $p < 0,027^*$	$r = 0,203$ $p > 0,1$
TIMP-1	$r = 0,474$ $p < 0,001^{**}$	$r = 0,391$ $p = 0,005^{**}$	$r = 0,044$ $p > 0,1$	$r = 0,192$ $p > 0,1$	$r = 0,377$ $p = 0,006^{**}$	$r = 0,167$ $p > 0,1$
MMP-9/ TIMP-1	$r = 0,425$ $p < 0,002^{**}$	$r = 0,372$ $p = 0,007^{**}$	$r = 0,338$ $p = 0,025^*$	$r = -0,004$ $p > 0,1$	$r = 0,449$ $p = 0,001^{**}$	$r = 0,374$ $p = 0,007^{**}$

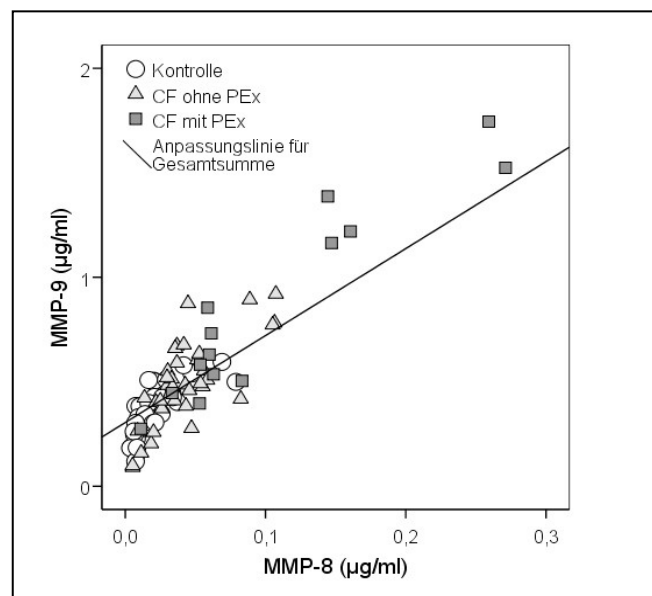


Abbildung 23: Graphische Darstellung der Korrelation zwischen MMP-8 und MMP-9.

4.6 MMPs bei medikamentöser Therapie

4.6.1 Dauerhafte antibiotische und antiinflammatorische Therapie

Chronische Entzündungsreaktionen und immer wiederkehrende Infektionen, besonders bei Besiedlung mit Problemkeimen, wie beispielsweise *Pseudomonas aeruginosa*, erfordern eine dauerhafte Steroid und/oder antibiotische Therapie. In Anbetracht des relativ hohen Alters und dem damit fortgeschrittenen Erkrankungszustand befanden sich die meisten der CF-Patienten der Studie in einer intensiven medikamentösen Behandlung. Die regelmäßige Einnahme von Antibiotika, wie Azithromycin, war bei insgesamt 48 Patienten oder rund 86% zu beobachten. 50 CF-Patienten, etwa 90%, nahmen eine dauerhafte antiinflammatorische Therapie in Form von Steroidinhalatoren zu sich. Die CF-Patienten, die eine dauerhafte antibiotische Therapie benötigten, zeigten im Durchschnitt eine geringere prozentuale FEV1 ($p = 0,001$), einen niedrigeren Sauerstoffpartialdruck ($p = 0,002$) sowie eine höhere Konzentration für MMP-9 Homodimer ($p = 0,003$) und MMP-8 ($p = 0,02$) als die CF-Patienten ohne Therapie. Die MMP-9 Gesamtkonzentration bei der Kontrollgruppe und den CF-Patienten mit und ohne dauerhafte antibiotische Medikation ist in Abbildung 24 wiedergegeben. Ähnliche Verläufe ergaben sich bei sämtlichen MMP-9 Isoenzymen sowie MMP-2. Eine signifikante Reduktion der MMPs oder der Entzündungszellen unter der dauerhaften antibiotischen Therapie ließ sich hingegen nicht finden.

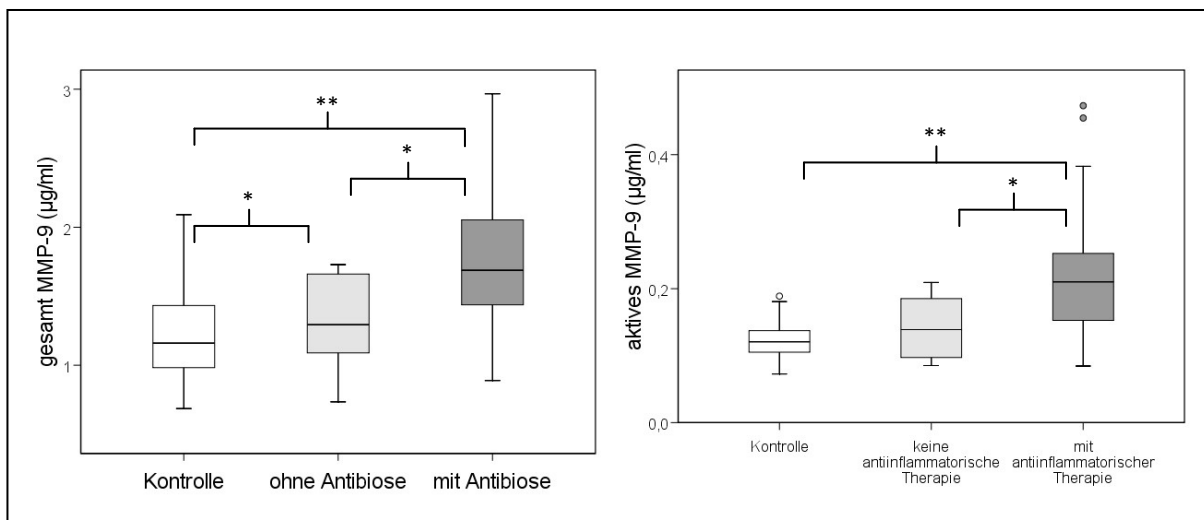


Abbildung 24: Einfluss der antibiotischen und antiinflammatorischen Therapie. Die dauerhafte medikamentöse antibiotische (*links*) und antiinflammatorische (*rechts*) Therapie bei CF-Patienten zeigte keinen signifikanten Abfall der MMPs, vielmehr bestand eine erhöhte Expression.

Ähnliche Ergebnisse konnten auch unter einer dauerhaften antiinflammatorischen Steroidtherapie beobachtet werden. CF-Patienten ohne antiinflammatorische Therapie zeigten eine in etwa gleiche Expression, an beispielsweise aktiviertem MMP-9 im Serum, wie die Kontrollgruppe. In der Gruppe der CF-Patienten mit Steroideinnahme fand sich entgegen der Erwartung kein Abfall der MMP-Enzymkonzentrationen unter der dauerhaften antiinflammatorischen Therapie, sondern ein signifikanter Anstieg. Auch wiesen die CF-Patienten mit einer dauerhaften Steroidtherapie eine Reduktion der Sauerstoffsättigung auf im Vergleich zu den CF-Patienten ohne antiinflammatorische Therapie ($p < 0,014$).

4.6.2 Patienten vor und nach intravenöser antibiotischer Therapie

In dem Beobachtungszeitraum von ungefähr einem Jahr stellten sich 58 CF-Patienten in der Ambulanz vor. Insgesamt 18 CF-Patienten wiesen bei Erstvorstellung eine akute Exazerbation mit einem Rosenfeld-Wert von über 2,6 auf. Sieben Patienten mit PEx wurden intravenös mit Tobramycin therapiert und deren klinische und laborchemische Befunde wurden vor und nach antibiotischer Therapie miteinander verglichen. Elf Patienten konnten nicht in die Untersuchung aufgenommen werden. Entweder erhielten sie orale Antibiotika oder entzogen sich dem klinischen und serologischen Follow up nach Ende der antibiotischen Therapie durch Vorstellung bei ihrem niedergelassen Pneumologen. Bei den verbliebenen sieben Patienten, bei zwei Patienten zu zwei verschiedenen Zeitpunkten, wurden MMP-8, MMP-9 und TIMP-1 im ELISA bestimmt und zusätzlich eine Gelatine-Zymographie durchgeführt. Einen repräsentativen Ausschnitt mit Senkung der aktiven MMP-9 Konzentration nach antibiotischer Therapie bei einem CF-Patienten zeigt Abbildung 25.

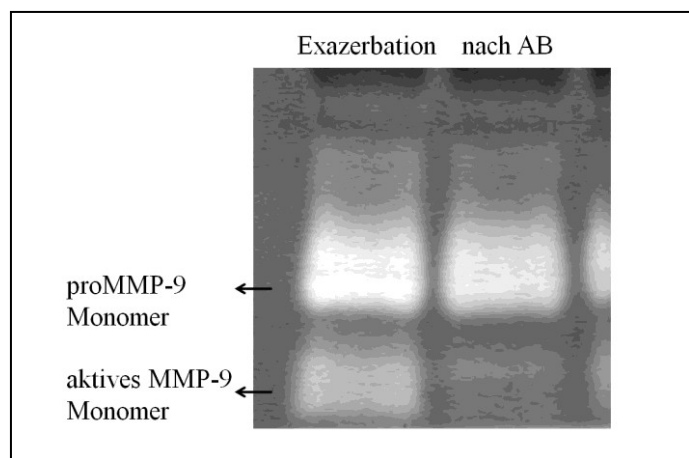


Abbildung 25: Überexpression bei pulmonaler Exazerbation. Die Konzentrationen (Helligkeitswerte) von proMMP-9 und aktivem MMP-9 vor (linke Lane) und nach antibiotischer Therapie (AB).

Die antibiotische Behandlung führte zu einem Abfall der Entzündungswerte sowie zu einer klinischen Besserung der CF-Patienten, was sich in der Reduktion des Rosenfeld-Score widerspiegelte ($p = 0,007$). Obwohl sich in Abbildung 26 Tendenzen erkennen lassen, haben sich weder die serologischen Entzündungsparameter, wie CRP oder Leukozyten, noch die Lungenfunktionswerte signifikant nach der antibiotischen Therapie verändert.

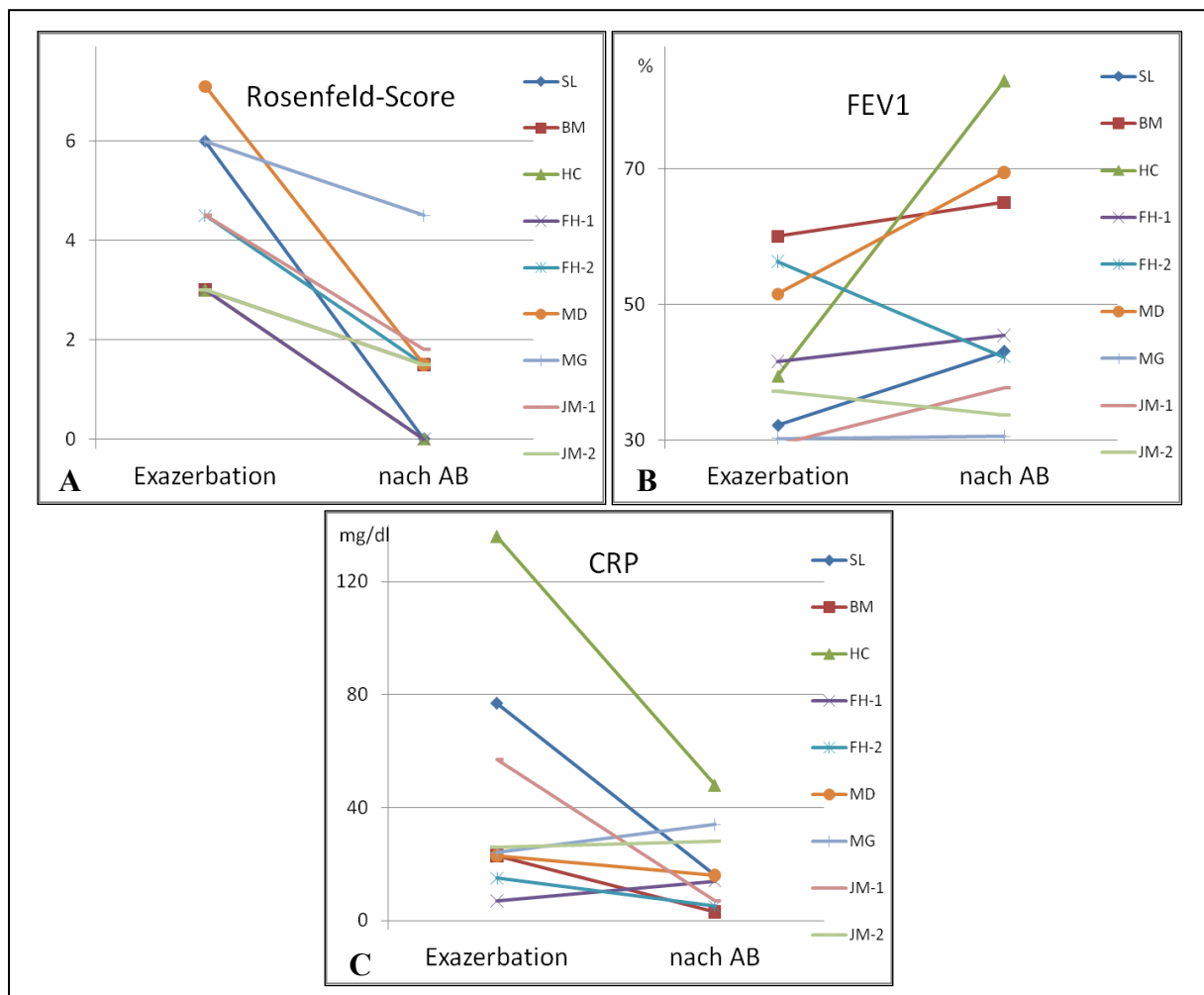


Abbildung 26: Klinische und serologische Parameter vor und nach antibiotischer Therapie. Die klinischen Parameter Rosenfeld-Score (A) und forcierte Einsekunden-Kapazität (B) sowie das CRP (C), dargestellt in neun Fällen (abgekürzt durch die Initialen) zum Zeitpunkt einer akuten Exazerbation und nach antibiotischer Therapie.

Die Konzentrationen von aktivem MMP-9 Homodimer ($p = 0,008$) und der Gesamtmenge an aktivem MMP-9 ($p = 0,012$) sanken signifikant nach der intravenösen antibiotischen Therapie im Vergleich zum Zeitpunkt vor der Intervention. MMP-2, MMP-8, TIMP-1, gesamtes MMP-9 und alle anderen Unterformen von MMP-9 (Monomer, NGAL-Heterodimer und

Homodimer) sanken ebenfalls in der Konzentration, konnten aber das Signifikanzniveau nicht erreichen.

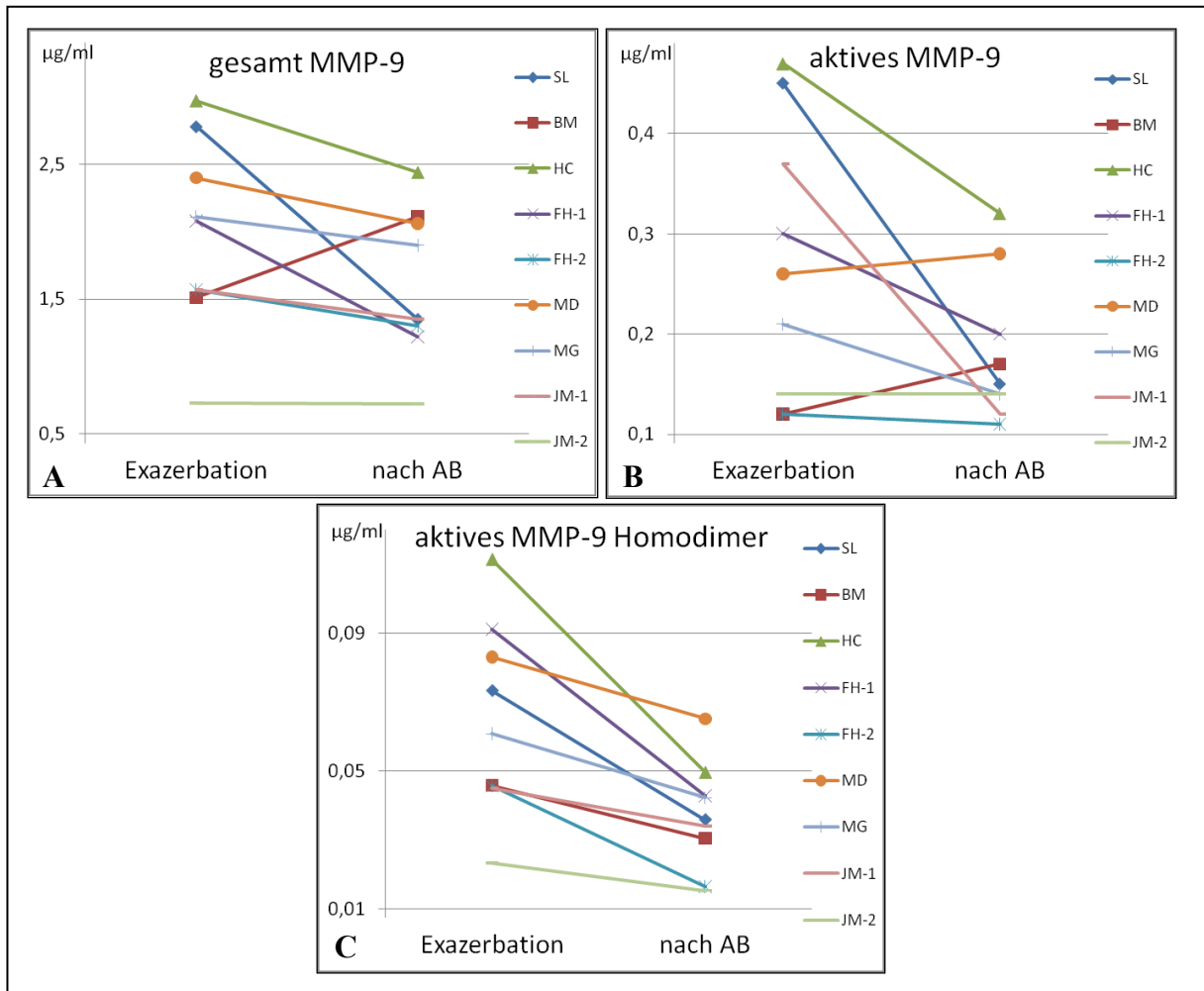


Abbildung 27: MMP-9 Isoenzyme vor und nach antibiotischer Therapie. Dargestellt ist die MMP-9 Gesamtkonzentration (A), die Gesamtmenge aller aktvierten MMP-9 (B) sowie das aktivierte MMP-9 Homodimer (C) in neun Fällen zum Zeitpunkt einer Exazerbation und nach antibiotischer Therapie.

5 Diskussion

5.1 Kritische Diskussion der Methoden

Die vorliegende Arbeit basiert auf der Untersuchung verschiedenster Isoenzyme der Gelatinase A (MMP-2) und der Gelatinase B (MMP-9) bei Patienten mit cystischer Fibrose. Neben der zunächst rein qualitativen Bestimmung sollte auch die quantitative Messung der Isoenzyme erfolgen, um klinisch stabile CF-Patienten mit gesunden Kontrollprobanden und CF-Patienten mit einer akuten Exazerbation (PEX) untereinander vergleichen zu können. Darüber hinaus sollte geprüft werden, ob die Bestimmung der Enzymkonzentrationen zur Verlaufskontrolle einer intravenösen antibiotischen Therapie geeignet ist.

5.1.1 Rekrutierung der CF-Patienten und der Kontrollgruppe

In der vorliegenden Studie wurden die Daten 58 adulter CF-Patienten über einen Zeitraum von zwölf Monaten untersucht. Die Studie zeichnet sich insbesondere durch das außergewöhnliche Patientenkollektiv aus. Bezogen auf die Prävalenz der CF und das relativ hohe Lebensalter der Patienten war der Stichprobenumfang sehr groß. Ähnlich angelegte Arbeiten umfassten weit weniger CF-Patienten oder schlossen Personen unter 18 Jahren ein [7, 16, 127, 128, 143]. Die Altersverteilung der CF-Patienten entsprach einer Normalverteilung, wies jedoch mit einem Alter von 31 Jahren ein im Mittel höheres Lebensalter auf als die Kontrollgruppe mit 26 Jahren. Es liegen keine Hinweise vor, dass eine Erhöhung der MMPs vom Alter abhängig ist. Thrailkill und Mitarbeiter beschreiben sogar eine negative Korrelation von der MMP-2 Konzentration und dem Lebensalter [136].

5.1.2 Materialgewinnung

Die Abnahme, Bearbeitung und Auswertung der Blutproben erfolgte nach standardisierten Methoden. Auch die Erhebung der klinischen Parameter, wie der Lungenfunktion, richtete sich nach internationalen Richtlinien [46]. Bei der Bestimmung der Exazerbation nach Rosenfeld stellten die sechs klinischen Symptome subjektive Befunde dar, die von Untersucher zu Untersucher variieren können [67]. Die klinische Einteilung der pulmonalen Inflammation unterliegt dabei einem gewissen Spielraum, gewährleistet aber durch die Summe aller klinischen Befunde eine sehr gute Orientierung. Es muss angefügt werden, dass keine laborchemischen und klinischen Parameter der Kontrollgruppe bestimmt wurden. Um

die CF-Gruppe mit der Kontrollgruppe vergleichen zu können, wurde der allgemeine Referenzwert herangezogen. Abhängig von Lebensalter und Geschlecht existieren durch statistische Untersuchungsergebnisse nicht kranker Personen Standards, die 95% der gesunden Normalbevölkerung entsprechen. Hierunter fielen beispielsweise die Lungenfunktionswerte, die Anzahl der immunologischen Zellen oder die serologischen Parameter.

5.1.3 Bedeutung der Zymographie

In dieser Arbeit wurden die labortechnischen Verfahren der Zymographie, des ELISAs und des Western Blots angewandt. Alle drei Methoden stellen etablierte Verfahren in der Nachweisdiagnostik von Proteinen dar. Während der ELISA neben einer qualitativen auch eine hohe quantitative Aussagekraft besitzt, blieb die Zymographie bisher überwiegend auf den qualitativen Nachweis von Proteinen beschränkt. Eine zymographische Bestimmung der Enzymkonzentration wird in der Literatur hingegen sehr selten beschrieben. Dabei ist die Zymographie ein geeignetes Verfahren eine Vielzahl von MMPs gleichzeitig und mit hoher Sensitivität (10pg) zu untersuchen [139]. Gute Ergebnisse hierfür finden sich bspw. bei Untersuchungen von Kolon- und Rektumkarzinomen [104, 144], der COPD [145, 146], der juvenile Arthritis [147] und der cystischen Fibrose [16].

Die Enzymkonzentrationen von ELISA und Zymographie ergaben eine signifikante Korrelation ($r = 0,882^{**}$) beider Messmethoden. Auch konnten mit der Zymographie bedeutende Aussagen bezüglich der MMP-2 und MMP-9 Expression bei CF-Patienten, wie sie schon mit dem ELISA in anderen Arbeiten nachgewiesen wurden, bestätigt werden [7, 14, 127]. Es konnte damit gezeigt werden, dass die quantitative Zymographie zur Konzentrationsbestimmung der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 eine vergleichbare Messmethode zum ELISA darstellt. Eine geringe Abweichung zu den ELISA Werten kann insbesondere durch die Vielzahl methodischer Einzelschritte bei der Zymographie erklärt werden, die potentielle Fehlerquellen beinhalten können. Insbesondere eine vorzeitige Aktivierung der MMPs durch unterbrochene Kühlung kann zu einer fehlerhaften Konzentrationsänderung der einzelnen Gelatinasen führen. Der große Vorteil der zymographischen Darstellung ist der zeitgleiche Nachweis sämtlicher MMP-9 Isoenzyme in einem Gel. In den vorliegenden Zymogrammen konnten auf diese Weise das MMP-9 Homodimer, das MMP-9/NGAL Heterodimer sowie das MMP-9 Monomer jeweils in der latenten und aktiven Form getrennt voneinander untersucht werden. Moderne ELISA Kits

ermöglichen neben der MMP-9 Gesamtkonzentration die Bestimmung der aktivierten MMP-9 Gesamtkonzentration, andere Enzymuntergruppen bleiben dabei jedoch unberücksichtigt. Der Einsatz von ELISA und Western Blot benötigt zudem die Anwendung von Antikörpern, die das Verfahren sehr kostenintensiv gestalten. Die Zymographie bietet hierzu eine schnelle und günstigere Alternative.

5.1.4 Verifizierung der proteolytischen Banden

Die Auswertung der insgesamt acht zymographischen Banden erfolgte zunächst anhand der Molekularmasse. Hierbei ergaben sich proteolytische Aktivitäten bei 72kDa, 80kDa, 86kDa, 92kDa, 115kDa, 135kDa, 200kDa und 220kDa. Die vollständige Inhibierung aller Banden durch EDTA bewies die Existenz von MMPs. Mit Hilfe des spezifischen Gelatinasstandards wurden proMMP-9 Monomer (92kDa), zwei Banden im Bereich des aktivierten MMP-9 Monomers (80kDa, 86kDa) sowie des proMMP-2 (72kDa) bestimmt. Polyklonale MMP-9 Antikörper detektierten im Western Blot neben dem bereits bekannten MMP-9 Monomer zwei weitere MMP-9 assoziierte Banden, die in der Literatur als MMP-9 Homodimer (~220kDa) und MMP-9/NGAL Heterodimer beschrieben werden (~135kDa) [106, 110]. Das MMP-9 Homodimer, welches aus zwei über eine Disulfid-Brücke kovalent gebundenen MMP-9 Monomeren besteht, wird unter reduzierten Bedingungen (Mercaptoethanol) gespalten [148]. Der definitive Nachweis des MMP-9/NGAL Heterodimers mit simultaner Detektion von Antikörpern gegen MMP-9 und NGAL oder der Massenspektrographie konnte auch mit mehrfacher Proteinanreicherung mittels Gelatin Sepharose nicht erbracht werden. Eine eindeutige Charakterisierung der Bande findet sich hingegen in der Literatur [110, 131, 148-150]. Yan et al. konnten neben dem direkten Nachweis einer zymographisch ~125kDa Bande durch Antikörper gegen NGAL und MMP-9 im Western Blot auch die Rekonstruktion eines MMP-9/NGAL-Komplexes durch in vitro Vermischung von MMP-9 und NGAL nachweisen. [149]. Die Aktivierung aller latenten Isoenzyme mit Hilfe von 4-Amino-Phenyl-Quecksilberacetat (APMA), welches das latenzvermittelnde Propeptid aus dem aktiven Zentrum verdrängt, gelang trotz wiederholter Versuche nicht. Ardi und Mitarbeiter hatten durch diese Autoaktivierung ein Verblässen der eigentlichen Bande und Erzeugung je einer Bande mit niedrigerem Molekulargewicht des Monomers, des Heterodimers sowie des Homodimers beobachtet [110].

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Die obstruktive Lungenerkrankung stellt den Hauptgrund für Morbidität und Mortalität der cystischen Fibrose dar. Eine chronische Inflammation sowie rezidivierende akute pulmonale Exazerbationen, charakterisiert durch einen von neutrophilen Granulozyten dominierten, gewebschädigenden Entzündungsprozess, enden in einem destruktiven Remodeling des Lungenparenchyms. Standardisierte, nicht invasive Parameter zur Validierung chronischer und akuter Inflammation sowie eine Verlaufskontrolle medikamentöser Therapien wurden bisher weder publiziert noch veröffentlicht. Die vorliegende Arbeit untersuchte erstmalig die Isoenzyme der Matrix-Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 von adulten CF-Patienten und verglich diese mit serologischen und klinischen Funktionsparametern. Ziel dieser Arbeit ist die Evaluation nicht invasiver Biomarker zur frühzeitigen Beurteilung pulmonaler Exazerbationen sowie zur Antwort- und Verlaufskontrolle antibiotischer Therapien.

5.2.1 MMP-9 Gesamtkonzentration

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen, dass im Serum von adulten, klinisch stabilen CF-Patienten die Expression von MMP-2 ($p < 0,001$) und MMP-9 ($p = 0,001$) im Vergleich zu gesunden Probanden erhöht ist und diese negativ mit der Lungenfunktion assoziiert sind. Beide MMPs sind in der Lage EZM zu degradieren und stehen im Verdacht eine entscheidende Rolle in der chronischen Parenchymdestruktion bei Patienten mit cystischer Fibrose zu spielen [127]. Dass diese Inflammation nicht nur eine lokale Auswirkung der MMPs im Bronchialsystem von CF-Patienten besitzt [6, 7, 16, 127, 128], sondern auch systemisch im Blut nachweisbar ist, wurde durch Roderfeld et. al 2009 bei adulten CF-Patienten belegt [14]. Ob die serologische Proteasenerhöhung durch eine primär pulmonale Ausschüttung mit anschließender Diffusion, bspw. über kleine Läsionen der Lungenwege, in die Blutbahn gelangte oder die MMPs direkt durch eine systemische Inflammation im Blut exprimiert werden, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Untersuchungen, die in der BAL von CF-Kindern eine 300 fach erhöhte MMP-8 sowie eine 116 fach erhöhte MMP-9 Konzentration im Vergleich zu gesunden Kindern beobachteten, sprechen jedoch für eine Entzündungsreaktion, die sich hauptsächlich in den Lungenwegen abspielt [127]. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie belegen im Serum eine dreifache MMP-8 sowie eine doppelte MMP-9 Konzentration bei klinisch stabilen CF-Patienten gegenüber der Kontrollgruppe. Ähnlich hohe serologische Konzentrationsdifferenzen beider MMPs wurden auch zwischen COPD Patienten und gesunden Probanden gefunden [9]. Brajer

und Mitarbeiter beobachteten weiterhin, dass mit der erhöhten Serumkonzentration an MMP-9 eine Reduktion der Lungenfunktion sowie ein aggressiverer Krankheitsverlauf einhergehen [9, 151]. Diese Beobachtung konnte auch für die CF bestätigt werden. Die Lungenfunktion, messbar durch die FEV1 oder die Vitalkapazität, zeigte eine signifikant inverse Korrelation mit MMP-8 ($r = -0,519$; $p < 0,001$) und aktiviertem MMP-9 ($r = -0,417$; $p = 0,001$). Die hohe Assoziation zwischen Lungenobstruktion und der Anzahl neutrophiler Granulozyten ($p < 0,001$) unterstreicht zusätzlich das enge Zusammenspiel zwischen inflammatorischen Zellen und MMPs bei klinisch stabilen CF-Patienten.

5.2.2 Gesamtkonzentration aller aktivierter MMP-9 Isoformen

Das Hauptziel der vorliegenden Studie war es zu demonstrieren, wie sich die unterschiedlichen MMP-9 Isoenzyme bei adulten CF-Patienten verhalten. Die gewonnenen Daten belegen eine Erhöhung der MMP-9 Gesamtkonzentration bei CF-Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe und bestätigen damit vorausgegangene Untersuchungen [7, 14, 128, 143]. Der Blickwinkel dieser fremden Studien blieb jedoch auf die MMP-9 Gesamtkonzentration fokussiert. Nur wenige Arbeiten untersuchten darüber hinaus auch die Existenz von aktivierten MMP-9 Monomeren und beschränkten sich dann häufig auf den rein qualitativen Nachweis [6, 15, 127, 152]. Der Großteil der Gelatinasen liegt in der inaktiven Form vor und zeigt keine destruierenden Eigenschaften [3, 12, 34, 97, 103]. Entscheidend für den strukturellen Umbau der Lunge sind jedoch im besonderen Maße die aktivierten MMPs mit ihrer proteolytischen Aktivität [16].

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass nicht nur eine erhöhte MMP-9 Gesamtkonzentration, sondern auch eine erhöhte Konzentration an aktivierter MMP-9 in Serumproben von CF-Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe vorliegen ($p < 0,001$). Eine besondere Bedeutung kommt in diesem Zusammenhang dem Quotienten aus aktivem und inaktivem/latentem Enzymanteil zu, da das Verhältnis von aktivem und latentem MMP-9 nicht im gleichen Maße zwischen beiden Gruppen anstieg. Die CF-Patienten wiesen deutlich mehr aktiviertes MMP-9 auf als die Kontrollgruppe ($p = 0,005$). Diese Beobachtung verdeutlicht einerseits, dass bereits bei klinisch unauffälligen CF-Patienten eine gesteigerte proteolytische Aktivität existiert, andererseits, dass die Antiproteasen mit einer suffizienten Inhibition überfordert sind. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Delacourt und Mitarbeiter, die im Sputum von 27 CF-Patienten die freie Gelatinaseaktivität bestimmten. Die Menge an nicht inhibierter Gelatinase korrelierte dabei nicht nur im hohen Maße mit dem aktivierten

MMP-9 Monomer, sondern auch mit der Menge an Abbauprodukten von Kollagen-Typ IV, dem wichtigsten Substrat von MMP-9 [16]. Das Voranschreiten der Lungendestruktion ist folglich mehr mit den aktivierten Gelatinasen und weniger mit der Gesamtkonzentration an MMP-9 assoziiert. Die Umwandlung der latenten MMPs hin zum aktivierten Enzym unterliegt vielfältigen Regulationsmechanismen. Einen entscheidenden Einfluss besitzt in diesem Zusammenhang die humane neutrophile Elastase (HNE). Diese Serinprotease aus neutrophilen Granulozyten, welche auch bei klinisch stabilen CF-Patienten erhöht ist [15], führt durch Abspaltung der Prodomäne von MMP-9 zu einem Anstieg der aktivierten MMP-9 Konzentration [6, 152]. Die gleichzeitige Eigenschaft von HNE zur Degradation von TIMP-1 begünstigt das Ungleichgewicht von Protease und Antiprotease [15].

Zusammenfassend unterstreichen die vorliegenden Ergebnisse die Tatsache, dass eine erhöhte Aktivität aktivierter MMP-9 bereits bei klinisch unauffälligen CF-Patienten vorliegt und diese enger mit dem Krankheitsverlauf assoziiert ist als die Gesamtkonzentration an MMP-9. Vor diesem Hintergrund wäre eine antiproteatische Therapie auch bei den CF-Patienten zu diskutieren, die nicht regelmäßigen Exazerbationen unterliegen.

5.2.3 Aktiviertes MMP-9 Monomer

Bei der zymographischen Auswertung konnten unterhalb des latenten MMP-9 Monomers zwei proteolytisch aktive Banden bei ca. 86kDa und 80kDa beobachtet werden. Bisher wurde bei ähnlichen Untersuchungen zur cystischen Fibrose ausschließlich von einer Bande im Bereich der aktivierten Gelatinase B berichtet, die abhängig von den Autoren zwischen 78kDa und 88kDa bestimmt wurde [6, 16, 106, 127, 152]. Eine Unterscheidung der aktivierten MMP-9 Spaltprodukte könnte dabei Rückschlüsse auf ihren Aktivierungsprozess ermöglichen.

Die Aktivierung von proMMP-9 ist abhängig von der primären Protease, die spezifisch an verschiedensten Stellen der Prodomäne die Initialproteolyse einleitet [100]. Nach Konformationsänderung des Proteins mit Bildung eines intermediären Metalloproteinase-Moleküls kommt es erst in einem weiteren Schritt, durch Autokatalyse oder durch Einfluss anderer MMPs, zur Abspaltung des Propeptids und damit zur vollständigen Aktivierung des Enzyms [96]. Die Arbeitsgruppen um Gaggar und Jackson beobachteten, dass HNE die Prodomäne am C-Terminus bei Val38 und Ala39 spaltet. Es resultierte ein 86kDa großes intermediäres Enzym, welches erst durch die anschließende autokatalytische

Abspaltung der verbleibenden Prodomäne in ein aktives Protein von ca. 78kDa überführt werden konnte [6, 15]. Ogata und Mitarbeiter aktivierten proMMP-9 durch Stromelysin (MMP-3) und generierten durch Spaltung zunächst zwischen Glu59 und Met60 ein inaktives Zwischenenzym (86kDa) sowie im Anschluss zwischen Arg87 und Phe88 ein ca. 82kDa großes aktives Isoenzym [109]. Die kurzlebigen und normalerweise inaktiven Zwischenstufen, die stark von der Proteasenkonzentration und der Inkubationszeit abhängig sind [109, 153], erfahren in Gegenwart von SDS eine Konformationsänderung und werden auf diese Weise zu einem Enzym mit gelatinespaltenden Eigenschaften aktiviert [153]. Eine zymographische Darstellung ist damit mit SDS-PAGE möglich und könnte eine Erklärung für beide beobachteten proteolytischen Banden in der vorliegenden Arbeit bieten. Eine andere Erklärung für die beiden Banden könnte die Aktivierung von proMMP-9 in vivo durch mehrere Endopeptidasen sein [154], die zu aktiven Formen mit unterschiedlichen Molekulargewichten zwischen 86kDa bis 65kDa führen [96, 142].

In der vorliegenden Studie änderte sich interessanterweise das Verhältnis von oberer zu unterer Bande bei CF-Patienten und Kontrollgruppe. Nach Summation beider aktiver MMP-9 Banden präsentierte sich mit 70% die obere 86kDa Bande bei der Kontrollgruppe stärker ausgeprägt als bei den klinisch stabilen CF-Patienten mit 65% ($p = 0,001$). Bei den CF-Patienten mit PEx fiel der prozentuale Anteil der oberen Bande noch weiter auf 57%, mit folglich erhöhter proteolytischer Aktivität in der unteren Bande. Diese Ergebnisse lassen bei identischer Inkubationszeit eine gesteigerte Proteasenkonzentration bzw. ein Missverhältnis aus Protease/Antiprotease vermuten. Auch der Einfluss anderer bzw. zusätzlicher Proteasen sollte bei CF-Patienten oder im Rahmen von akuten Exazerbationen erwogen werden. So beschreibt bspw. Gaggar et al. eine bis zu 40fache Erhöhung von HNE bei CF-Patienten mit akuter Exazerbation im Vergleich zu gesunden Probanden [6].

Endgültig lässt sich anhand der beiden Banden bei 80kDa und 86kDa keine sichere Aussage darüber treffen, wie viele bzw. welche Proteasen an der Aktivierung von proMMP-9 beteiligt waren. Zur Klärung in wie weit die HNE hierbei eine entscheidende Rolle spielt sind weiterführende Untersuchungen notwendig.

5.2.4 Neutrophile MMP-9 Sekretion

Eine Vielzahl von Zellen, wie die bronchialen Epithelzellen, Fibrozyten, alveolare Zellen Typ II und glatte Muskelzellen, sind in der Lage MMP-9 zu exprimieren [146]. Bei pulmonalen Entzündungen und inflammatorischen Lungenerkrankungen stellen jedoch die Leukozyten, insbesondere die neutrophilen Granulozyten, den Hauptproduktionsort der Gelatinase B dar [15, 16, 134, 151, 155,]. Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen diese Annahme bei CF-Patienten im klinisch stabilen Zustand sowie im Rahmen einer akuten Exazerbation.

Insbesondere folgende Befunde sprechen für diese Annahme. In der Zymographie fanden sich bei allen CF-Patienten drei eindeutige Banden mit einem Molekulargewicht von 92kDa, 130kDa und 220kDa. Diese Banden entsprechen dem charakteristischen proteolytischen Muster neutrophiler Granulozyten, bestehend aus den inaktiven Formen des MMP-9 Monomers, des MMP-9/NGAL Heterodimers (Lipocalin) sowie des MMP-9 Homodimers [110, 148, 150]. Alle drei Banden korrelierten stark untereinander ($p < 0,001$) und zeigten, bis auf das MMP-9 Monomer, signifikant höhere Enzymkonzentrationen bei den CF-Patienten im Vergleich zu der Kontrollgruppe ($p < 0,001$).

Weiterhin lässt die Korrelation zwischen dem Anteil neutrophiler Granulozyten und der Konzentration an MMP-8 ($p < 0,001$) sowie den MMP-9 Isoenzymen ($p < 0,001$) eine positive Assoziation bei CF-Patienten vermuten. Vergleichbare Ergebnisse fanden sich bereits in Studien zu akuten Pneumonien [11, 127]. Hier konnte gezeigt werden, dass die neutrophile Kollagenase, Synonym für MMP-8, im Rahmen der akuten Entzündung aus spezifischen Granula der neutrophilen Granulozyten freigesetzt wird. Power et al. beobachteten zudem, dass die Erhöhung der Kollagenaseaktivität im Sputum von CF-Patienten mit einer Zunahme der Erkrankungsschwere einhergeht und vermuteten, dass MMP-8 eine entscheidende Rolle in der Lungenzerstörung bei CF-Patienten spielt [129]. Die Ergebnisse dieser Studie belegen eine hohe Assoziation zwischen MMP-8 und MMP-9 bei CF-Patienten ($r = 0,852$; $p < 0,001$) im Gegensatz zu der Kontrollgruppe, bei der dieser Zusammenhang nicht gefunden wurde, und stützen damit die Vermutung einer zelleinheitlichen Sekretion beider MMPs.

Für die neutrophilen Granulozyten als Expressionsort von MMP-9 spricht zudem das Vorkommen von NGAL (neutrophil gelatinase associated lipocalin). NGAL stellt einen stabilen Heterodimerkomplex aus MMP-9 Monomer und Lipocalin dar, der sich zymographisch bei allen CF-Patienten mit einer Molekülmasse von ca. 125-130kDa fand. Humanes neutrophiles Lipocalin (HNL), ein 25kDa großes Protein, ist Teil der nichtadaptiven Immunabwehr und verursacht nach Freisetzung aus der neutrophilen Zelle durch Bindung an

Siderophoren eine bakterielle Eisenverarmung [156]. Obwohl NGAL auch in Kolonepithelzellen, während einer gastrointestinalen Inflammation (M. Crohn, Colitis ulcerosa, Appendizitis oder Divertikulitis) gefunden werden konnte [157], ist es spezifisch für Granula neutrophiler Granulozyten beschrieben [131, 148, 158]. Es wird daher als idealer Neutrophilenmarker angesehen [159]. Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen klar, dass NGAL eine hohe Assoziation zu neutrophilen Granulozyten ($r = 0,472$; $p < 0,001$), zu MMP-8 ($r = 0,728$; $p < 0,001$) und zur Gesamtkonzentration von MMP-9 ($r = 0,807$; $p < 0,001$) aufweist.

Alle drei Proteine, MMP-8, MMP-9 und NGAL, die in neutrophilen Granulozyten exprimiert werden, waren in der Studie signifikant in den CF-Patienten im Vergleich zu der Kontrollgruppe erhöht ($p < 0,001$) und wiesen darüber hinaus eine hohe Korrelation zueinander auf. Diese Ergebnisse betonen den von neutrophilen Granulozyten dominierenden Entzündungsprozess in CF-Patienten [51].

Weiterhin fanden sich signifikant höhere Konzentrationen von NGAL bei klinisch stabilen CF-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,001$). Jedoch blieb ein zusätzlicher Anstieg von NGAL bei CF-Patienten mit akuter Exazerbation unterhalb der Signifikanzgrenze im Vergleich zu CF-Patienten ohne PEx ($p = 0,071$). Damit zeigt sich eine Diskrepanz zu den Untersuchungen von Eichler und Roeschard, die beide den Wert des human neutrophilen Lipocalins im Serum als einen geeigneten Parameter für die Diagnose einer akuten pulmonalen Exazerbation bei CF ansahen [49, 160]. Während Eichler und Mitarbeiter einen erhöhten HNL-Spiegel bei klinisch stabilen CF-Patienten bestätigten, stieg die HNL Konzentration in beiden Studien bei akuter Exazerbation weiter an. Die Diskrepanz zwischen diesen Befunden könnte zum einen in den unterschiedlichen Definitionen der Exazerbation liegen. Ein definierter Exazerbation-Score, wie der von Rosenfeld, kam bei Eichler und Roeschard nicht zum Einsatz. Andererseits wurde in den hier durchgeführten Untersuchungen zymographisch nur das MMP-9 gebundene Lipocalin quantitativ bestimmt. Freies Lipocalin hingegen, welches durch den Enzym-Immuno-Assay von Eichler und Roeschard miterfasst wurde, entging der Zymographie.

5.2.5 Aktive neutrophile Gelatinase assoziiert an Lipocalin

Unterhalb des MMP-9/NGAL Heterodimers präsentierte sich eine weitere proteolytische Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 115kDa. Dieses MMP-9 Isoenzym zeigte als einziges keine Konzentrationsunterschiede zwischen CF-Patienten und der Kontrollgruppe. Darüber hinaus fanden sich keine Korrelationen mit den Konzentrationen anderer Isoenzyme. In der Literatur finden sich nur wenige Hinweise auf die Existenz dieses MMP-9 Isoenzymes. Yan et al. beschreiben im Urin von Tumorpatienten zwei Banden von ~115kDa und ~125kDa, beide positiv auf Antikörper gegen MMP-9 und NGAL, und interpretierten diese als MMP-9 Komplexe mit der monomeren oder dimeren Form von NGAL [149]. Im Gegensatz dazu argumentierten Ardi und Mitarbeiter, dass es sich hierbei um ein aktiviertes MMP-9/NGAL Heterodimer handelt. Alle drei neutrophil assoziierten Banden (92kDa, 130kDa und 220kDa) konvertierten nach Aktivierung in vitro mit APMA zu Gelatine spaltenden Enzymen kleinerer Molekülmassen. Beide unterschiedlichen Annahmen stimmen jedoch darin überein, dass NGAL in der Lage ist MMP-9 vor der Degradation zu schützen [149, 161]. Diese Überlegung bestätigte sich in den Ergebnissen der vorliegenden Studie, da es weder bei klinisch stabilen CF-Patienten noch während einer akuten Exazerbation zu einer gesteigerten Aktivierung des MMP-9/NGAL Heterodimers kam.

5.2.6 Das MMP-9 Homodimer

Zwei weitere zymographisch aktive Banden mit einer Molekülmasse von ca. 220kDa und 200kDa wurden als latentes und aktives MMP-9 Homodimer detektiert. Bestehend aus zwei über eine Disulfid-Brückenbindung kovalent gebundenen MMP-9 Monomeren, zeichnet sich das Homodimer durch ähnliche biochemische Eigenschaften wie das Monomer aus. Für die Dimerisierung ist die Abwesenheit von TIMP-1 Voraussetzung [106, 108]. Intrazellulär synthetisiert wird es ausschließlich in der inaktiven Form sekretiert. Während eine Inhibition durch TIMP-2 nicht möglich ist, bestehen zwei hoch affinitive Bindungsstellen für TIMP-1 [106]. Auch eine Aktivierung der latenten Form durch bspw. MMP-3 wurde beschrieben [106]. Obwohl zahlreiche Autoren die zymographische Existenz der homodimeren Form vor allem aus sekretorischen Vesikeln neutrophiler Granulozyten dargestellt haben [11, 108, 110, 127, 148, 150], ist über das Verhalten bei CF-Patienten wenig bekannt.

Mit den vorliegenden Ergebnissen konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass bei klinisch stabilen CF-Patienten das aktive sowie das latente MMP-9 Homodimer um das Doppelte

gegenüber der Kontrollgruppe hochreguliert war ($p < 0,001$). Wie auch bei der Monomeren-Form, unterschied sich der Quotient aus aktiven/inaktiven Homodimeren signifikant zwischen beiden Gruppen und deutet auf eine stärkere Präsenz des aktivierten Isoenzym bei CF-Patienten hin. Weiterhin waren alle drei MMP-9 Isoenzyme, Monomer, NGAL-Heterodimer und Homodimer, in hohem Maße untereinander assoziiert ($p < 0,001$). Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme einer neutrophil dominierten Inflammation bei CF-Patienten. Welchen Einfluss jedoch die Homodimere im Zusammenspiel mit den anderen MMP-9 Isoenzymen haben oder welche Rolle sie in der pulmonalen Parenchymdestruktion spielen, bleibt unklar.

5.2.7 TIMP-1 sowie MMP-9/TIMP-1 Quotient

Diese Arbeit demonstrierte, dass TIMP-1, als wichtigster Inhibitor von MMP-9, bei CF-Patienten mit PEx gegenüber der gesunden Kontrollgruppe sowie der CF-Gruppe ohne PEx signifikant hochreguliert war. Hingegen konnte kein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und klinisch stabilen CF-Patienten gefunden werden.

Die Ergebnisse stimmen mit Studien, die das Verhalten von TIMP-1 bei klinisch stabilen CF-Patienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe analysierten, überein [14, 128, 143]. Gegenläufig zeigen sich hingegen die Studienergebnisse von Sagel et al. und Jackson et al. Die erste Studie beschreibt einen signifikanten TIMP-1 Anstieg im Sputum von 18 klinisch stabilen CF-Kindern im Vergleich zu 8 gesunden Kontrollkindern [7]. Im Gegensatz dazu berichten Jackson et al. eine signifikante Reduktion von TIMP-1 im Sputum von neun erwachsenen CF-Patienten im Vergleich zu einem gesunden Kollektiv aus 5 Personen [15]. Eine Verzerrung der Ergebnisse beider Arbeiten könnte hierbei möglicherweise durch das kleine Studienkollektiv entstanden sein. Auch divergierende Messwerte durch die unterschiedliche Probengewinnung (provoziertes Sputum versus Serumproben) wären denkbar. Divergierende Befunde zwischen den Proben aus Serum und BAL fanden sich beispielsweise bei Hartog et al., die zeitgleich die TIMP-1 Konzentration bei Patienten mit Pneumonie untersuchten [11]. Trotz der zum Teil widersprüchlichen absoluten TIMP-1 Konzentrationen ist die Studienlage bezüglich dem Verhältnis von MMP-9/TIMP-1 eindeutig. Durch eine deutlich stärkere Expression von MMP-9 im Vergleich zum TIMP-1 besteht bei stabilen CF-Patienten ein höherer MMP-9/TIMP-1 Quotient [7, 14, 15, 127, 128]. Ähnliche Ergebnisse lassen sich auch für andere chronische Lungenerkrankungen, wie der COPD, der idiopathischen Lungenfibrose oder der Sarkoidose

finden [8, 10]. Auch die Ergebnisse dieser Studie belegen einen Anstieg des MMP-9/TIMP-1 Quotienten, nicht nur zwischen der Kontrollgruppe und klinisch stabilen CF-Patienten ($p = 0,002$), sondern insbesondere zu der CF-Gruppe mit PEx ($p = 0,02$). Gleichzeitig zeigte sich eine negative Assoziation mit der Lungenfunktion. Eine Erhöhung der absoluten TIMP-1 Konzentration im Rahmen akuter Entzündungen, bisher unter anderem beschrieben bei Pneumonie oder ARDS [11, 162], konnte durch diese Arbeit nun erstmalig auch bei CF-Patienten beobachtet werden [14]. Diese Ergebnisse belegen einerseits ein chronisches Ungleichgewicht zwischen MMP-9 und TIMP-1 bei bereits klinisch stabilen CF-Patienten. Andererseits verstärkt sich dieses Missverhältnis aus Proteasen und Inhibitor bei akuter Exazerbation noch einmal. Grund hierfür könnte unter anderem eine zeitliche Verzögerung in der pulmonalen TIMP-1 Expression durch Alveolarepithelzellen, Fibroblasten, glatte Muskelzellen sowie alveolare Makrophagen sein [146]. Wang et. al konnten zeigen, dass die mRNA-Expression von MMP-2 und MMP-9 nach Paraquat induzierter Entzündungsreaktion in Rattenlungen bereits nach sieben Tagen auf ihr Maximum anstieg. TIMP-1 hingegen erreichte seine maximale Konzentration erst nach 21 Tagen [163]. Diese zeitliche Diskrepanz unterstreicht die Bedeutung des MMP-9/TIMP-1 Quotienten als Indikator für die Schwere pulmonaler Exazerbationen und betont die Notwendigkeit einer frühzeitigen antiproteatischen Therapie. Entscheidend für das TIMP-1/MMP-9 Ungleichgewicht bei klinisch stabilen CF-Patienten scheint jedoch in erster Linie die humane Elastase aus neutrophilen Granulozyten zu sein, welche spezifische Bindungsreaktionen für die Aktivierung von proMMP-9 sowie die Inhibierung von TIMP-1 besitzt [6]. Die zusätzliche Beobachtung, dass eine hohe HNE Konzentration mit dem MMP-9/TIMP-1 Quotienten bei klinisch stabilen CF-Patienten korrelierte, deutete die Arbeitsgruppe um Gaggar als Ursache für die Imbalance zwischen MMP-9 und TIMP-1 [6].

5.2.8 MMP-2

Die hier vorliegenden Ergebnisse der zymographischen Bestimmung von MMP-2 konnten zeigen, dass, ähnlich wie bei MMP-8 und MMP-9, eine erhöhte MMP-2 Expression bei CF-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden ($p < 0,001$) vorliegt. Innerhalb der CF-Gruppe ergab sich hingegen kein Unterschied in der MMP-2 Verteilung.

Im Vergleich zu anderen Untersuchungen über chronische Lungenerkrankungen stimmen diese Ergebnisse mit denen verschiedenster Arbeitsgruppen überein [12, 95, 151, 164, 165]. Maisi et al. beispielsweise beschreiben in ähnlicher Weise eine erhöhte MMP-2 und MMP-9

Konzentration in Sputum und in BAL bei Patienten mit chronischem Asthma bronchiale im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe. Während es im Rahmen einer akuten Asthmaexazerbation zu einer weiteren Erhöhung von MMP-9 kam, konnte ein weiterer Anstieg von MMP-2 nicht beobachtet werden [165]. Entsprechende Daten fehlen bisher für die cystische Fibrose. Roderfeld und Mitarbeiter beobachteten im ELISA einen signifikanten Abfall der MMP-2 Expression in adulten CF-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe [14]. Diesen Widerspruch zu den hier erhobenen Daten konnten Wright und Mitarbeiter nicht bestätigen. Die Autoren demonstrierten bei pulmonalen Zellkulturen von CF-Patienten eine gleichfalls vermehrte Expression von MMP-2, nachdem sie diese mit *Burkholderia cenocepacia*, einem opportunistischen Bakterium in Lungen von CF-Patienten, infiziert hatten [32]. Die hier vorgestellte Studie zeigte weiterhin eine fehlende Korrelation von MMP-2 zu den neutrophilen Granulozyten, wie sie bspw. bei MMP-8 und MMP-9 zu finden war. Dieses Ergebnis unterstreicht, dass MMP-2, anders als MMP-8 und MMP-9, nicht durch neutrophile Granulozyten exprimiert wird. Als Expressionsorte für MMP-2 spielen u.a. Fibroblasten, Alveolarzellen Typ II sowie bronchialen Endothelzellen eine entscheidende Rolle [12, 91, 134].

Trotz deutlich ausgeprägter proMMP-2 Konzentration konnte keine aktive Form von MMP-2 in der Zymographie gesehen werden. Lediglich bei neun Patienten war eine schwache Bande bei ~68kDa zu vermuten. Während aktiviertes MMP-2 zymographisch in Gewebeproben von kolonrektalen Karzinomen [104, 130], Zervikalschleim [114], Wundheilungsgewebe [92] oder aus einer BAL bei Patienten mit idiopathischer interstitieller Pneumonie [125] detektiert werden konnte, fanden sich in der Literatur keine ähnlichen Ergebnisse für Serumproben von CF-Patienten. Auch andere zymographische Untersuchungen für aktives MMP-2 aus Serumproben blieben negativ [165, 166]. Ein möglicher Grund hierfür könnte in der lokalen, zelloberflächengebundenen MMP-2 Aktivierung durch den MT1-MMP-TIMP-2-Komplex liegen [12, 107]. Hierdurch entsteht zwar eine starke perizelluläre Aktivierung von MMP-2, die rasche Inhibierung durch TIMPs nach der Rezeptorfreisetzung macht eine proteolytische Aktivität weit entfernt von der Zelloberfläche aber wenig wahrscheinlich [167]. Auch konnte gezeigt werden, dass im Serum zirkulierendes aktives MMP-2 mit $\alpha 2$ Makroglobulin einen stabilen Komplex bildet und sich somit der zymographischen Bestimmung bei 64kDa entzieht [103, 114].

5.2.9 Leberwerte

Die Lebererkrankung stellt nach Lungen- und Transplantationskomplikationen die dritthäufigste Ursache für krankheitsbezogene Todesfälle bei CF-Patienten dar. Das Alter der Erstdiagnose, das Geschlecht und andere Komorbiditäten, wie zusätzliche Erkrankungen des Pankreas und/oder der Lunge, zeigen einen erheblichen Einfluss auf den Krankheitsverlauf [78]. In der Studie fanden sich 32 CF-Patienten mit einer Leberbeteiligung, die sich damit signifikant in den Transaminasen AST ($p = 0,019$) und ALT ($p = 0,005$) von den CF-Patienten ohne Lebererkrankung unterschieden. Auffällig war, dass die CF-Patienten mit pulmonaler Exazerbation (PEx) signifikant niedrigere AST- und ALT-Werte aufwiesen als die Patienten ohne PEx. Eine Erhöhung der Transaminasen war damit deutlich seltener mit einem pulmonalen Infekt assoziiert als eine Lungenexazerbation ohne Leberbeteiligung ($p = 0,009$). Die erste Annahme, dass ein höherer Anteil der CF-Patienten ohne PEx durch eine dauerhafte antibiotische Therapie pulmonal stabil blieb, jedoch durch die lebertoxische antimikrobielle Therapie höhere Transaminasen aufwiesen, bestätigte sich bei näherer Analyse der klinischen Daten nicht. Vergleichbare Daten konnten trotz intensiver Literatursuche nicht gefunden werden. Bekannt ist, dass einige CFTR-Genotypen (Gruppe I bis III) mit einem höheren Mortalitätsrisiko assoziiert sind als CFTR-Genotypen der Gruppen IV und V [26, 29, 80, 172]. Belege für die Annahme, dass definierte Genotypen existieren, die spezielle Organsysteme häufiger oder ausgeprägter befallen als andere (Leber oder Lungen), konnten hingegen nicht gefunden werden. Für eine eigene Analyse lagen bedauerlicherweise die CFTR-Mutationen der einzelnen CF-Patienten in einem zu kleinen Stichprobenumfang vor. In Zukunft könnten diesbezüglich Arbeiten zu pulmonaler Exazerbation und Leberfibrose, bspw. gemessen mit Hilfe der transienten hepatischen Elastographie, in Zusammenschau mit dem jeweiligem CFTR-Genotyp bei Patienten mit cystischer Fibrose weitere wichtige Ergebnisse liefern.

5.3 Akute Exazerbation und antibiotische Therapie

Eine in der vorliegenden Arbeit bearbeitete Fragestellung war die nach der Reversibilität der erhöhten MMP Konzentrationen im Serum in Abhängigkeit von der Krankheitsaktivität. Es war zu prüfen, ob Patienten mit einer akuten pulmonalen Exazerbation von einer intravenösen antibiotischen Behandlung profitieren und ob nach erfolgter Therapie die Serumwerte klinisch stabiler Patienten erreicht werden.

5.3.1 Akute Exazerbation

Die 18 CF-Patienten, die das klinische Symptombild einer akuten pulmonalen Exazerbation nach Rosenfeld 2001 [67] aufwiesen, zeigten eine erhöhte Serumexpression von MMP-8 ($p = 0,001$) und MMP-9 ($p < 0,006$) im Vergleich zu klinisch stabilen CF-Patienten. Dieser Anstieg beider proteolytischer Enzyme war assoziiert mit einer Reduktion der FEV1 ($p < 0,001$) sowie einer Erhöhung der neutrophilen Granulozyten ($p = 0,002$) und dem CRP ($p < 0,001$). Diese Ergebnisse belegen damit, dass bei einer akuten Exazerbation MMP-8 und MMP-9 Konzentrationen ebenso wie die standardisierten Serumparameter ansteigen. Vergleichbare Ergebnisse wurden bereits für CF [14] sowie für COPD beschrieben [145, 173]. Weiterhin zeigten CF-Patienten mit PEx einen höheren TIMP-1 Spiegel als CF-Patienten ohne PEx ($p = 0,018$), jedoch demonstrierte der höhere MMP-9/TIMP-1 Quotient bei CF-Patienten mit PEx die zunehmende Sättigung der Inhibitoren bei einer akuten Entzündung. Diese Annahme einer Überforderung der Anti-Gelatinaseaktivität bestätigt sich in der hohen Konzentration an aktivierten MMP-9 bei CF-Patienten mit PEx. Die vermehrte Gelatinase-Aktivität steht in engem Zusammenhang mit Abbauprodukten von Kollagen Typ IV und ist ursächlich für die Destruktion von Lungengewebe bei CF-Patienten [16]. Obwohl zahlreiche Aktivatoren latenter MMP-9 bekannt sind, sprechen viele Daten für einen dominierenden Einfluss der neutrophilen Elastase bei der akuten Exazerbation und damit für die zentrale Rolle der neutrophilen Inflammation [15, 174].

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die drei charakteristischen zymogenen MMPs neutrophiler Granulozyten im Rahmen einer akuten Exazerbation nicht in gleichem Maße ansteigen. Während das MMP-9 Monomer bei CF-Patienten mit PEx signifikant hochreguliert war, blieb der Konzentrationsanstieg des MMP-9/NGAL Heterodimers sowie des MMP-9 Homodimers unterhalb der Signifikanzgrenze. Die unterschiedliche Aktivierung der neutrophilen Granulozyten unter einer akuten Inflammation könnte ursächlich für die

Änderung der Sekretregulation sein [131]. Auffällig war das starke Auftreten der unteren aktivierten MMP-9 Monomer-Bande bei 80kDa ($p = 0,01$). Obwohl unklar bleibt welche Protease die Aktivierung auslöst, könnte dieses Spaltprodukt durch seine signifikante Hochregulierung unter einer akuten Exazerbation als geeigneter Biomarker fungieren.

5.3.2 Intravenöse antibiotische Therapie

Die Ergebnisse dieser Studie belegen eine klinische Besserung der Patienten mit pulmonaler Exazerbation nach intravenöser antibiotischer Behandlung, was sich in der Reduktion des Rosenfeld-Scores widerspiegelte ($p = 0,001$). Obwohl abfallende Tendenzen in den serologischen Entzündungsparametern, wie CRP und Leukozyten, sowie eine Verbesserung der Lungenfunktionswerte gesehen werden konnte, fielen diese nicht signifikant aus. Andere Arbeiten konnten hingegen signifikante Senkungen von CRP [49, 175] und den neutrophilen Granulozyten [49, 176] sowie einen Anstieg der FEV1 [49, 176] nachweisen. Ein Grund für die fehlende Signifikanz der vorliegenden Daten könnte in dem geringen Follow up begründet sein. Eine weitere Diskrepanz könnte sich gemäß oben zitierten Autoren durch die fehlende Interventionsdauer der antibiotischen Therapie ergeben. Unterschiede zwischen den Zeitpunkten der Serumentnahmen waren nicht auszuschließen. Parallel zu den etablierten Entzündungsparametern konnte in der vorliegenden Arbeit auch ein Abfall der Konzentrationen von MMP-2, MMP-8, TIMP-1, und der MMP-9 Gesamtkonzentration beobachtet werden. Diese Gesamtkonzentrationen blieben auch nach drei Wochen antibiotischer Intervention hoch. Eine andere Tendenz zeigte sich hingegen bei den MMP-9 Isoenzymen. Die Gesamtkonzentration aller aktivierten MMP-9 Isoformen ($p = 0,012$), insbesondere die des aktiven MMP-9 Homodimers ($p = 0,008$), reduzierte sich besonders deutlich durch eine intravenöse antibiotische Therapie. Dabei, und das unterscheidet sich klar von den Ergebnissen der MMP Gesamtkonzentration, fiel die Konzentration an aktiviertem MMP-9 auf die Baseline-Werte von stabilen CF-Patienten. Die Erhöhung der aktivierten MMP-9 bei CF-Patienten mit pulmonaler Exazerbation scheint somit durch frühes Ansprechen und Reversibilität unter der antibiotischen Therapie gekennzeichnet zu sein und könnte daher als hilfreicher Parameter zur Beurteilung des Verlaufs bei akuter pulmonaler Exazerbation eingesetzt werden.

5.4 Schlussfolgerung

- Als Ergebnis der vorliegenden Arbeit und in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten [130, 139] stellt die Zymographie, neben der qualitativen und semiquantitativen, ein etabliertes Verfahren zur quantitativen Proteasenbestimmung dar. Damit bietet sie derzeit, anders als das Messverfahren per ELISA, den Vorteil unterschiedliche MMP-9 Isoenzyme gleichzeitig zu detektieren.
- Klinisch stabile CF-Patienten weisen trotz dauerhafter antibiotischer und/oder antiinflammatorischer Therapie eine erhöhte systemische MMP-8, MMP-9 und MMP-2 Expression im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden auf. Die gleichzeitige Korrelation zum Entzündungsmediator CRP sowie die negative Assoziation mit der Lungenfunktion (FEV1) betonen eine chronisch destruktive Inflammation im gesamten Organismus.
- Eine hohe Assoziation von MMP-8, MMP-9 Monomer, MMP-9/NGAL (Lipocalin) sowie den neutrophilen Granulozyten spricht für einen neutrophil dominierten Entzündungsprozess.
- Im Rahmen einer akuten pulmonalen Exazerbation steigt die MMP-9 Gesamtkonzentration stärker als ihr natürlicher Inhibitor TIMP-1, so dass es zu einem Protease/Antiprotease Ungleichgewicht kommt. Damit verbunden ist eine gesteigerte Aktivierung von MMP-9, die nachweislich mit einer erhöhten Parenchymdestruktion einhergeht. Aktivierungsprozess und aktivierungsspezifische Proteasen bei einer akuten Exazerbation bleiben jedoch ungeklärt.
- Eine differenzierte Antwort der unterschiedlichen MMP-9 Isoenzyme lässt sich bei akuter Inflammation finden, die bezüglich ihrer diagnostischen oder therapeutischen Möglichkeiten weiter untersucht werden sollten. Insbesondere könnte die zymographische Bestimmung von NGAL bzw. dem aktivierten MMP-9 einen Surrogat-Marker für die akute Exazerbation bei der cystischen Fibrose darstellen.
- Der verzögerte Abfall der unterschiedlichen MMP-9 Isoenzyme nach intravenöser antibiotischer Therapie beschreibt trotz klinischer Symptombesserung eine anhaltend hohe Inflammation. Neue Behandlungsstrategien, wie etwa der Einsatz von MMP-Inhibitoren, sollten diesbezüglich geprüft werden.

5.5 Ausblick für die Zukunft

Es ist bekannt, dass pulmonale Exazerbationen ein Resultat von erhöhtem Bakterienvorkommen in den Atemwegen darstellt, auf die der Körper mit einer Entzündungsreaktion antwortet. Für eine frühzeitige und zielorientierte Therapie ist es notwendig, die pulmonale Infektion schon im Anfangsstadium zu erkennen. Chronische oder wiederkehrende Infektionen führen zu einer fortschreitenden Destruktion der Atemwege und verschlechtern auf lange Sicht die respiratorische Funktion der CF-Patienten.

Die erhöhten Serumspiegel von MMP-8 und MMP-9 von Patienten mit cystischer Fibrose sowie ein Ungleichgewicht an TIMP-1 lässt eine Bedeutung von MMP-8 und MMP-9 in Verbindung mit pulmonalen Infekten bei Patienten mit CF vermuten. Akute Infekte in den Atemwegen reduzieren die Lungenfunktion bei gleichzeitiger Erhöhung der MMPs. Auf der anderen Seite sind die MMPs nicht nur bei akuter Exazerbation erhöht, sondern auch bei klinisch stabilen CF-Patienten. Die Destruktion des Lungenparenchyms erfolgt kontinuierlich und ist nicht ausschließlich Folge wiederkehrender Infekte. Ein möglichst kontinuierliches Monitoring sowie eine dauerhafte antiinflammatorische und frühzeitige Therapie bei beginnender Exazerbation könnte hier zu einer verbesserten Therapie führen. In diesem Zusammenhang könnten MMP-8, MMP-9 und insbesondere NGAL sowie aktives MMP-9 mit einem spezifische cut-off-Wert als Biomarker bei Patienten mit CF genutzt werden.

Karakoc et al. bestätigten in einer Studie mit 38 CF-Patienten, dass die erhöhte MMP-9 Expression im Zusammenhang mit Bronchiektasien als Zeichen chronischer Atemwegsdestruktion steht [143]. Gaggar et al. entdeckten, dass MMP-8 und MMP-9 an der Produktion des Peptids PGP (Prolin-Glycine-Prolin) beteiligt sind, welches positiv chemotaxisch auf neutrophile Granulozyten agiert und die Inflammation weiter aufrecht erhält [177]. Beide Autoren kommen zu dem Ergebnis, dass CF-Patienten von einer gezielten MMP-Inhibition bezüglich der Lungenfunktion profitieren können.

Die Daten dieser Arbeit unterstreichen die Bedeutung einer antiproteolytischen Therapie auch bei den CF-Patienten, die nicht wiederholten Exazerbationen unterliegen. Eine besondere Bedeutung könnte hierbei unter anderem die Inhibierung der humanen neutrophilen Elastase bei CF-Individuen spielen. Jackson et al. konnten kürzlich in vitro den Beweis erbringen, dass die humane neutrophile Elastase nicht nur spezifische Bindungsregionen zur Aktivierung von proMMP-9, sondern auch eine Bindungsregion zur Inaktivierung von TIMP-1 besitzt [15]. Dieser doppelte Wirkungsmechanismus potenziert die proteolytische Aktivität der humanen

neutrophilen Elastase. Neben einer spezifischen Inhibierung der HNE wäre auch die Entwicklung so genannter „Designer-Moleküle“ denkbar. Diese könnten eine spezifische Mutation von TIMP-1 in der HNE-Bindungsregion enthalten, die eine Degradation unmöglich macht [178]. Mit dem Ziel das Gleichgewicht von MMP-9 und TIMP-1 bei CF-Patienten wiederherzustellen, wäre auch die inhalative Inhibitorenapplikation von α 1-Antithypsin oder TIMP-1 denkbar, um das chronische Remodeling des Lungengewebes zu reduzieren oder sogar zu stoppen. Synthetische Inhibitoren bieten anders als natürliche Inhibitoren, die einer schnellen Metabolisierung unterliegen, den Vorteil einer langlebigeren und spezifischen Antwort. Auch der Einsatz von chelatbildenden Antibiotika wie Tetrazykline und Anthrazykline, die zusätzlich zu ihrer antibakteriellen Wirkung auch eine Inhibition der MMPs ermöglichen, könnten in diesem Zusammenhang Anwendung finden [97].

Neben der schädlichen Wirkung auf das Lungengerüst haben die MMPs jedoch auch vielfältige andere physiologische Wirkungsweisen. Eine ungerichtete Inhibition der MMPs könnte unter Umständen mehr schaden als helfen. Unverzichtbar sind MMPs bspw. bei der Zellmigration, ohne die eine effektive Bekämpfung pulmonaler Infekte nicht denkbar ist. Eine Überdosierung von TIMP-1 könnte zudem eine stärkere Fibrosierung in Lunge oder Leber verursachen. Angelaufene Studien konnten bisher keine akute TIMP-1 assoziierte Toxizität erkennen lassen, Langzeitstudien stehen aber noch aus.

6 Zusammenfassung

Die Familie der Matrix Metalloproteinasen (MMPs) ist in der Lage alle Komponenten der extrazellulären Matrix proteolytisch zu degradieren. MMPs spielen daher eine entscheidende Rolle für die Parenchymdestruktion in chronischen Lungenerkrankungen, inklusive der cystischen Fibrose. Eine Erhöhung der MMPs sowie ein Ungleichgewicht zu deren Inhibitoren, den Tissue Inhibitors of Metalloproteases (TIMP), steht in engem Zusammenhang zur Lungenfunktion und einer akuten pulmonalen Exazerbation. Mit Zunahme der Lebenserwartung erwachsener CF-Patienten kann die genaue Betrachtung des Proteasen-Antiproteasen-Verhältnisses sowie das Verhalten der MMP-9 Isoenzyme für die Langzeitprognose von grundlegender Bedeutung sein, da aktuell objektive Methoden zur Evaluierung des Krankheitsverlaufs und Therapieerfolgs fehlen.

In dieser Arbeit wurden 136 Serumproben von 58 erwachsenen CF-Patienten sowie 40 Serumproben von 40 gesunden Kontrollpersonen mit Hilfe der Gelatinezymographie qualitativ und quantitativ auf die Anwesenheit von MMP-2 und MMP-9 untersucht. Schwerpunktmäßig wurden die gelatinolytische Aktivität der MMP-9 Isoenzyme, der aktiven und latenten Formen des MMP-9 Homodimers, des MMP-9/NGAL-Heterodimers sowie der aktiven und latenten Form des MMP-9 Monomers gemessen. Die Bestimmung erfolgte durch den Western Blot. Darüber hinaus wurden mittels ELISA Technik die Konzentrationen von MMP-2, MMP-8, MMP-9 und TIMP-1 bestimmt. Des Weiteren erfolgte eine klinische Unterteilung der Patientengruppe mit pulmonaler Exazerbation (PEX) nach dem Rosenfeld-Score. In neun Fällen erfolgte mittels der Werte aus Zymographie und ELISA eine Verlaufskontrolle vor und nach intravenöser antibiotischer Therapie.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die quantitative zymographische Bestimmung von aktivem und latentem MMP-9 sowie MMP-2 in einer hohen Korrelation zu den gewonnenen ELISA Daten steht ($r = 0,882$). Für alle MMP-9 Isoenzyme und MMP-2 fanden sich erhöhte Enzymkonzentrationen im Vergleich zu der Kontrollgruppe, wobei eine deutliche Dominanz des aktiven MMP-9 Homodimers sowie des MMP-9/NGAL Heterodimers ersichtlich war. Von den 58 CF-Patienten wurde nach den klinischen Rosenfeld Kriterien bei 16 CF-Patienten eine akute pulmonale Exazerbation (PEX) diagnostiziert. Die Enzymkonzentrationen für MMP-2, MMP-8 und MMP-9 waren bei CF-Patienten mit PEX signifikant erhöht, verglichen mit CF-Patienten ohne PEX oder der gesunden Kontrollgruppe. MMP-2, MMP-8 und MMP-9 korrelierten zudem negativ mit den Lungenfunktionswerten,

wie FEV1 und Vitalkapazität. Unter einer intravenösen antibiotischen Therapie bei CF-Patienten mit PEx konnte parallel zur Krankheitssymptomatik eine Abnahme von MMP-8 und MMP-9 beobachtet werden. TIMP-1 war in allen Proben (Kontrolle, CF-Patienten ohne PEx, CF-Patienten mit PEx) nachweisbar, die Konzentrationszunahme mit zunehmender Entzündungsreaktion fiel jedoch weniger stark aus als der Anstieg von MMP-9. Das Verhältnis von MMP-9 zu TIMP-1 stieg zwischen der Kontrollgruppe und CF-Patienten ohne PEx ($p < 0,01$) sowie zwischen CF-Patienten ohne PEx zu CF-Patienten mit PEX ($p < 0,05$) signifikant an. Es liegt also bei CF-Patienten ein Ungleichgewicht der Proteasen gegenüber ihren Inhibitoren vor. Zudem fand sich eine hohe Korrelation zwischen der MMP-8 und MMP-9 Konzentration ($r = 0,856$). Beide Isoenzyme korrelierten gleichzeitig signifikant mit den Leukozyten, insbesondere mit den neutrophilen Granulozyten.

Die Ergebnisse betonen, dass erhöhte Serumkonzentrationen verschiedener MMPs bereits bei klinisch asymptomatischen CF-Patienten erhöht sind, die Expression bei einer akuten pulmonalen Exazerbationen jedoch weiterhin stark zunimmt. Dabei steht nicht nur die MMP-9 Gesamtkonzentration in enger Korrelation zu den klinischen und laborchemischen Befunden, auch dem Verhältnis zu den natürlichen Inhibitoren sowie den aktivierten MMP-9 Isoenzymen kommt eine besondere Bedeutung zu. Hierin besteht ein diagnostischer Ansatzpunkt sowie eine Möglichkeit frühzeitig, also noch bevor sich dauerhafte Schäden eingestellt haben, eine zielgerichtete MMP-basierte medikamentöse Therapie bei CF-Patienten einzuleiten.

7 Summary

Matrix metalloproteinases (MMPs), a family of proteolytic enzymes, degrade all components of the extracellular matrix and play a crucial role in the airway remodeling and tissue injury in cystic fibrosis (CF). An increased expression of various MMPs and the unbalance to their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteases (TIMP) is linked to impaired lung function and acute pulmonary exacerbation. Emanating from these previous findings, a quantitative analysis of the protease-antiprotease-balance and investigation of the MMP-9 variants might be fundamental for the health-related quality of life and probability of surviving of adult patients with CF. Currently objective methods to control the progress of the disease and therapeutic success are missing.

In the study presented the qualitative and quantitative protease activity of MMP-2 and MMP-9 were investigated by deploying gelatin-zymography. A total of 136 blood serum samples of 58 adult CF patients compared to those of 40 healthy control individuals were analysed. Special attention was paid to the gelatinolytic activity of the MMP-9 variants, like active and inactive MMP-9 homodimer, MMP-9/NGAL heterodimer and active and inactive MMP-9 monomer. This enzyme classification was verified by Western Blot analysis. In addition, the concentrations of MMP-2, MMP-8, MMP-9, and TIMP-1 were also examined by ELISA. Furthermore CF patients with an acute pulmonary exacerbation (PEx) were identified based on the clinical score by Rosenfeld. In nine cases, the follow-up of zymography and ELISA were assessed before and after systemic antibiotic therapy.

The results of the analysis showed a high correlation of active and inactive MMP-9 and MMP-2 between quantitative gelatin zymography and ELISA ($r = 0,882$). The increased serum gelatinolytic activity of all MMP-9 variants and MMP-2 in CF patient compared to the healthy control group was detected. Particularly active homodimer and MMP-9/NGAL heterodimer were raised. Among the 58 CF patients examined, PEx was diagnosed for 16 of them. Serum levels of MMP-2, MMP-8 and MMP-9 were significantly elevated in CF patients with PEx, compared to CF patients without PEx and healthy controls. These data also show that the increase of MMP-2, MMP-8 and MMP-9 is associated with a decrease of pulmonary function, as measured by forced expiratory volume in 1 sec (FEV1) ($p < 0,01$) and vital capacity ($p < 0,01$).

Antibiotic treatment of CF patients with PEx led to a decrease of MMP-8 and MMP-9 protein concentrations, which correlate with other clinical parameters. In all samples, TIMP-1 was

detectable. However, TIMP-1 concentration did increase less than the inflammatory response of MMP-9. The MMP-9/TIMP-1 molar ratio was significantly higher in the CF group without PEx than in the control group ($p < 0,01$) and also higher in the CF group with PEx than in the CF group without PEx ($p < 0,05$). Hence, an imbalance between the protease and their inhibitors exists. In addition, MMP-8 and MMP-9 concentrations correlated with each other ($r = 0,856$) and moreover were positively correlated with the total white cells count, especially the neutrophil granulocytes.

The data of this study provide with compelling evidence the increased serum concentration of certain MMPs found for patients with clinically stable CF lung disease, which again rise in the case of pulmonary exacerbation. It is not only the MMP-9 concentration as a whole associated with other clinical and laboratory findings, but also its interaction with TIMP-1 and the active MMP-9 variants, particularly the active homodimer, that seem to be important. These relations may be useful surrogate markers and could furthermore lead to the development of specific MMP-based medical treatment to prevent chronic airway remodeling and tissue destruction for patients with CF.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC-Transport-Familie	<i>ATP-binding cassette transport protein family</i>
ABPA	allergische bronchopulmonale Aspergillose
ALT (GPT)	Alanin-Aminotransferase
aMMPs	aktive Matrix-Metalloproteinasen
ANOVA	<i>ordinary measures of analysis of variance</i>
APMA	<i>p-aminophenylmercuric acetate</i>
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrom</i>
Asialo-GM1-Rezeptor	<i>cell surface glycolipid asialo ganglioside M1receptor</i>
AST (GOT)	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	bronchoalveoläre Lavage
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
CaCl ₂	Summenformel von Calciumchlorid
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CF	Cystische Fibrose
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CK	Creatinkinase
cm	Zentimeter
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>
CRP	C-reaktives Protein
Δ F508	Delta F508
DNA (DNS)	<i>desoxyribonuclein acid</i> , Desoxyribonucleinsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ENaC	<i>epithelial sodium channel</i>
Eppi-Tubes	Eppendorf-Reaktionsgefäß

evtl.	eventuell
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FEV1	Forciertes Expiratorisches Volumen der 1. Sekunde
FVC	Forcierte Vitalkapazität
HCl	Summenformel der Chlorwasserstoffsäure
HLA	Humane Leukozytenantigene
HNE	humane neutrophile Elastase
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
kDA	Kilodalton (Maßeinheit der atomaren Masse)
KMR	krebserzeugend, erbgutverändernd, fortpflanzungsgefährdend
M	Mol ---> SI-Basiseinheit der Stoffmenge
MEF25	Maximaler Expiratorischer Flow bei 25 % der FVC
MHC	Major Histocompatibility Complex
mM	Milimol (1/1000 Mol)
MMPs	Matrix Metalloproteinasen
mRNA	messenger RNA
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
MT-MMPs	<i>membran type matrix metalloproteinase</i>
NaCl	Natrium Chlorid
NF- κ B	<i>nuclear factor κB</i> (Nukleärer Faktor)
NGAL	<i>neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i>
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
ORCC	<i>outwardly rectifying chloride channels</i>
pCO ₂	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
PCT	Procalcitonin
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PE _x	pulmonale Exazerbation
PG	Prostaglandin
pH	pH-Wert
PMN	polymorph nukleärer (Granulozyt)
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
proMMPs	inaktive Matrix-Metalloproteinasen

PVDF	Polyvinylidenfluorid
R-Domäne	Regulator-Domäne
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>SDS polyacrylamide gel electrophoresis</i>
β-FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
TEMED	Tetramethylethan-1,2-diamin
TGF-β1	<i>transforming growth factor</i>
TIMPs	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TNF-α	<i>tumor necrosis factor α</i> (Tumor-Nekrose-Faktor alpha)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
U/l	Units pro Liter
VC	Vitalkapazität
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
%	Prozent

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Osmotische Dysregulation durch defekten Chloridkanal.	4
Abbildung 2: Die vier Säulen der pulmonalen Therapie bei CF-Patienten.....	8
Abbildung 3: Schematischer Aufbau der MMPs.	11
Abbildung 4: Aktivierung durch Abspaltung der Prodomäne.	13
Abbildung 5: Schematische Darstellung der zymographischen MMP-2/9 Isoenzyme.....	15
Abbildung 6: Gegenüberstellung unterschiedlicher Densitometrie Programme.....	34
Abbildung 7: Lineare Beziehung zwischen ELISA und Zymographie.....	37
Abbildung 8: Proteinbanden im Western Blot	38
Abbildung 9: Altersverteilung der CF-Patienten und der Kontrollgruppe.....	40
Abbildung 10: Vitalkapazität und FEV1 bei CF-Patienten ohne und mit PEx.	42
Abbildung 11: CRP und neutrophile Granulozyten bei Patienten ohne und mit PEx.....	43
Abbildung 12: Leberbeteiligung in Abhängigkeit von Geschlecht und Exazerbation.....	44
Abbildung 13: Transaminasen bei CF-Patienten mit und ohne PEx.....	45
Abbildung 14: Pankreaserkrankung	46
Abbildung 15: Repräsentatives Zymographiegel	47
Abbildung 16: Überexpression der Isoenzyme bei CF-Patienten.	48
Abbildung 17: Verhältnis der Enzymkonzentration von MMP-9 und MMP-2	49
Abbildung 18: Verhältnis von aktiviertem zu latentem MMP-9.....	51
Abbildung 19: FEV1 und MMP-9 bei pulmonaler Exazerbation.	52
Abbildung 20: MMP-9 Expression in der Kontroll- und Patientengruppe.	53
Abbildung 21: MMP-8 und TIMP-1	54
Abbildung 22: MMP-9/TIMP-1-Quotient.....	54
Abbildung 23: Korrelation von MMP-8 und MMP-9.....	55
Abbildung 24: Einfluss der antibiotischen und antiinflammatorischen Therapie.....	56
Abbildung 25: Überexpression bei pulmonaler Exazerbation.	57
Abbildung 26: Klinische und serologische Parameter vor und nach antibiotischer Therapie	58
Abbildung 27: MMP-9 Isoenzyme vor und nach antibiotischer Therapie.....	59

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auswirkungen unterschiedlicher CFTR-Mutationen	5
Tabelle 2: Beeinflussung der Transkription von MMPs	12
Tabelle 3: Die Matrix-Metalloproteinasen 2, 8 und 9	14
Tabelle 4: Zusammensetzung des Trenngels	24
Tabelle 5: Zusammensetzung des Sammelgels	24
Tabelle 6: Zusammensetzung des Wasch- und Inkubationspuffers	25
Tabelle 7: Puffer und Lösungen	26
Tabelle 8: Zusammensetzung des TBS-NP40-Puffers	32
Tabelle 9: Zusammensetzung der Anoden- und Kathodenpuffer im Western Blot	32
Tabelle 10: Korrelation serumgleicher Gele	35
Tabelle 11: Korrelation der Enzymkonzentration von ELISA und Zymographie	36
Tabelle 12: Studienkollektiv	39
Tabelle 13: Zusammensetzung der Kontroll- und Patientengruppe	41
Tabelle 14: Lungenfunktionsparameter und Blutgase	42
Tabelle 15: Entzündungsparameter bei CF-Patienten mit und ohne PEx	43
Tabelle 16: Exazerbation und Leberbeteiligung	45
Tabelle 17: Verteilung der Isoenzyme bei Kontrollgruppe und CF-Patienten	48
Tabelle 18: Prozentuale MMP-9 Verteilung	50
Tabelle 19: MMP-Expression in der Kontroll- und Patientengruppe	52
Tabelle 20: MMP-8, MMP-9, TIMP-1 und MMP-9/TIMP-1 Quotient im ELISA	53
Tabelle 21: Korrelation der MMPs und TIMP-1 mit inflammatorischen Zellen	55

11 Literaturverzeichnis

1. **Ratjen F.** Aktuelle Aspekte zu Diagnostik und Therapie der Mukoviszidose: UNI-MED; Bremen 2004.
2. **Reinhardt D.** Cystische Fibrose. Springer; Berlin: 2001.
3. **Boyle MP.** Adult cystic fibrosis. JAMA 2007, 298:1787–1793
4. **Davis PB.** Cystic fibrosis since 1938. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2006, 173:475–482
5. **McLaughlin SE, Diener-West M, Indurkha A, Rubin H, Heckmann R, Boyle MP.** Improving transition from pediatric to adult cystic fibrosis care: lessons from a national survey of current practices. Pediatrics 2008, 121:e1160-6
6. **Gaggar A, Li Y, Weathington N, Winkler M, Kong M, Jackson P, Blalock JE, Clancy JP.** Matrix metalloproteinase-9 dysregulation in lower airway secretions of cystic fibrosis patients. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 2007, 293:L96-L104
7. **Sagel SD, Kapsner RK, Osberg I.** Induced sputum matrix metalloproteinase-9 correlates with lung function and airway inflammation in children with cystic fibrosis. Pediatr. Pulmonol. 2005, 39:224–232
8. **Beeh KM, Beier J, Kornmann O, Buhl R.** Sputum matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and their molar ratio in patients with chronic obstructive pulmonary disease, idiopathic pulmonary fibrosis and healthy subjects. Respiratory Medicine 2003, 97:634–639
9. **Brajer B, Batura-Gabryel H, Nowicka A, Kuznar-Kaminska B, Szczepanik A.** Concentration of matrix metalloproteinase-9 in serum of patients with chronic obstructive pulmonary disease and a degree of airway obstruction and disease progression. J. Physiol. Pharmacol. 2008, 59 Suppl 6:145–152
10. **Henry MT, McMahon K, Mackarel AJ, Prikk K, Sorsa T, Maisi P, Sepper R, Fitzgerald MX, O'Connor CM.** Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in sarcoidosis and IPF. Eur. Respir. J. 2002, 20:1220–1227
11. **Hartog CM, Wermelt JA, Sommerfeld CO, Eichler W, Dalhoff K, Braun J.** Pulmonary matrix metalloproteinase excess in hospital-acquired pneumonia. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2003, 167:593–598

12. **Gueders MM, Foidart J, Noel A, Cataldo DD.** Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in the respiratory tract: potential implications in asthma and other lung diseases. *Eur. J. Pharmacol.* 2006, 533:133–144
13. **Gerlach RF, Meschiari CA, Marcaccini AM, Palei ACT, Sandrim VC, Cavalli RC, Tanus-Santos JE.** Positive correlations between serum and plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 or MMP-9 levels in disease conditions. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2009, 47:888–891
14. **Roderfeld M, Rath T, Schulz R, Seeger W, Tschuschner A, Graf J, Roeb E.** Serum matrix metalloproteinases in adult CF patients: Relation to pulmonary exacerbation. *J. Cyst. Fibros.* September 2009, Volume 8, Issue 5, Pages 338–347
15. **Jackson PL, Xu X, Wilson L, Weathington NM, Clancy JP, Blalock JE, Gaggar A.** Human neutrophil elastase-mediated cleavage sites of MMP-9 and TIMP-1: implications to cystic fibrosis proteolytic dysfunction. *Mol. Med.*, 16:159–166
16. **Delacourt C, Le Bourgeois M, D'Ortho MP, Doit C, Scheinmann P, Navarro J, Harf A, Hartmann DJ, Lafuma C.** Imbalance between 95kDa type IV collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases in sputum of patients with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995, 152:765–774
17. **Peterson-Carmichael SL, Harris WT, Goel R, Noah TL, Johnson R, Leigh MW, Davis SD.** Association of lower airway inflammation with physiologic findings in young children with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 2009, 44:503–511
18. **World Health Organisation.** Classification of cystic fibrosis and related disorders. *J. Cyst. Fibros.* 2002, 1:5–8
19. **Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ.** Cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 2005, 352:1992–2001
20. **Dobbin CJ, Bye PTP.** Adults with cystic fibrosis: meeting the challenge! *Internal medicine journal* 2003, 33:593–597
21. **Gadsby DC, Vergani P, Csanády L.** The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature* 2006, 440:477–483
22. **Mehta A.** CFTR: more than just a chloride channel. *Pediatr. Pulmonol.* 2005, 39:292–298

23. **Chmiel JF, Davis PB.** State of the art: why do the lungs of patients with cystic fibrosis become infected and why can't they clear the infection? *Respir. Res.* 2003, 4:8
24. **Tarran R, Loewen ME, Paradiso AM, Olsen JC, Gray MA, Argent BE, Boucher RC, Gabriel SE.** Regulation of murine airway surface liquid volume by CFTR and Ca²⁺-activated Cl⁻ conductances. *J. Gen. Physiol.* 2002, 120:407–418
25. **Busse O, Damm G, Sens B, Stern M, Wenzlaff P, Wiedemann B.** Qualitätssicherung Mukoviszidose: Überblick über den Gesundheitszustand der Patienten in Deutschland 2006: MWV Medizinisch Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 2007.
26. **McKone EF, Goss CH, Aitken ML.** CFTR-genotype as a predictor of prognosis in cystic fibrosis. *Chest* 2006, 130:1441–1447
27. **Mekus F, Ballmann M, Bronsveld I, Dörk T, Bijman J, Tümmler B, Veeze HJ.** Cystic-fibrosis-like disease unrelated to the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Hum. Genet.* 1998, 102:582–586
28. **Google-Ergebnis** für http://www.uni-muenster.de/imperia/md/images/biologie_zoo/physiologie/electrophys/_v/ncf.jpg
29. **Herrmann U, Dockter G, Lammert F.** Cystic fibrosis-associated liver disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2010, 24:585–592
30. **Poolman EM, Galvani AP.** Evaluating candidate agents of selective pressure for cystic fibrosis. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* 2007, 4:91–98
31. **Gracia J de, Mata F, Alvarez A, Casals T, Gatner S, Vendrell M, La Rosa D de, Guarner L, Hermosilla E.** Genotype-phenotype correlation for pulmonary function in cystic fibrosis. *Thorax* 2005, 60:558–563
32. **Wright JM, Merlo CA, Reynolds JB, Zeitlin PL, Garcia JGN, Guggino WB, Boyle MP.** Respiratory epithelial gene expression in patients with mild and severe cystic fibrosis lung disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2006, 35:327–336
33. **Accurso FJ, Sontag MK.** Gene modifiers in cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.* 2008, 118:839–841
34. **Accurso FJ.** Update in cystic fibrosis 2005. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2006, 173:944–947

35. **Sturgess J, Imrie J.** Quantitative evaluation of the development of tracheal submucosal glands in infants with cystic fibrosis and control infants. *Am. J. Pathol.* 1982, 106:303–311
36. **Jacquot J, Tabary O, Clement A.** Hyperinflammation in airways of cystic fibrosis patients: what's new? *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2008, 8:359–363
37. **Khan TZ, Wagener JS, Bost T, Martinez J, Accurso FJ, Riches DW.** Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995, 151:1075–1082
38. **Balough K, McCubbin M, Weinberger M, Smits W, Ahrens R, Fick R.** The relationship between infection and inflammation in the early stages of lung disease from cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 1995, 20:63–70
39. **Boucher RC.** Cystic fibrosis: a disease of vulnerability to airway surface dehydration. *Trends Mol Med* 2007, 13:231–240
40. **Karp CL, Flick LM, Park KW, Softic S, Greer TM, Keledjian R, Yang R, Uddin J, Guggino WB, Atabani SF, Belkaid Y, Xu Y, Whitsett JA, Accurso FJ, Wills-Karp M, Petasis NA.** Defective lipoxin-mediated anti-inflammatory activity in the cystic fibrosis airway. *Nat. Immunol.* 2004, 5:388–392
41. **Reiniger N, Lee MM, Coleman FT, Ray C, Golan DE, Pier GB.** Resistance to *Pseudomonas aeruginosa* chronic lung infection requires cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-modulated interleukin-1 (IL-1) release and signaling through the IL-1 receptor. *Infect. Immun.* 2007, 75:1598–1608
42. **Saiman L, Prince A.** *Pseudomonas aeruginosa* pili bind to asialoGM1 which is increased on the surface of cystic fibrosis epithelial cells. *J. Clin. Invest.* 1993, 92:1875–1880
43. **Starner TD, McCray PB.** Pathogenesis of early lung disease in cystic fibrosis: a window of opportunity to eradicate bacteria. *Ann. Intern. Med.* 2005, 143:816–822
44. **Lechtzin N, John M, Irizarry R, Merlo C, Diette GB, Boyle MP.** Outcomes of adults with cystic fibrosis infected with antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Respiration; international review of thoracic diseases* 2006, 73:27–33
45. **Lindemann, Tümmler.** Mukoviszidose - Zystische Fibrose: Thieme Verlag; 2004.

46. **Flume PA, O'Sullivan BP, Robinson KA, Goss CH, Mogayzel PJ, Willey-Courand DB, Bujan J, Finder J, Lester M, Quittell L, Rosenblatt R, Vender RL, Hazle L, Sabadosa K, Marshall B.** Cystic fibrosis pulmonary guidelines: chronic medications for maintenance of lung health. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2007, 176:957–969
47. **Shak S, Capon DJ, Hellmiss R, Marsters SA, Baker CL.** Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1990, 87:9188–9192
48. **Sagel SD, Chmiel JF, Konstan MW.** Sputum biomarkers of inflammation in cystic fibrosis lung disease. *Proc Am Thorac Soc* 2007, 4:406–417
49. **Röschard MA.** Akute pulmonale Exazerbation bei cystischer Fibrose [Elektronische Ressource]: Veränderung neutrophiler Inflammationsmarker unter Antibiotikatherapie. Giessen, Univ., Diss., 2005.
50. **Nakamura H, Yoshimura K, McElvaney NG, Crystal RG.** Neutrophil elastase in respiratory epithelial lining fluid of individuals with cystic fibrosis induces interleukin-8 gene expression in a human bronchial epithelial cell line. *J. Clin. Invest.* 1992, 89:1478–1484
51. **Weiss SJ.** Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.* 1989, 320:365–376
52. **Brennan S.** Innate immune activation and cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* 2008, 9:271-9; quiz 279-80
53. **Keck T, Balcom JH, Fernández-del Castillo C, Antoniu BA, Warshaw AL.** Matrix metalloproteinase-9 promotes neutrophil migration and alveolar capillary leakage in pancreatitis-associated lung injury in the rat. *Gastroenterology* 2002, 122:188–201
54. **Kim JH, Suk MH, Yoon DW, Lee SH, Hur GY, Jung KH, Jeong HC, Lee SY, Lee SY, Suh B in, Shin C, Shim JJ, In KH, Yoo SH, Kang KH.** Inhibition of matrix metalloproteinase-9 prevents neutrophilic inflammation in ventilator-induced lung injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2006, 291:L580-7
55. **Delclaux C, Delacourt C, D'Ortho MP, Boyer V, Lafuma C, Harf A.** Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1996, 14:288–295

56. **Hogardt M, Häußler S, Balke B, Kahl BC, Schmoldt S, Leitritz L, Jäger G, Kappler M, Suerbaum S.** Atemwegsinfektionen bei Mukoviszidose: Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik: Urban & Fischer in Elsevier; 2006.
57. **Ricou B, Nicod L, Lacraz S, Welgus HG, Suter PM, Dayer JM.** Matrix metalloproteinases and TIMP in acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996, 154:346–352
58. **Bresnihan B.** Cystic fibrosis, chronic bacterial infection and rheumatic disease. *Br. J. Rheumatol.* 1988, 27:339–341
59. **Hajj R, Lesimple P, Nawrocki-Raby B, Birembaut P, Puchelle E, Coraux C.** Human airway surface epithelial regeneration is delayed and abnormal in cystic fibrosis. *J. Pathol.* 2007, 211:340–350
60. **Bonfield TL, Panuska JR, Konstan MW, Hilliard KA, Hilliard JB, Ghnaim H, Berger M.** Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995, 152:2111–2118
61. **Eickmeier O, Huebner M, Herrmann E, Zissler U, Rosewich M, Baer PC, Buhl R, Schmitt-Grohé S, Zielen S, Schubert R.** Sputum biomarker profiles in cystic fibrosis (CF) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and association between pulmonary function. *Cytokine* 2010, 50:152–157
62. **Bonfield TL, Konstan MW, Burfeind P, Panuska JR, Hilliard JB, Berger M.** Normal bronchial epithelial cells constitutively produce the anti-inflammatory cytokine interleukin-10, which is downregulated in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1995, 13:257–261
63. **Chmiel JF, Konstan MW, Saadane A, Krenicky JE, Lester Kirchner H, Berger M.** Prolonged inflammatory response to acute *Pseudomonas* challenge in interleukin-10 knockout mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2002, 165:1176–1181
64. **Saadane A, Soltys J, Berger M.** Role of IL-10 deficiency in excessive nuclear factor-kappaB activation and lung inflammation in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator knockout mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005, 115:405–411
65. **Dakin C, Henry RL, Field P, Morton J.** Defining an exacerbation of pulmonary disease in cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 2001, 31:436–442

66. **Rabin HR, Butler SM, Wohl MEB, Geller DE, Colin AA, Schidlow DV, Johnson CA, Konstan MW, Regelman WE.** Pulmonary exacerbations in cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 2004, 37:400–406
67. **Rosenfeld M, Emerson J, Williams-Warren J, Pepe M, Smith A, Montgomery AB, Ramsey B.** Defining a pulmonary exacerbation in cystic fibrosis. *J. Pediatr.* 2001, 139:359–365
68. **Amadori A, Antonelli A, Balteri I, Schreiber A, Bugiani M, Rose V de.** Recurrent exacerbations affect FEV(1) decline in adult patients with cystic fibrosis. *Respiratory medicine* 2009, 103:407–413
69. **Vandevanter DR, Yegin A, Morgan WJ, Millar SJ, Pasta DJ, Konstan MW.** Design and powering of cystic fibrosis clinical trials using pulmonary exacerbation as an efficacy endpoint. *J. Cyst. Fibros.* Dec 2011, 10(6):453-9
70. **Bianchi ML, Romano G, Saraifoger S, Costantini D, Limonta C, Colombo C.** BMD and body composition in children and young patients affected by cystic fibrosis. *J. Bone Miner. Res.* 2006, 21:388–396
71. **Dasenbrook EC, Merlo CA, Diener-West M, Lechtzin N, Boyle MP.** Persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and rate of FEV1 decline in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2008, 178:814–821
72. **Dick A.** Einfluss der intravenösen Antibiotikatherapie auf Lungenfunktion und Ernährungszustand von Patienten mit Cystischer Fibrose: Shaker; 1997.
73. **Döring G.** Serine proteinase inhibitor therapy in alpha(1)-antitrypsin inhibitor deficiency and cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 1999, 28:363–375
74. **Gottlieb J, Ballmann M, Mallinckrodt C von, Staab D, Smaczny C, Simon A, Welte T, Wagner TO.** Lung transplantation in cystic fibrosis--a position paper. *Pneumologie* 2009, 63:451–460
75. **Marshall BC, Butler SM, Stoddard M, Moran AM, Liou TG, Morgan WJ.** Epidemiology of cystic fibrosis-related diabetes. *J. Pediatr.* 2005, 146:681–687
76. **Scott-Jupp R, Lama M, Tanner MS.** Prevalence of liver disease in cystic fibrosis. *Arch. Dis. Child.* 1991, 66:698–701

77. **Sokol RJ, Durie PR.** Recommendations for management of liver and biliary tract disease in cystic fibrosis. Cystic Fibrosis Foundation Hepatobiliary Disease Consensus Group. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 1999, 28 Suppl 1:S1-13
78. **Lindblad A, Glaumann H, Strandvik B.** Natural history of liver disease in cystic fibrosis. *Hepatology* 1999, 30:1151–1158
79. **Colombo C, Battezzati PM, Crosignani A, Morabito A, Costantini D, Padoan R, Giunta A.** Liver disease in cystic fibrosis: A prospective study on incidence, risk factors, and outcome. *Hepatology* 2002, 36:1374–1382
80. **Colombo C, Apostolo MG, Ferrari M, Seia M, Genoni S, Giunta A, Sereni LP.** Analysis of risk factors for the development of liver disease associated with cystic fibrosis. *J. Pediatr.* 1994, 124:393–399
81. **Colombo C, Battezzati PM.** Liver involvement in cystic fibrosis: primary organ damage or innocent bystander? *J. Hepatol.* 2004, 41:1041–1044
82. **Colombo C, Russo MC, Zazzeron L, Romano G.** Liver disease in cystic fibrosis. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2006, 43 Suppl 1:S49-55
83. **Lindblad A, Hultcrantz R, Strandvik B.** Bile-duct destruction and collagen deposition: a prominent ultrastructural feature of the liver in cystic fibrosis. *Hepatology* 1992, 16:372–381
84. **Colombo C.** Liver disease in cystic fibrosis. *Current opinion in pulmonary medicine* 2007, 13:529–536
85. **Bernal F, Hartung H, Kieseier BC.** Tissue mRNA expression in rat of newly described matrix metalloproteinases. *Biol. Res.* 2005, 38:267–271
86. **Ahrens D, Koch AE, Pope RM, Stein-Picarella M, Niedbala MJ.** Expression of matrix metalloproteinase 9 (96-kd gelatinase B) in human rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1996, 39:1576–1587
87. **Tamarina NA, McMillan WD, Shively VP, Pearce WH.** Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in aneurysms and normal aorta. *Surgery* 1997, 122:264-71

88. **Roeb E, Dietrich CG, Winograd R, Arndt M, Breuer B, Fass J, Schumpelick V, Matern S.** Activity and cellular origin of gelatinases in patients with colon and rectal carcinoma differential activity of matrix metalloproteinase-9. *Cancer* 2001, 92:2680–2691
89. **Brand K.** Cancer gene therapy with tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). *Current gene therapy* 2002, 2:255–271
90. **Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM.** Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* 2002, 295:2387–2392
91. **Hayashi T, Stetler-Stevenson WG, Fleming MV, Fishback N, Koss MN, Liotta LA, Ferrans VJ, Travis WD.** Immunohistochemical study of metalloproteinases and their tissue inhibitors in the lungs of patients with diffuse alveolar damage and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.* 1996, 149:1241–1256
92. **Moses MA, Marikovsky M, Harper JW, Vogt P, Eriksson E, Klagsbrun M, Langer R.** Temporal study of the activity of matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors during wound healing. *J. Cell. Biochem.* 1996, 60:379–386
93. **Cañete-Soler R, Gui YH, Linask KK, Muschel RJ.** Developmental expression of MMP-9 (gelatinase B) mRNA in mouse embryos. *Dev. Dyn.* 1995, 204:30–40
94. **Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, Shapiro SD, Senior RM, Werb Z.** MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 1998, 93:411–422
95. **Elkington PTG, Friedland JS.** Matrix metalloproteinases in destructive pulmonary pathology. *Thorax* 2006, 61:259–266
96. **Nagase H.** Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol. Chem.*, 378:151–160
97. **Herouy Y, Vanscheidt W, Schöpf E, Norgauer J.** Gen- und Proteinfamilie der Matrix-Metalloproteinasen: Struktur, Funktion und Expression in der Haut. *Hautarzt* 1999;50:825–836
98. **Rath T, Roderfeld M, Graf J, Roeb E.** Matrix metalloproteinases in inflammatory bowel disease - from basic research to clinical significance. *Z. Gastroenterol.* 2009, 47:758–769

99. **Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z.** Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007, 8:221–233
100. **van Wart HE, Birkedal-Hansen H.** The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1990, 87:5578–5582
101. **Hockenbery DM.** MMPs in unusual places. *Am. J. Pathol.* 2006, 169:1101–1103
102. **Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S.** Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB J.* 1998, 12:1075–1095
103. **Somerville RPT, Oblander SA, Apte SS.** Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biol.* 2003, 4:216
104. **Arndt M.** Die Expression der Matrix-Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 beim Kolon- und Rektumkarzinom. Aachen, Univ., Diss., 2005.
105. **Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL, Eisen AZ, Grant GA, Goldberg GI.** SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J. Biol. Chem.* 1989, 264:17213–17221
106. **Olson MW, Bernardo MM, Pietila M, Gervasi DC, Toth M, Kotra LP, Massova I, Mobashery S, Fridman R.** Characterization of the monomeric and dimeric forms of latent and active matrix metalloproteinase-9. Differential rates for activation by stromelysin 1. *J. Biol. Chem.* 2000, 275:2661–2668
107. **Woessner JF, Nagase H.** Matrix metalloproteinases and TIMPs. New York: Oxford University Press; 2002.
108. **Goldberg GI, Strongin A, Collier IE, Genrich LT, Marmer BL.** Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin. *J. Biol. Chem.* 1992, 267:4583–4591
109. **Ogata Y, Enghild JJ, Nagase H.** Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9. *J. Biol. Chem.* 1992, 267:3581–3584

110. **Ardi VC, Kupriyanova TA, Deryugina EI, Quigley JP.** Human neutrophils uniquely release TIMP-free MMP-9 to provide a potent catalytic stimulator of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007, 104:20262–20267
111. **Rath T.** Untersuchungen zur Expression von Matrix Metalloproteinasen und deren spezifischen Inhibitor in gastrointestinalen Präkanzerosen. Giessen, Univ., Diss., 2008.
112. **Iredale JP.** Cirrhosis: new research provides a basis for rational and targeted treatments. *BMJ* 2003, 327:143–147
113. **Arthur MJ, Mann DA, Iredale JP.** Tissue inhibitors of metalloproteinases, hepatic stellate cells and liver fibrosis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 1998, 13 Suppl:S33-8
114. **Becher N, Hein M, Uldbjerg N, Danielsen CC.** Balance between matrix metalloproteinases (MMP) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) in the cervical mucus plug estimated by determination of free non-complexed TIMP. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2008, 6:45
115. **Stockley RA.** Neutrophils and protease/antiprotease imbalance. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999, 160:S49-52
116. **Murphy G, Docherty AJ.** The matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1992, 7:120–125
117. **Liotta LA, Stetler-Stevenson WG, Steeg PS.** Cancer invasion and metastasis: positive and negative regulatory elements. *Cancer Invest.* 1991, 9:543–551
118. **Kordula T, Güttgemann I, Rose-John S, Roeb E, Osthues A, Tschesche H, Koj A, Heinrich PC, Graeve L.** Synthesis of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in human hepatoma cells (HepG2). Up-regulation by interleukin-6 and transforming growth factor beta 1. *FEBS Lett.* 1992, 313:143–147
119. **Chirco R, Liu X, Jung K, Kim HC.** Novel functions of TIMPs in cell signaling. *Cancer Metastasis Rev.* 2006, 25:99–113
120. **Chen P, McGuire JK, Hackman RC, Kim K, Black RA, Poindexter K, Yan W, Liu P.** Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 moderates airway re-epithelialization by regulating matrilysin activity. *Am. J. Pathol.* 2008, 172:1256–1270

121. **Roeb E, Graeve L, Müllberg J, Matern S, Rose-John S.** TIMP-1 protein expression is stimulated by IL-1 beta and IL-6 in primary rat hepatocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1995, 762:462–464
122. **Albaiceta GM, Gutiérrez-Fernández A, Parra D, Astudillo A, García-Prieto E, Taboada F, Fueyo A.** Lack of matrix metalloproteinase-9 worsens ventilator-induced lung injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2008, 294:L535-43
123. **Wenzel SE, Balzar S, Cundall M, Chu HW.** Subepithelial basement membrane immunoreactivity for matrix metalloproteinase 9: association with asthma severity, neutrophilic inflammation, and wound repair. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003, 111:1345–1352
124. **Russell REK, Culpitt SV, DeMatos C, Donnelly L, Smith M, Wiggins J, Barnes PJ.** Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2002, 26:602–609
125. **Suga M, Iyonaga K, Okamoto T, Gushima Y, Miyakawa H, Akaike T, Ando M.** Characteristic elevation of matrix metalloproteinase activity in idiopathic interstitial pneumonias. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000, 162:1949–1956
126. **Zheng L, Lam WK, Tipoe GL, Shum IH, Yan C, Leung R, Sun J, Ooi GC, Tsang KW.** Overexpression of matrix metalloproteinase-8 and -9 in bronchiectatic airways in vivo. *Eur. Respir. J.* 2002, 20:170–176
127. **Ratjen F, Hartog C, Paul K, Wermelt J, Braun J.** Matrix metalloproteases in BAL fluid of patients with cystic fibrosis and their modulation by treatment with dornase alpha. *Thorax* 2002, 57:930–934
128. **Hilliard TN, Regamey N, Shute JK, Nicholson AG, Alton EFW, Bush A, Davies JC.** Airway remodelling in children with cystic fibrosis. *Thorax* 2007, 62:1074–1080
129. **Power C, O'Connor CM, MacFarlane D, O'Mahoney S, Gaffney K, Hayes J, Fitzgerald MX.** Neutrophil collagenase in sputum from patients with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1994, 150:818–822
130. **Waas ET, Lomme RMLM, DeGroot J, Wobbes T, Hendriks T.** Tissue levels of active matrix metalloproteinase-2 and -9 in colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 2002, 86:1876–1883

131. **Borregaard N, Cowland JB.** Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 1997, 89:3503–3521
132. **Shute J.** Matrix metalloproteinase-9: marker or mediator of tissue damage in asthma? *Clin. Exp. Allergy* 2002, 32:168–171
133. **Torii K, Iida K, Miyazaki Y, Saga S, Kondoh Y, Taniguchi H, Taki F, Takagi K, Matsuyama M, Suzuki R.** Higher concentrations of matrix metalloproteinases in bronchoalveolar lavage fluid of patients with adult respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997, 155:43–46
134. **Opdenakker G, van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, van Coillie E, Masure S, Proost P, van Damme J.** Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J. Leukoc. Biol.* 2001, 69:851–859
135. **Liu Z, Zhou X, Shapiro SD, Shipley JM, Twining SS, Diaz LA, Senior RM, Werb Z.** The serpin alpha1-proteinase inhibitor is a critical substrate for gelatinase B/MMP-9 in vivo. *Cell* 2000, 102:647–655
136. **Thraikill KM, Moreau CS, Cockrell G, Simpson P, Goel R, North P, Fowlkes JL, Bunn RC.** Physiological matrix metalloproteinase concentrations in serum during childhood and adolescence, using Luminex Multiplex technology. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2005, 43:1392–1399
137. **Heussen C, Dowdle EB.** Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal. Biochem.* 1980, 102:196–202
138. **Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227:680–685
139. **Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG.** Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal. Biochem.* 1994, 218:325–329
140. **Netzel-Arnett S, Mallya SK, Nagase H, Birkedal-Hansen H, van Wart HE.** Continuously recording fluorescent assays optimized for five human matrix metalloproteinases. *Anal. Biochem.* 1991, 195:86–92
141. **Eckstein PP.** *Angewandte Statistik mit SPSS: Praktische Einführung für Wirtschaftswissenschaftler: Betriebswirtschaftlicher Verlag Gabler;* 2008.

142. **Zhao Y, Lyons CE, Xiao A, Templeton DJ, Sang QA, Brew K, Hussaini IM.** Urokinase directly activates matrix metalloproteinases-9: a potential role in glioblastoma invasion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008, 369:1215–1220
143. **Karakoc GB, Inal A, Yilmaz M, Altintas DU, Kendirli SG.** Exhaled breath condensate MMP-9 levels in children with bronchiectasis. *Pediatr. Pulmonol.* 2009.
144. **Roeb E, Arndt M, Jansen B, Schumpelick V, Matern S.** Simultaneous determination of matrix metalloproteinase (MMP)-7, MMP-1, -3, and -13 gene expression by multiplex PCR in colorectal carcinomas. *Int. J. Colorectal Dis* 2004, 19:518–524
145. **Mercer PF, Shute JK, Bhowmik A, Donaldson GC, Wedzicha JA, Warner JA.** MMP-9, TIMP-1 and inflammatory cells in sputum from COPD patients during exacerbation. *Respir. Res.* 2005, 6:151
146. **Cataldo DD, Gueders MM, Rocks N, Sounni NE, Evrard B, Bartsch P, Louis R, Noel A, Foidart JM.** Pathogenic role of matrix metalloproteases and their inhibitors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease and therapeutic relevance of matrix metalloproteases inhibitors. *Cell. Mol. Biol.* 2003, 49:875–884
147. **Peake NJ, Foster HE, Khawaja K, Cawston TE, Rowan AD.** Assessment of the clinical significance of gelatinase activity in patients with juvenile idiopathic arthritis using quantitative protein substrate zymography. *Ann. Rheum. Dis.* 2006, 65:501–507
148. **Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengeløv H, Borregaard N.** Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J. Biol. Chem.* 1993, 268:10425–10432
149. **Yan L, Borregaard N, Kjeldsen L, Moses MA.** The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Modulation of MMP-9 activity by NGAL. *J. Biol. Chem.* 2001, 276:37258–37265
150. **Hibbs MS, Hasty KA, Seyer JM, Kang AH, Mainardi CL.** Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. *J. Biol. Chem.* 1985, 260:2493–2500
151. **Chakrabarti S, Patel KD.** Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. *Exp. Lung Res.*, 31:599–621

152. **Ferry G, Lonchamp M, Pennel L, Nanteuil G de, Canet E, Tucker GC.** Activation of MMP-9 by neutrophil elastase in an in vivo model of acute lung injury. *FEBS Lett.* 1997, 402:111–115
153. **Springman EB, Angleton EL, Birkedal-Hansen H, van Wart HE.** 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. U.S.A.* 1990, 87:364–368
154. **Ramos-DeSimone N, Hahn-Dantona E, Siple J, Nagase H, French DL, Quigley JP.** Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. *J. Biol. Chem.* 1999, 274:13066–13076
155. **Betsuyaku T, Nishimura M, Takeyabu K, Tanino M, Venge P, Xu S, Kawakami Y.** Neutrophil granule proteins in bronchoalveolar lavage fluid from subjects with subclinical emphysema. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999, 159:1985–1991
156. **Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN, Strong RK.** The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol. Cell* 2002, 10:1033–1043
157. **Nielsen BS, Borregaard N, Bundgaard JR, Timshel S, Sehested M, Kjeldsen L.** Induction of NGAL synthesis in epithelial cells of human colorectal neoplasia and inflammatory bowel diseases. *Gut* 1996, 38:414–420
158. **Sevéus L, Amin K, Peterson CG, Roomans GM, Venge P.** Human neutrophil lipocalin (HNL) is a specific granule constituent of the neutrophil granulocyte. Studies in bronchial and lung parenchymal tissue and peripheral blood cells. *Histochem. Cell Biol.* 1997, 107:423–432
159. **Venge P.** The monitoring of inflammation by specific cellular markers. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 1994, 219:47–54
160. **Eichler I, Nilsson M, Rath R, Enander I, Venge P, Koller DY.** Human neutrophil lipocalin, a highly specific marker for acute exacerbation in cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.* 1999, 14:1145–1149

161. **Fernández CA, Yan L, Louis G, Yang J, Kutok JL, Moses MA.** The matrix metalloproteinase-9/neutrophil gelatinase-associated lipocalin complex plays a role in breast tumor growth and is present in the urine of breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 2005, 11:5390–5395
162. **Fligiel SEG, Standiford T, Fligiel HM, Tashkin D, Strieter RM, Warner RL, Johnson KJ, Varani J.** Matrix metalloproteinases and matrix metalloproteinase inhibitors in acute lung injury. *Hum. Pathol.* 2006, 37:422–430
163. **Wang B, Tu Y, Fu J, Zhong Y, Fu G, Tian X, Wang L, Gong L, Ren Q.** Unbalanced MMP/TIMP-1 expression during the development of experimental pulmonary fibrosis with acute paraquat poisoning. *Mol Med Report*, 4:243–248
164. **Maisi P, Prikk K, Sepper R, Pirilä E, Salo T, Hietanen J, Sorsa T.** Soluble membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and gelatinase A (MMP-2) in induced sputum and bronchoalveolar lavage fluid of human bronchial asthma and bronchiectasis. *APMIS* 2002, 110:771–782
165. **Oshita Y, Koga T, Kamimura T, Matsuo K, Rikimaru T, Aizawa H.** Increased circulating 92kDa matrix metalloproteinase (MMP-9) activity in exacerbations of asthma. *Thorax* 2003, 58:757–760
166. **Altieri P, Brunelli C, Garibaldi S, Nicolino A, Ubaldi S, Spallarossa P, Olivotti L, Rossettin P, Barsotti A, Ghigliotti G.** Metalloproteinases 2 and 9 are increased in plasma of patients with heart failure. *Eur. J. Clin. Invest.* 2003, 33:648–656
167. **Ratnikov BI, Deryugina EI, Strongin AY.** Gelatin zymography and substrate cleavage assays of matrix metalloproteinase-2 in breast carcinoma cells overexpressing membrane type-1 matrix metalloproteinase. *Lab. Invest.* 2002, 82:1583–1590
168. **Watkin SL, Elborn JS, Cordon SM, Hiller EJ, Shale DJ.** C-reactive protein is not a useful indicator of intermittent bacterial colonization in early lung disease of patients with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 1994, 17:6–10
169. **Glass S, Hayward C, Govan JR.** Serum C-reactive protein in assessment of pulmonary exacerbations and antimicrobial therapy in cystic fibrosis. *J. Pediatr.* 1988, 113:76–79
170. **Rayner RJ, Wiseman MS, Cordon SM, Norman D, Hiller EJ, Shale DJ.** Inflammatory markers in cystic fibrosis. *Respiratory medicine* 1991, 85:139–145

171. **Levy H, Kalish LA, Huntington I, Weller N, Gerard C, Silverman EK, Celedón JC, Pier GB, Weiss ST.** Inflammatory markers of lung disease in adult patients with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 2007, 42:256–262
172. **Wilschanski M, Rivlin J, Cohen S, Augarten A, Blau H, Aviram M, Bentur L, Springer C, Vila Y, Branski D, Kerem B, Kerem E.** Clinical and genetic risk factors for cystic fibrosis-related liver disease. *Pediatrics* 1999, 103:52–57
173. **Higashimoto Y, Iwata T, Okada M, Satoh H, Fukuda K, Tohda Y.** Serum biomarkers as predictors of lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Med.* 2009, 103:1231–1238
174. **Peppin GJ, Weiss SJ.** Activation of the endogenous metalloproteinase, gelatinase, by triggered human neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1986, 83:4322–4326
175. **Gray RD, Imrie M, Boyd AC, Porteous D, Innes JA, Greening AP.** Sputum and serum calprotectin are useful biomarkers during CF exacerbation. *J. Cyst. Fibros.* 2010, 9:193–198
176. **Ordoñez CL, Henig NR, Mayer-Hamblett N, Accurso FJ, Burns JL, Chmiel JF, Daines CL, Gibson RL, McNamara S, Retsch-Bogart GZ, Zeitlin PL, Aitken ML.** Inflammatory and microbiologic markers in induced sputum after intravenous antibiotics in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003, 168:1471–1475
177. **Gaggar A, Jackson PL, Noerager BD, O'Reilly PJ, McQuaid DB, Rowe SM, Clancy JP, Blalock JE.** A novel proteolytic cascade generates an extracellular matrix-derived chemoattractant in chronic neutrophilic inflammation. *J. Immunol.* 2008, 180:5662–5669
178. **Nagase H, Brew K.** Engineering of tissue inhibitor of metalloproteinases mutants as potential therapeutics. *Arthritis Res.* 2002, 4 Suppl 3:S51-61

12 Eidesstattliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten 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“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

(Christian Wenzel)

13 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, deren Rat und Unterstützung die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Elke Roeb für die Vergabe des interessanten Themas und die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, sowie ihre jahrelange, unermüdliche Unterstützung und das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Besonderen Dank schulde ich Dr. Martin Roderfeld, der bei Fragen immer zeitnah und hilfsbereit zur Verfügung stand und auch in mancher schweren Stunde immer mit den richtigen Worten und Ideen zur Seite stand.

Auch allen anderen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe sei herzlich gedankt für ungezählte Hilfestellungen und Ratschläge zu meiner Arbeit, stellvertretend darf ich hier Herrn Dr. med. Timo Rath und Frau Annette Tschuschner dankend hervorheben.

Gleichermaßen gebührt meinen Freunden mein tiefer Dank für die verständnisvollen offenen Ohren und kreativen Anregungen.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mir im Verlaufe meines Studiums und dieser Arbeit nach besten Kräften hilfreich und mit ihren Anregungen zur Seite gestanden haben – Danke!