

G. Hoheisel¹
U. Sack²
D. S. C. Hui⁴
F. Lai⁵
K. S. Chan⁶
C. H. Choi⁷
J. Schauer¹
A. Tannapfel³

Immunhistochemische Lokalisation von Matrixmetalloproteinasen (MMP) und ihrer Inhibitoren (tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMP) bei tuberkulöser Pleuritis

Immunohistochemical Localization of Matrix Metalloproteinases (MMP) and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMP) in Tuberculous Pleuritis

Zusammenfassung

Matrixmetalloproteinasen (MMP) und ihre spezifischen Inhibitoren (tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMP) wurden mittels ELISA und Gelatinezymographie in unterschiedlichen Konzentrationen in Pleuraflüssigkeit bei tuberkulöser (TB) Pleuritis nachgewiesen. Zur weiteren Differenzierung wurden MMP und TIMP durch immunhistochemische Färbungen in Pleura-biopsaten mit Antikörpern gegen MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-1 und TIMP-2 mittels der Labelled-Avidin-Biotin (LAB)-Methode lokalisiert. Immunhistochemische Reaktivität für MMP-1 wurde in epitheloidzelligen Histiozyten, Langhans'schen Riesenzellen, Lymphozyten, Makrophagen, sowie in Fibroblasten granulomatöser Reaktionen nachgewiesen. MMP-2 fand sich in wenigen epitheloidzelligen Histiozyten, Fibroblasten und Entzündungszellen. MMP-3 färbte wenige Lymphozyten nur schwach. MMP-9 fand sich in wenigen Fibroblasten, Epitheloid- und Entzündungszellen, besonders jedoch in Pleuramesothelzellen. Nur wenige Fibroblasten zeigten eine Immunreaktivität für

Abstract

Matrix metalloproteinases (MMP) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) have been found by ELISA and gelatine zymography in different concentrations in pleural fluid in tuberculous (TB) pleuritis. For further differentiation MMP and TIMP were localized in pleural biopsies by immunohistochemical staining with antibodies directed against MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 using the Labelled-Avidin-Biotin (LAB). Immunohistological reactivity of MMP-1 was found in epitheloidcellular histiocytes, Langhans' giant cells, lymphocytes, macrophages, as well as in fibroblasts of granulomatous reactions. MMP-2 was found in a few epitheloid cellular histiocytes, fibroblasts, and inflammatory cells. MMP-3 was weakly positive in a few lymphocytes only. MMP-9 was found in a few fibroblasts, epitheloid cells, and inflammatory cells, foremost, however, in pleural mesothial cells. A few fibroblasts only showed immunoreactivity of TIMP-1 and TIMP-2. The observed inhomogenous staining pattern could be explained by the different

Institutsangaben

¹Abt. Pneumologie, Med. Klinik und Poliklinik I

²Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin

³Institut für Pathologie, Klinikum der Universität Leipzig, AÖR

⁴Department of Medicine and Therapeutics, Pulmonary Unit

⁵Department of Pathology, Prince of Wales Hospital, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong, China

⁶Pulmonary and Palliative Care Unit, Haven of Hope Hospital, Hong Kong, China

⁷Department of Pathology, United Christian Hospital, Hong Kong, China

Widmung

Herrn Professor Dr. med. Joachim Schauer zum 65. Geburtstag gewidmet

Danksagung

Die Autoren danken M. Fügenschuh, D. Lemanski, Po-Kit Ma, W. W. S. Wong und S. L. S. Yiu für labortechnische Arbeiten und Dres. D. K. L. Choy und T. S. T. Li für die Hilfe bei der Rekrutierung und Betreuung von Patienten.

Anmerkung

Unterstützt durch: Stipendium 423/hk-rl, Deutscher Akademischer Auslandsdienst (DAAD)/Research Grants Council of Hong Kong (Hong Kong-German Joint Research Program); Förderverein Pneumologie, Universität Leipzig; Stipendium des Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung (IZKF), Universität Leipzig.

Korrespondenzadresse

Priv.-Doz. Dr. med. Gerhard Hoheisel · August-Bebel-Str. 71 · 04275 Leipzig

E-mail: gerhard.hoheisel@t-online.de

Eingang: 16. Februar 2004. · **Nach Revision angenommen:** 22. April 2004.

Bibliografie

Pneumologie 2004; 58: 305–308 · © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York

DOI 10.1055/s-2004-818452

ISSN 0934-8387

TIMP-1 und TIMP-2. Die beobachtete Inhomogenität der Anfärbung könnte durch den unterschiedlichen Aktivierungszustand einzelner Zellverbände erklärbar sein. Schlussfolgernd ist der immunhistochemische Nachweis von MMP und TIMP in pleuralen Zellen und Gewebestrukturen Hinweis für deren lokale Beteiligung an fibrosierenden Reaktionen bei TB-Pleuritis.

Einleitung

Pleuramesothelzellen bilden mit der extrazellulären Matrix (EM) eine funktionelle Einheit. Die Integrität der EM wird durch ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau kontrolliert. Matrixmetalloproteinasen (MMP), eine Familie zinkabhängiger Endoproteasen und ihre endogenen Inhibitoren, die „tissue inhibitors of metalloproteinases“ (TIMP), spielen dabei eine entscheidende Rolle. MMP sind nicht nur am Wachstum und der Differenzierung von Gewebe und am physiologischen Gewebeumbau beteiligt, sondern auch an pathologischen Prozessen mit Bindegewebsdestruktion wie Osteoarthritis, rheumatoider Arthritis oder Infektion [1–3]. Die pathogenetische Bedeutung unterschiedlicher Freisetzung und Aktivität einzelner MMP und TIMP bei fibrosierenden Lungenerkrankungen, Asthma bronchiale, chronisch obstruktiver Bronchitis und dem Lungenemphysem wird zunehmend erkannt [4–9]. Es gibt Hinweise darauf, dass MMP und TIMP in Pleuraergüssen verschiedener Genese eine entscheidende Rolle in der Homöostase des Pleuraraumes zukommt und einige von ihnen bei bestimmten Erkrankungen induziert werden [1,10,11]. Bei der tuberkulösen (TB) Pleuritis sind eine lymphogene oder hämatogene Streuung oder eine direkte Pleurainvasion von Tuberkelbakterien an der Ergussentstehung beteiligt, darüber hinaus eine Hypersensitivitätsreaktion [12]. Die TB Pleuritis ist ferner durch die Akkumulation von Subpopulationen inflammatorischer Zellen und proinflammatorischer Zytokine am Ort des Krankheitsgeschehens charakterisiert [10,13–15]. Zum Heilungsprozess tuberkulöser Läsionen gehört die Fibrosierung, die den verkäsigen Fokus in der Lunge abgrenzt, im Pleuraraum jedoch Ursache einer behinderten Atemmechanik werden kann [16–18]. Ein gestörtes Gleichgewicht prokoagulatorischer und fibrinolytischer Faktoren trägt zur pleuralen Fibrosierung bei [13,18,19]. Kürzlich berichteten wir über immunreaktiv und gelatinolytisch nachgewiesene Konzentrationen von MMP und TIMP bei tuberkulöser Pleuritis [20]. Ziel der vorliegenden Arbeit ist der immunhistochemische Nachweis von MMP und TIMP in Pleuragewebe von TB Pleuritis zur weiteren Differenzierung ihrer Beteiligung am Krankheitsgeschehen.

Patienten und Methoden

Pleurabiopsien

Die Studie war durch die Ethikkommissionen genehmigt. Nach Bestätigung der Diagnose und vor Beginn der antituberkulösen Therapie wurden 21 Patienten mit TB-Pleuritis (5 Frauen, 16 Männer, Alter 51 ± 5 Jahre) konsekutiv in die Studie aufgenommen. Bei diagnostischer oder therapeutischer Indikation wurde eine Pleurapunktion und bei unklarer Diagnose zusätzlich eine

state of activation of individual cellular units. In conclusion, the immunohistochemical demonstration of MMP and TIMP in pleural cells and tissue structures indicates their local involvement in fibrosing reactions in TB-pleuritis.

Pleurablindbiopsie in Lokalanästhesie mit 10 ml 2 % Lidocain unter Verwendung der Nadel nach Cope durchgeführt. Die Biopsien wurden in Röhrchen mit 10 % gepuffertem Formalin gelagert. Die Diagnose der TB basierte auf dem Nachweis eines Lymphozyten reichen Exsudats, einer granulomatösen Pleuritis in der Pleurabiopsie in zehn Fällen, dem mikrobiologischen Nachweis in Pleuraflüssigkeit oder Sputum in sechs Fällen und dem Ansprechen auf die antituberkulöse Therapie in acht Fällen.

Immunhistologie

Zur Lokalisation von MMP und TIMP in Pleuragewebe wurden immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-1 und TIMP-2 durchgeführt. Es wurde die Labelled-Avidin-Biotin (LAB)-Methode, wie zuvor an Paraffinschnitten beschrieben, angewendet [21,22]. Verwendet wurden kommerziell erhältliche Antikörper (Klon/Verdünnung): MMP-1 (41-IE5/1:40), MMP-2 (42-5D11/1:40), MMP-3 (55-2A4/1:100), MMP-9 (56-2A4/1:20), TIMP-1 (7-6C1/1:20) von der Fa. Oncogene-Science®, Uniondale, USA, und TIMP-2 (C20/1:80) von der Fa. Santa Cruz Biotechnology®, Heidelberg. Die Pleurabiopsien wurden nach standardisierter Methode in Paraffin eingebettet. Nach Anfertigung von Schnitten wurden diese entwacht und rehydriert. Die Aktivität der endogenen Peroxidase wurde mit 3 % Wasserstoffperoxid in Methanol für 30 min bei Raumtemperatur blockiert. Die vorbereiteten Schnitte wurden mit Serum von der Ziege für 20 min bedeckt und mit dem primären Antikörper inkubiert. Die Schnitte wurden in phosphatgepuffertem Kochsalz gewaschen, mit biotinyliertem Anti-Maus Immunglobulin G von der Ziege (BioGenex, San Ramon, USA) für 30 min inkubiert und mit Peroxidase-konjugiertem Streptavidin (Dakopatts, DAKO Diagnostica, Hamburg) bedeckt. Die Peroxidase-Reaktion wurde mit 0,05 % 3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochloridlösung für acht Minuten als Substrat durchgeführt. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt, in mehreren Schritten in Alkohol dehydriert und fixiert. Positive Kontrollschnitte wurden bei jeder Untersuchung eingefügt, negative Kontrollen wurden durchgeführt, indem der primäre Antikörper durch Aszitesflüssigkeit von der Ziege ersetzt wurde (Sigma, Deisenhofen).

Ergebnisse

Pleurabiopsien waren von 17 Patienten verfügbar. Bei 10 waren repräsentative Areale mit Granulombildung, teils mit zentraler Verkäsung nachweisbar (Abb. 1a, b). Das Verteilungsmuster und die Intensität der Anfärbung sind in Tab. 1 dargestellt. Es fand sich eine unterschiedliche Anzahl von epitheloidzelligen Histiozyten, Langhans'schen Riesenzellen und Lymphozyten. Immunreaktivität für MMP-1 wurde überwiegend in epitheloidzelligen

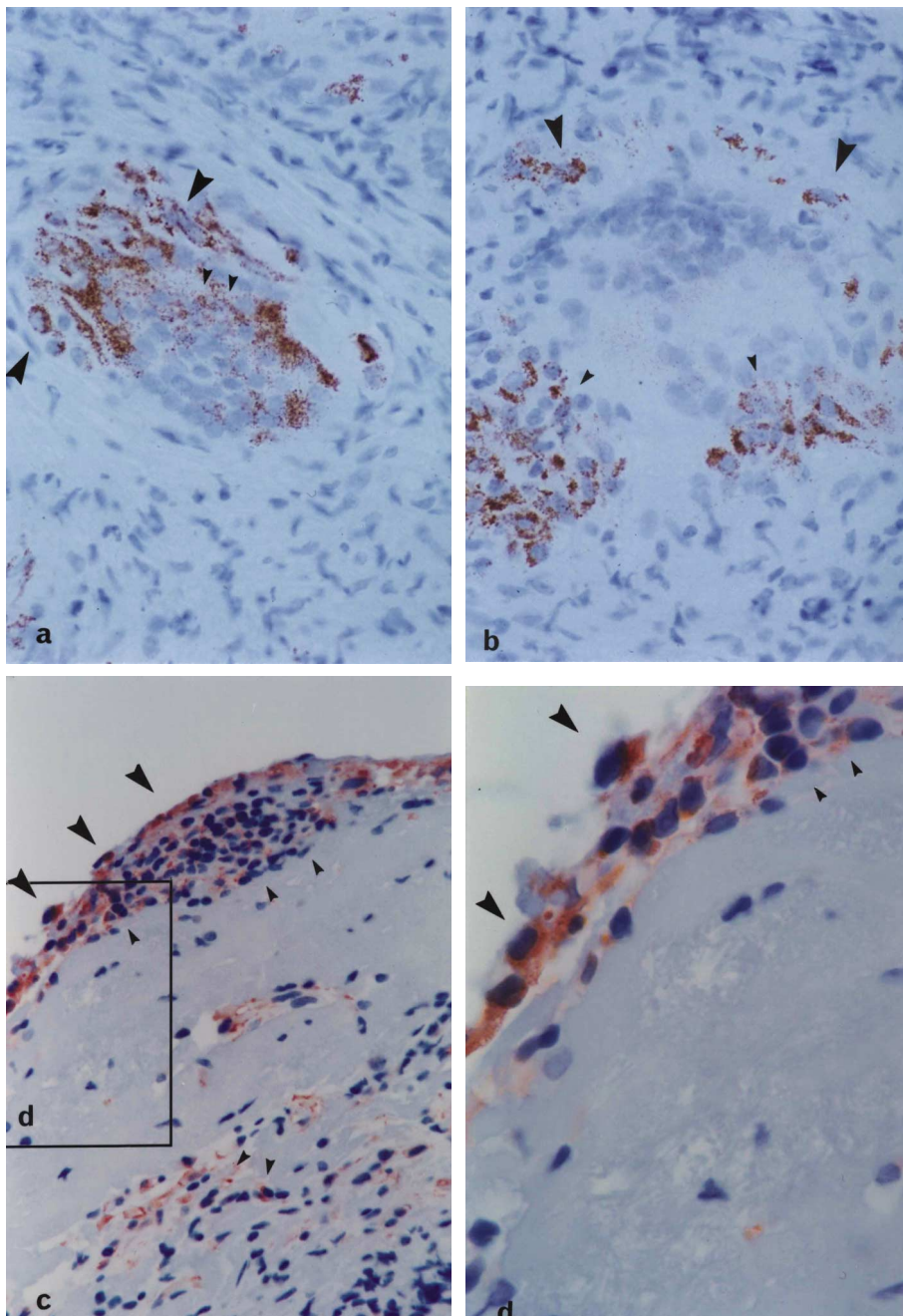


Abb. 1a–b: Biopsiepräparate der parietalen Pleura bei tuberkulöser Pleuritis. Immunhistochemische Färbungen nach der Labelled-Avidin-Biotin-(LAB)-Methode. **a**) Nicht-verkäsende Granulombildung mit Immunreaktivität für MMP-1 von epitheloidförmigen Histiocyten (kleine Pfeile) und Fibroblasten (große Pfeile). Das Zytoplasma immunreaktiver Zellen zeigt eine feinkörnige Anfärbung (ursprüngliche Vergrößerung $\times 40$). **b**) Granulombildung mit zentraler Verkäsung und Immunreaktivität für MMP-2 von Fibroblasten (große Pfeile) und einiger weniger epitheloidförmiger Histiocyten (kleine Pfeile) mit feinkörniger Anfärbung des Zytoplasma. Das Nekroseareal zeigt keine Immunreaktivität (ursprüngliche Vergrößerung $\times 40$). **c–d**: Pleura parietalis mit Verdickung und Infiltration durch Entzündungszellen und Immunreaktivität der Mesothelzellschicht für MMP-9 (große Pfeile). Die überwiegend monozytären Entzündungszellen infiltrieren die Mesothelzellschicht und das ödematöse submesotheliale Bindegewebe und zeigen eine geringere Immunreaktivität als Mesothelzellen (ursprüngliche Vergrößerung $\times 40$ und $\times 100$).

Histiocyten, Langhans'schen Riesenzellen und in inflammatorischen Zellen, wie Lymphozyten und Makrophagen nachgewiesen. Die Fibroblasten der granulomatösen Reaktionen waren ebenfalls positiv (Abb. 1a). Positivität für MMP-2 wurde bei wenigen epitheloidzelligen Histiocyten, Entzündungszellen und Fibroblasten nachgewiesen (Abb. 1b). MMP-1 und -2 färbten das Zytoplasma in einem feinkörnigen Muster, als Hinweis auf eine mögliche Lokalisation dieser Proteine im endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat. MMP-3 färbte nur wenige Lymphozyten positiv (ohne Abb.). Eine spezifische Färbung für MMP-9 konnte nur in wenigen Epitheloidzellen, Entzündungszellen und Fibroblasten nachgewiesen werden, eine starke Anfärbung jedoch in Pleuramesothelzellen (Abb. 1c, d). Nur wenige Fibroblasten zeigten eine Immunreaktivität für TIMP-1 und TIMP-2 (ohne Abb.). Verkäsende Areale zeigten keinerlei spezifische Färbung für MMP oder TIMP.

Diskussion

Diese Studie zeigt, dass sich MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-1 und TIMP-2 in unterschiedlicher Intensität in pleuralen Zellen und im Gewebe immunhistochemisch bei TB-Pleuritis lokalisieren lassen. Die beobachtete Inhomogenität der Anfärbung einzelner MMP und TIMP in dieser Studie steht im Einklang mit immunhistochemischen Untersuchungen verschiedenster Gewebe, desgleichen die Anfärbung nur eines Teils gleichartiger Zellen [3, 23]. Dieser Umstand könnte durch den unterschiedlichen Aktivierungszustand einzelner Zellverbände erklärbar sein.

MMP-1 zeigte ähnlich wie MMP-2 eine Anfärbung verschiedenster Zellen als Hinweis auf die Beteiligung und Interaktion mehrerer Zellarten. So produzieren Subpopulationen von Lymphozyten MMP-9 und TIMP-1, deren Einfluss wiederum von verschiedenen

Tab. 1 Immunzytologisches Verteilungsmuster von MMP und TIMP

	Histio- zyten	Lang- hans'Z.	Lympho- zyten	Makro- phagen	Fibro- blasten	Meso- thelien
MMP-1	+	+	+	+	+	-
MMP-2	(+)	-	(+)	(+)	(+)	-
MMP-3	-	-	(+)	-	-	-
MMP-9	(+)	-	(+)	(+)	(+)	++
TIMP-1	-	-	-	-	(+)	-
TIMP-2	-	-	-	-	(+)	-

Zytokinen verstärkt oder abgeschwächt wird [24]. *M. tuberculosis* und der hauptallergene Zellbestandteil Lipoarabinomannan stimulieren bei der Lungentuberkulose die Freisetzung von MMP-9 und verstärken die Genexpression von MMP-1 und MMP-9 in Makrophagen [25]. Die vermehrte Produktion und Sekretion durch lokale Zellen könnte eine Erklärung für die hohen mittels ELISA bestimmten Konzentrationen von MMP-1 im pleuralen Kompartiment bei TB-Pleuritis sein [20].

MMP-9 zeigte eine intensive Anfärbung des Pleuraepithels in dieser Studie. Humane pleurale und peritoneale Mesothelzellen exprimieren mRNA für MMP-1, MMP-2, MMP-9 und TIMP. Deren Expression ist außer für MMP-2 durch Phorbolmyristatacetat induzierbar [26]. Bemerkenswert ist die Beobachtung der Autoren, dass epitheloid geformte Zellen in der Zellkultur sich durch vermehrte MMP-9 und verminderte TIMP-Expression als vermehrt Matrix abbauend darstellen im Gegensatz zu fibroblastoid geformten Zellen [26]. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass Mesothelzellen fähig sind, die MMP-9-Produktion infolge einer Traumatisierung der Serosa zu steigern, wohingegen MMP-2 konstitutiv exprimiert zu sein scheint [26]. Diese Beobachtung sollte jedoch nicht ohne weiteres auf Tuberkulose übertragen werden, obgleich eine Assoziation von epitheloiden Zellen mit Tuberkulose nahe liegt.

Schlussfolgernd ist der immunhistochemische Nachweis von MMP und TIMP in pleuralen Zellen und Gewebestrukturen ein weiterer Hinweis für deren lokale Beteiligung an fibrosierenden Reaktionen im Rahmen der komplexen Pathomechanismen zur Eindämmung der tuberkulösen Infektion bei TB-Pleuritis. Zum Beweis der ortsständigen Produktion müssten Untersuchungen auf RNA-Ebene angeschlossen werden.

Literatur

- Eickelberg O, Sommerfeld CO, Wyser C et al. MMP and TIMP expression in pleural effusions of different origin. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 1987–1992
- Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; 4: 197–250

- Stetler-Stevenson WG. Dynamics of matrix turnover during pathologic remodeling of the extracellular matrix. *Am J Pathol* 1996; 148: 1345–1350
- Choi KH, Lee HB, Jeong MY et al. The role of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in cryptogenic organizing pneumonia. *Chest* 2002; 121: 1478–1485
- Zhe X, Yang Y, Jakkaraju S et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 downregulation in lymphangioliomyomatosis: potential consequence of abnormal serum response factor expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28: 504–511
- Cataldo DD, Gueders MM, Rocks N et al. Pathogenic role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease and therapeutic relevance of matrix metalloproteinase inhibitors. *Cell Mol Biol* 2003; 49: 875–884
- Ohnishi K, Takagi M, Kurokawa Y et al. Matrix metalloproteinase-mediated extracellular matrix protein degradation in human pulmonary emphysema. *Lab Invest* 1998; 78: 1077–1087
- Russell RE, Culpitt SV, DeMatos C et al. 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
- Imai K, Dalal SS, Chen ES et al. Human collagenase (matrix metalloproteinase-1) expression in the lungs of patients with emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 786–791
- Hurewitz AN, Zucker S, Mancusco P et al. Human pleural effusions are rich in matrix metalloproteinases. *Chest* 1992; 102: 1808–1814
- Hurewitz AN, Wu CL. Tetracycline and doxycycline inhibit pleural fluid metalloproteinases. *Chest* 1993; 103: 1113–1117
- Light RW. Tuberculous pleural effusions. In: *Pleural diseases*. 3rd ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995: 154–166
- Hoheisel G, Roth M, Chan CHS et al. Procoagulant activity of PPD-stimulated pleural effusion mononuclear cells in tuberculous pleurisy. *Respiration* 1997; 64: 152–158
- O'Connor CM, Fitzgerald MX. Matrix metalloproteinases and lung disease. *Thorax* 1994; 49: 602–609
- Hoheisel G, Izbicki G, Roth M et al. Compartmentalization of proinflammatory cytokines in tuberculous pleurisy. *Respir Medicine* 1998; 92: 14–17
- Dannenberg AM. Pathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1982; 125: 25–30
- Hoheisel G, Vogtmann M, Chan KS et al. Pleuritis tuberculosa – therapeutische Wertigkeit wiederholter Pleurapunktionen. *Pneumologie* 2004; 58: 25–29
- Chan CHS, Arnold M, Chan CY et al. Clinical and pathological features of tuberculous pleural effusion and its long-term consequences. *Respiration* 1991; 58: 171–175
- Philip-Joët F, Alessi M-C, Philip-Joët C et al. Fibrinolytic and inflammatory processes in pleural effusions. *Eur Respir J* 1995; 8: 1352–1356
- Hoheisel G, Sack U, Hui DSC et al. Occurrence of matrix metalloproteinases (MMP) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) in tuberculous pleuritis. *Tuberculosis* 2001; 81: 203–209
- Tannapfel A, Hahn H, Katalinic A et al. Prognostic value of ploidy and proliferation markers in renal cell carcinoma. *Cancer* 1996; 77: 64–171
- Tannapfel A, Hoheisel G, Schütz A et al. Immunzytologischer Nachweis von Metalloproteinasen und ihren Inhibitoren in Pleuraergüssen. *Pneumologie* 1998; 52: 75
- Stetler-Stevenson WG, Hewitt R, Corcoran M. Matrix metalloproteinases and tumor invasion: from correlation and causality to the clinic. *Semin Cancer Biol* 1996; 7: 147–154
- Johnatty RN, Taub DD, Reeder SP et al. Cytokine and chemokine regulation of proMMP-9 and TIMP-1 production by human peripheral blood lymphocytes. *J Immunol* 1997; 158: 2327–2333
- Chang JC, Wysocki A, Tchou-Wong KM et al. Effect of Mycobacterium tuberculosis and its components on macrophages and the release of matrix metalloproteinases. *Thorax* 1996; 51: 306–311
- Marshall BC, Santana A, Xu QP et al. Metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in mesothelial cells. Cellular differentiation influences expression. *J Clin Invest* 1993; 91: 1792–1799