

Kirsten Sauckel

Dr. med.

Die Bedeutung der Cysteinpeptidase Cathepsin B und der Cysteinpeptidase-Inhibitoren Cystatin C, E und F in der Pleuraergussflüssigkeit. Ihre Beziehung zu Malignität und benignen Entzündungsprozessen

Geboren am 29.03.1969 in Heidelberg

Reifeprüfung am 02.05.1988 in Sandhausen

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1993 bis WS 1999

Physikum am 15.03.1995 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Grosshöchstetten/Schweiz und Heidelberg

Staatsexamen am 10.11.1999 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. W. Ebert

Den Cysteinpeptidasen vom Cathepsin B-Typ wird während der Tumordinvasion und Metastasierung sowie in weiteren pathologischen Prozessen wie der Amyloidose, der Osteoporose oder Entzündungsvorgängen eine wesentliche Rolle zugeschrieben. Die proteolytische Aktivität der Cysteinpeptidasen wird durch spezifische Inhibitoren, den Cystatinen, kontrolliert. Von dem Inhibitor Cystatin C ist bereits bekannt, dass er eine hohe Affinität zu Cathepsin B besitzt. Für weitere Inhibitoren dieser Inhibitor-Familie wie Cystatin E und Cystatin F gibt es dagegen nur wenige Daten. Dies ist durch den Umstand begründet, dass ihre Serumspiegel an der Nachweisgrenze der verfügbaren Analyseverfahren liegen. Vorversuche haben jedoch gezeigt, dass Cystatin E und F in der Pleuraergussflüssigkeit in messbaren Konzentrationen vorhanden sind.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Spiegel von Cathepsin B und der Cystatine C, E und F in der Pleuraergussflüssigkeit zu bestimmen, um Kenntnisse über die Wechselwirkung zwischen Cathepsin B und den Cystatinen zu gewinnen, sowie einen Bezug zur Ätiologie der Pleuraergüsse unter Berücksichtigung ihrer entzündlichen oder malignen Genese herzustellen.

Die zur Verfügung stehenden 215 Pleuraergussflüssigkeiten wurden entsprechend den zytopathologischen und laborchemischen Befunden gruppiert. Die Konzentrationen von

Cathepsin B und den Cystatinen C, E und F wurden mit Enzymimmunoassays bestimmt. Die Aktivität von Cathepsin B wurde fluorometrisch gemessen. Zusätzlich wurde das Expressionsmuster von Cathepsin B und Cystatin C nach SDS-PAGE-Auftrennung und anschließendem Immunoblotting unter Verwendung spezifischer Antikörper untersucht.

Die in 70 Pleuraergussflüssigkeiten gemessene mediane Cathepsin B-Konzentration betrug 50 ng/ml (5 %- / 95 %-Perzentilen: 10,5 / 240 ng/ml), wobei die Cathepsin B-Konzentration nicht zwischen Ergüssen benigner und maligner Genese differenzierte. Bei den malignen Ergüssen wurden die höchsten Cathepsin B-Spiegel in der Gruppe der metastasierenden Adenokarzinome gemessen. Bemerkenswerterweise fand sich keine freie proteolytische Aktivität in 14 der von uns untersuchten Flüssigkeiten unterschiedlicher Ätiologie.

Cystatin C zeigte im Vergleich zu den Cystatinen E und F den höchsten medianen Spiegel mit 1438 ng/ml (5 %- / 95 %-Perzentilen: 639 / 2689 ng/ml) in den 214 untersuchten Pleuraergussflüssigkeiten ($p < 0,01$). Für Cystatin E und F wurden jeweils 2,5 ng/ml (5 %- / 95 %-Perzentilen: 0,9 / 6,1 ng/ml) und 0,8 ng/ml (5 %- / 95 %-Perzentilen: 0,2 / 4,9 ng/ml) gemessen. Dies entspricht einem medianen Verhältnis der Konzentrationen von Cystatin C : Cystatin E : Cystatin F wie 1800 : 575 : 1. Unter Berücksichtigung der Molgewichte resultiert ein Verhältnis zwischen Cystatin C, E und F von 97 : 0,147 : 0,067 pmol/ml beziehungsweise 1450 : 2,2 : 1. Daraus folgt bei einem Molgewicht von 30 kDa eine mediane molare Konzentration für Cathepsin B von 1,3 nM, d.h. 1 nM Cathepsin B steht eine Konzentration von $\sim 0,1 \mu\text{M}$ Cystatin C, und somit ein 100-facher Überschuss gegenüber.

Mit Hilfe der biochemischen Parameter LDH und Gesamtprotein wurden die Pleuraergussflüssigkeiten in Exsudate und Transsudate unterteilt. In den 178 exsudativen Flüssigkeiten fanden sich mediane Konzentrationen für Cystatin C, E und F von 1434 ng/ml (5 %- / 95 %-Perzentilen: 639 / 2535 ng/ml), 2,72 ng/ml (5 %- / 95 %-Perzentilen: 1 / 6,1 ng/ml) sowie 0,9 ng/ml (5 %- / 95 %-Perzentilen: 0,3 / 4,9 ng/ml). Die medianen Konzentrationen für Cystatin C, E und F in den 29 Transsudaten betragen 1681 ng/ml (5 %- / 95 %-Perzentilen: 826 / 3081 ng/ml), 2,04 ng/ml (5 %- / 95 %-Perzentilen: 1,3 / 6,9 ng/ml) sowie 0,46 ng/ml (5 %- / 95 %-Perzentilen: 0,08 / 1,5 ng/ml). Während Cystatin C nicht zwischen Transsudaten und Exsudaten differenzierte fanden sich sowohl für Cystatin E ($p = 0,015$) als auch Cystatin F ($p = 0,002$) signifikante Unterschiede.

Das Patientenkollektiv wurde gemäß Ätiologie in sechs Gruppen unterteilt, nämlich in Patienten mit Mesotheliomen (primäre Pleuratumoren), mit sekundären Pleuratumoren, mit paramalignen Ergüssen, mit Ergüssen unklarer Dignität, mit Parapneumonie/Empyem sowie mit benignen Erkrankungen. Der höchste mediane Cystatin E-Spiegel von 3,37 ng/ml (5 %- / 95 %-Perzentilen: 1,25 / 12,32 ng/ml) wurde bei den 31 Patienten mit Pleuramesotheliomen gemessen. In dieser Gruppe korrelierte der Cystatin E-Spiegel mit der Anzahl der Tumorzellen ($n = 26$, $p < 0,017$, $r = 0,46$). Im Gegensatz zu Cystatin E zeigte Cystatin F eine andere Verteilung. Der höchste Medianwert von Cystatin F mit 2,9 ng/ml (5 %- / 95 %-Perzentilen: 0,06 / 17,15 ng/ml) fand sich in der Gruppe mit parapneumonischen Erguss / Empyem. Der Median von Cystatin F in dieser Gruppe lag jeweils 2,4-, 4,1-, 4,1-, 4,8- sowie 2,7-fach höher als die entsprechenden Medianwerte in den Patientengruppen Mesotheliome, sekundäre Pleuratumore, paramaligne Ergüsse, Ergüsse unklarer Dignität sowie benigne Erkrankungen (sämtliche Differenzen: $p < 0,01$). In der Patientengruppe mit parapneumonischem Erguss respektive Empyem beobachteten wir eine signifikante Korrelation der Cystatin F-Spiegel mit der Neutrophilenzahl ($n = 16$, $p < 0,017$, $r = 0,73$) und

zusätzlich mit der Konzentration des Entzündungsmarkers CRP ($p = 0,000006$, $r = 0,59$). Der höchste Spiegel von Cystatin F wurde in tuberkulösen Pleuraergüssen gefunden. Kennzeichnend für diese exsudative Flüssigkeit ist eine Dominanz von T-Lymphozyten.

Schlussfolgerung

Cystatin C bildet ein konstantes Inhibitorreservoir zur Neutralisation der proteolytischen Aktivität von Cathepsin B und weiteren Cysteinpeptidasen. Auch Cystatin E und F tragen trotz ihrer geringen Konzentration zu diesem Inhibitorreservoir bei. Über ihre eigentliche Funktion kann nur spekuliert werden. Vermutlich regulieren sie die proteolytische Aktivität nicht näher charakterisierter Cysteinpeptidasen. Als wesentliches Ergebnis dieser Arbeit ist jedoch festzuhalten, dass Cystatin E mit der Anzahl der Tumorzellen beim Pleuramesotheliom und Cystatin F mit den Entzündungsparametern CRP und Neutrophilenzahl korreliert. Trotz dieser Zuordnung bedarf es weiterer Untersuchungen, um Herkunft und Funktion der Cystatine E und F zweifelsfrei zu ergründen.