

Medizinische Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
aus der Medizinischen Klinik I für Gastroenterologie, Infektiologie
und Rheumatologie
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Zeitz

**Untersuchung der Interaktion von Matrix-Metalloproteinasen
mit nicht-Substrat Kollagenen und Kollagenmimetika mittels
Surface-Plasmon-Resonance. Lokale Modulation von
Bindung und Aktivität der Matrix-Metalloproteinasen als
Basis neuer therapeutischer Ansätze**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doctor rerum medicarum
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von Christian Freise
aus Berlin

Referent: Prof. Dr. med. R. Somasundaram

Korreferent: Prof. Dr. med. M. van der Giet

Gedruckt mit Genehmigung der Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 22.06.2007

Teile der vorliegenden Dissertation fanden Einfluss in folgenden Kurzbeiträgen:

Rühl M, **Freise Ch**, Seja M, Erben U, Schuppan D, Farndale R, Zeitz M, Somasundaram R. GPO₁₀, a collagen mimetic effectively promotes activation of collagen bound pro-matrixmetalloproteinase-2 in fibrotic liver tissue. *J Hepatol.* 44:130, Suppl. 2, 2006

Rühl M, **Freise Ch**, Seja M, Schuppan D., Erben U., Farndale R, Zeitz M, Somasundaram R. Das Kollagenmimetikum GPO setzt Leberkollagen-gespeichertes proMMP-2 frei, was zu einer Generierung von aktivem MMP-2 und erhöhter Zellmobilität/-invasivität führt. *Zeitschr. Gastroenterol.* 44:77, 2006

Somasundaram R; Ruehl M; **Freise, C**; Seja M; Erben U; Schuppan D; Zeitz M. Collagen type VI and its alpha-2 chain promote liver fibrosis by attenuation of collagenase activity. *Hepatology.* 42 (4): 606A-607A Suppl., 2005

Rühl M, Seja M, **Freise Ch**, Erben U., Schuppan D, Farndale R, Zeitz M und Somasundaram R. Pro-MMP2 bindet an Kollagene der Leber und wird durch das Kollagenmimetikum (GPO)₁₀ freigesetzt sowie aktiviert – Bestimmung der Bindungsstärke und Aktivität mittels Surface-Plasmon-Resonance und Fluorimetrie. *Zeitschr. Gastroenterol.* 43: 846, 2004

Folgende Manuskripte sind in Vorbereitung:

Ruehl, M., **Freise, C.**, Seja, M., Erben, U., Milani, S., Farndale, R., Schuppan, D., Zeitz, M., and Somasundaram, R.: 'Dual role of the collagen mimetic (GPO)₁₀ acting on fibrotic matrix-stored proMMP-2 as competitive binding inhibitor and activator of enzymatic activity.'

Ruehl. M., Seja, M., **Freise, C.**, Erben, U., Farndale, R., Schuppan, D., Zeitz, M., and Somasundaram, R.: 'The gelatinases proMMP-2/-9 are retained by the collagenous triple helix of fibrotic liver tissue - their binding and activity are modulated by the collagen analog (GPO)₁₀'.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die extrazelluläre Matrix	1
1.1.1	Kollagene	1
1.1.1.1	Kollagen I	3
1.1.1.2	Kollagen VI.....	3
1.2	Regulation der extrazellulären Matrix	4
1.2.1	Matrix-Metalloproteinasen.....	5
1.2.1.1	Struktur der Matrix-Metalloproteinasen	7
1.2.1.2	Kollagenasen	9
1.2.1.3	Gelatinasen.....	10
1.2.2	Physiologische Regulation der Matrix-Metalloproteinasen.....	11
1.2.2.1	Regulation auf Transkriptions- bzw. Translationsebene	11
1.2.2.2	Regulation der Aktivierung.....	12
1.2.2.3	Regulation der Aktivität (Inhibition)	13
1.2.2.4	(Leber-)fibrose-Assoziation der Matrix-Metalloproteinasen.....	14
1.2.2.5	Tumor-Assoziation der Matrix-Metalloproteinasen.....	14
1.3	Die Leber	15
1.3.1	Funktion und Struktur der Leber.....	15
1.3.2	Schädigung der Leber	16
1.3.2.1	Fettleber.....	16
1.3.2.2	Leberfibrose	17
1.3.2.3	Leberzirrhose	17
1.3.3	Hepatische Sternzellen	17
1.3.4	Ansätze anti-fibrotischer Therapien.....	19
2	Fragestellung und Arbeitshypothese	21
3	Material und Methoden	22
3.1	Material	22
3.1.1	Chemikalien	22
3.1.2	Puffer	22
3.1.2.1	In den Bindungsstudien verwendete Puffer.....	23
3.1.3	Spezielle Verbindungen	23
3.1.4	Zelllinien.....	25

3.1.5	Lösungen für die Zellkultur	25
3.1.6	Gerätschaften.....	26
3.2	Methoden	27
3.2.1	Aktivierung der Matrix-Metalloproteinasen	27
3.2.2	SDS-Gel-Zymographie.....	28
3.2.3	Isolierung der Kollagen VI α 2-Kette	29
3.2.4	Radioaktive Markierung der Matrix-Metalloproteinasen	30
3.3	Bindungsstudien.....	31
3.3.1	Surface Plasmon Resonance.....	32
3.3.1.1	Messprinzip.....	32
3.3.1.2	Limitierende Faktoren	35
3.3.1.3	Kinetik und Auswertung	36
3.3.1.4	Datenauswertung mit der BIAevaluation®-Software	37
3.3.1.5	Immobilisierung der Liganden (Kollagen I, (GPO) ₁₀ , α 2(VI)-Kette) ...	38
3.3.1.6	(GPO) ₁₀ -Bindungsversuche von proMMP-2.....	39
3.3.1.7	Kollagen I-Bindungsversuche der Gelatinasen MMP-2/-9	40
3.3.1.8	Beeinflussung der Gelatinasen-Bindung durch (GPO) ₁₀	40
3.3.1.9	MMP-2-Bindung mit MMP-Inhibitor	40
3.3.1.10	α 2(VI)-Bindungsversuche der MMPs -1/-3/-8/-13 sowie MMP-2/-9...40	
3.3.2	Festphasen-Bindungsstudien.....	41
3.3.2.1	Bindungsversuche in Mikrotiterplatten	41
3.3.2.2	Ligandenblot	41
3.3.3	<i>In situ</i> -Bindungsversuche	42
3.3.3.1	Fluoreszenz (Cy2)-Markierung von proMMP-2	42
3.3.3.2	Cy2-proMMP-2-Bindung an kollagene Septen.....	42
3.3.3.3	Sirius-Rot-Färbung zirrhotischer (kollagener) Stränge.....	43
3.3.3.4	Beeinflussung der proMMP-2/Kollagen-Bindung durch (GPO) ₁₀	43
3.3.3.5	Freisetzung von Kollagen-gebundenem proMMP-2 durch (GPO) ₁₀ ...43	
3.4	Aktivitätsstudien	43
3.4.1	Fluorimetrische Aktivitäts-Assays.....	43
3.4.1.1	Einfluss von (GPO) ₁₀ auf die MMP-2 / -9 –Aktivierung bzw. Aktivität..	44
3.4.1.2	Einfluss von Kollagen VI-Fragmenten auf die MMP-8-Aktivierung bzw. Aktivität.....	44

3.4.1.3	Einfluss von Kollagen VI-Fragmenten auf die Aktivität von proMMP-13/MMP-13.....	45
3.4.2	Typ I-Kollagenase-Assay	45
3.4.2.1	Einfluss von Kollagen VI-Fragmenten auf die Aktivität der Kollagenasen MMP-1, -8, -13	46
3.5	In vitro-Versuche (Zellkultur)	46
3.5.1	Auftauen bzw. Einfrieren von Zellen.....	46
3.5.2	Zellpassagierung.....	47
3.5.3	Bestimmung der Zellzahl.....	47
3.5.4	Einfluss von MMP-2 und (GPO) ₁₀ auf die Proliferation von CFSC	48
3.5.5	Einfluss von MMP-2 und (GPO) ₁₀ auf die Migration/Invasion von HT1080-Zellen	49
3.6	Statistische Datenauswertung	50
4	Ergebnisse	51
4.1	Bindungsstudien der Gelatinasen an eine Kollagen-I-Matrix – Modulation der Bindung mit dem Kollagenmimetikum (GPO)₁₀	51
4.1.1	Bindung der Gelatinasen an immobilisiertes Kollagen I	51
4.1.2	Bindung von proMMP-2 an das Kollagenmimetikum (GPO) ₁₀	52
4.1.3	Modulation der Kollagen I-Bindung der Gelatinasen durch das Kollagenmimetikum (GPO) ₁₀	53
4.1.3.1	Gelatinasebindung an Kollagen I in Tris-Puffer	54
4.1.4	Modulation der Gelatinase - Kollagen I-Bindung durch das Kollagenmimetikum (GPO) ₁₀ in Tris-Puffer.....	56
4.1.5	Bindung von proMMP-2/MMP-2 an Kollagen I unter Ausschluss kollagenolytischer Effekte: Zugabe des Inhibitors Ro28-2653	57
4.2	ProMMP-2 bindet an Kollagen in fibrotischem Lebergewebe und kann durch (GPO)₁₀ freigesetzt werden.....	59
4.3	Einfluss von (GPO)₁₀ auf die Gelatinase-Aktivität.....	60
4.3.1	(GPO) ₁₀ setzt Kollagen I-gebundenes proMMP-2/MMP-2 frei und erhöht dessen Aktivität.....	61
4.3.2	(GPO) ₁₀ und MMP-2 stimulieren die Proliferation von hepatischen Sternzellen (CFSC)	63
4.3.2.1	Die (GPO) ₁₀ -induzierte Proliferation von CFSC-Zellen wird durch MMP-2 vermittelt.....	65

4.3.3	Einfluss von (GPO) ₁₀ und MMP-2 auf die HT1080-Migration/Invasion <i>in vitro</i>	66
4.3.3.1	(GPO) ₁₀ und MMP-2 wirken Migrations-fördernd auf HT1080-Zellen <i>in vitro</i>	66
4.4	Kollagen VI ist Bindungsligand aber nicht Substrat für Kollagenasen	69
4.4.1	Bestimmung kinetischer Parameter der Kollagenasen-Bindung an die α 2(VI)-Kette mittels Biacore	71
4.5	Einfluss von Kollagen VI-Fragmenten auf die Kollagenaseaktivität.....	73
4.5.1	Typ I Kollagenase Assay.....	73
4.5.2	Fluorimetrischer Aktivitäts-Assay	76
5	Diskussion	81
5.1	Die Bindungsstärke (K_D) der Proformen der Gelatinasen an Kollagen I liegt im mikromolaren Bereich.....	81
5.1.1	Die Wahl des Puffersystems beeinflusst die Bindungskinetiken der MMP- Kollagen-Bindungen.....	82
5.2	(GPO)₁₀ schwächt die Kollagen I-Bindung der Gelatinasen	83
5.3	(GPO)₁₀ löst und aktiviert an Kollagen I-gebundenes bzw. gespeichertes proMMP-2 (dualer Wirkmechanismus)	84
5.4	(GPO)₁₀ und MMP-2 wirken Proliferations-stimulierend auf hepatische Sternzellen	87
5.5	(GPO)₁₀ aktiviert endogenes proMMP-2 und fördert so die Migration/Invasion von HT1080-Zellen.....	88
5.6	(GPO)₁₀ als Grundlage einer anti-fibrotischen Strategie	88
5.7	Durch Bindung an das nicht-MMP-Substrat Kollagen VI werden die Kollagenasen in ihrer Aktivierung und Aktivität gehemmt.....	89
5.8	Kollagenfragmente und –mimetika als potentielle Therapeutika im Kontext gängiger Therapieansätze.....	91
6	Zusammenfassung.....	98
7	Literaturverzeichnis	101
8	Abkürzungsverzeichnis	113
	Danksagung.....	116
	Lebenslauf	117
	Erklärung	118

6 Zusammenfassung

Die Leberfibrose ist durch vermehrte Akkumulation von extrazellulärer Matrix (EZM) charakterisiert. Antifibrotische Therapieansätze zielen sowohl auf die Verringerung der EZM-Synthese als auch den verstärkten EZM-Abbau, z.B. durch Matrix-Metalloproteinasen (MMPs). Kollagene als Hauptbestandteile der EZM modulieren indirekt durch die Speicherung von MMPs und Wachstumsfaktoren (WF) zelluläre Prozesse wie Proliferation, Migration und Differenzierung. Die gezielte Beeinflussung dieser Matrix-Bindung von MMPs oder WF stellt einen rationalen Ansatzpunkt für neue lokal wirkende, therapeutische Strategien dar. Voraussetzung dafür ist die Kenntnis des Bindungsverhaltens der biologisch wirksamen Moleküle an Kollagene aus der EZM. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Bindung ausgewählter MMPs und ihrer Proformen durch Kollagene, die teilweise nicht als Substrat beschrieben sind. In der Arbeitsgruppe wurde in Vorarbeiten die tripelhelikale Kollagensequenz „(Glycin-Prolin-Hydroxyprolin)_n, (GPO)_n“ als Konsensusbindungsstelle für die Proformen von MMPs (proMMPs) identifiziert.

Ziel dieser Arbeit war die Bestimmung der Bindungsstärke der Gelatinasen und Kollagenasen an Kollagene bzw. Kollagenfragmente sowie an ein aus der Konsensusbindungssequenz abgeleitetes tripelhelikales Kollagenmimetikum als Basis für eine gezielte lokale Modulation/Kompetition dieser Bindung. Darüber hinaus sollte der Einfluss der MMP-Kollagen-Interaktion auf die enzymatische Aktivität der MMPs untersucht werden. In Hinblick auf zukünftige Anwendungen, zunächst im Tiermodell der Fibrose, waren auch Effekte von Kollagenmimetika *in vitro* auf MMP-produzierende Zellen von Interesse.

Die Kinetik der Bindungen, wie die Dissoziationskonstante K_D , wurde mit Hilfe der Surface Plasmon Resonance-Methode (Biacore) und qualitative Bindungsparameter, wie die Bindung an verschiedene Kollagenfragmente, mit Festphasenbindungs-Assays in Mikrotiterplatten ermittelt. Zusätzlich wurden MMP-Kollagen-Wechselwirkungen *in situ* auf Gewebeschnitten der Leber untersucht. Änderungen der Enzymaktivität der MMPs wurden über die Umsetzung Fluoreszenz-markierter bzw. biotinylierter MMP-spezifischer Substrate gemessen. Effekte der MMPs auf Proliferation und Migration/Invasion u.a. von hepatischen Sternzellen, wurden in Zellkulturversuchen untersucht.

Die Dissoziationskonstante K_D als Maß der Bindungsstärke der Gelatinasen proMMP-2 und -9 an tripelhelikales Kollagen I lag im niederen mikromolaren Bereich ($K_D \sim 10^{-7}$ M). Für die aktivierten Enzyme war sie etwa 10fach schwächer. Die proMMP-2-Bindung an das sehr stabile und rigide tripelhelikale Kollagenmimetikum (GPO)₁₀ war mit einem K_D -Wert im Bereich von 10^{-9} M ca. 100fach stärker als die proMMP-2-Bindung an Kollagen I. (GPO)₁₀ hob die proMMP-2-Kollagenbindung kompetitiv auf, was zur Freisetzung zuvor Kollagen-gebundener MMPs führte. Dies wurde auch *in situ* auf Gewebeschnitten zirrhotischen Lebergewebes gezeigt. Dies unterstreicht die Wirkung von (GPO)₁₀ als hochwirksamen Kompetitor der MMP-Kollagen-Wechselwirkung. Anders als der natürliche Bindungspartner, das tripelhelikale Kollagen I-Fragment, wirkte (GPO)₁₀ zusätzlich als Aktivator von proMMP-2. In Migrations-/Invasionsassays wurde die MMP-2-abhängige Invasion der Fibrosarkomzelllinie HT1080 und die durch MMP-2 stimulierte Proliferation der hepatischen Sternzelllinie CFSC durch (GPO)₁₀ gesteigert.

Die Kollagenasen proMMP-1, -3, -8 und proMMP-13 banden mit K_D -Werten im nanomolaren Bereich an das nicht-Substrat Kollagen VI über dessen tripelhelikales Kollagen VI-Fragment. Die $\alpha 2(VI)$ - bzw. $\alpha 3(VI)$ -Einzelketten wurden als direkte Bindungspartner identifiziert. Auch hier banden die aktivierten Enzyme etwa 10fach schwächer. Und anders als das Kollagenmimetikum (GPO)₁₀ bei den Gelatinasen hemmten die KVI-Ketten die enzymatische Aktivität der Kollagenasen. Die Autoaktivierung der Kollagenasen war in Gegenwart der $\alpha 2(VI)$ -Kette inhibiert.

Aus den Ergebnissen ergeben sich folgende Schlussfolgerungen: Die latenten Proformen der MMPs binden an Kollagene die teilweise nicht-MMP-Substrate sind. Die Bindung der proMMPs ist nicht nur eine Speicherung im Sinne einer Aufbewahrung für eine evtl. spätere Aktivierung, sondern schützt die proMMPs direkt vor autolytischer Aktivierung. Aus pathophysiologischer Sicht wird die lokale Wirkung der MMPs durch überschüssiges Kollagen neutralisiert.

Die Kollagenbindung der Gelatinasen kann durch das Kollagenmimetikum (GPO)₁₀ gezielt geschwächt werden, was zur Freisetzung der Enzyme führt. ProMMP-2 wird zudem durch (GPO)₁₀ aktiviert. *In vitro* bewirkt (GPO)₁₀ eine verstärkte Proliferation und Migration von hepatischen Stern- und anderen mesenchymalen Zellen. Die Aktivität der Kollagenasen wird durch KVI, welches in zirrhotischem Gewebe vermehrt exprimiert ist, und insbesondere durch dessen $\alpha 2(VI)$ -Kette moduliert. Die Speicherfunktion der $\alpha 2(VI)$ -Kette für die MMP-Proformen und die gleichzeitige Inhibition der enzymatischen

Zusammenfassung

Aktivität aktivierter Kollagenasen unterstreicht die Inhibitor-ähnliche bzw. -unterstützende Funktion der $\alpha 2(\text{VI})$ -Kette.

Die lokale Modulation der MMP-Aktivität durch $(\text{GPO})_{10}$ für die Gelatinasen bzw. durch die $\alpha 2(\text{VI})$ -Kette oder entsprechende Analoga für die Kollagenasen eröffnet so einen rationalen Ansatzpunkt zur Therapie pathologischer Veränderungen wie der Leberfibrose oder auch von Tumorerkrankungen. Das *in vivo*-Potential soll jetzt im Tierversuch getestet werden.

8 Abkürzungsverzeichnis

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen

bzw.	Beziehungsweise
ca.	circa
d.h.	das heißt
et al.	und andere
etc.	et cetera
ggf.	Gegebenenfalls
o.g.	oben genannt
s.o.	siehe oben
u.a.	unter anderem
u.	und
usw.	und so weiter
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel

Aminosäuren

Alanin	Ala	A
Cystein	Cys	C
Asparaginsäure	Asp	D
Glutaminsäure	Glu	E
Phenylalanin	Phe	F
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Hydroxyprolin	Hyp	O
Isoleucin	Ile	I
Lysin	Lys	K
Leucin	Leu	L
Methionin	Met	M
Asparagin	Asn	N
Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q
Arginin	Arg	R
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Valin	Val	V
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y

Abkürzungsverzeichnis

Kinetische Konstanten

ka	Assoziationsrate ("On-Rate") ($M^{-1}s^{-1}$)
K_A	Assoziationskonstante (M^{-1})
kd	Dissoziationsrate ("Off-Rate") (s^{-1})
K_D	Dissoziationskonstante (M)

Physikalische Größen und Einheiten

° / °C	Grad bzw. Grad Celsius
Å	Ångström ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$)
kD	Kilodalton
λ	Wellenlänge (nm)
L	Liter
M	molar (mol / L) / Mol
m	Meter / milli
N	Normalität (mol / L)
n	nano / Stoffmenge
p	pico
RU	"Resonance Units" – Resonanz Einheiten (Biacore)
s	Sekunden
T_m	Schmelz- bzw. Denaturierungstemperatur (°C)
μ	mikro

Sonstige

$\alpha_1(I/VI)$	jeweilige tripelhelikale Abschnitte der α -Einzelketten von Kollagen I & VI
APMA	4-Aminophenylquecksilberacetat
AS	Aminosäure
CB	Cyanbromidfragment
CBD	Collagen Binding Domain
CFSC	<u>C</u> ystic <u>F</u> ibrotic <u>S</u> tellate <u>C</u> ells
Col-1,-2,-3	Subdomänen der CBD
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDC	N-Ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACIT	Fibril Associated Collagens with interrupted Triple Helices

Abkürzungsverzeichnis

Fn	Fibronectin
GAP	H-GCA-(GAP) ₅ -GFOGER-(GAP) ₅ -GCAG-NH ₂
(GPO) ₁₀	[H-GCO-(GPO) ₁₀ -GCOG-NH ₂] ₃
HOAc	Essigsäure
HBS-EP	HEPES-buffered saline-EDTA/P20
HSZ	hepatische Sternzelle
IL	Interleukin
IFN	Interferon
KI	Kollagen I
KVI	Kollagen VI
KVI-F	tripelhelikales Kollagen VI-Fragment
KVI r,a	Kollagen VI-Einzelkettengemisch
MMP(s)	Matrix-Metalloproteinase(n)
MT-MMP	Membrane Type-Matrix Metalloproteinase
NHS	N-Hydroxysuccinimid
P20	Polysorbat 20 / Polyoxyethylen(20)sorbitanmonolaurat
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPR	Surface Plasmon Resonance
TGF	Transforming Growth Factor
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Rajan Somasundaram und Dr. Martin Rühl für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und der Überlassung des Themas der Dissertation. Damit verbunden natürlich auch für die Bereitstellung der nötigen Arbeitsmaterialien und dem entgegengebrachten Vertrauen in meine Arbeit.

Meinen Eltern und meiner Großmutter sei für ihre Liebe und vor allem die finanzielle Unterstützung gedankt, die einem das Studentenleben doch sehr zu vereinfachen half.

Der restlichen Arbeitsgruppe, allen Diplomanden, Doktoranden und weiteren Mitarbeitern gilt Dank für die stets freundliche Atmosphäre im Labor.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Erklärung

„Ich, Christian Freise, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Untersuchung der Interaktion von Matrix-Metalloproteinasen mit nicht-Substrat Kollagenen und Kollagenmimetika mittels Surface-Plasmon-Resonance. Lokale Modulation von Bindung und Aktivität der Matrix-Metalloproteinasen als Basis neuer therapeutischer Ansätze“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, 06.12.06

Christian Freise