

1 Einleitung

1.1 Die extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix (EZM) fasst alle unlöslichen Bestandteile des interzellulären Raumes (auch: interstitieller Raum) zusammen. Dazu gehören sowohl funktionell assoziierte Makromoleküle als auch zelluläre Bestandteile [1]. Die EZM ist an dem organspezifischen räumlichen Aufbau und der Informationsvermittlung innerhalb des Organs beteiligt. Sie ist nicht nur organspezifisch, sondern auch regional innerhalb eines Organs unterschiedlich zusammengesetzt [2, 3]. Die Funktionen der EZM gliedern sich grob in drei Bereiche. Der erste Aspekt ist mechanischer Natur und beinhaltet statische Stützfunktionen sowie eine Filter- bzw. Diffusionsbarrierefunktion. Ein weiterer Aspekt ist die Beeinflussung von Zellfunktionen und -Eigenschaften wie Proliferation, Migration, Adhäsion, Polarität sowie des Phänotyps. Zusätzlich erfüllt die EZM eine Speicherfunktion für Zytokine und Wachstumsfaktoren [4, 5].

Die EZM der Leber besteht im Wesentlichen aus drei Molekülklassen: Kollagenen, nicht-kollagenen Glykoproteinen und Proteoglykanen [6]. Im Folgenden soll auf die für diese Arbeit relevante Klasse der Kollagene näher eingegangen werden.

1.1.1 Kollagene

Kollagene sind ein wichtiger Bestandteil der EZM. Alle Kollagene zusammen stellen ca. 25% des Gesamtkörperproteins bei Säugern dar. Sie weisen eine hohe Zugfestigkeit auf und sind Bestandteil der meisten Binde- und Stützgewebe (Knorpel, Sehnen, Knochen) [7-9]. Die Großfamilie der Kollagene wird in fibrilläre und nicht-fibrilläre Kollagene eingeteilt. Charakteristisches Merkmal aller Kollagentypen ist, dass sie Bestandteil der extrazellulären Matrix sind und zumindest eine tripelhelikale Domäne besitzen. Fibrilläre Kollagene weisen durchgehend Tripelhelixstruktur auf. Die Kollagenfaser besteht aus mehreren Kollagenfibrillen. Diese setzen sich aus mehreren Mikrofibrillen zusammen, die elektronenmikroskopisch darstellbar sind. Die Mikrofibrillen bestehen aus Tropokollagen-Molekülen, die aus drei Polypeptidketten aufgebaut sind, welche in Form einer rechtsgängigen Tripelhelix umeinander gewunden sind (**Abb. 1**).

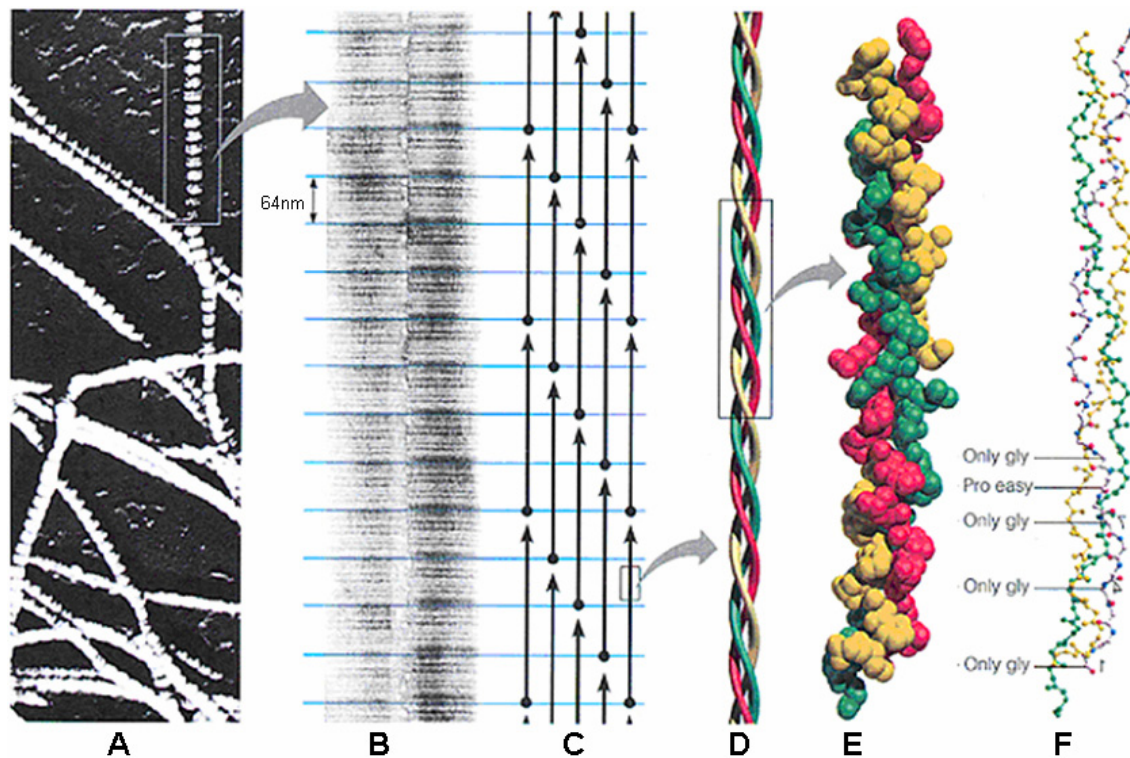


Abbildung 1: Übersicht über die verschiedenen Ebenen der Kollagen-Struktur [10]. Dargestellt sind (A+B) Kollagenfasern unter dem Elektronenmikroskop (C) Schematischer Aufbau der Kollagenfaser, bestehend aus (D) mehreren tripelhelikalen Fasern. Diese bestehen aus (E+F) einzelnen Aminosäureketten mit der charakteristischen Sequenz: Glycin-Prolin-(Hydroxy)prolin.

Die Peptidketten des fibrillären Kollagens bestehen aus der repetitiven Sequenz Gly-X-Y. Jede dritte Stelle nimmt Glycin ein, an der Position X findet sich meist Prolin, an Position Y oft Hydroxyprolin. Gleichfalls kommt Lysin häufig in der Peptidkette vor. Die Pyrrolidinringe von Prolin- und Hydroxyprolin tragen zur Stabilität der Tripelhelix bei, da sie aufgrund ihrer Größe nur eine geringe Drehung der Helix in sich zulassen. Zudem begünstigen der elektronegative Sauerstoff des Prolins sowie die OH-Gruppe des Hydroxyprolins die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, welche die drei Polypeptidketten miteinander verknüpfen. Lysin- und Hydroxylysinreste tragen zur Bildung von kovalenten Bindungen innerhalb und zwischen den Tropokollagen-Molekülen bei und sind damit für die Zugfestigkeit des Kollagens entscheidend. Neben den helikalen Domänen weisen Tropokollagen-Moleküle auch nicht-helikale Abschnitte auf. Diese befinden sich sowohl am Amino- als auch am Carboxyl-Ende der Peptidketten und werden als Telopeptide bezeichnet. Nicht-fibrilläre Kollagene weisen die Tripelhelixstruktur nur in bestimmten Molekülanteilen auf. Sie besitzen auch größere globuläre Domänen, wodurch sich ihre Gesamtstruktur erheblich von der fibrillären

Kollagene unterscheidet. Die für Kollagene charakteristische tripelhelikale Struktur findet sich auch in anderen Proteinen, wie z.B. in dem Enzym Azetylcholinesterase. Es wird aber nicht zu den Kollagenen gezählt, da es nicht Bestandteil der EZM ist [7-9].

1.1.1.1 Kollagen I

Kollagen I gehört zu den Fibrillen-bildenden Kollagenen, die etwa 90% des gesamten Kollagens im Körper ausmachen [9]. Kollagen I besteht aus zwei $\alpha 1$ -Ketten ($\alpha 1(I)$) und einer $\alpha 2$ -Kette ($\alpha 2(I)$), welche von unterschiedlichen Genen kodiert werden. Die Expression von Kollagen I ist während der Fibrogenese stark erhöht [11].

1.1.1.2 Kollagen VI

Kollagen VI ist ein nicht-Fibrillen-bildendes, Mikrofilament-aufbauendes Kollagen und ist bis heute das einzige Kollagen in dieser Gruppe [12]. Es ist ein 105 nm Heterotrimer aus $\alpha 1(VI)$, $\alpha 2(VI)$ und $\alpha 3(VI)$ -Ketten (**Abb. 2**).

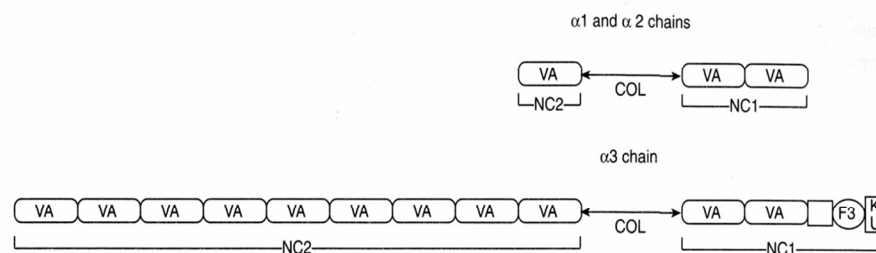


Abbildung 2: Struktur der Kollagen VI-Einzelketten Die einzelnen $\alpha(VI)$ -Ketten bestehen aus einem tripelhelikalen kollagenen Abschnitt (Col), NC bezeichnet jeweils die nicht-kollagenen Bereiche. VA steht für die vWF-A, F3 ist die Fn Typ III und KU die Kunitz Trypsininhibitor-Domäne. Das leere Quadrat der $\alpha 3$ -Kette ist ein Lysin- und Prolin-reicher Sequenzbereich [13].

Kollagen VI weist einen hohen Anteil an Disulfidbrücken auf, die eine wichtige Rolle bei der Bildung der Mikrofilamente und der Stabilität der Tripelhelix spielen. Dadurch widersteht die Kollagentripelhelix den proteolytischen Angriffen vieler Proteinase [14].

Kollagen VI wird in der Leber von der hepatischen Sternzelle (HSZ) synthetisiert. Als Mikrofilament kommt es in großen Mengen verankert auf Fibrillen der Kollagene I und III im Gewebe vor, wo es vaskuläre Strukturen mit dem Interstitium verbindet [12].

Kollagen VI scheint in der Leber Einfluss auf den fibrotischen Verlauf zu haben. Es wird in der aktivierten HSZ hochreguliert und tritt im frühen Stadium der Leberfibrose auf. Freies Kollagen VI im Serum gilt als Fibrosemarker [15]. In den relativ kurzen Helices

von Kollagen VI kommt 13 mal die RGD-Sequenz, eine Integrin Bindungsstelle vor [16]. Als Kollagen-VI-Rezeptoren wurden Integrine ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ und $\alpha 6\beta 4$) und das Glykoprotein NG2 beschrieben [17, 18]. Zudem wurde der DDR1-Rezeptor (Discoidin Domän Rezeptor-Tyrosinkinase) als Kollagen-VI-Rezeptor identifiziert [19].

Über einen noch unbekanntem Rezeptor (es wird ein aus Integrinen bestehender Rezeptorkomplex vermutet) bewirkt das Kollagenfragment eine Proliferation und sinkende Apoptose von aktivierten HSZ.

Kollagen VI induziert die MAPK-Signalkaskade durch Phosphorylierung von Tyrosin in Proteinen der fokalen Adhäsion (FAK, Paxillin und p130 CAS), mit anschließender Aktivierung der Mitogen-aktivierenden-Proteinkinase (MAPK) ERK2 und bewirkt die Mitose von aktivierten HSZ [20].

Die mitochondriale Apoptosesteuerung der Zelle hängt u.a. von dem Bax/Bcl-2-Verhältnis im Zytoplasma ab. Die Rezeptoraktivierung durch Kollagen VI führt zu einer Herunterregulierung des pro-apoptotischen Bax [21].

Mit der Beeinflussung der Apoptose, Mitose und Proliferation der aktivierten Sternzellen und als Speicher für Kollagenasen und Wachstumsfaktoren wirkt Kollagen VI entscheidend auf den Matrixumbau der EZM ein und begünstigt die Progression der Leberfibrose [22-24].

Interessanterweise zeigt das intakte - nicht durch Pepsinabbau erzeugte - Kollagen-VI-Mikrofilament keine Beeinflussung von Apoptose, Proliferation und keinen mitogenen Effekt. Das Phänomen, dass Fragmente von Kollagenen eine spezifische biologische Aktivität erwerben, ist bisher auch für die Kollagene IV (mitogen), Kollagen XIV (Differenzierungsinduktion) und Kollagen XVIII/Endostatin (Angiogenesehemmung) bekannt [12, 25].

1.2 Regulation der extrazellulären Matrix

Kollagenes Bindegewebe unterliegt einem kontinuierlichen Umsatz („tissue remodelling“). Synthese und Degradation befinden sich unter physiologischen Bedingungen in einem dynamischen Gleichgewicht [26]. Ein Verschieben dieser Homöostase ist unter physiologischen Bedingungen (z.B. Wachstum und Embryogenese), wie auch bei pathologischen Vorgängen (z.B. Fibrogenese, Tumorwachstum) möglich.

Die Regulation der EZM-Synthese erfolgt über lösliche und unlösliche Signalstoffe. So werden z.B. die Wachstumsfaktoren *Transforming Growth Factor- α* (TGF- α), *Transforming Growth Factor- β 1* (TGF- β 1) sowie verschiedene Interleukine als Transmitter von eingewanderten Zellen des Immunsystems oder lokalen Gewebszellen sezerniert und wirken auto- und parakrin stimulierend auf EZM-synthetisierende Zellen [27]. Zu diesen EZM-synthetisierenden Zellen in der Leber gehören Hepatozyten, Endothelzellen, Gallengangsepithelzellen, Kupffer-Zellen, Fibroblasten und insbesondere die hepatischen Sternzellen [28].

Der Matrixsynthese steht die Matrixdegradation gegenüber. Die Degradation von Kollagenen erfolgt durch ein Zusammenspiel einer Vielzahl von Enzymen, deren Aktivität durch Zytokine reguliert wird. Beteiligt sind z.B. Serinproteasen und die Matrix-Metalloproteinasen.

1.2.1 Matrix-Metalloproteinasen

Die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) stellen eine Familie Kalzium-abhängiger Endopeptidasen dar, die sich über ein drei Histidinreste enthaltendes Bindungsmotiv charakterisieren, welches ein Zink-Ion im katalytischen Zentrum bindet. Die MMPs sind die entscheidenden Matrix-abbauenden Proteasen. In ihrer Gesamtheit können sie alle Protein-Komponenten der EZM abbauen. MMPs werden als inaktive Zymogene (Proformen der MMPs - proMMPs) sezerniert und dann extrazellulär schrittweise durch proteolytische Spaltungen und Konformationsänderungen aktiviert. Aufgrund ihrer Matrix-degradierenden Eigenschaft kommt den MMPs eine bedeutende Rolle beim Gewebsumbau sowohl im Rahmen physiologischer-, als auch zahlreicher pathologischer Prozesse zu [29]. So wird ihnen z.B. bei der Zellmigration [30, 31], Embryogenese [32, 33], Wundheilung [34] und dem ovariellen und endometrialen Zyklus [35] eine Bedeutung zugeschrieben. Zu den pathologischen Prozessen zählen Tumorerkrankungen, insbesondere der Prozess der Invasion bei der Metastasierung [36-38], Kornea- und Magenulzera sowie Kollagenosen, wie etwa Arthritis und Fibrose von Niere und Leber [5, 39-41]. Expression und Aktivierung der MMPs unterliegen einer strengen physiologischen Regulierung [42].

Anhand unterschiedlicher Substratspezifität lassen sich die MMPs in sechs Gruppen unterteilen (**Tab. 1**).

Tabelle 1 Familie der Matrix-Metalloproteinasen. Übersicht über Nomenklatur und Substrate [42].

Gruppe	Enzym	MMP-Nomenklatur	Substrate
Kollagenasen	Interstitielle Kollagenase	MMP-1	Typ I-, II-, III-, VII-, VIII-, X-, XI-Kollagen, Gelatine, Aggrecan, Tenascin, Laminin, Fibronectin, Entactin, Vitronectin
	Neutrophile Kollagenase	MMP-8	Typ I-, II-, III-Kollagen, Aggrecan
	Kollagenase-3	MMP-13	Typ I-, II-, III-,VI-, IX-, X-, XIV-Kollagen, Fibronectin, Aggrecan, Gelatine
	Xenopus Kollagenase	MMP-18	Typ I- Kollagen
Gelatinasen	Gelatinase A	MMP-2	Typ I-,II-, III-, IV-, V-, VII-, X-, XI-Kollagen, Gelatine, Elastin, Laminin, Fibronectin, Proteoglykane, Tenascin, Vitronectin
	Gelatinase B	MMP-9	Typ IV-, V-, XI-, XIV- Kollagen, Gelatine, Elastin, Proteoglykane
Stromelysine	Stromelysin-1	MMP-3	Typ I-, III-, IV-, V-, VIII-, IX-Kollagen, Proteoglykane, Laminin, Gelatine, Elastin, Fibronectin, Tenascin
	Stromelysin-2	MMP-10	Typ I-, III-, IV-, V-, VII-, IX-, X-, XI-Kollagen, Gelatine, Proteoglykane, Elastin, Laminin, Fibronectin
	Stromelysin-3	MMP-11	N-terminale Domäne erkennt Casein
Membranständige MMPs	MT-MMP-1	MMP-14	Typ I-, II-, III- Kollagen, Proteoglykane, Laminin, Fibronectin, Gelatine
	MT-MMP-2	MMP-15	Gelatine, Laminin, Fibronectin, Tenascin
	MT-MMP-3	MMP-16	Fibronectin
	MT-MMP-4	MMP-17	Gelatine
	MT-MMP-5	MMP-24	
	MT-MMP-6 (Leukolysin)	MMP-25	Gelatine
Matrilysin	Matrilysin (PUMP)	MMP-7	Typ I- Kollagen, Gelatine, Fibronectin, Elastin, Proteoglykan, Laminin
nicht klassifizierbare MMPs	Metalloelastase	MMP-12	Typ I-, IV- Kollagen, Gelatine, Elastin, Laminin, Fibronectin
	RASI-1	MMP-19	Typ I-, IV- Kollagen, Gelatine, Tenascin, Aggrecan
	Enamelysin	MMP-20	Amelogenin
	XMMP	MMP-21	
	CMMP	MMP-22	
	Femalysin	MMP-23	
		MMP-27	
	Epilysin	MMP-28	

PUMP, putative metalloproteinase; **RASI-1**,Rheumathoid arthritis synovia inflammation-1

1.2.1.1 Struktur der Matrix-Metalloproteinasen

Die Basisstruktur aller Matrix-Metalloproteinasen besteht aus drei Domänen: dem N-terminalen Propeptid, der katalytischen Domäne und - mit Ausnahme des Matrilysins - einer Hämopexin-ähnlichen Domäne am C-terminalen Ende (**Abb. 3**) [43].

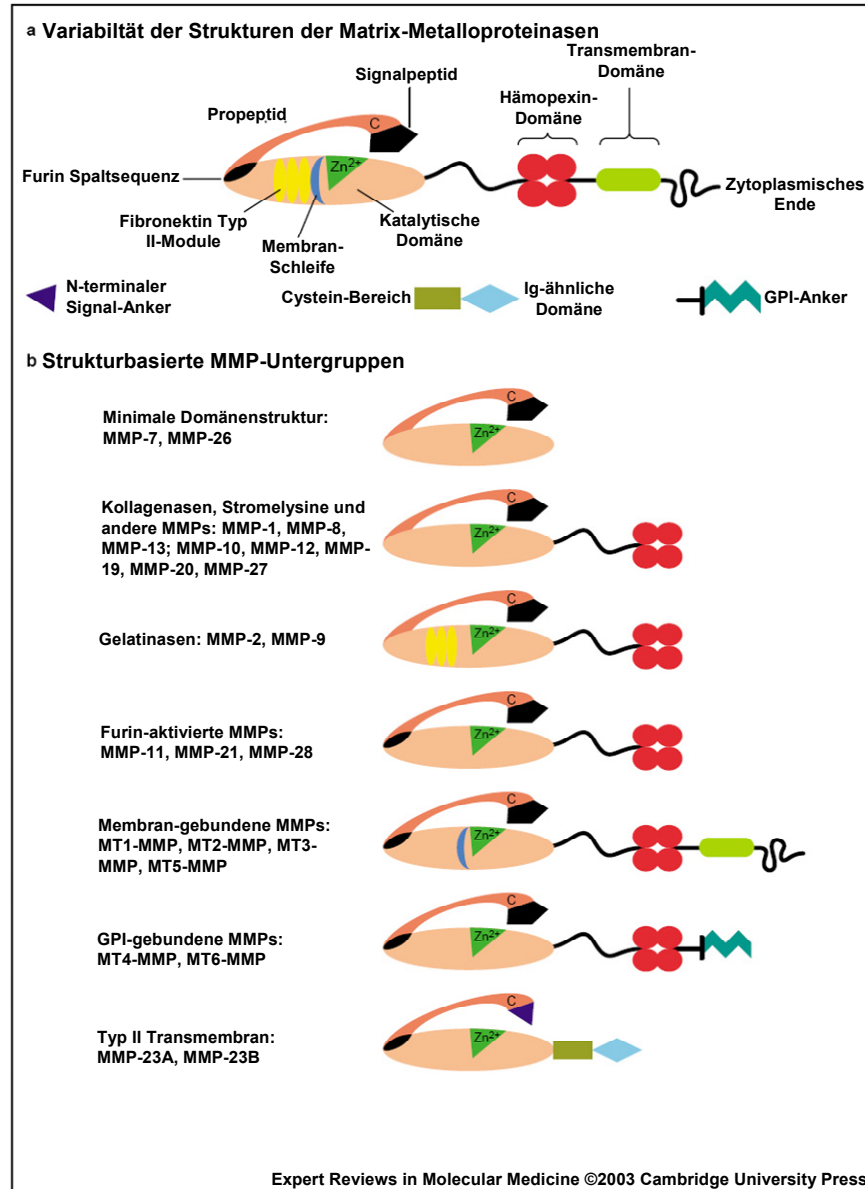


Abbildung 3: Allgemeine und spezielle strukturelle Organisation der MMP-Familie – MMPs können anhand ihrer Struktur in mehrere Untergruppen eingeteilt werden. Alle MMPs weisen ein Signalpeptid auf, das sie für die Sekretion in den extrazellulären Raum markiert, zudem ein Propeptid sowie eine katalytische Domäne. Die meisten MMPs (außer MMP-7 und MMP-26) besitzen eine C-terminale Hämopexin-Domäne und eine „Hinge-Region“. MMP-Untergruppen zeigen gesonderte Merkmale wie Transmembran-Domänen, zytoplasmische Enden und eine MT-Schleife (MT1-, MT2-, MT3- and MT5-MMP). Ausserdem ein Bindungsmotiv für GPI (MT4-MMP and MT6-MMP), eine Furin-Spaltsequenz (MT-MMPs, MMP-11, -21, -23, -28), Fibronectin Typ II-Module (MMP-2 and -9), einen N-terminalen Signalanker, einen Cystein-haltigen Bereich sowie eine Ig-ähnliche Domäne (MMP-23) auf.

Das **N-terminale Propeptid** besteht aus 80-90 Aminosäuren und interagiert über ein charakteristisches Motiv, der sog. „cystein-switch-Sequenz“ RRCG(N/V)D, über einen Cysteinrest mit dem katalytischen Zinkatom. Das Enzym wird durch diesen so genannten „*Cystein-switch*“ in seiner latenten Form gehalten [44-46]. Durch die Cystein-Zink-Bindung wird das Propeptid über die katalytische Domäne gefaltet und somit das aktive Zentrum maskiert [44, 47]. Auch wird durch die Wechselwirkung des Cysteins mit dem Zink des katalytischen Zentrums ein für die Katalyse notwendiges Wassermolekül verdrängt, welches als Bindungspartner des aktivierten Enzyms fungiert [48] (**Abb. 4**). Eine proteolytische Abspaltung des Propeptids führt zur Aktivierung der Matrix-Metalloproteinasen [34].

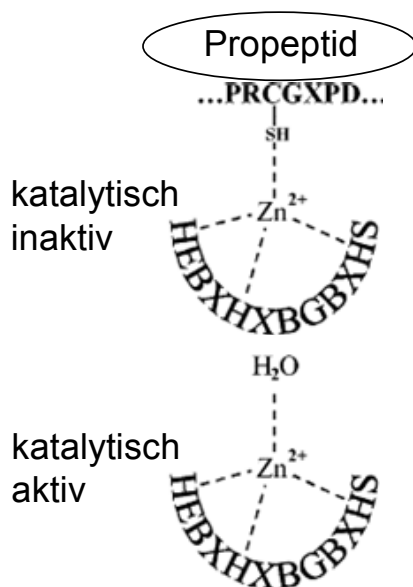


Abbildung 4: Schematische Darstellung des katalytischen Zentrums der Matrix-metalloproteinasen. Die an dem Propeptid lokalisierte Thiol-Gruppe koordiniert mit dem katalytischen Zink-Ion der latenten MMPs. Das aktive Zentrum ist durch das Propeptid maskiert. Während der Aktivierung, dem „Cystein-Switch“, nimmt ein Wassermolekül den Platz der Thiol-Gruppe ein, das Propeptid wird abgespalten. Das Enzym wird katalytisch aktiv [49].

Die **katalytische Domäne** (ca. 170 Aminosäuren) umfasst zwei Zink-Ionen, von denen eines im aktiven Zentrum lokalisiert ist, wohingegen das zweite Zink-Ion gemeinsam mit zwei bis drei Kalzium-Ionen die Stabilität des Enzyms sichert [50]. Die charakteristische Aminosäuresequenz HEXXHXXGXXH („Zinkbindungsmotiv“) bindet über ihre drei Histidinreste das katalytische Zinkatom (**Abb. 4**) [51]. Neben der Substratbindungsstelle der katalytischen Domäne existieren weitere Domänen außerhalb des aktiven Zentrums, welche auch für große Moleküle wie tripelhelikale Kollagene zugänglich sind. Sie werden als „**Exosites**“ bezeichnet [52].

Eine solche „Exosite“ stellt die C-terminale **Hämopexin-ähnliche Domäne** - so benannt aufgrund ihrer Sequenzhomologie zu dem Plasmaprotein Hämopexin [53] – dar. Sie besteht aus ca. 210 Aminosäuren, spielt eine funktionelle Rolle bei der Substratbindung und Interaktion mit spezifischen endogenen Inhibitoren der MMPs (TIMPs – *Tissue*

inhibitors of metalloproteinases) [54] und ist zudem essentiell für die Spaltung von interstitiellem Kollagen durch Kollagenasen [55]. Ihre vier Hämopexin-ähnlichen Untereinheiten weisen am Ende jeweils einen Cysteinrest auf. Disulfidbrücken zwischen diesen Resten führen zur Faltung einer vierblättrigen Propellerstruktur, wobei jedes Blatt aus vier antiparallelen β -Faltblättern und einer α -Helix besteht [56, 57]. MMP-7 und MMP-12 sind auch ohne diese Domäne enzymatisch aktiv [45]. Wird diese Domäne bei MMP-1 entfernt, so besitzt dieses Enzym weiterhin eine katalytische Aktivität, verliert jedoch die Fähigkeit, die Tripelhelix von Kollagen abzubauen [45]. Entsprechendes konnte auch für MMP-8 gezeigt werden [58].

Katalytische- und Hämopexindomäne sind über eine Brückensequenz, die „**Hinge-Region**“, verbunden. Sie kann in den MMPs in Länge und Zusammensetzung variieren (bis zu 75 Aminosäuren). Die Hinge-Region weist eine tripelhelikale Struktur auf (*Prolin-Zipper*), welche mit der Kollagen-Tripelhelix interagiert und den proteolytischen Prozess unterstützt [59].

Zusätzlich zu den bereits genannten Domänen besitzen die Gelatinasen eine **Fibronectin Typ II-ähnliche, Gelatine-/Kollagen-bindende Domäne (Collagen Binding Domain - CBD)**, die für die Gelatine-, bzw. Kollagenbindung verantwortlich ist [60]. Die CBD wird auch als zweite „**Exosite**“ bezeichnet.

Membranständige MMPs verfügen dagegen über eine Transmembrandomäne, die im Fall von MT1-MMP u.a. an der physiologischen Aktivierung von MMP-2 beteiligt ist [61].

1.2.1.2 Kollagenasen

Kollagenasen degradieren interstitielles Kollagen (Typ I, II und III). Durch Spaltung der Tripelhelix in ein $\frac{1}{4}$ - und ein $\frac{3}{4}$ -Fragment ist es auch für die aktiven Zentren anderer Enzyme wie den Gelatinasen zugänglich und steht diesen zur weiteren Degradation zur Verfügung [62, 63].

Die kollagenolytische Aktivität der Kollagenasen gliedert sich in einen dreistufigen Prozess [64]: Zunächst folgt die Kollagenbindung über eine „Exosite“, welche das Kollagenmolekül orientiert und destabilisiert. Bei den Kollagenasen sind dies die Hämopexin-Domäne und die Hinge-Region. Im Anschluss wird das native Kollagen lokal unterbrochen und entwunden, um die Schnittstellen verfügbar zu machen (Tripelhelikaseaktivität). Diese Tripelhelikaseaktivität ist aufgrund der beschränkten

Taschenöffnung des aktiven Zentrums nötig. Kollagen I besteht aus zwei $\alpha 1(I)$ - und einer $\alpha 2(I)$ -Kette, ist ca. 3000 Å lang und besitzt einen Durchmesser von ca. 15 Å, wogegen die Taschenbreite nur ca. 5 Å misst. Deshalb können nur einzelne Polypeptidketten katalytisch gespalten werden. Erst nach der Entwindung kommt es also zur Peptidspaltung durch das aktive Zentrum der katalytischen Domäne, welches an den einzelnen Ketten ansetzt (Telozeptidaseaktivität). Eine Eliminierung der Hämopexin-Domäne ermöglicht den Kollagenasen zwar noch Telozeptidaseaktivität (z.B. Spaltung synthetischer Peptide), natives Kollagen dagegen kann nicht mehr in $\frac{1}{4}$ - und $\frac{3}{4}$ -Fragmente gespalten werden [65].

1.2.1.3 Gelatinasen

Die Gelatinasen MMP-2 und -9 degradieren denaturiertes Typ V-Kollagen (Gelatine = denaturiertes Kollagen) [66] und intaktes Typ IV-Kollagen, welches einen wichtigen Baustein von Basalmembranen darstellt [67]. Darüber hinaus werden Laminin, Fibronectin und Elastin von Gelatinasen gespalten [68] (**Tab. 1**).

Die Typ IV-Kollagen-degradierende Aktivität ist für den Abbau der normalen Lebermatrix von großer Bedeutung [69]. In frühen Stadien der Lebererkrankung konnte ein vermehrtes Auftreten aktivierter MMPs nachgewiesen werden [70]. Dennoch zeigt sich mit Progression der Fibrose eine zunehmende Ablagerung von Typ IV-Kollagen, was unterschiedlich diskutiert wird. Einerseits wird die Kollagen-synthetisierende hepatische Sternzelle MMP-2-vermittelt stimuliert [71, 72], andererseits die Aktivität von MMP-2 durch TIMP-2 gehemmt [73].

Wie aus **Tab. 1** hervorgeht, besitzt MMP-2 auch schwache kollagenolytische Aktivität gegenüber Kollagen I [29, 74-76] sowie synthetischen tripelhelikalen Kollagenmimetika [77, 78]. Dabei wurde jeweils APMA-aktiviertes MMP-2 eingesetzt.

Die Bindung der Gelatinasen an native Kollagene und Gelatine geschieht primär über die Kollagen-Bindungs-Domäne (CBD) [78]. Diese, in Kap. 1.2.1.1 bereits erwähnte „Exosite“, besteht aus einem Fibronectin Typ II-ähnlichen Motiv, das sich aus drei homologen Subdomänen Col-1, Col-2 und Col-3 (**Abb. 3**) zusammensetzt. Die CBD kann mehrere Kollagenmoleküle gleichzeitig binden. Die ternäre Struktur spielt hierbei eine besondere Rolle, da isolierte Domänen eine geringere Bindungsaffinität als das Trimer zeigen [79, 80]. Trotz struktureller Homologie zeigt sich ein unterschiedliches Bindungsverhalten der isolierten Module [79, 81]. Das Col-2-Modul beider Gelatinasen bindet Gelatine- bzw. Kollagen [82, 83]. In NMR-Studien konnte zudem gezeigt werden,

dass Col-1, -2 im Gegensatz zu Col-3 eine höhere Affinität gegenüber den Kollagenmimetika (GPP)₆ und (GPP)₁₂ zeigen. Col-3 weist dagegen eine höhere Affinität gegenüber einem Segment des Propeptids (PIIKFPGDVA - p33-42) auf. Col-1, -2 zeigen nur geringe Affinität gegenüber p33-42 [84-86]. Die Propeptid-Col-3-Bindung trägt zur Stabilität der latenten Zymogenstruktur bei [49].

Gelatine zeigt außer zur CBD auch eine Bindungsaffinität zur C-terminalen Hämopexin-Domäne der Gelatinasen [82, 87]. Diese, zusammen mit der Bindung an die katalytische Domäne scheint ausreichend für Gelatinolyse und den Kollagenabbau [75]. *Tam et al.* beschreiben, dass die CBD die α -Ketten des Kollagens spreizt bzw. destabilisiert, worauf der Kollagenabbau erfolgt [88].

1.2.2 Physiologische Regulation der Matrix-Metalloproteinasen

MMPs werden in der Regel nur dann synthetisiert und sezerniert, wenn entsprechende Zellen (z.B. die hepatischen Sternzellen) spezifische Signale erhalten [89]. Unphysiologisch aktivierte, bzw. fehlregulierte MMPs können zu einer ungewollten Zerstörung von Gewebe und damit zu pathologischen Vorgängen führen; daher ist eine strenge Regulierung der MMPs erforderlich. Die Regulation erfolgt sowohl auf Ebene der Genexpression, als auch durch Kontrolle der proteolytischen Aktivität der Proteine. Nach der Sekretion als Zymogene erfolgt eine regulierte Prozessierung und Aktivierung. Aktivierte MMPs können durch ebenso strikt regulierte Prozesse inaktiviert, bzw. gehemmt werden. So wird ein Gleichgewicht aus latenten, d.h. inaktiven, aktivierten und inaktivierten Enzymen hergestellt.

1.2.2.1 Regulation auf Transkriptions- bzw. Translationsebene

Die meisten MMP-Gene sind induzierbar. Die Genexpression kann durch Wachstumsfaktoren, bestimmten Zytokinen, verschiedenen chemischen Reagenzien (z.B. Phorbol ester), physikalischen Stress und zelluläre Transformation bei Krebs hochreguliert und durch Faktoren wie z.B. Glukocorticoide, Retinolsäure, Progesteron, TGF- β , IFN- β und - γ , runterreguliert werden [90-94]. Zudem dienen TNF- α und IL-1 [92, 95, 96], aber auch Wachstumsfaktoren wie EGF (epidermal growth factor) und PDGF (platelet-derived growth factor) als Initiatoren der MMP-Synthese [92-94].

Anhand ihres Expressionsmusters zeigt sich ein Hauptunterschied der Gelatinasen MMP-2 und -9 [97]. MMP-2 wird gewöhnlich konstitutiv exprimiert, wird also nur gering

durch Wachstumsfaktoren etc. beeinflusst [98]. Eine wichtige Ausnahme im Kontext der Leber stellt das Hepatitis C-Virus dar, welches bei humanen hepatischen Sternzellen MMP-2-induzierend wirkt [99].

Die MMP-9-Expression dagegen ist stark induzierbar und wird durch Wachstumsfaktoren, Chemokine und andere Stimuli reguliert [100].

1.2.2.2 Regulation der Aktivierung

Die in Kap. 1.2.1.1 beschriebene Aktivierung über den „Cystein-switch“ kann *in vivo* und *in vitro* sowohl auf proteolytische als auch auf nicht-proteolytische Weise erfolgen. Für die proteolytische Aktivierung sind verschiedene Mechanismen beschrieben [60]:

a) extrazelluläre Aktivierung durch nicht-MMP-Proteine

Gewebe- oder Plasmaendopeptidasen wirken direkt proteolytisch auf Matrix-Metalloproteinasen. Eine der in diesem Zusammenhang wohl am besten untersuchten Peptidasen ist das Plasmin, welches zur vollständigen Aktivierung von proMMP-9, proMMP-3 und proMMP-10 und zur teilweisen Aktivierung weiterer Pro-Kollagenasen fähig ist [101, 102]. Daneben spielen auch Kallikrein, Thermolysin, Chymotrypsin und Trypsin eine Rolle in der proteolytischen Aktivierung von MMPs [103-105].

b) extrazelluläre Aktivierung durch andere MMPs

Matrilysin ist in der Lage, proMMP-3 vollständig und proMMP-9 teilweise zu aktivieren [106]. Zudem können MMP-3 [107] sowie MMP-2 zur proMMP-9 Aktivierung beitragen [108].

c) intrazelluläre Aktivierung von Stromelysinen und MT-MMP durch Furin

Furin erkennt und spaltet Proteine, welche die Aminosäuresequenz RXKR aufweisen. Dies ist bei Stromelysinen und Mitgliedern der MT-MMPs der Fall, bei denen die genannte Sequenz zwischen der Prodomäne und der katalytischen Domäne liegt [109, 110].

d) MT-MMP-abhängige Aktivierung von MMP-2

MT1-MMP ist der entscheidende natürliche Aktivator von proMMP-2 [111-114]. Das bereits intrazellulär aktivierte, membranständige MT1-MMP agiert an der

Zelloberfläche zunächst als Ligand für TIMP-2. Dieser Aktivator-TIMP-2 Komplex wiederum fungiert als Ligand für proMMP-2, nach dessen Bindung MT1-MMP die pro-Gelatinase proteolytisch aktiviert (**Abb. 5**) [34, 115].

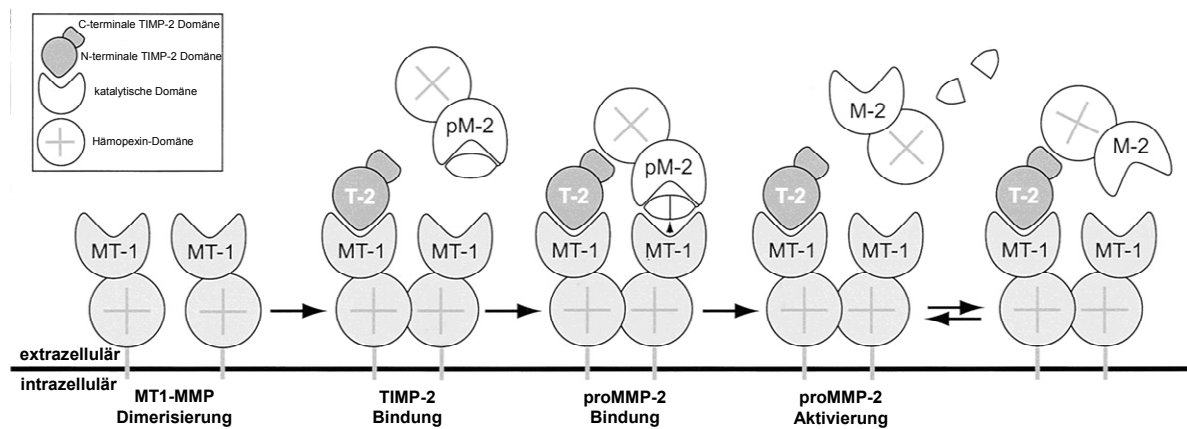


Abbildung 5: Modell der proMMP-2-Aktivierung nach Komplexbildung mit MT1-MMP und TIMP-2. Über die Interaktion der Hämopexindomänen können MT1-MMP-Moleküle Dimere und Multimere an der Zelloberfläche bilden. Ein MT1-MMP bindet ein TIMP-2-Molekül, welches wiederum mit der Hämopexindomäne eines proMMP-2-Moleküls Wechselwirken kann. Das TIMP-2-freie MT1-MMP kann nun das Propeptid des proMMP-2-Moleküls abspalten. Es entsteht ein aktiviertes MMP-2-Molekül.

Nicht-proteolytische Aktivierung ist u.a. durch organische Quecksilberverbindungen wie APMA (4-Aminophenylquecksilberacetat – s. Kap. 3.2.1) möglich [116]. Zudem können niedrige pH-Werte sowie Temperaturerhöhungen zur Aktivierung führen [117, 118]. Teilweise Denaturierung bzw. daraus folgende Konformationsänderungen bewirken wahrscheinlich die Lösung der Cystein-Bindung der Prodomäne vom aktiven Zentrum (Cystein-switch).

1.2.2.3 Regulation der Aktivität (Inhibition)

MMPs und ihre Inhibitoren, die *Tissue Inhibitors of Matrix-Metalloproteinases* (TIMPs), bilden 1:1 Komplexe, die zu einer Hemmung der MMP-Aktivität führen. Die Balance beider Komponentengruppen ist somit entscheidend für das proteolytische Potential beim Ab- bzw. Umbau der extrazellulären Matrix. Bis heute konnten 4 Homologe identifiziert werden, die eine Molmasse von 21-28,5 kDa aufweisen [119]. TIMPs binden nicht kovalent an aktive oder auch inaktive MMPs. Der Komplex von TIMP-1 und der katalytischen Domäne von MMP-3 konnte bereits kristallisiert werden. Die kritischen Aminosäurenreste von TIMP-1, die an der MMP-Inhibition beteiligt sind, lassen sich in der Region der Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen an Position 1 und 70

lokalisieren. Die N-terminale Aminosäure interagiert direkt mit dem katalytischen Zink-Ion und verhindert so die Bindung des für die Katalyse notwendigen Wassermoleküls. Die ersten fünf Aminosäuren des N-Terminus von TIMP-1 binden an das aktive Zentrum der MMPs und verhindern so die Substratbindung. Ähnliches wurde auch für die Bindung und damit die Hemmung von MMPs durch TIMP-2 gezeigt [120].

Werden TIMP-1 und -2 bevorzugt in der (fibrotischen) Leber exprimiert, ist TIMP-3 bevorzugt in Niere, Lunge sowie Gehirn [121] und nur teilweise in zirrhotischem Lebergewebe lokalisiert [122]. TIMP-4 wurde bisher nur im Herzmuskel lokalisiert und scheint keine physiologische Relevanz in der Leber zu besitzen [123]. In der Gruppe der unspezifischen Inhibitoren kommt dem im Serum vorkommenden α_2 -Makroglobulin die größte Rolle zu [124].

1.2.2.4 (Leber-)fibrose-Assoziation der Matrix-Metalloproteinasen

Der Fibrogeneseprozess ist durch eine Inbalance des MMP-TIMP-Gleichgewichtes charakterisiert und der daraus resultierenden, vermehrten Netto-Bindegewebsablagerung. Durch die (pathologische) Aktivierung der hepatischen Sternzellen werden insbesondere die MMPs -1, -2, -3, -13 und -14 hochreguliert [125-129]. Gleichzeitig erfolgt aber auch die Hochregulation von TIMP-1 und -2, wobei TIMP-1 im frühen- und TIMP-2 eher im fortgeschrittenen Stadium der Fibrose/Zirrhose exprimiert wird [73, 126, 130].

Neben den enzymatischen „Grund“-funktionen kommen den MMPs und den TIMPs noch weitere Funktionen zu. Die hepatische Sternzelle wird als Zielzelle der Wirkung von TIMP-1 als indirekten Überlebensfaktor und MMP-2 als Wachstumsfaktor beschrieben [129].

1.2.2.5 Tumor-Assoziation der Matrix-Metalloproteinasen

Die Relevanz von Matrix-Metalloproteinasen für die Metastasierung von Tumoren *in vivo*, bzw. der Invasion *in vitro* wurde bereits vielfach nachgewiesen. Insbesondere die MMPs -2, -13 und -14 spielen dabei eine wichtige Rolle, was sich an erhöhter Invasion durch vermehrte Expression der MMPs zeigt [131-133]. In vielen *in vitro* MMP-Inhibitions- und -Aktivierungsstudien konnte die Bedeutung der MMPs für die Invasion von Liposarkomzellen [134], Glioblastomzellen [135] sowie Fibrosarkomzellen [136-138] gezeigt werden. Bei der HT1080-Zelllinie trug insbesondere aktiviertes MMP-2 zur

gesteigerten Invasivität bei [139]. Dieser Umstand wird auch in Versuchen in dieser Dissertation genutzt, um MMP-2-spezifische Effekte zu untersuchen.

1.3 Die Leber

1.3.1 Funktion und Struktur der Leber

Im Darm resorbierte Nährstoffe gelangen über die Pfortader in die Leber. Im Rahmen der Biotransformation wirkt die Leber als „Entgiftungsorgan“ für endogene (z.B. Steroide) sowie exogene (z.B. Alkohol, Pharmaka) Substanzen. Diese werden in eine körperversfügbare oder eine ausscheidungsfähige Form gebracht. So wird z.B. Glukose in die Speicherform Glykogen überführt und gespeichert.

Die Leber besteht aus Leberläppchen (**Abb. 6**). In diesen sind Hepatozyten in Zellballen um die Zentralvene angeordnet. Zwischen den Leberzellbalken verlaufen kleinere Blutgefäße, die Sinusoide. Sie besitzen einen Durchmesser von ca. 4-15 μm . Durch sie sind die Hepatozyten in der Regel von mindestens zwei Seiten von Blutgefäßen umströmt, was den Stoffaustausch optimiert. Die Wände der Sinusoide weisen im Gegensatz zu sonstigen Blutgefäßen keine Basalmembran auf. Stattdessen bestehen sie aus einem einschichtigen Endothel aus Endothel- und Kupfferzellen mit zahlreichen Lücken und Öffnungen. So kann das Plasma des Pfortaderblutes aus dem Kapillarbett in den perisinusoidalen Raum (auch Dissé-Raum) austreten. Proteine und Elektrolyte kommen in Kontakt mit den Hepatozyten, während die Blutzellen innerhalb der Sinusoide verbleiben. Die an den Dissé-Raum angrenzenden Hepatozyten besitzen zahlreiche in den Raum ragende Mikrovilli, die durch eine 5- bis 6fache Oberflächenvergrößerung einen besseren Stoffaustausch ermöglichen [140]. Die Kupfferzellen (Lebermakrophagen) übernehmen eine Schutzfunktion und nehmen Zellbruchstücke, Bakterien und Fremdkörper auf. Der 0,5–2 μm breite Dissé-Raum enthält auch vereinzelt hepatische Sternzellen, die Haupt-Fibrogenesezelle.

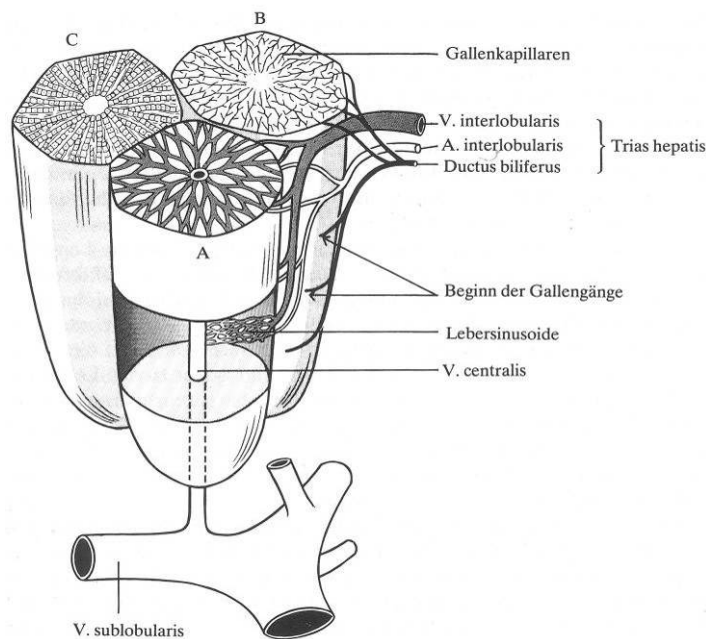


Abbildung 6: Aufbau der Leber [141].
Hauptelemente der Blutzirkulation. A = Pfortadersystem und Lebersinusoide; B = Gallenkapillaren innerhalb eines Leberläppchens; C = Leberzellballen mit radiärer Grundstruktur.

1.3.2 Schädigung der Leber

Die Erkrankung der Leber ist das Resultat der Einwirkung einer Noxe, einem schädigendem Faktor. Nach nur kurzer Exposition hat der Körper die Möglichkeit, den Schaden durch eine entsprechende Immunantwort zu beheben. Diese vermittelt einen Wundheilungsprozess, um geschädigtes Gewebe zu erneuern – im Unterschied zu einer wiederholten chronischen Schädigung, die eine übermäßige, pathologische Wundheilung bewirkt. Bekanntestes Beispiel einer Noxe ist der übermäßige Konsum von Alkohol. Ein weiteres Beispiel eines schädigenden Faktors ist das Hepatitis-C-Virus. Gelangt es in den menschlichen Körper, wandert es über das Blut in die Leber, nistet sich dort in den Leberzellen ein und vermehrt sich. Es kommt zu einer Leberentzündung, die in der Regel einen chronischen Verlauf nimmt, da das körpereigene Immunsystem der meisten Betroffenen nicht in der Lage ist, das Virus erfolgreich zu bekämpfen.

1.3.2.1 Fettleber

Durch langjährigen, übermäßigen Alkoholkonsum kann eine Leberverfettung entstehen (alkoholische Steatohepatitis – ASH). Im Rahmen des Alkoholabbaus findet eine vermehrte Biosynthese von Fettsäuren und Triacylglycerinen statt. Diese werden vermehrt in der Leber eingelagert. Von einer Fettleber spricht man, wenn mehr als 50% der Hepatozyten betroffen sind. Dieser Zustand ist über längerfristige Alkohol-Abstinenz noch umkehrbar [140]. Zudem gewinnt die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH),

die mit modernen „Zivilisationskrankheiten“ wie Diabetes und dem metabolischen Syndrom assoziiert ist, immer mehr an Bedeutung.

1.3.2.2 Leberfibrose

Bei einer persistierenden Noxe münden die oben geschilderten Krankheitsbilder in einer Leberfibrose. Es kommt zu einem Wundheilungsprozess bei dem aktivierte hepatische Sternzellen vermehrt fibrilläre Kollagene („Narbengewebe“) synthetisieren bzw. sezernieren. Die Leberfibrose ist das Resultat der Störung der Homöostase von Matrixsynthese und Matrixdegradation.

1.3.2.3 Leberzirrhose

Weiter anhaltende Schädigung führt zur Leberzirrhose. Während die Fibrose noch einen reversiblen Zustand darstellt, ist die Zirrhose als Endstufe in vielen Fällen irreversibel. Dabei führen die Bildung von Leberzellnekrosen und die Zerstörung der normalen Läppchenstruktur zur Leberinsuffizienz führt. Man unterscheidet zwischen dem *Grading* (Leberentzündungsprozesse) und *Staging* (Leberbindegewebssynthese) sowie ansteigenden Fibrotestadien. Der Zerfall der Leberstruktur führt in vielen Fällen zum Tod der betroffenen Patienten (1% der Todesfälle in Deutschland). Als effektive therapeutische Maßnahme bleibt bisher nur eine Lebertransplantation.

1.3.3 Hepatische Sternzellen

Hepatische Sternzellen (HSZ) sind die Hauptproduzenten der extrazellulären Matrix in der Leber. Sie liegen als Perizyten im an die Lebersinusoide angrenzenden Dissé-Raum vor (**Abb. 7**). Die physiologische Hauptaufgabe der HSZ besteht in der Akkumulation von Vitamin A (Retinoid) in den intrazellulären Fettvakuolen. In diesem quieszenten (nicht-angeregten) Zustand der HSZ liegt ein anderes Expressionsprofil gegenüber den aktivierten Zellen vor. Die Produktion Matrix-aufbauender Moleküle (u.a. Kollagen IV) und Matrix-abbauender Proteasen befindet sich in einem physiologischen Gleichgewicht. In Bereichen lokaler oder diffuser Zellschädigung gehen die HSZ aus dem quieszenten in einen aktivierten Zustand über. Ähnlich einer Wundvernarbung werden die aktivierten HSZ dazu angeregt, verstärkt Komponenten der EZM zu synthetisieren und zu sezernieren (**Abb. 7, 8**).

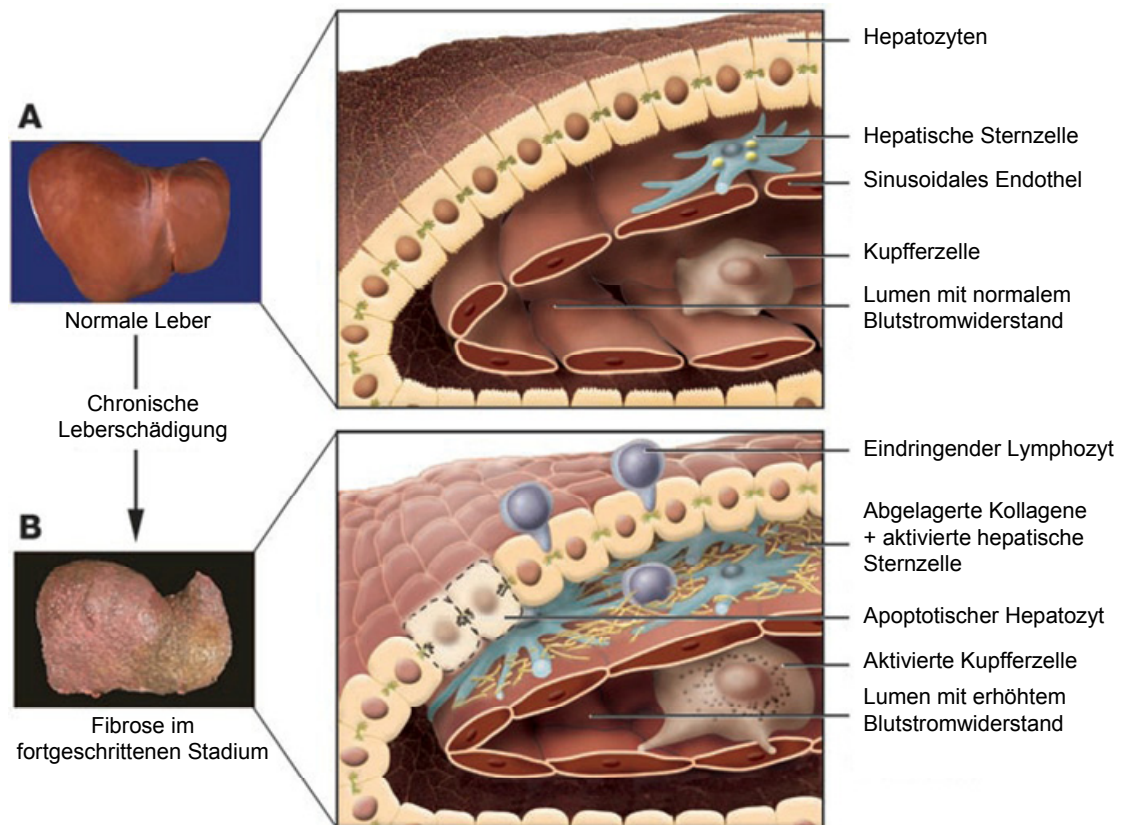


Abbildung 7: Pathologische Vorgänge in der Leber auf Zellebene. (A) Im normalen Zustand liegt die hepatische Sternzelle im quieszenten Zustand vor. Die Hepatozyten besitzen Mikrovilli für den Stoffaustausch. Der Blutstrom kann die Sinusoide ungehindert durchströmen. (B) Bei erkrankter Leber werden die quieszenten HSZ aktiviert. Sie transdifferenzieren zu Myofibroblasten und produzieren vermehrt Bindegewebe sowie Wachstumsfaktoren und Chemokine. Es kommt zu einer Entzündungsreaktion, in Folge dessen Hepatozyten die Mikrovilli verlieren und teilw. absterben. Die vermehrten Kollagenablagerungen, sowie der Rückgang der Endothelfenestrierung führen zu einem erhöhten Blutstromwiderstand, der Stoffaustausch ist gestört [142].

Während der Transformation durchlaufen die Zellen zunächst eine Initialphase, in der sie besonders empfänglich für Wachstumsfaktoren und andere Stimulantien (Zytokine, Mediatoren) sind (**Abb. 8**). Eine Ursache für die Auslösung der Initialphase sind erkrankte Hepatozyten und benachbarte Endothel- sowie Kupferzellen. Auch aktivierte bzw. angelockte T-Zellen können zur HSZ-Aktivierung beitragen. Neben reaktiven Sauerstoffradikalen setzen diese Zelltypen auch TGF- β , TNF- α , Endothelin-1, PDGF, IL-6 oder IFN- γ frei. Die dadurch bewirkte HSZ-Aktivierung führt zu verstärkter Proliferation und Kollagensynthese [142]. Die vermehrte Zytokin-Synthese der aktivierten HSZ (**Abb. 8**) führt auto-/parakrin zu weiterer HSZ-Aktivierung. Solche aktivierten mesenchymalen Zellen, welche einen Überschuss Matrixproteine (Kollagene und andere Makromoleküle) synthetisieren, aber zu wenig an Matrix-abbauenden

Proteasen (MMPs) sezernieren bzw. verstärkt TIMPs synthetisieren, sind Ansatzpunkt potentieller anti-fibrotischer Therapien [142, 143].

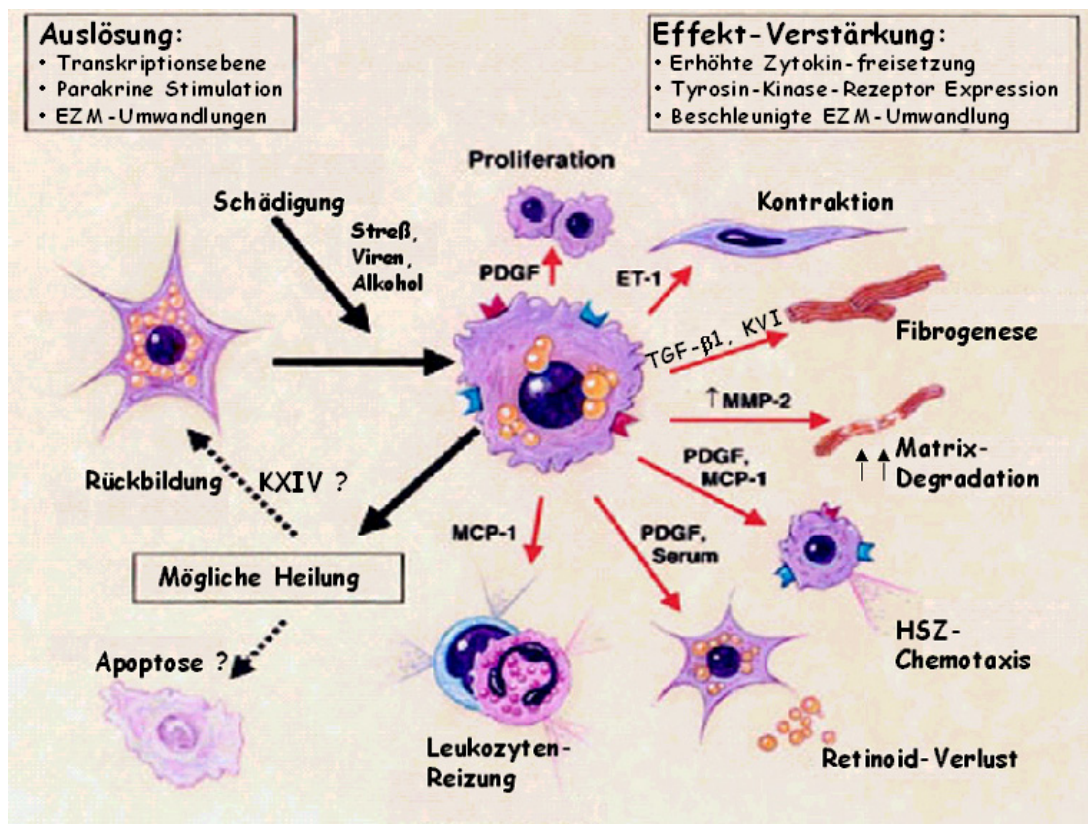


Abbildung 8: Der Prozess der Aktivierung und die Funktion von aktivierten HSZ während einer Lebererkrankung bzw. dessen Heilung. Aufgrund einer Erkrankung gehen die quieszenten HSZ (links, sternförmig) in die aktivierte Myofibroblasten-Form (Mitte) über. Je nachdem welche Modulatoren (rote Pfeile) zur Stimulation zur Verfügung stehen, neigen die gebildeten Myofibroblasten zur Proliferation, Fibrogenese, zum Matrixabbau, Retinoidverlust, und zur chemischen Reizung (Anlockung) von Leukozyten (WBC) und anderen HSZ. Eine mögliche Zurückbildung aktivierter HSZ im Rahmen der Heilung der Leberfibrose („resolution“) ist aktueller Gegenstand der Forschung [144, 145].

1.3.4 Ansätze anti-fibrotischer Therapien

Die Pathogenese der Leberfibrose wird primär durch die hepatische Sternzelle bestimmt. Mögliche anti-fibrotische Therapieansätze zielen demnach auf die Beeinflussung der HSZ direkt, bzw. auf die von geschädigten HSZ ausgehenden Mediatoren.

Grundsätzlich existieren derzeit sechs therapeutische Ansatzpunkte [142]:

- Behandlung der primären Erkrankung, mit dem Ziel, eine Perpetuierung der Fibrose zu supprimieren. Im einfachsten Fall ist dies die Alkohol-Abstinenz, aber

auch der Einsatz antiviraler Therapeutika im Fall von viraler Hepatitis oder der Einsatz von Chelatoren bei der sog. Wilson-Erkrankung, einer Stoffwechselkrankheit der Leber, bei der die Ausscheidung von Kupfer aus dem Körper gestört ist.

- b) Unterbindung der hepatischen Entzündungsreaktion, zur Prävention der HSZ-Aktivierung. Die Applikation von entzündungshemmenden Substanzen wie Colchizin oder Malotilat zeigten erste viel versprechende Resultate. Aber auch die Antagonisierung von pro-inflammatorischen Zytokinen zeigte gute Effekte. Hier haben sich z.B. die Behandlung mit IL-10 oder die Inhibition von TNF- α bewährt.
- c) Antioxidantien, zur Inhibition der HSZ-Aktivierung. Einsatz von Vitamin E, Silymarin oder Gluthathion zeigten gute Resultate. Neben den Antioxidantien gilt auch der Einsatz von Interferon- γ (Hepatitis C), HGF oder Trichostatin A als viel versprechend.
- d) Inhibierung / Schwächung auto- und parakriner Prozesse durch aktivierte HSZ. Hier zeigte die Inhibierung von mitogenen und pro-fibrogenen Zytokinen (PDGF- α , TGF- β) erste Erfolge. Durch Manipulation des Gleichgewichts von Endothelin und NO konnte der portalen Hypertension, als wichtiger Fibroestimulus entgegengewirkt werden. Zudem konnte eine vermehrte Kollagensynthese durch Inhibition des Renin-Angiotensin-Systems unterbunden werden.
- e) Modulierung der Degradation von fibrotischer Neomatrix. Dieser Punkt weist insofern hohe klinische Relevanz auf, da Patienten meist erst mit fortgeschrittenem Fibrose-Stadium behandelt werden. Entscheidend ist die Manipulation des Gleichgewichts von MMPs und TIMPs. Dies kann durch Inhibierung der TIMP-Expression oder der Induktion der MMP-Expression erfolgen. Ein weiterer Ansatzpunkt ist die mögliche Freisetzung, bzw. Aktivierung Matrix-assoziiertes MMPs durch synthetische Kollagenmimetika. Letzterer Punkt ist zentraler Gegenstand dieser Arbeit.
- f) Stimulierung der HSZ-Apoptose. Idee ist, die schädigenden (Matrix-produzierenden) aktivierten HSZ aus dem Organismus zu entfernen. Dies kann durch Aktivierung der Caspase-Signaltransduktionswege geschehen. Entweder extrazellulär durch Stimulierung der „Todes“-Rezeptoren (Fas, TNF- α) oder intrazellulär ebenfalls durch Caspase-Aktivierung (z.B. durch Adenoviren).