

3 Material und Methoden

3.1 Material

Die verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Lösungsmittel waren von der höchsten erhältlichen Reinheitsstufe. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien und Reagenzien von der Firma Sigma (Seelze, Deutschland) bzw. Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Demineralisiertes Wasser zum Ansetzen der Pufferlösungen wurde mit einer Ionenaustauscheranlage gewonnen (Millipore, Schwalbach, Deutschland).

3.1.1 Chemikalien

EDC (Ethylpropylcarbodiimid)	Biacore AB, Uppsala, Schweden
Ethanolamin	Biacore AB, Uppsala, Schweden
Guanidin-HCl	Serva, Heidelberg, Deutschland
NHS (N-Hydroxysuccinimid)	Biacore AB, Uppsala, Schweden
Rinder-Serum-Albumin (BSA)	Dade Behring, Marburg, Deutschland

3.1.2 Puffer

Acetatpuffer	10 mM, Natriumacetat/Essigsäure pH 4,8
Ammoniumhydrogencarbonatpuffer	50 mM NH_4HCO_3 in demineralisiertem H_2O
Boratpuffer	30 mM Borsäure pH 8,6
Guanidiniumpuffer	6 M Guanidin-HCl, 500 mM Tris pH 8,6, 10 mM EDTA, 2 M NaCl
HBS-EP	Biacore - 10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% Surfactant P20, sterilfiltriert und entgast (Biacore AB, Uppsala, Schweden)
Zymographie-Probenpuffer	Biorad, München, Deutschland

3.1.2.1 In den Bindungsstudien verwendete Puffer

In den Versuchen kamen unterschiedliche Puffersysteme zum Einsatz. **Tab. 2** zeigt die verwendeten Puffer und beschreibt die jeweiligen Besonderheiten.

Tabelle 2: Übersicht der in den Bindungsstudien und Aktivitäts-Assays verwendeten Puffer

Puffer	verwendeter Assay	Pufferrezept	Besonderheit
PBS-Puffer	Festphasenbindungs-Assay (Kap. 3.3.2), Biacore (Kap. 3.3.1)	8000 mg/L NaCl, 200 mg/L KCl, 1150 mg/L Na ₂ HPO ₄ , 200 mg/L KH ₂ PO ₄ , 0,05% Tween20, pH 7,2	Enthält keine divalenten Kationen wie Ca ²⁺ und Mg ²⁺ . Ermöglicht deshalb keine MMP-Aktivität.
Tris-Puffer	Biacore (Kap. 3.3.1), Aktivitäts-Assays (Kap. 3.4), <i>in situ</i> Bindungsversuche (Kap. 3.3.3)	50 mM Tris-HCl pH 7,4, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl ₂ , 0,05% Brij-35, sterilfiltriert	Enthält divalente Kationen und ermöglicht so MMP-Aktivität; kommt physiologischen Bedingungen am nächsten
Tris-Puffer + Ro28-2653	Biacore (Kap. 3.3.1.6)	50 mM Tris-HCl pH 7,4, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl ₂ , 0,05% Brij-35, sterilfiltriert + 2 µM Ro28-2653	Enthält den MMP-2 Inhibitor Ro28-2653; keine enzymatische Aktivität

3.1.3 Spezielle Verbindungen

Bolton Hunter Reagenz (2200 Ci/mmol)	(N-succinimidyl-3-(4-hydroxy-3-[¹²⁵ I]-iodophenyl)propionate) DuPont NEN, Boston MA, USA
[6- ³ H]-Thymidin (5 Ci/mmol)	GE Healthcare, Little Chalfont, UK

Kollagen I wurde aus humaner Plazenta nach Verdau mit Pepsin selbst isoliert und durch wiederholte Salzfraktionierung, Ionenaustausch- und Molekularsieb-Chromatographie gereinigt. Die Bestimmung der Reinheit erfolgte mittels Gelelektrophorese, Radioimmunoassays und Western Blots.

Tripelhelikale Kollagen VI-Fragmente - KVI-F wurden nach Pepsinabbau durch fraktionierte Salzfällungen aus humanen Plazenten gewonnen.

Das **Kollagen VI-Kettengemisch – KVI r,a** wurde durch **R**eduktion und **A**lkylierung der tripelhelikalen Kollagen VI-Domänen hergestellt. Das entstandene Kettengemisch wurde nach einer Dialyse gegen 0,15 M HOAc gefriergetrocknet (Kap. 3.2.3).

Der tripelhelikale Abschnitt der **α 2-Kette** von Kollagen VI (**α 2(VI)**) wurde aus dem Kettengemisch durch FPLC über eine Hydroxyapatitsäule gewonnen. Nach der Dialyse wurde die Kette durch Gefriertrocknung als reines Protein erhalten (Kap. 3.2.3).

(GPO)₁₀, ein synthetisches, tripelhelikales Kollagenmimetikum mit der Aminosäuresequenz [H-Gly-Cys-Hyp-(Gly-Pro-Hyp)₁₀-Gly-Cys-Hyp-Gly-NH₂]₃ ; M = 12,06 kD wurde wie auch das lineare, synthetische „Kontrollpeptid“ **GAP** (AS-Sequenz: H-Gly-Ala-Cys(Gly-Ala-Pro)₅-Gly-Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg-(Gly-Ala-Pro)₅-NH₂ ; M = 4,08 kD von *R. Farndale* von der Univ. of Cambridge, Dep. Biochemistry bezogen (β = 1 mg/ml gelöst in 150 mM HOAc). Die spontane Tripelhelixausbildung wurde polarimetrisch demonstriert. Bei 5 mg/ml betrug die Denaturierungstemperatur 82,3 \pm 1,4°C für (GPO)₁₀. GAP wies auch bei 5°C keine tripelhelikale Struktur auf. Die Stammlösungen wurden bei -80°C gelagert.

Die Matrix-Metalloproteinasen wurden jeweils als inaktive Proformen bezogen und bei Bedarf aktiviert (Kap. 3.2.1). Sie lagen als gelöste Form in Tris-Puffer mit Zusatz von 0,05% NaN₃ (Natriumazid) vor.

MMP-1	Biotrend, Köln, Deutschland
MMP-2	Invitek, Berlin, Deutschland
MMP-3	Biotrend, Köln, Deutschland
MMP-8	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
MMP-9	Invitek, Berlin, Deutschland
MMP-13	Invitek, Berlin, Deutschland
MMP-13 katalytische Domäne (kMMP-13)	Invitek, Berlin, Deutschland
MMP-2 Fluoreszenz-Substrat	Bachem, Weil am Rhein, Deutschland - (7-Methoxycoumarin-4-yl)-Acetyl-Pro-Leu-Gly-Leu-(3-[2,4-dinitrophenyl]-L-2,3-diaminopropionyl)-Ala-Arg-NH ₂ , <u>Abk.</u> : Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH ₂ bzw. MCA

MMP-8 Fluoreszenz-Substrat	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland - DNP-Pro-Leu-Ala-Tyr-Trp-Ala-Arg-OH
MMP-13 Fluoreszenz-Substrat	Anaspec, San Jose CA, USA MCA-Pro- <u>Cha</u> -Gly- <u>Nva</u> -His-Ala- <u>Dpa</u> -NH ₂
FluoroLink™ MAb Cy2 Marker-Kit	GE Healthcare, München, Deutschland
GM6001 (Ilomastat)	Chemicon, Temecula CA, USA
Ro28-2653 (MMP-Inhibitor)	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland; zur Verfügung gestellt von H.W. Krell
Typ I Kollagenase Assay	Chemicon, Temecula CA, USA
QCM™ 96-Well Cell Invasion Assay	Chemicon, Temecula CA, USA

3.1.4 Zelllinien

CFSC	Halbaktivierte hepatische Sternzellen; adhärentes Wachstum; Spezies: Ratte [146]
HT1080-Zellen	Humane Fibrosarkomzellen; adhärentes Wachstum; ATCC #CCL-121 [147]

3.1.5 Lösungen für die Zellkultur

- L-Ascorbinsäure 50 mg/L (Firma: Sigma, Seelze, Deutschland)
- Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) mit Glutamax-I (862 mg/L L-Alanyl-Glutamin), 4,5 g/L (25 mM) Glukose, 110 mg/L Natriumpyruvat (Firma: Gibco, Karlsruhe, Deutschland) → Für die Zellkultur werden zu 442,5 mL Medium 50 ml FKS (Endkonzentration: 10%, hitzeinaktiviert), 2,5 ml der L-Ascorbinsäure-Lösung und 5 mL Penicillin/Streptomycin zugefügt.
- Einfriermedium für Zellkulturen: 50% DMEM, 45% DMSO, 5% FKS
- Fötale Kälberserum (FKS) – hitzeinaktiviert - (Firma: Gibco, Karlsruhe, Deutschland)
- Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS), steril, ohne Mg²⁺/Ca²⁺, pH 7,2 (Firma: Biochrom, Berlin, Deutschland) (8000 mg/L NaCl, 200 mg/L KCl, 1150 mg/L Na₂HPO₄, 200 mg/L KH₂PO₄)
- Penicillin/Streptomycin (10 mg/ml) Biochrom, Berlin, Deutschland
- Trypanblau Biochrom, Berlin, Deutschland
- Trypsin/EDTA (0,05/0,02%) Biochrom, Berlin, Deutschland

3.1.6 Gerätschaften

96-Loch Mikrotiterplatten	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
BIAcore® X	Biacore AB, Uppsala, Schweden
BioMax MS Film,	Kodak, Stuttgart, Deutschland
BioMax Filmkassette	Kodak, Stuttgart, Deutschland
CM5-Sensorchip	Biacore AB, Uppsala, Schweden
Combitips	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Deckgläser 24x32 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
ELISA-Reader	Dynatech, Burlington, USA
Fluoreszenz-Mikroskop	Olympus, Hamburg, Deutschland
FPLC	GE Healthcare, München, Deutschland
Gefriertrocknungsanlage	Christ, Osterode, Deutschland
Glasfaser-Filtermatte	LKB Wallac, Turku, Finnland
Kryostat	Leica, Solms, Deutschland
Lichtmikroskop	Zeiss, Jena, Deutschland
Membranfiltereinheit (0,22 µm)	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Multipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Objektträger	Vogel, Gießen, Deutschland
PD 10-Säule	GE Healthcare, München, Deutschland
pH-Meter	Knick, Berlin, Deutschland
Pipetten & -spitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Polystyren Mikrotiterplatten (Immulon 2HB removawell strips)	Dynex Technologies, Chantilly VA, USA
Protean II Minigel System	Biorad, München, Deutschland
Scanner "Studio Scan II si"	Agfa, Köln, Deutschland
SpectraMax Gemini XS (Fluoreszenz-Reader)	Molecular Devices, Sunnyvale CA, USA
Szintillationswachs	PerkinElmer, Rodgau, Deutschland
Schwarze 96-Loch Mikrotiterplatten	Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA
Szintillationsmessgerät 1450-Microbeta	PerkinElmer, Rodgau, Deutschland
Zählkammer nach Neubauer	Brand, Wertheim, Deutschland
Zell-Harvester	PerkinElmer, Rodgau, Deutschland

Zellkulturflaschen (75 cm ²)	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Zentrifuge Minifuge RF	Heraeus
Zymographie-SDS-Gelatine-Gel	Biorad, München, Deutschland
Zymographie-SDS-Casein-Gel	Biorad, München, Deutschland

3.2 Methoden

3.2.1 Aktivierung der Matrix-Metalloproteinasen

Da die Matrix-Metalloproteinasen meist nur als inaktive Proform (Zymogene) vertrieben werden, erfordern Studien mit aktiven Enzymen die Aktivierung der MMPs. Dies kann meist mit Aminophenylquecksiberacetat (APMA) erfolgen.

proMMP-1-Aktivierung

52,3 µL (36,9 pM) proMMP-1 wurden mit 2,8 µL einer 40 mM APMA-Lösung ($C_{APMA}=2$ mM/L) im Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt und für 1 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Das aktivierte MMP-1 wurde aliquotiert bei -80°C gelagert. Die Aktivität wurde per SDS-Gel-Zymographie untersucht (Kap. 3.2.2).

proMMP-2 Aktivierung

Zur Aktivierung der MMP-2 Proform (M = 72 kDa) in die aktivierte Form (M = 62 kDa) wurden 2 µg / 10 µL (27,8 nM) proMMP-2 mit 29 µL Tris-Puffer sowie 1 µL 40 mM APMA (gelöst in DMSO) im Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt. Nach 1 h Inkubation bei 37°C im Wasserbad wurde das aktivierte MMP-2 aliquotiert bei -80°C eingefroren und aufbewahrt.

Für den Einsatz von MMP-2 *in vitro* wurde das Protokoll aufgrund des sonst stark zelltoxisch wirkenden APMA modifiziert. 9 µL (25,0 nM) proMMP-2 wurden mit 1 µL 0,5 mM APMA (verdünnt mit DMSO) im Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt. Die Inkubationszeit bei 37° im Wasserbad wurde auf 2,5 h verlängert.

proMMP-3 Aktivierung

4,8 µL (26,6 pM) proMMP-3 wurden mit 0,3 µL einer 40 mM APMA-Lösung ($C_{APMA}=20$ mM/L) im Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt und für 4,5 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde das aktivierte MMP-3 aliquotiert bei -80°C gelagert.

proMMP-8 Aktivierung

52,3 μL (18,1 μM) proMMP-8 wurden mit 0,5 μL einer 40 mM APMA-Lösung ($C_{\text{APMA}} = 5,5 \text{ mM/L}$) und 10 μL Tris-Puffer im Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt und für 1 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde das aktivierte MMP-8 aliquotiert bei -80°C gelagert.

proMMP-9 Aktivierung

2 μg / 10 μL (21,7 nM) proMMP-9 (M = 92 kDa) wurden mit 80 μL Tris-Puffer sowie 20 μL TPCK-Trypsin (0,5 mg / mL) gemischt. Nach 20 min Inkubation bei 37°C im Wasserbad wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 μL Aprotinin (1 mg / mL) und weiteren 10 min Reaktionszeit gestoppt. Das aktivierte MMP-9 (M = 86 kDa) wurde aliquotiert und bei -80°C eingefroren und aufbewahrt.

proMMP-13 Aktivierung

19,5 μL (65 μM) proMMP-13 wurden mit 0,5 μL einer 40 mM APMA-Lösung ($C_{\text{APMA}} = 5,5 \text{ mM/L}$) im Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt und für 1,5 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde das aktivierte MMP-13 aliquotiert bei -80°C gelagert.

Die erfolgreiche Aktivierung aller MMPs wurde mittels SDS-Gel-Zymographie überprüft.

3.2.2 SDS-Gel-Zymographie

Die Abspaltung der Prodomäne der MMPs resultiert in einer geringeren Molmasse, welche durch erhöhte Mobilität im Gel dargestellt wird. Die Pro- sowie die aktivierte Form der MMPs können mittels Gel-Zymographie dargestellt werden (**Abb. 9**).

Jeweils ca. 4 ng der MMPs, verdünnt in physiologischem Aktivierungs- bzw. Probenpuffer wurden auf 10%ige Gelatine-haltige (MMP-2/-9) bzw. 12%ige Casein-haltige (MMP-1/-3/-8/-13) Polyacrylamidgele (Biorad) aufgetragen und für ca. 1,5 h bei 180 V elektrophoretisch aufgetrennt. Um das denaturierende SDS aus dem Gel zu entfernen und das Enzym zu entfalten, wurde das Gel anschließend 15 min auf einem Laborschüttler mit PBS (+ 2,5% Triton X-100) gewaschen. Dabei wurde die Waschlösung dreimal ersetzt. Das Gel mit den aufgetrennten MMPs wurde anschließend für ca. 15 h (Gelatinegel) bzw. 48 h (Caseingel) in Tris-Puffer bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die im Puffer enthaltenen Ca^{2+} -Ionen ermöglichen die Aktivierung

bzw. die enzymatische Aktivität sowohl der Pro- als auch der aktivierten MMPs. Die im Gel vorhandene Gelatine bzw. das Casein wird auf der durch die Elektrophorese festgelegten Höhe der MMP-Formen abgebaut (verdaut), wobei auch die Proform nach Autoaktivierung das Substrat umsetzt. Die im Gel vorhandene intakte Gelatine bzw. das Casein wurde nun mit Coomassie-Brillantblau (0,5% in 40% Methanol, 10% Essigsäure) 30 min auf dem Schüttler gefärbt und viermal für insgesamt ca. 30 min mit Entfärbelösung (40% Methanol und 10% Essigsäure) gewaschen, bis sich die MMPs als weiße Banden gegen den blauen Hintergrund des Gels abzeichneten. Zur Dokumentation wurden die Gele zwischen zwei Kopierfolien eingescannt und nach digitaler Bildbearbeitung als invertiertes Bild gespeichert. Durch Vergleich mit Standards der pro- und aktivierten MMPs können die erhaltenen Bandenmuster den jeweiligen Pro- und aktivierten Formen zugeordnet werden. So können die oben beschriebenen Aktivierungsvorgänge sowohl qualitativ als auch quantitativ kontrolliert werden. In **Abb. 9** sind exemplarisch einige erhaltene Bandenmuster dargestellt.

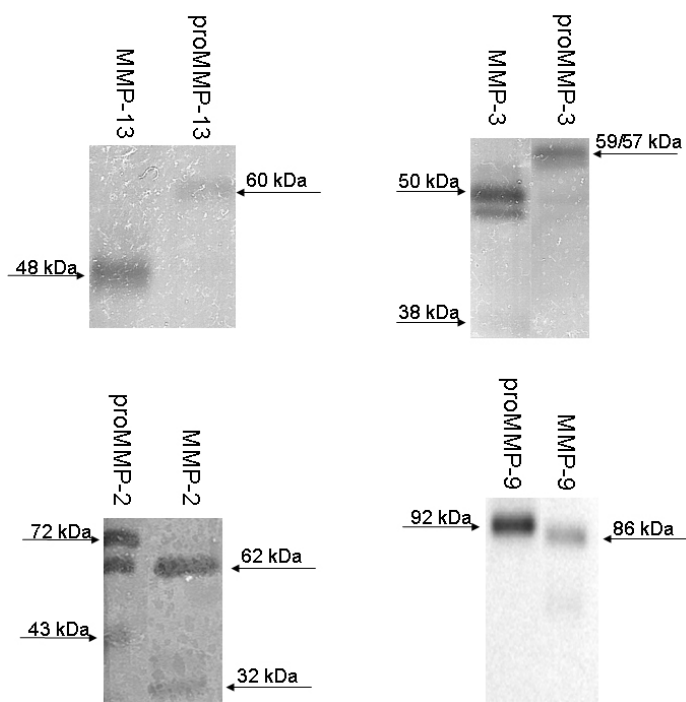


Abbildung 9: Bandenmuster einiger Gelatine/Casein-Zymographie-Gele vor und nach Aktivierung der MMPs.

Die Proformen sowie die aktivierten MMPs wurden in Gelatine-/Casein-haltigen SDS-PAGE-Gele aufgetrennt. Nach Inkubation der Gele in Tris-Puffer wurden die durch MMP-Aktivität entstandenen Banden durch negativ-Coomassie Färbung visualisiert und die Gele zur Dokumentation eingescannt. Aktivierte MMPs zeigen Banden höherer Mobilität. So weist proMMP-2 eine Molmasse von 72 kDa auf. Nach Abspaltung der Prodomäne liegt sie bei 62 kDa.

3.2.3 Isolierung der Kollagen VI α 2-Kette

Zunächst wurde das tripelhelikale Kollagen VI-Fragment (KVI-F) mittels Pepsinabbau nach in der Arbeitsgruppe etablierten Protokollen gewonnen [148, 149]. Anschließend wurde aus dem tripelhelikalen KVI-F das Kettengemisch KVI r,a gewonnen. Eine

erneute Kettenverknüpfung wird durch eine Reduktion mit anschließender Alkylierung (r,a) verhindert. Dazu wurden 4 mg/ml des KVI-F in Guanidiniumpuffer gelöst und 5 min mit N₂ begast. Durch Zugabe von 4 mg DTT und 2 h Inkubation bei 37°C wurde das KVI-F reduziert. Nun wurden 40 µl einer wässrigen 1,5 molaren Iodacetamid-Lösung zugegeben und die Lösung 30 min bei Raumtemperatur (20°C) abgedunkelt geschüttelt. Nach Zugabe von 40 µl 2-Mercaptoethanol zur Eliminierung möglicher noch bestehender Kettenverknüpfungen wurde die KVI r,a-Lösung gegen 0,05 M HOAc dialysiert.

Der tripelhelikale Abschnitt der α_2 (VI)-Kette konnte aus dem durch Reduktion und Alkylierung erhaltenen KVI r,a-Kettengemisch mittels FPLC über eine Hydroxyapatitsäule gewonnen werden. Das reduziert/alkylierte KVI r,a-Kettengemisch wurde auf eine Hydroxyapatitsäule (Biorad, Econo-Pac CHT-II) gegeben und mittels eines Natriumhydrogenphosphat-puffergradienten (0,2–1,0 mM) eine Isolierung der α_2 (VI)-Kette erreicht (die α_2 (VI)-Kette eluiert in den ersten Fraktionen, während das α_1 , α_3 (VI)-Kettengemisch zum Ende des Gradienten eluiert und gegebenenfalls über eine Anionenaustauscherchromatographie getrennt werden kann).

Nach einer Dialyse gegen 0,15 M HOAc, Gefriertrocknung und anschließender Resolvatisierung in 0,15 M HOAc (1 mg/ml) wurde die Ketten-Isolierung per SDS-PAGE überprüft. **Abb. 10** zeigt das erhaltene Bandenmuster der α_2 (VI)-Isolierung im Vergleich mit einem reduzierten Kollagen VI-Standard.

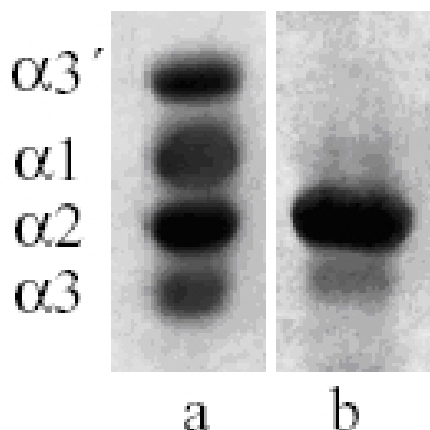


Abbildung 10: **SDS-PAGE-Analyse der α_2 (VI)-Kettenisolierung.** Im Vergleich zu (a) einem reduziertem Kollagen VI-Standard, welcher alle KVI-Ketten zeigt, ist in (b) zu über 90% die α_2 (VI)-Kette enthalten.

3.2.4 Radioaktive Markierung der Matrix-Metalloproteinasen

Mit [¹²⁵I]-Bolton-Hunter- (N-succinimidyl-3-(4-hydroxy-3-[¹²⁵I]-iodo-phenyl)propionat) markierte Proteine können über den γ -Zerfall des Iods detektiert werden. Die MMPs werden dabei ähnlich der SPR-Technik, mittels NHS-Ester-Kopplungschemie (vgl. Kap.

3.3.1.5) mit einem Gammastrahlen-emittierenden Isotop ($[^{125}\text{I}]$) markiert. Dessen Halbwertszeit beträgt 13 Tage. Die Markierung des als „carrier-free“ also Fremdprotein-frei vorliegenden MMPs erfolgte nach etablierten Protokollen [24, 150].

Dazu wurden 50 μl des Bolton-Hunter-Reagenzes zu 10 μl der zu markierenden Matrix-Metalloproteinasen gegeben (0,33 mCi / Probe). Nach 45 min Inkubation bei 4°C erfolgte die Zugabe von 500 μl Glycinpuffer zu jeder Probe. Die Reaktion wird dadurch gestoppt, nichtgekoppeltes Bolton-Hunter-Reagenz wird neutralisiert.

Das $[^{125}\text{I}]$ -markierte MMP wurde anschließend über eine Gelfiltrationssäule (Sephacose G25; PD 10) mit PBS/0,05% Tween 20 als Laufpuffer abgetrennt. Von den erhaltenen Fraktionen wurden jeweils 2 μL im γ -Zähler vermessen. Die Fraktionen 5+6 (von 10) enthielten die markierten MMPs und wurden vereint. Es wurden Aktivitäten von 40-80.000 cpm / ng Protein erhalten. Die aliquotierten MMPs wurden bei -20°C maximal zwei Wochen aufbewahrt.

Der Anteil an proteingebundener Radioaktivität wurde mittels Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) bestimmt. 2 μl radioaktiv markiertes MMP wurden mit je 200 μl 1%iger BSA- und 20%iger TCA-Lösung 30 min bei 4°C inkubiert. Nach 5 min Zentrifugation bei ca. 500 x g wurden das erhaltene Pellet sowie der Überstand separat im γ -Zähler vermessen. Über 96% der gemessenen Radioaktivität waren in den präzipitierten MMPs gebunden. Die Reinheit der markierten MMPs wurde mittels Gelelektrophorese und anschließender Autoradiographie kontrolliert.

3.3 Bindungsstudien

Um die Kollagenbindungen der Matrix-Metalloproteinasen zu untersuchen, wurden unterschiedliche Methoden angewendet. Zum einen die sog. Oberflächen-Resonanz-Technik (Surface Plasmon Resonance – SPR) und zum anderen gängige Festphasenassays, d.h. Bindungen an kollagenbeschichtete Oberflächen in Mikrotiterplatten bzw. an Nitrozellulosemembranen.

Um der *in vivo*-Situation näher zu kommen, wurden zudem auch einige Bindungsversuche *in situ*, auf zirrhotischen Lebergewebsschnitten durchgeführt.

3.3.1 Surface Plasmon Resonance

Die Nutzung von Instrumenten, die auf optischen Biosensoren basieren, erlaubt die Untersuchung von biologischen Interaktionen, meist ohne die Moleküle in einem vorherigen Arbeitsschritt markieren zu müssen [151]. BIAcore®-Biosensoren messen biospezifische Interaktionen sowohl qualitativ als auch quantitativ in Echtzeit. Das Detektionsprinzip beruht auf der Surface Plasmon Resonance – SPR [152].

3.3.1.1 Messprinzip

Das BIAcore-System setzt sich zusammen aus einem miniaturisierten Flussinjektionssystem (IFC), das ein Arbeiten mit sehr kleinen Mengen erlaubt und einem integrierten optischen Sensor, der die Oberflächenplasmonenresonanz zur Detektion nutzt. SPR-Sensoren nutzen das quantenmechanische Phänomen der optischen Schwingungsanregung von Elektronen in dünnen Metallfilmen [152]. Durch die Wechselwirkung mit Photonen entstehen Schwingungen, sog. Plasmonen, die sich in der Metallschicht wellenförmig ausbreiten [153]. Der Sensorchip besteht aus einem Glasträger mit einem ca. 50 nm dünnen Goldfilm, an dessen Oberfläche meist eine Matrix aus carboxymethyliertem Dextran gekoppelt ist. Durch ein Prisma wird auf die Rückseite des Sensors polarisiertes Licht eingestrahlt und reflektiert. Über einen CCD-Sensor (charge coupled device) wird das Winkelspektrum des reflektierten Lichtes erfasst. Verbunden mit der optischen Schwingungsanregung ist eine elektromagnetische Welle, die nicht an der Phasengrenze aufhört, sondern als evaneszentes, d.h. exponentiell abnehmendes Feld, ca. 300 nm in die benachbarte Flusszelle hineinreicht. Auf der der Flusszelle zugewandten Sensorseite befindet sich die flexible Dextranmatrix, an die potentielle Bindungspartner kovalent gekoppelt werden. Diese werden als Liganden bezeichnet. Kommt es zu Veränderungen, durch Wechsel zu einem Puffer anderer optischer Dichte oder durch Anlagerung eines Moleküls, dem Analyten, an einen bereits immobilisierten Liganden, so ändert sich der Brechungsindex und damit der Winkel, unter dem die Resonanz stattfindet (**Abb. 11**) [154].

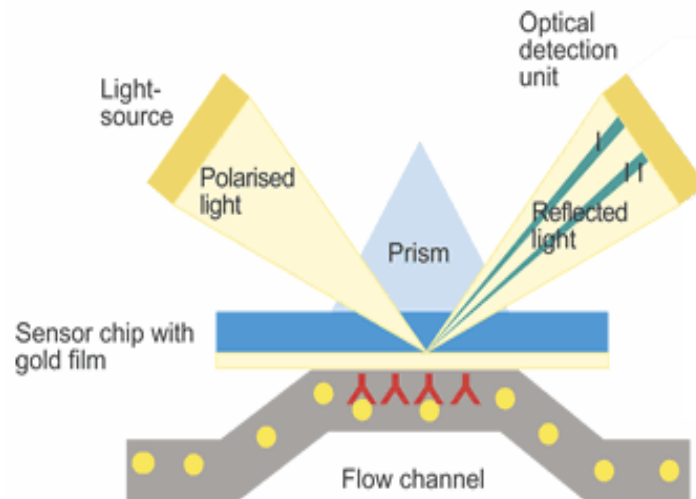


Abbildung 11: Detektions-/Funktionsprinzip der Surface Plasmon Resonance [155]. Auf dem Sensorchip kovalent gekoppelte Kollagene binden MMPs und bewirken eine Änderung des Brechungsindex und damit des Winkels, unter dem die Resonanz stattfindet. MMP-Assoziation und Winkeländerung sind dabei proportional. Die entsprechenden Bindungssignale werden als Kurvendiagramm in Echtzeit dargestellt.

Während der Messung wird der im Laufpuffer gelöste Analyt über den an den Sensor-Chip gekoppelten Liganden gegeben. Dabei kann es zu einer Bindung des Analyten an den Liganden kommen (Assoziation). Nach einiger Zeit stellt sich ein Gleichgewichtszustand zwischen assoziierenden und dissoziierenden Molekülen ein. Der Punkt an dem im Laufpuffer kein Analyt mehr gelöst ist (wechsel zu entsprechendem Puffer) markiert den Beginn der Dissoziationsphase. Man erhält ein Diagramm, in dem die Signalhöhe über der Zeit dargestellt ist (**Abb. 12**).

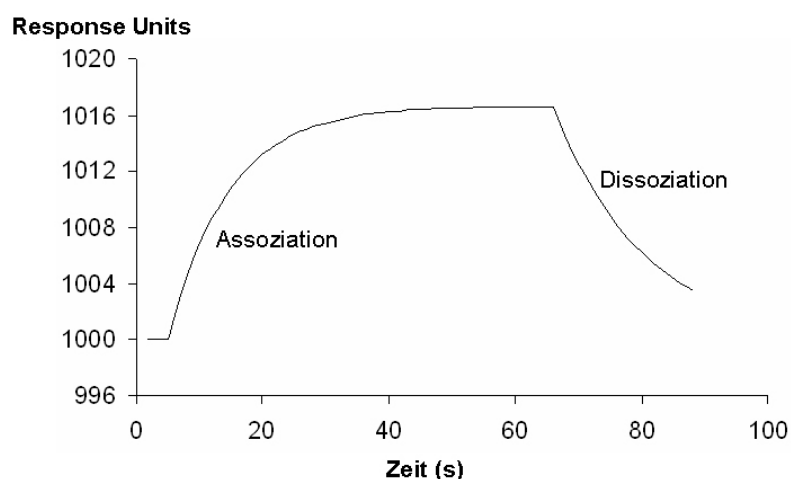


Abbildung 12: Typischer Verlauf eines Sensorgramms aus einer Biacore-Messung. Aufgetragen wird das Messsignal als Response Units (Bindungseinheiten – RU) über der Zeit. Es besteht aus einer Assoziationsphase, dem Sättigungsbereich, bzw. der Einstellung eines Gleichgewichtes, sowie der Dissoziationsphase.

Das Sensorsignal wird in Resonance-Units (RU) angegeben. Experimentelle Kalibrierungen mit radioaktiv markierten Proben haben gezeigt, dass eine Signalzunahme von 1000 RU, d.h. einer Änderung des Ausstrahlwinkels von $0,1^\circ$, einer Anlagerung von 1 ng/mm^2 Ligand entspricht [154, 156].

Nach Einlegen des CM5-Sensorchips wird automatisch eine optische Einheit auf die Sensoroberfläche des Chips gedrückt. Diese befindet sich auf der integrierten mikrofluidischen Einheit (*Integrated μ -Fluidic Cartridge*; IFC), die aus einer Reihe von Kanälen und Ventilen besteht, die die kontrollierte Führung der Probe über die zwei Flusszellen ermöglichen.

Vor jeder Messreihe wurden System, IFC und Flusszellen mit Laufpuffer gespült und die Dextranmatrix des Sensorchips über einen Zeitraum von ca. 10 min equilibriert. Die Proben wurden über eine Probenaufgabestation in eine „Proben-Schleife“ gespritzt und dann vom Laufpuffer über die Flusszellen gespült. Die Injektion erfolgte mit der „*bubble-Technik*“. Dabei wird mit der Pipette zunächst das Probenvolumen, anschließend $5 \mu\text{L}$ Luft, $5 \mu\text{L}$ Probe und wieder $5 \mu\text{L}$ Luft aufgezogen und in den Probenaufgabeblock injiziert. Die Luftblasen verhindern ein Vermischen der Probe mit dem Laufpuffer. Nach der Injektionsphase wurde der Ligand mit Verzögerung (*delayed wash*) von der Oberfläche gespült, um auch die Dissoziationsphase ohne Puffer-Artefakte im Signal zu untersuchen. Die Probe kann mittels der Ventile der IFC über Flusszelle 1 (Fc1) oder über Flusszelle 2 (Fc2) (*single flow path*) bzw. über beide Zellen in Reihe (*multi channel flow path*) geführt werden (**Abb. 13**).

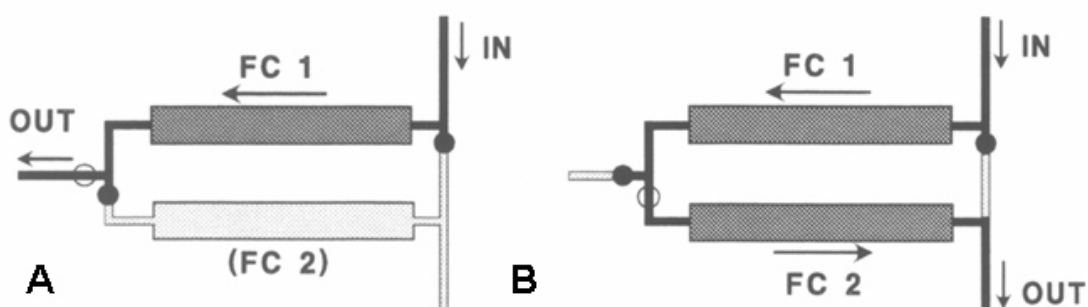


Abbildung 13: Mögliche Fließschemata über den Sensorchip: (A) *single flow path*: der Pufferstrom wird ausschließlich über eine Flusszelle geleitet; (B) *multi channel flow path*: der Pufferstrom wird in Reihe über zwei Messzellen geleitet, was Referenz-Messungen ermöglicht [155].

Die *single flow path*-Funktion wurde für die Immobilisierungsprozesse auf der Sensoroberfläche verwendet. Für die Untersuchung der Bindung von Analyt an Ligand wurde die *multi channel flow path*-Funktion verwendet, bei der zuerst die

Referenzoberfläche (Fc1) und dann die spezifische Oberfläche (Fc2) durchspült wird. **Abb. 14** zeigt den dadurch ermöglichten Vergleich bzw. die Differenz beider Messzellen.

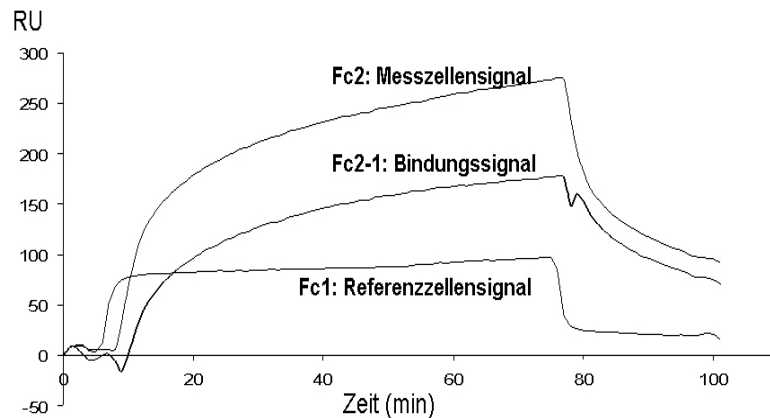


Abbildung 14: Darstellung der erhaltenen Sensorgramme bei Nutzung der multi channel flow path-Funktion. Das Signal der Referenzzelle (Fc1) wird von dem Signal der Messzelle (Fc2) abgezogen, so dass das spezifische Bindungssignal (Fc2-1) erhalten wird, das der weiteren Auswertung dient.

3.3.1.2 Limitierende Faktoren

Ein großer Anteil der Interaktionen von Biomolekülen weicht vom 1:1 Bindungsmodell ab, bei der jeweils ein Molekül Analyt ein Molekül Ligand bindet. Man kann die dafür verantwortlichen Phänomene in drei Gruppen einteilen [157]: zum einen können Probleme, die direkt mit dem Instrument assoziiert sind, wie z.B. Fluiddynamik und Liganden-Immobilisierung, zum anderen experimentelle Einflussgrößen wie Multivalenz des Analyten, Massentransport-Effekte und die Rückbindung des dissoziierten Analyten eine Abweichung vom Idealfall erklären. Ebenso können auch komplexe Interaktionen wie Konformationsänderungen, Interaktionen zwischen zwei verschiedenen Zuständen und heterogene Bindungsstellen eine wichtige Rolle spielen [158].

Diese Faktoren sollten für einen erfolgreichen experimentellen Aufbau für die kinetische Analyse stets berücksichtigt werden. So kann z.B. eine Rückbindung des freigesetzten Analyten während der Dissoziationsphase durch Immobilisieren des Liganden mit geringerer Dichte und Messung mit hoher Flussrate reduziert werden [156].

Eine Referenzoberfläche kann die Qualität von Bindungsdaten erheblich steigern. Artefakte die vom Brechungsindex des Laufpuffers, Matrix-Effekten, nichtspezifischen Bindungen sowie Injektionsschwankungen und Basisliniendrift herrühren, können dadurch korrigiert werden [159, 160].

3.3.1.3 Kinetik und Auswertung

Die Adsorption von Analyt am Ligand wird unter konstantem Analytstrom als eine Reaktion pseudo-erster Ordnung angenommen. Da die Konzentration des Analyten als konstant anzusehen ist, kann die Interaktion des Analyten A mit dem Liganden L (Gleichung 1)



durch folgende Gleichung (Gleichung 2) beschrieben werden:

$$\frac{d[AL]}{dt} = k_a \cdot [A] \cdot [L] - k_d \cdot [AL] \quad (2)$$

Assoziations- und Dissoziationsraten k_a bzw. k_d können durch Interaktions-Experimente mit verschiedenen Konzentrationen C des Analyten ermittelt werden. Durch Messung der Bindungsrate dR/dt als Funktion des SPR-Signals R kann Gleichung [161] in der Form (Gleichung 3)

$$\frac{dR}{dt} = k_a \cdot C \cdot R_{max} - (k_a \cdot C + k_d) \cdot R \quad (3)$$

geschrieben werden. R_{max} ist das maximale Signal der Analyt-Bindung. Für eine Reihe von Analytkonzentrationen liefert die Auftragung von dR/dt auf R den Term $k_a C + k_d$ als Steigung, der als k_s -Wert bezeichnet wird. Auftragung des k_s -Wertes über der Konzentration C liefert eine Gerade, deren Steigung dem k_a -Wert entspricht. Der K_D -Wert kann durch eine, die Dissoziationsphase beschreibende Gleichung (Gleichung 4) ermittelt werden:

$$\ln\left(\frac{R_0}{R_t}\right) = k_d \cdot (t - t_0) \quad (4)$$

R_t ist das Signal zur Zeit t , R_0 das Startsignal zur Zeit t_0 . Durch Auftragung des Terms $\ln(R_0/R_t)$ auf $(t-t_0)$ wird eine Gerade mit der Steigung k_d erhalten [151]. Die Gleichgewichtskonstanten der Assoziation und Dissoziation ergeben sich als Quotienten der Reaktionsraten $K_A = k_a/k_d$ bzw. $K_D = k_d/k_a = 1/K_A$ [156].

Die Ermittlung der kinetischen Parameter erfolgte praktischerweise mit der vom Hersteller mitgelieferten Software *BIAevaluation*.

3.3.1.4 Datenauswertung mit der *BIAevaluation*®-Software

Die mit *BIAcontrol*® aufgenommenen Kurven wurden in das Programm *BIAevaluation*® importiert. Zur Berechnung der Parameter wurden Injektionsstart und -stopp als auch die Bereiche der Assoziation und Dissoziation, über die eine Berechnung erfolgen soll, festgelegt (**Abb. 15**). Den einzelnen Kurven wurde deren Konzentration zugeordnet, das Bindungsmodell (z.B. 1:1 Langmuir, 1:1 Langmuir mit Drift der Basislinie) ausgewählt und die Berechnung initiiert. Die Berechnung kann sowohl global (mehrere Kurven – „Global Fit“), als auch lokal (jede Kurve separat – „Local Fit“) für verschiedene Parameter erfolgen. Beim „Global Fit“ erhält man jeweils einen festen Wert ohne die Angabe einer Abweichung.

Aufgrund der unterschiedlichen Matrix-degradierenden Eigenschaften der Proben erfolgte das Anpassen (Fit) für jede Kurve meist separat („Local Fit“).

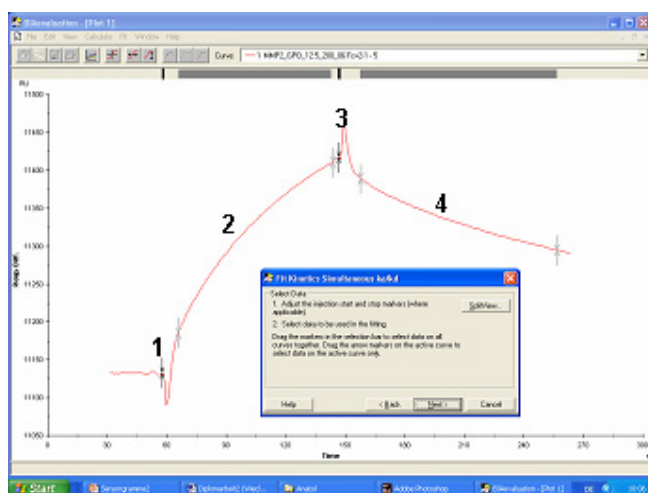


Abbildung 15: Ermittlung der kinetischen Parameter mittels *BIAevaluation*® - Manuelle Festlegung von Injektionsstart (1), Assoziationsphase (2), Injektionsstopp (3) und Dissoziationsphase (4).

Neben den kinetischen Parametern wird auch das sog. Fehlerquadrat χ^2 bestimmt (**Abb. 16**). Dieser Wert dient als Qualitätsmerkmal der errechneten Parameter und sollte 1% des maximalen RU-Wertes im Sättigungsbereich nicht überschreiten.

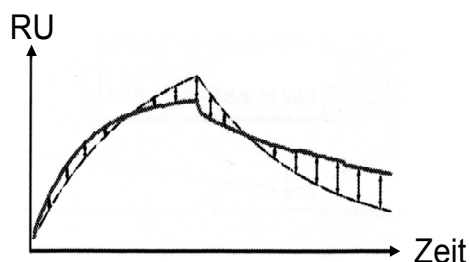


Abbildung 16: Differenz zwischen berechneter und experimentell bestimmter Bindungskurve. Der schraffierte Bereich entspricht der graphischen Darstellung des χ^2 -Wertes, dem Flächenquadrat der Abweichung der Messwerte vom berechneten, „idealen“-Fit.

Die für jede vermessene Probe erhaltenen K_D -Werte wurden gemittelt, wobei alle Proben mindestens viermal gemessen wurden. Messungen mit $\chi^2 > 0,5\%$ wurden nicht berücksichtigt.

Die mit BIAcontrol[®] aufgenommenen und ausgewerteten Kurven wurden als Textdateien in Microsoft[®]-Excel importiert und in Excel-Kurvendiagramme umgewandelt.

3.3.1.5 Immobilisierung der Liganden (Kollagen I, (GPO)₁₀, α 2(VI)-Kette)

Zur kovalenten Kopplung der Liganden an die Dextran-basierten Sensorchips können Amin-, Thiol- oder Aldehyd-Gruppen des Liganden genutzt werden [155]. Bei allen Methoden werden in einem ersten Schritt die Matrix-Carboxylgruppen mit einer Mischung aus N-Ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) in reaktive NHS-Ester überführt. Dabei werden nach Angaben des Herstellers bis zu 40% der Carboxylgruppen eines CM5 Sensorchips aktiviert. Nun kann der Ligand bei einem pH-Wert unterhalb seines pI-Wertes auf der Matrix-Oberfläche vorkonzentriert und kovalent gekoppelt werden. Bei der Amin-Kopplung, mit der alle Kopplungen in dieser Arbeit durchgeführt wurden, reagieren freie NH₂-gruppen des Analyten mit den Ester-Gruppen auf dem Chip zu Amid. Überschüssige NHS-Ester und mögliche Reste des vorkonzentrierten Liganden können mit Ethanolamin inaktiviert bzw. entfernt werden [155].

Die Sensoroberflächen der CM5-Sensorchips wurden bei einer Flussrate von 5 μ L/min mit HBS-EP-Puffer (Biacore) als Laufpuffer folgendermaßen beschichtet: die Messzelle (Fc2) wurde mittels *single flow path*-Funktion mit 35 μ L eines 1:1-Gemisches von EDC (0,2 M) und NHS (0,8 M) aktiviert. Die Carboxylgruppen auf dem Chip werden dabei in reaktive Estergruppen überführt. Der Ligand (Kollagen I / bzw. α 2(VI) und (GPO)₁₀ wurde in Acetatpuffer zu 100 μ g/mL gelöst. Nach Injektion von 35 μ L des jeweiligen Liganden wurde die Sensoroberfläche durch Injektion von 40 μ L Ethanolamin deaktiviert. Der NH₂-Gruppen-haltige Ligand wird an den Chip gekoppelt. Die Deaktivierung der Oberfläche läuft über die gleiche Reaktion ab, jetzt aber mit überschüssigem Ethanolamin, so dass alle Estergruppen „besetzt“ sind und keine Probenmoleküle mehr aufgrund von Kopplungsreaktionen binden.

Die „Immobilisierung“ der Kontrolloberfläche (Fc1) wurde analog der Messzelle durchgeführt. Der Liganden-Kopplungsschritt wurde mit Acetatpuffer ohne

Ligandenzusatz durchgeführt. Die Sensorchips wurden dann für weitere Messungen in 50 mL Falcon-Zentrifugenröhrchen in Tris-Puffer (Tab. 2, S. 23) aufbewahrt.

Abb. 17 zeigt ein Sensorgramm der Kollagen I-Immobilisierung. Es wurden ca. 5000 RU gekoppelt, was einer Menge von etwa 5 ng/mm² Kollagen I entspricht.

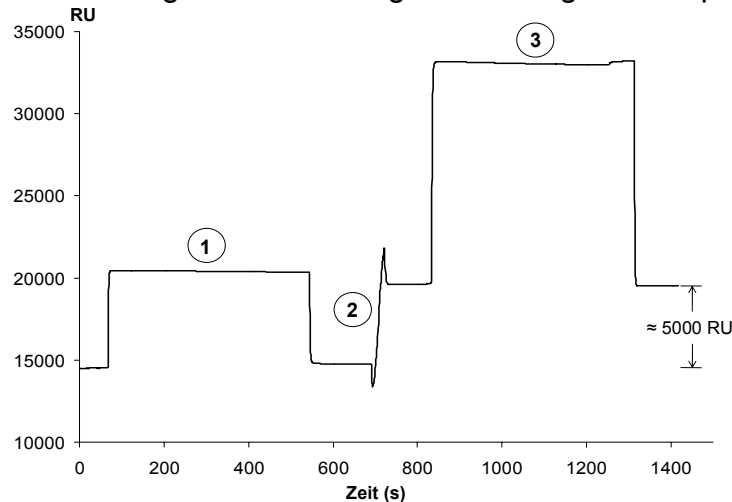


Abbildung 17: Sensorgramm bei Immobilisierung von Kollagen I auf dem Sensorchip CM5 (1): Aktivierung der Chipoberfläche mit EDC/NHS, (2): Immobilisierung von Kollagen I, (3): Deaktivierung freier Bindungsstellen mit Ethanolamin. Die Menge an immobilisiertem Kollagen I ist an dem erhöhten Basissignal nach der Kopplung zu erkennen (ca. 5000 RU).

Die $\alpha 2(VI)$ - bzw. $(GPO)_{10}$ -Immobilisierungen ergaben ein jeweils ähnliches Sensorgramm wie Kollagen I. Es wurden ca. 4600 RU ($\approx 4,6$ ng/mm²) der $\alpha 2(VI)$ -Kette bzw. 10700 RU ($\approx 10,7$ ng/mm²) $(GPO)_{10}$ immobilisiert.

3.3.1.6 $(GPO)_{10}$ -Bindungsversuche von proMMP-2

Es wurden die $(GPO)_{10}$ -beladenen Sensor-Chips benutzt. Zur Bestimmung der kinetischen Bindungs-Parameter wurden Bindungssignale bei verschiedenen Analytkonzentrationen (12,5-50 nM) aufgenommen. Das proMMP-2 wurde in Tris-Puffer (Tab. 2, S. 23) verdünnt.

Es wurden jeweils Proben mit einem Volumen von 70 μ L angesetzt. Das benötigte Volumen pro Messung betrug 35 μ L, so dass jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt werden konnten. Jede Probe wurde mindestens dreimal neu angesetzt und vermessen, so dass zur späteren Mittelwert-Bildung der Kinetikdaten jeweils mindestens 6 Messwerte vorlagen.

Die Messungen erfolgten mit der *multi chanel flow path*-Funktion bei einer Flussrate von 10 μ L/min. Jeweils 9-12 μ L der Enzyme wurden über die Sensorchips geschickt. Der

automatische Spülvorgang des Gerätes erfolgte mit 30-60s Verzögerung („delayed wash“). Nach jeder Messung wurde die Sensoroberfläche durch Injektion von 10 μ L 10 mM Glycin-HCl, pH 2,0 regeneriert.

3.3.1.7 Kollagen I-Bindungsversuche der Gelatinasen MMP-2/-9

Es wurden die mit Kollagen I-beladenen Sensor-Chips benutzt. Zur Bestimmung der kinetischen Bindungs-Parameter wurden Bindungssignale bei verschiedenen Analytkonzentrationen (100-250 nM) aufgenommen. Die Enzyme wurden in Tris-Puffer bzw. PBS-0,05% Tween20 verdünnt (siehe Tab. 2, S. 23).

Es wurden jeweils Proben mit einem Volumen von 70 μ L angesetzt, was ausreichend für jeweils eine Doppelbestimmung war. Jede Probe wurde mindestens dreimal neu angesetzt und vermessen, so dass zur späteren Mittelwert-Bildung der Kinetikdaten jeweils mindestens 6 Messwerte vorlagen.

Die Messungen erfolgten wie unter Kap. 3.3.1.6 beschrieben.

3.3.1.8 Beeinflussung der Gelatinasen-Bindung durch (GPO)₁₀

Zu den Enzymen wurde ein 10facher molarer Überschuss von (GPO)₁₀ gegeben. Das (GPO)₁₀ wurde dabei vor der Enzymverdünnung dem Tris-Puffer bzw. dem PBS/0,05% Tween20 zugesetzt, so dass bei allen Messungen gleiche Probenvolumina erhalten wurden. Für 65 μ L einer 100 nM proMMP-2 Lösung wurden 0,8 μ L der (GPO)₁₀-Stammlösung mit 61,9 μ L Puffer gemischt und 2,4 μ L (6,5 pM) der MMP-2-Stammlösung zugegeben. Bei höher konzentrierten MMP-2-Proben wurden die zugesetzten Volumina von (GPO)₁₀ und MMP-2 entsprechend erhöht.

3.3.1.9 MMP-2-Bindung mit MMP-Inhibitor

Um die Kollagen-Bindung der MMP-2 Konfigurationen ohne Einfluss von proteolytischer Aktivität zu untersuchen, wurden die Proben in Anwesenheit des hochselektiven MMP-2 Inhibitors Ro28-2653 [162] vermessen. Der Inhibitor wurde Tris-Puffer zugesetzt (Tab. 2, S. 23). Dabei wurde eine von der Firma Roche empfohlene Endkonzentration von 2 μ M/L eingesetzt. Die Messungen erfolgten wie in Kap. 3.3.1.6 beschrieben.

3.3.1.10 α 2(VI)-Bindungsversuche der MMPs -1/-3/-8/-13 sowie MMP-2/-9

Es wurden die mit α 2(VI)-Kette beladenen Sensor-Chips benutzt. Zur Bestimmung der kinetischen Bindungs-Parameter wurden Bindungssignale bei verschiedenen Analytkonzentrationen (12,5-100 nM) aufgenommen. Die 70 μ L-Proben wurden in Tris-

Puffer angesetzt. Jede Probe wurde mindestens dreimal neu angesetzt und vermessen, so dass zur späteren Mittelwertbildung der Kinetikdaten jeweils mindestens 6 Messwerte vorlagen.

Die Messungen erfolgten mit der *multi chanel flow path*-Funktion bei einer Flussrate von 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. Jeweils 10 μL der Enzyme wurden über die Sensorchips geschickt, was ausreichend war um ein Gleichgewicht der Bindungskurve zu erhalten. Der automatische Spülvorgang des Gerätes erfolgte mit 60 s Verzögerung („delayed wash“). Nach jeder Messung wurde die Sensoroberfläche durch Injektion von 10 μL 10 mM Glycin-HCl, pH 2,0 regeneriert.

3.3.2 Festphasen-Bindungsstudien

3.3.2.1 Bindungsversuche in Mikrotiterplatten

Mikrotiterplatten wurden mit jeweils 2 μg der nativen Kollagene I, III, IV und VI bzw. den Ketten $\alpha 1(\text{I})$, $\alpha 2(\text{I})$ und $\alpha 1(\text{VI})$, $\alpha 2(\text{VI})$ sowie mit 1 μg Fibronektin beschichtet. Die Beschichtung erfolgte in 50 mM Ammoniumhydrogencarbonatpuffer (pH 9,6) für 24 h bei 4°C. Nach Entfernung von nichtgebundenen Proteinen mit PBS/0,05% Tween20 wurden mögliche freie Bindungsstellen mit 0,1%iger BSA-Lösung (1h, 37°C) blockiert. Nach erneutem Waschen mit 200 $\mu\text{L}/\text{Loch}$ PBS/0,05% Tween20 wurden 2 ng [^{125}I]-markiertes MMP pro Loch in 100 μL Ammoniumhydrogencarbonatpuffer zugegeben. Nach 2 h Inkubation bei 4°C wurden nicht gebundene MMPs durch dreimaliges Waschen mit 200 μL PBS/0,05% Tween20 entfernt. Die gebundene Radioaktivität wurde im γ -Zähler mit der initial eingesetzten Aktivität verglichen. Die Division beider Werte ergab den prozentualen Bindungswert der MMPs an die Kollagene.

3.3.2.2 Ligandenblot

Zusätzlich zu den Festphasenversuchen wurde auch ein Ligandenblot mit [^{125}I]-proMMP-3 durchgeführt, um die Bindungsstelle auf dem Kollagen VI-Molekül einzugrenzen. Dazu wurden 2 μg des KVI-Kettengemisches (KVI r,a) sowie der $\alpha 1(\text{VI})$ - und der $\alpha 2(\text{VI})$ -Einzelkette per SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert bzw. immobilisiert. Freie Bindungsstellen wurden 1 h mit PBS/0,3% Tween20 blockiert. Der Blot wurde anschließend für 2 h bei 4°C mit [^{125}I]-proMMP-3 (600.000 cpm bzw. 0,27 μCi in 12 ml PBS/0,05% Tween80) inkubiert. Nach dreimaligen Waschen mit PBS/0,05% Tween20 wurde gebundenes [^{125}I]-proMMP-3

mittels Autoradiographie visualisiert. Der entwickelte Film wurde zur Dokumentation eingescannt.

3.3.3 *In situ*-Bindungsversuche

3.3.3.1 Fluoreszenz (Cy2)-Markierung von proMMP-2

ProMMP-2 wurde mit dem FluoroLink™ MAb Cy2 Markierungs-Kit fluoreszenzmarkiert. Alle Arbeitsschritte wurden in einem abgedunkelten, gekühlten Raum (15°C) auf Eis durchgeführt. Da die Cy2-Markierung auf Kopplung an freie Amingruppen beruht, musste zunächst das Tris-HCl aus dem Tris-Puffer, in dem das proMMP-2 gelöst ist, entfernt werden. 2 µg (27,8 pMol) proMMP-2 gelöst in 100 µL PBS/0,1% BSA wurden zweimal durch NANOSEP 10k Omega-Tubes zentrifugiert, um das Tris-HCl abzutrennen. Die erhaltenen 85 µL proMMP-2-Lösung wurden mit 5 µL Cy2-Kopplungs-Puffer (Kit) für 1,5 h bei 4°C auf einem Rolltisch inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit je 50 µL Tris-Puffer (Zentrifugation durch NANOSEP 10k Omega-Tubes) wurde das Cy2-markierte proMMP-2 aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Die erfolgreiche Markierung wurde mit einem Fluoreszenz-Spektrometer kontrolliert. 5 µL markiertes proMMP-2 wurden mit 45 µL physiologischem Aktivierungspuffer in einem Loch einer schwarzen 96-Loch Mikrotiterplatte gemischt. Daraus wurden 5 µL abgenommen und in einem zweiten Loch mit 45 µL Tris-Puffer gemischt (1:10 Verdünnung). Daraus wurde in einem dritten Loch wiederum eine 1:10 Verdünnung hergestellt. Als Kontrolle dienten 50 µL Tris-Puffer alleine. Die Fluoreszenzmessung erfolgte als Endpunktmessung bei λ_{ex} : 489 nm, und λ_{em} : 506 nm. Entsprechend erhaltende Fluoreszenz-Signale bestätigen eine erfolgreiche Cy2-Markierung von proMMP-2. Mittels Gel-Zymographie wurde kontrolliert, ob das markierte proMMP-2 noch die Proform-Konfiguration aufweist.

3.3.3.2 Cy2-proMMP-2-Bindung an kollagene Septen

Auf Objektträger aufgebrachte, serielle 5 µM dicke Gewebsschnitte aus humaner, zirrhotischer Leber (alkohol-toxisch induziert) wurden 5 min bei 0°C mit Aceton fixiert. Die luftgetrockneten Schnitte wurden mit 60 ng (0,83 pM) Cy2-markiertem proMMP-2, gelöst in 50 µL Tris-Puffer, bedeckt. Als Kontrolle diente der Puffer ohne proMMP-2-Zusatz. Die bedeckten Schnitte wurden 24 h in einer dunklen, feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde nichtgebundenes proMMP-2 durch Schwenken in PBS gewaschen und luftgetrocknet. Auf dem Schnitt auskristallisierte Salze wurden

durch sehr kurzes Eintauchen der Schnitte in demineralisiertes Wasser entfernt. Gebundenes proMMP-2 wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop unter Nutzung eines FITC-Filters (520 nm) als grüne Lichtsignale detektiert und die Bilder digital gespeichert. Die Bearbeitung der digitalen Bilder erfolgte mit der Adobe-Photoshop-Software.

3.3.3.3 Sirius-Rot-Färbung zirrhotischer (kollagener) Stränge

Um die erhaltenen proMMP-2-Bindungssignale auf den Schnitten kollagenhaltigen Arealen zuordnen zu können, wurden diese mit Sirius-Rot rot angefärbt. Serielle Schnitte wurden dazu für 1 h bei RT in 0,1% Sirius-Rot-haltiger, gesättigter, wässriger Pikrinsäure inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte entwässert. Dazu wurden sie für je 5 min in einer ansteigenden Ethanol-Konzentrationsreihe inkubiert (30%, 70%, 95% und reiner Ethanol). Abschließend folgte eine 5 minütige Inkubation in reinem Xylol. Die entwässerten Schnitte wurden mit einem transparenten Harz versiegelt und die Schnitte mit einem Lichtmikroskop analysiert. Zur Dokumentation wurden die Schnitte mit einer Digitalkamera fotografiert.

3.3.3.4 Beeinflussung der proMMP-2/Kollagen-Bindung durch (GPO)₁₀

Um die (GPO)₁₀-vermittelte Beeinflussung der Bindung von proMMP-2 an Kollagen-Stränge zu untersuchen, wurde markiertes proMMP-2 (0,83 pM) mit 8,3 pM (GPO)₁₀ vorinkubiert. ProMMP-2 und (GPO)₁₀ waren in 50 µL Tris-Puffer gelöst. Nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur (20°C) im Eppendorf-Reaktionsgefäß erfolgte mit dieser Lösung die Bindung auf dem Schnitt wie oben beschrieben (Kap. 3.3.3.2).

3.3.3.5 Freisetzung von Kollagen-gebundenem proMMP-2 durch (GPO)₁₀

Die mit Cy2-proMMP-2 behandelten Schnitte wurden nach Detektion der proMMP-2-Bindung mit 8,3 pM (GPO)₁₀ (gelöst in 50 µL Tris-Puffer) nachinkubiert. Als Kontrolle diente Tris-Puffer ohne (GPO)₁₀-Zusatz. Wasch- und Detektionsschritte erfolgten analog zu Kap. 3.3.3.2.

3.4 Aktivitätsstudien

3.4.1 Fluorimetrische Aktivitäts-Assays

Die Bestimmung der Aktivität bzw. des Verlaufs der Aktivierung der MMPs erfolgte unter Nutzung von MMP-spezifischen Fluoreszenz-Substraten [163, 164].

Das **MMP-2/-9** spezifische Substrat *MCA* besitzt ein Fluorophor (Methoxycoumarin), dessen Fluoreszenz durch einen sog. "Quencher-Molekül" (Dinitrophenyl) inhibiert wird. Durch enzymatische Substratspaltung wird das Fluorophor freigesetzt. Dabei kommt es zu einer Verstärkung der eingestrahlten Lichtintensität um den Faktor 190 (λ_{exc} : 328 nm, λ_{em} : 393 nm).

Die verwendeten fluorimetrischen Substrate für **MMP-8** (DNP-Pro-Leu-Ala-Tyr-Trp-Ala-Arg-OH; λ_{exc} : 280 nm, λ_{em} : 360 nm) und **MMP-13** bzw. der katalytischen Domäne **kMMP-13** (MCA-Pro-Cha-Gly-Nva-His-Ala-Dpa-NH₂; λ_{exc} : 280 nm, λ_{em} : 360 nm) basieren ebenfalls auf der „Quencher-Methode“. Die unterstrichenen Bestandteile stellen Quencher-Gruppen dar.

3.4.1.1 Einfluss von (GPO)₁₀ auf die MMP-2 / -9 –Aktivierung bzw. Aktivität

Für die fluorimetrischen Aktivitätsmessungen wurde ein Teil der Löcher einer schwarzen 96-Loch Mikrotiterplatte mit Kollagen I beschichtet (pro Loch: 1 µg/100 µL 0,15 M HOAc; 12 h, 4°C). Anschließend wurden freie Bindungsstellen in allen Löchern durch BSA-Beschichtung blockiert (pro Loch: 200 µL 0,1% BSA in PBS; 1 h, 37°C). Nach zweimaligem Waschen mit 200 µL PBS wurden pro Loch 150 µL einer 0,8 µM *MCA*-Lösung (verdünnt mit Tris-Puffer) vorgelegt. Bis zur Zugabe der MMPs wurde die Platte lichtgeschützt in Aluminiumfolie auf Eis aufbewahrt (ca. 10 min). Nach Vorheizen des Fluoreszenz-Mikroplatten-Messgerätes auf 37°C und anschließender Bestimmung der Fluoreszenz dienten die erhaltenen Daten als Nullwerte und wurden von später erhaltenen Messdaten subtrahiert.

Je nach Versuchsansatz wurden nun die entsprechenden Mengen an (GPO)₁₀ dazupipettiert (6,9 pM bei MMP-2; 3,5 pM bei MMP-9). Die Peptide waren jeweils in 8,4 µL Tris-Puffer gelöst. Anschließend folgte - wenn vorgesehen - die Zugabe von 3 µL 40 mM APMA pro Loch. Abschließend wurden jeweils 10 µL der MMPs gelöst in Tris-Puffer dazupipettiert (0,69 pM pro-/MMP-2; 0,35 pM pro-/MMP-9).

Die kinetische Messung erfolgte bei 37°C über 120 min mit minütlicher Datenerfassungsrate.

3.4.1.2 Einfluss von Kollagen VI-Fragmenten auf die MMP-8-Aktivierung bzw. Aktivität

In schwarzen 96-Lochplatten wurden freie Bindungsstellen mit 200 µL 0,1% BSA in PBS geblockt (1 h, 37°C). Nach zweimaligem Waschen mit 200 µL PBS wurden 100 µL

einer 10 μM MMP-8 Fluoreszenz-Substratlösung in die Löcher pipettiert. Pro Loch wurden nun jeweils 0,45 μM in 10 μL proMMP-8 (26,25 ng) bzw. MMP-8 (20 ng) pipettiert. Bei den Löchern mit $\alpha 2(\text{VI})$ -Behandlung waren in den 10 μL /Loch MMP-Lösung noch jeweils 4,5 μM (0,23 μg) der Kollagen VI-Kette enthalten, was einem 10fachen molaren Überschuss gegenüber den MMPs entspricht. Die fluorimetrische Messung erfolgte für 2 h bei 37°C in einem Fluoreszenz-Lesegerät mit minütlicher Datenerfassungsrate (λ_{ex} : 280 nm, λ_{em} : 360 nm). Gleichbehandelte Löcher (Substrat-, $\alpha 2(\text{VI})$) ohne MMP-8-Zusatz dienten als Nullwerte und wurden von den erhaltenen Messwerten subtrahiert. Zur besseren Darstellung wurden die Messwerte in Sigma-Plot™ übertragen und als Balkendiagramm dargestellt.

3.4.1.3 Einfluss von Kollagen VI-Fragmenten auf die Aktivität von proMMP-13/MMP-13

In schwarzen 96-Lochplatten wurden freie Bindungsstellen mit 200 μL 0,1% BSA in PBS geblockt (1 h, 37°C). Nach zweimaligem Waschen mit 200 μL PBS wurden 150 μL einer 0,8 μM MMP-13 Fluoreszenz-Substratlösung (verdünnt in Tris-Puffer) in die Löcher pipettiert. Anschließend folgte die Zugabe von jeweils 74 μM der Kollagen-Fragmente KVI-F, KVI r,a und $\alpha 2(\text{VI})$, jeweils gelöst in 10 μL 0,15 M HOAc. Abschließend wurden jeweils 7,4 μM in 10 μL Tris-Puffer proMMP-13, MMP-13 bzw. kMMP-13 in die Löcher pipettiert. Unmittelbar danach wurde die Platte in das Fluoreszenz-Lesegerät geschoben und die Fluoreszenzsignale für 2 h bei 37°C detektiert (λ_{ex} : 325 nm, λ_{em} : 393 nm). Gleichbehandelte Löcher (Substrat-, $\alpha 2(\text{VI})$) ohne MMP-13-Zusatz dienten als Nullwerte und wurden von den erhaltenen Messwerten subtrahiert. Zur besseren Darstellung wurden die Messwerte in Sigma-Plot™ übertragen und als Balkendiagramm dargestellt.

3.4.2 Typ I-Kollagenase-Assay

Der *Typ I Kollagenase Assay* (Chemicon) basiert auf der Spaltung und damit Freisetzung biotinylierter Kollagen-Fragmente durch Kollagenasen. Die entstandenen Fragmente werden in eine Biotin-bindende Mikrotiterplatte überführt und nicht besetzte Biotinbindungsstellen blockiert. Über eine entsprechende enzymatische Farbreaktion und durch Vergleich mit Positiv- bzw. Negativkontrollen kann der Grad der Kollagenase-aktivität bestimmt werden.

3.4.2.1 Einfluss von Kollagen VI-Fragmenten auf die Aktivität der Kollagenasen MMP-1, -8, -13

Es wurde jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Als Proben dienten sowohl die APMA-aktivierten- als auch die Pro-Formen der MMPs. Jeweils 0,86 pM der MMPs gelöst in 10 µL Tris-Puffer ($\pm 8,6$ pM $\alpha 2(VI)$) und 30 µL 5fach konzentrierten Tris-Puffer wurden mit 100 µL eines biotinyliertem Kollagenasesubstrates (Kit) gemischt und 2 h bei 37°C in einer 96-Loch Mikrotiterplatte inkubiert. Nach Zugabe von 10 µL einer *Enhancer*-Lösung folgten weitere 30 min Inkubation bei 37°C. Anschließend wurden jeweils 100 µL jeder Probe in eine Biotin-bindende 96-Loch-Mikrotiterplatte überführt und 30 min bei 37°C inkubiert. Nach einem gründlichen Waschschrift der Löcher (fünfmal mit je 200 µL Tris-Puffer) wurden 100 µL einer 1:3000-Verdünnung eines Streptavidin-Enzym-Konjugates zu den Proben gegeben. Nach weiteren 30 min Inkubation bei 37°C und einem erneuten gründlichen Waschschrift (s.o.) wurden jeweils 100 µL einer *Substrat-Lösung* zu den Proben gegeben. Nach ca. 10-15 min bildete sich in Löchern mit MMP-Aktivität ein grüner Farbstoff. Die Reaktion wurde mit einer *Stopp-Lösung* beendet und die Extinktion der Proben in einem ELISA-Reader bei 450 nm gemessen. Die Daten wurden in Sigma-Plot™ überführt und als Tabelle bzw. Balkendiagramm dargestellt.

3.5 *In vitro*-Versuche (Zellkultur)

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter keimarmen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank mit laminarer, vertikaler Luftströmung.

3.5.1 Auftauen bzw. Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren von Zellkulturen wird ein *Einfriermedium* verwendet. 10^6 -Zellen werden in 1,8 mL Einfriermedium in speziellen Kryoröhrchen (Firma: Nunc) aufgenommen. Nach 24 Stunden Vorkühlung bei -80°C können die Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt werden. Durch die Vorkühlung und die Verwendung von DMSO wird einer intrazellulären Kristallbildung beim Gefrieren entgegengewirkt.

Beim Wiederauftauen der Zellen wird das angetaute Einfriermedium schnell durch Spülung mit 40 mL DMEM-10% FKS in ein 50 mL Falcon-Zentrifugenröhrchen überführt. Die rasche Verdünnung ist aufgrund der zelltoxischen Wirkung des DMSO

notwendig. Nach Abzentrifugation der Zellen können sie in Zellkulturflaschen kultiviert werden.

3.5.2 Zellpassagierung

Die Zellkultivierung erfolgte in 75 cm²-Kulturflaschen mit DMEM-10% FKS in einem Brutschrank bei 37°C unter feuchter Atmosphäre mit 5% CO₂-Anteil.

Das Kulturmedium wurde alle zwei bis drei Tage erneuert und die Zellen einmal mit PBS gespült. Bei erreichter Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dazu wurden nach zweimaligem Spülen der Zellen mit PBS durch Zugabe von 3 ml einer Trypsin/EDTA (T/E)-Lösung die Zellen abgelöst. Nach mikroskopischer Kontrolle der Vollständigkeit der Ablösung wurden die Zellen mit 7 ml Medium verdünnt und in ein 50 ml Falcon-Zentrifugenröhrchen überführt. Nach 10 min Zentrifugation bei 800 U min⁻¹ (ca. 114 x g) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 5 ml frischem DMEM-10% FKS resuspendiert.

Aus 50 µL der Zellsuspension erfolgte vor Proliferations-/Invasionsversuchen die Zellzählung. 500-1000 µL der Suspension wurden mit 19,5 ml DMEM-10% FKS in einer neuen Kulturflasche bis zur erneuten Konfluenz kultiviert.

3.5.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Zellzahlbestimmung wird eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Um vitale und tote bzw. geschädigte Zellen differenzieren zu können, werden 50 µL der Zellsuspension mit 50 µL einer Trypanblaulösung gemischt. Der Farbstoff dringt durch die defekte Zellmembran toter (geschädigter) Zellen und färbt so ihr Zytoplasma an. Die blaugefärbten Zellen wurden beim Auszählen nicht berücksichtigt.

Durch die definierte Vertiefung der Platte werden genau 10 µl der Trypanblau-/Zellmischung zwischen Platte und Deckglas gesogen. Nach Auszählung von zwei Großquadraten á 4x4 Feldern, deren Summenbildung und Multiplikation mit dem „Zählkammerfaktor“ (10⁴), erhält man die Zellzahl in der Suspension pro ml.

Entsprechend der gewünschten Zellzahl, die in die Kultur-Platten ausgesät werden soll, kann die Suspension mit DMEM-10% FKS verdünnt werden.

3.5.4 Einfluss von MMP-2 und (GPO)₁₀ auf die Proliferation von CFSC

Jeweils 5000 CFSC wurden in 100 µL 10% FKS pro Loch ausgesät. Nach 24 h Inkubation wurde das Medium durch 0,25% FKS-haltiges Medium ersetzt (100 µL/Loch). Nach weiteren 24 h Inkubation folgte die Behandlung der Zellen. Von jeder Behandlungsgruppe wurden 6-fach Werte angesetzt. Bis auf die 10% FKS-Behandlung wurden alle Ansätze mit 0,25% FKS-haltigem Medium verdünnt. 100 µl der Ansätze wurden in jedes Loch pipettiert. Die molaren Konzentrationen der Behandlungen sind in **Tab. 3** dargestellt. Als entsprechende Kontrollen zu den Behandlungen dienten die jeweiligen Lösemittel bzw. potentiell toxischen Substanzen in gleicher Konzentration ohne gelöstes Stimulans (z.B. APMA mit Zusatz von Tris-Puffer statt MMP-2; DMSO ohne gelöstes GM6001).

Tabelle 3: Molare Angaben der entsprechenden Behandlungen von CFSC und HT1080-Zellen bei den Proliferations- bzw. Migrations-/Invasionsversuchen.

Behandlung	Mol / L
MMP-2	$1,7 \times 10^{-9}$
proMMP-2	$1,7 \times 10^{-9}$
(GPO) ₁₀	$1,7 \times 10^{-8}$
GAP	$1,7 \times 10^{-8}$
GM6001	$6,4 \times 10^{-6}$

Nach 6 h Inkubation wurde [³H]-markiertes Thymidin zu den Zellen gegeben (0,5 µCi bzw. 18,5 kBq = 500 nM in 20 µL 0,25%-FKS-haltigem Medium pro Loch). Nach 4 h Inkubation im Brutschrank wurde das Medium abgekippt und die Zellen mit 200 µL 10% Trichloressigsäure (TCA) fixiert (30 min, Raumtemperatur: 20°C). Nach Abgießen der TCA wurden die Zellen 30 min mit 50 µL 0,2 N NaOH lysiert. Durch die partielle alkalische Hydrolyse wird die DNS fragmentiert und freigesetzt. Anschließend wird die Lyse mit 50 µL 0,8 N HCl abgestoppt. Die solubilisierte DNS kann mittels eines *Cell-Harvesters* auf einen Glasfaserfilter übertragen werden. Nichteingebautes Thymidin sowie kleinere Zellfragmente werden weggespült. Durch Aufschmelzen eines Szintillationswachses auf den Glasfaserfilter können die in Lichtsignale umgewandelten β-Zerfälle in einem Szintillationszähler gemessen werden. Die emittierte Strahlung wird als Zerfälle (counts) pro Minute (cpm) erfasst.

3.5.5 Einfluss von MMP-2 und (GPO)₁₀ auf die Migration/Invasion von HT1080-Zellen

Für die Invasionsexperimente wurde der QCM™ 96-Well Cell Invasion Assay (Chemicon) benutzt. **Abb. 18** zeigt schematisch den Aufbau des Assays.

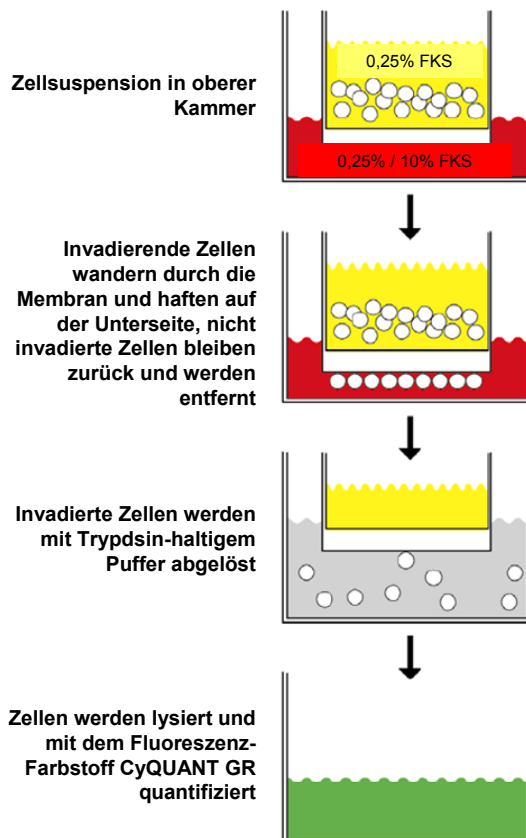


Abbildung 18: Schema des verwendeten Invasions-Assays HT1080-Zellen werden in 0,25% FKS zusammen mit MMP-2/GPO/GM6001 in die obere Kammer pipettiert. Die untere Kammer enthält 0,25% FKS ohne Zusatz bzw. 10% FKS als Positivkontrolle. Nach ca. 20 h Inkubation werden die auf der Unterseite haftenden, invadierten Zellen lysiert und mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes quantifiziert.

Mit Matrigel (ECMatrix™) beschichtete Einsätze (8 µm Porengröße) wurden 2 h mit FKS-freiem Medium rehydriert. Anschließend wurden 50.000 HT1080-Zellen (in 75 µL 0,25% FKS/Loch) in den Einsätzen (obere Kammer) ausgesät. Danach folgte die Zugabe von GM6001 (64 nM/Loch), (GPO)₁₀ (1,7 pM/Loch) und MMP-2 (0,17 pM/Loch), jeweils gelöst in 25 µL/Loch 0,25%-FKS-haltigem Medium. Die untere Kammer wurde zuvor mit 150 µL 10% bzw. 0,25% FKS-haltigem Medium gefüllt. Je Behandlungsgruppe wurde pro Versuch eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Nach 22 h Inkubation bei 37°C wurde das Medium aus der oberen Kammer mit einer Pipettenspitze abgesaugt. Die Einsätze wurden anschließend in eine neue 150 µL / Loch Zellenablösungspuffer-enthaltende Platte gesetzt. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurden 50 µL eines 4:1-Gemisches aus Lyse-Puffer und einem fluoreszierendem Farbstoff zu der Zelllösung gegeben. Dieser grün-fluoreszierende Farbstoff zeigt nach Anbindung an zelluläre Nukleinsäuren eine starke Fluoreszenzzunahme [165]. Nach

weiteren 15 min Inkubation (RT) wurden 150 μL der Mischung in eine schwarze 96-Lochplatte überführt. Die Fluoreszenz wurde in einem Fluoreszenz-Mikroplatten-Messgerät mit einem 480/520 nm Filter-Set bestimmt. Die Daten wurden mit Sigma-Plot™ als Balken-Diagramme dargestellt.

3.6 Statistische Datenauswertung

Mittelwerte und die Standardabweichung (*Gleichung 5*) wurden zunächst mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel bestimmt.

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} \quad (5)$$

Signifikanzen wurden durch *One Way Analysis Of Variance* (ANOVA) und anschließendem paired *t*-Test zum Vergleich der Einzelgruppen mit dem Programm SigmaStat™ (SPSS Inc., Chicago, USA) ermittelt.