

4 Ergebnisse

Teil I: Gelatinasen (MMP-2, -9)

4.1 Bindungsstudien der Gelatinasen an eine Kollagen-I-Matrix – Modulation der Bindung mit dem Kollagenmimetikum (GPO)₁₀

Um die Interaktion von inaktiven und aktivierten Gelatinasen (MMP-2/-9) mit Kollagenen und dem Kollagenmimetikum (GPO)₁₀ zu vermessen, wurde zunächst die SPR-Technik eingesetzt.

4.1.1 Bindung der Gelatinasen an immobilisiertes Kollagen I

Wie alle vorausgegangenen Festphasen-Bindungsstudien und vergleichbare Versuche auch anderer Arbeitsgruppen wurden die Biacore-Messungen zunächst in PBS/0,05% Tween20-Puffer durchgeführt. Mehrere unterschiedlich konzentrierte (pro)MMP-Proben wurden über den mit Kollagen I-beschichteten Biacore-Chip gegeben. Dabei ergaben sich für alle Proben typische Bindungskurven (vgl. Abb. 12, S. 33), aus denen mit der BIAevaluation-Software die kinetischen Parameter der Bindungen bestimmt werden konnten. Die Werte der ermittelten Dissoziationskonstanten K_D sowie die Dissoziationsraten k_d zeigt **Tab. 4**. Dabei zeigte sich eine jeweils stärkere Bindung der proMMPs gegenüber den aktivierten MMPs. ProMMP-2 band 2,5fach stärker als MMP-2, proMMP-9 5fach stärker als MMP-9. Die jeweiligen Isoformen von MMP-2 wiesen eine höhere Bindungsstärke als die von MMP-9 auf.

Tabelle 4: *Bestimmung der kinetischen Parameter der Gelatine-KI-Bindung mittels SPR. Unterschiedlich konzentrierte MMP-Proben wurden in PBS/0,05% Tween20-Puffer über den mit Kollagen I-beschichteten Chip gegeben. Die Auswertung erfolgte mittels BIAevaluation-Software (n = 6).*

	Proform		Aktivierte Form	
	k_d (s ⁻¹)	K_D (μM)	k_d (s ⁻¹)	K_D (μM)
MMP-2	0,48	0,07 ± 0,03	0,48	0,17 ± 0,05
MMP-9	0,32	0,12 ± 0,09	0,76	0,87 ± 0,39

4.1.2 Bindung von proMMP-2 an das Kollagenmimetikum (GPO)₁₀

Neben der Bindungsstärke von proMMP-2 an Kollagen I war auch die Bindungsstärke von proMMP-2 an das Kollagenmimetikum (GPO)₁₀ von Interesse. Um die Stärke der Bindung von proMMP-2 an das Kollagenmimetikum (GPO)₁₀ zu untersuchen, wurde (GPO)₁₀ auf dem Sensor-Chip immobilisiert. Unterschiedlich konzentrierte proMMP-2-Proben wurden, verdünnt in Tris-Puffer (12,5-50 nM), über den Biacore-Chip gegeben und die kinetischen Bindungsdaten mittels der BIAevaluation-Software bestimmt. **Abbildung 19** zeigt ein repräsentatives Sensorgramm. Dabei ergab sich eine Dissoziationskonstante von $K_D = 7,46 \text{ nM}$ (keine Fehlerangabe, da „Global fit“ – siehe Kap. 3.3.1.4).

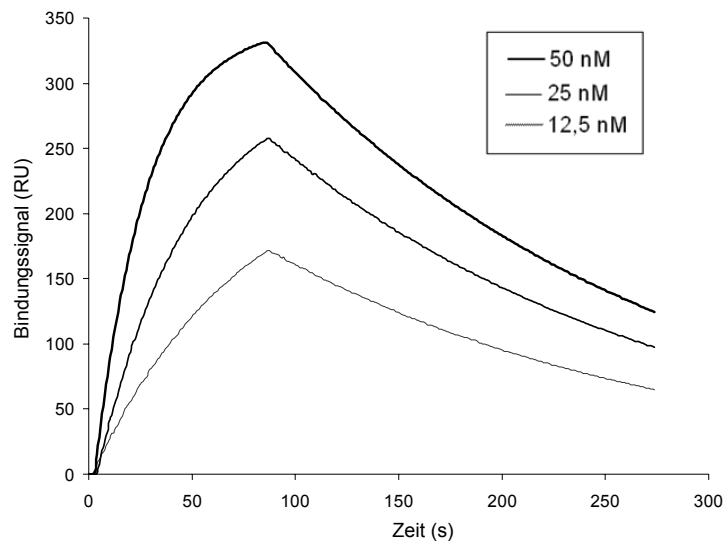


Abbildung 19: Sensorgramme der Bindung von proMMP-2 an das immobilisierte tripelhelikale Kollagenmimetikum (GPO)₁₀. Unterschiedlich konzentrierte proMMP-2-Lösungen wurden über einen mit (GPO)₁₀-beladenen CM5-Sensor-Chip gegeben. Die Referenzzelle wurde mit dem linearen „Kontrollpeptid“ GAP beschichtet. Das Bindungssignal der Referenzzelle wurde von dem der Messzelle subtrahiert. ProMMP-2 zeigte eine starke Assoziation an die (GPO)₁₀-Matrix. Die Dissoziationskonstante K_D lag im nanomolaren Bereich (7,46 nM).

Bindungsversuche von proMMP-9 an immobilisiertes (GPO)₁₀ ergaben nur unzureichende Ergebnisse. Die Bindungskurven zeigten teilweise störende Artefakte und die χ^2 -Werte (vgl. Kap. 3.3.1.4, S. 37) lagen alle oberhalb von 0,5% des maximalen RU-Wertes. Erhaltene Bindungssignale ließen sich damit nicht zuverlässig auswerten. Nachdem zunächst die Bindungsstärken der Gelatinasen-Kollagen I-Wechselwirkung ermittelt worden waren und (GPO)₁₀ eine etwa 100fach stärkere proMMP-2-Assoziation als Kollagen I gezeigt hatte, wurde in nachfolgenden Versuchen die mögliche

Modulation der Gelatinasen-Kollagen I-Bindung mit dem Kollagenmimetikum (GPO)₁₀ charakterisiert.

4.1.3 Modulation der Kollagen I-Bindung der Gelatinasen durch das Kollagenmimetikum (GPO)₁₀

In Biacore-Bindungsstudien wurde untersucht, ob und wie stark (GPO)₁₀ die Gelatinasen-Kollagen I-Bindung beeinflussen kann. Ziele waren die mögliche Freisetzung gebundener Gelatinasen, die Verhinderung der Kollagen-Bindung oder die Verringerung der Bindungsstärke. Dazu wurden die Gelatinasen zusammen mit einem 10fachen molaren Überschuss des Kollagenmimetikums (GPO)₁₀ über den Kollagen I-Chip gegeben. Eingesetzt wurde erneut der PBS/0,05% Tween20-Puffer. Der (GPO)₁₀-Zusatz bewirkte bei beiden Gelatinasen eine Abnahme der Bindungsstärke. Der Effekt zeigte sich sowohl bei der pro- als auch der aktivierten Form. Bei proMMP-2 zeigte sich eine Verringerung der Bindungsstärke um den Faktor 1,4, bei MMP-2 um den Faktor 1,2. ProMMP-9 zeigte nach (GPO)₁₀-Zusatz eine Abnahme der Kollagen I-Bindungsstärke um den Faktor 10. Dem gegenüber wurde die Bindung von aktiviertem MMP-9 um den Faktor 2 vermindert. In **Tab. 5A** sind alle ermittelten Bindungsdaten mit und ohne (GPO)₁₀-Zugabe gegenübergestellt.

Tabelle 5: Modulation der Gelatinasen-Kollagen I-Bindungsstärke durch das Kollagenmimetikum (GPO)₁₀. Dargestellt sind die ermittelten kinetischen Bindungsdaten der Biacore-Bindungsstudien in **A**) PBS/0,05% Tween20-Puffer und **B**) Tris-Puffer (Kap. 4.1.4). Die Daten stellen Mittelwerte aus jeweils $n = 6$ Messwerten dar.

A	- (GPO) ₁₀		+ (GPO) ₁₀	
	k_d (s ⁻¹)	K_D (μM)	k_d (s ⁻¹)	K_D (μM)
proMMP-2	0,48	0,07 ± 0,03	0,37	0,10 ± 0,04
MMP-2	0,48	0,17 ± 0,05	0,56	0,21 ± 0,15
proMMP-9	0,32	0,12 ± 0,09	0,22	1,22 ± 0,64
MMP-9	0,76	0,87 ± 0,39	0,61	1,79 ± 1,81
B				
proMMP-2		17,4	-	-
proMMP-9		23,1 ± 19,5	-	-

Nach Ermittlung von Bindungsstärken und der Identifizierung des Kollagenmimetikums (GPO)₁₀ als potentem Inhibitor der (pro)MMP-Kollagen I-Bindung wurde der Einfluss des verwendeten Puffersystems auf das Bindungsverhalten untersucht. Dies sollte insbesondere unter dem Aspekt der physiologischen Relevanz der Messdaten erfolgen.

4.1.3.1 Gelatinasebindung an Kollagen I in Tris-Puffer

Matrix-Metalloproteinasen benötigen die Verfügbarkeit divalenter Kationen für ihre enzymatische Aktivität. Um das verwendete Puffersystem physiologischen Bedingungen anzunähern, wurden die Biacore-Versuche analog zu den Versuchen in PBS/0,05% Tween20-Puffer, mit einem Ca²⁺-haltigen physiologisch ähnlichem Tris-Puffer durchgeführt (siehe Tab. 2, S. 23). Mehrere (pro)MMP-2-Proben wurden in Tris-Puffer über den mit Kollagen I-immobilisierten Chip gegeben. Die für proMMP-2 erhaltene Dissoziationskonstante entsprach etwa dem 250fachen des in PBS-Puffer erhaltenen Wertes (**Tab. 5B**), also einer verminderten Bindungsstärke. Ein weiterer Unterschied zeigte sich im Kurvenverlauf der erhaltenen Sensorgramme. Im Gegensatz zur Messung in PBS-Puffer zeigte das Bindungssignal in Tris-Puffer bei proMMP-2 und MMP-2 ein Absinken unter die Nulllinie: bei proMMP-2 nur schwach während der Dissoziationsphase, bei MMP-2 dagegen zeigte sich schon nach kurzer Assoziation eine deutliche Abnahme des Bindungssignals (**Abb. 20**). Das dadurch für MMP-2 erhaltene atypische Sensorgramm (vgl. Abb. 12) lies keine Auswertung zu. Der Signalabbau lässt sich nur mit einem Verlust an immobilisiertem Kollagen I erklären, vermutlich durch kollagenolytische Aktivität der MMPs gegenüber der Kollagen I-Matrix.

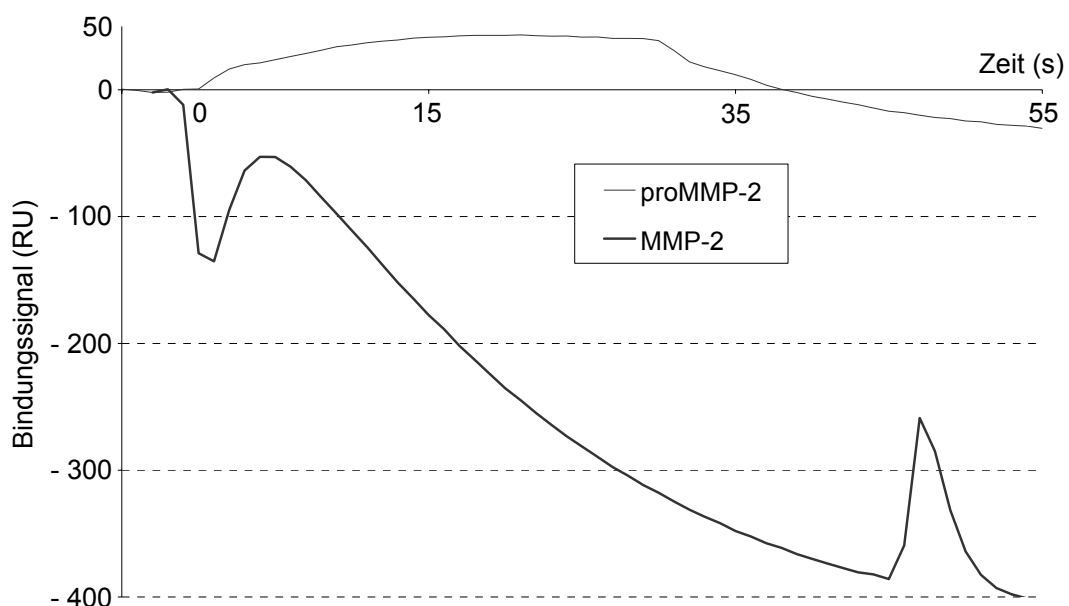


Abbildung 20: Repräsentatives Sensorgramm der Interaktion von in Tris-Puffer gelöstem proMMP-2 und MMP-2 mit einer Kollagen I-Matrix. 100-250 nM proMMP-2/MMP-2 wurden bei 25°C und einer

Ergebnisse

Flussrate von 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ in Tris-Puffer über den Chip gegeben. ProMMP-2 zeigte eine repräsentative Bindungskurve. Schwache katalytische Aktivität wurde durch das Absinken des RU-Signals unter die Nulllinie deutlich. MMP-2 dagegen zeigte nach schwacher Assoziation einen stärkeren Abfall des Bindungssignals, also höhere kollagenolytische Aktivität gegenüber der Kollagen I-Matrix ($n = 2$).

Wie für proMMP-2 wurde auch die Kollagen I-Bindung von proMMP-9 in Tris-Puffer untersucht (**Abb. 21**). Die proMMP-9–Kollagen I-Interaktion zeigte eine Dissoziationskonstante der gleichen Größenordnung wie für proMMP-2, aber um das 190fache über dem in PBS-Puffer erhaltenen K_D -Wert (**Tab. 5B**). Auch der Kurvenverlauf des MMP-9-Bindungssignals zeigte eine (gegenüber MMP-2 deutlich schwächere) Abnahme unter die Nulllinie und damit den Abbau von immobilisiertem Kollagen I auf dem Chip. Die Signalabnahme bei MMP-9 betrug nur 5-7 Resonanz-Einheiten (RU), während sie bei MMP-2 im gleichen Messzeitraum im Bereich von ca. 400 RU lag (siehe Abb. 20). Aufgrund des atypischen Kurvenverlaufs (s.o.) konnte auch für aktiviertes MMP-9 keine K_D -Wert-Bestimmung durchgeführt werden.

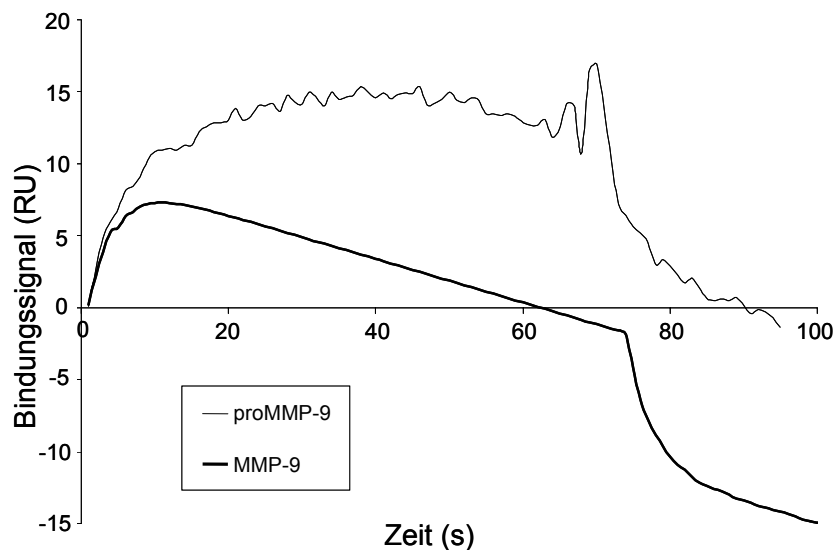


Abbildung 21: Bindungskurven von proMMP-9/MMP-9 an Kollagen I in Tris-Puffer. ProMMP-9 zeigte nach der Assoziationsphase eine Gleichgewichtseinstellung und eine Dissoziationsphase. MMP-9 dagegen zeigte nach kurzer Assoziationsphase einen schwachen Abbau des auf dem Chip immobilisierten Kollagen I ($n = 2$).

Die Ergebnisse zeigten eine 190-250fach schwächere Kollagenbindung der Gelatinasen in Tris-Puffer gegenüber der Messung in PBS/0,05% Tween20-Puffer. Dies lieferte einen ersten Hinweis auf den möglichen Einfluss von der pufferabhängigen Konformation bzw. Aktivität der MMPs auf deren Bindung.

4.1.4 Modulation der Gelatinase - Kollagen I-Bindung durch das Kollagenmimetikum (GPO)₁₀ in Tris-Puffer

In PBS/0,05% Tween20 und Tris-Puffer konnte gezeigt werden, dass die Proformen der Gelatinasen an Kollagen I binden (Kap. 4.1.2 & 4.1.3). In PBS/0,05% Tween20 wurde zudem gezeigt, dass (GPO)₁₀ ein kompetitiver Inhibitor der proMMP–Kollagen I-Bindung ist (Kap. 4.1.3). Im Folgenden wurde untersucht, ob dies auch unter mehr physiologischen Bedingungen in Tris-Puffer möglich ist. ProMMP-2/-9 wurden, gelöst in Tris-Puffer, zusammen mit einem 10fachen molaren (GPO)₁₀-Überschuss über den Kollagen I-Chip gegeben. Dabei zeigte sich für das proMMP-2/(GPO)₁₀-Gemisch ein ähnlicher Kurvenverlauf wie für das aktivierte MMP-2 ohne (GPO)₁₀-Zugabe (**Abb. 22A**). Die Anwesenheit von (GPO)₁₀ bewirkte also eine Aktivierung des proMMP-2, was dann zu einer Degradation des immobilisierten Kollagen I auf dem Chip führte. Ein Vergleich des Verlaufs des proMMP-2+(GPO)₁₀-Bindungssignals mit dem von direkt aktiviertem MMP-2 zeigte, dass ungefähr 20% des Enzyms durch (GPO)₁₀ aktiviert worden waren. Dies war erkennbar an dem im gleichen Zeitraum weniger starken Matrix-Abbau auf dem Chip: ca. 80 RU bei proMMP-2 gegenüber ca. 400 RU bei MMP-2 (**vgl. Abb. 20 u. 22A**).

Die (GPO)₁₀-Zugabe zu proMMP-9 blockierte die Bindung an den Liganden Kollagen I. Im Gegensatz zu den Daten mit proMMP-2 bewirkte die (GPO)₁₀-Zugabe zu proMMP-9 keine Degradation von immobilisiertem Kollagen I im beobachteten Zeitraum von 40s. Stattdessen verlief das Bindungssignal auf der Nulllinie. Es wurde also in Gegenwart von (GPO)₁₀ keine kollagenolytische Aktivität beobachtet, aber auch keine Assoziation von proMMP-9 an Kollagen I (**Abb. 22B**).

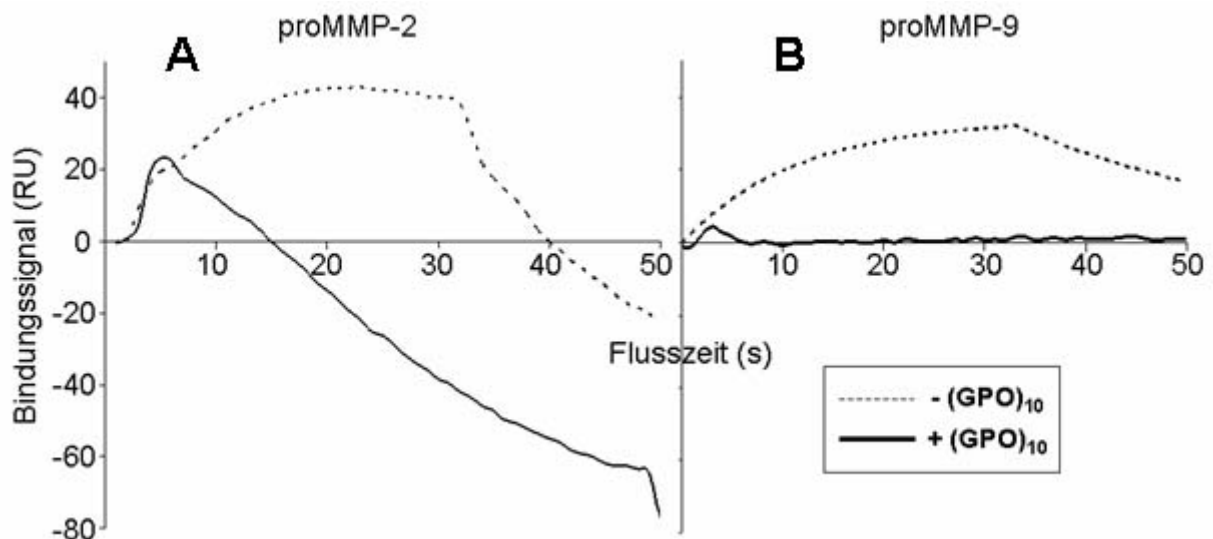


Abbildung 22: Einfluss von (GPO)₁₀ auf die Kollagen I-Bindung der Proformen der Gelatinasen. ProMMP-2 / -9 wurden in Tris-Puffer über einen mit Kollagen I-beschichteten Sensor-Chip gegeben. Alternativ wurde den MMPs jeweils ein 10facher molarer Überschuss an (GPO)₁₀-Molekülen beigemischt. Das geänderte Bindungsverhalten wird an den divergenten Kurvenverläufen deutlich (n = 4).

Wie aus den vorangegangenen Experimenten deutlich wurde, musste für die Bestimmung von Bindungsdaten im Tris-Puffer die Aktivierung bzw. die Aktivität der Gelatinasen inhibiert werden (PBS-Puffer). Nur dann war eine Bestimmung der kinetischen Bindungsdaten von MMP-2 sowie der proMMP-2/(GPO)₁₀-Mischung möglich.

4.1.5 Bindung von proMMP-2/MMP-2 an Kollagen I unter Ausschluss kollagenolytischer Effekte: Zugabe des Inhibitors Ro28-2653

(GPO)₁₀-vermittelte Bindungsmodulationen ließen sich nur unter Ausschluss von Aktivierungs-/Aktivitätseffekten von (pro)MMP-2 untersuchen, weshalb der MMP-2-spezifische Inhibitor Ro28-2653 eingesetzt wurde. Ro28-2653 weist eine Struktur auf, die spezifisch an das aktive Zentrum des MMP-2-Moleküls angepasst ist. „Exosites“ (CBD) werden nicht beeinflusst [162].

Nach Inhibition der enzymatischen Aktivität konnten auch in Tris-Puffer Bindungen von proMMP-2/MMP-2 an Kollagen I vermessen werden, ohne dass ein Matrixabbau stattgefunden hätte. Es bestätigten sich die Vorergebnisse, dass das Zymogen deutlich stärker an Kollagen I bindet als die aktivierten Gelatinasen (**Abb. 23, Tab. 6**). Der Zusatz eines 10fachen molaren Überschusses an (GPO)₁₀ zu pro- und MMP-2 bewirkte eine verminderte Kollagen I-Bindung, die sich durch schwächere Assoziation bzw. eine

Zunahme der K_D -Werte darstellte (Tab. 6, Abb. 23). Insgesamt zeigten die K_D -Werte eine $(GPO)_{10}$ -vermittelte Zunahme, d.h. eine Abnahme der Bindungsstärke bei proMMP-2 um das 4fache und bei MMP-2 um den Faktor 10 (Tab. 6). Der in Anwesenheit von $(GPO)_{10}$ ermittelte K_D -Wert von proMMP-2 lag dabei in der gleichen Größenordnung (ca. $2,5 \mu\text{M}$) wie der K_D -Wert von MMP-2 alleine.

Tabelle 6: Kinetische Daten der Bindung von proMMP-2 und MMP-2 an Kollagen I unter physiologischen Bedingungen (in Ca^{2+} -haltigem Tris-Puffer) nach Inhibition enzymatischer Aktivität ($n = 6$).

Bindung an Kollagen I nach Zugabe von Ro28-2653

	- $(GPO)_{10}$		+ $(GPO)_{10}$	
	k_d (s^{-1})	K_D (μM)	k_d (s^{-1})	K_D (μM)
proMMP-2	0,14	$0,70 \pm 0,40$	0,01	$2,57 \pm 1,50$
MMP-2	0,11	$2,51 \pm 0,30$	0,06	$27,1 \pm 9,00$

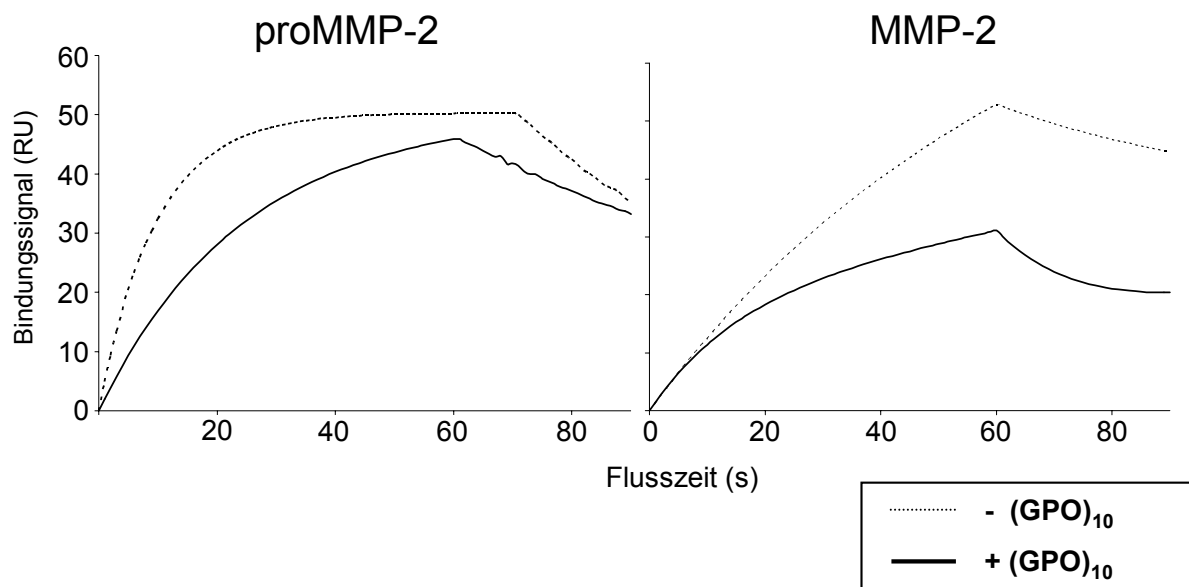


Abbildung 23: $(GPO)_{10}$ schwächt die Kollagen-Bindung von proMMP-2 und MMP-2 nach Inhibition der enzymatischen Aktivität 100 nM proMMP-2/MMP-2 alleine oder mit einem 10fachen $(GPO)_{10}$ -Überschuss wurden zusammen mit dem MMP-Inhibitor Ro28-2653 in Tris-Puffer über einen mit Kollagen I-beschichteten CM5-Sensor-Chip gegeben. ProMMP-2 zeigte eine stärkere Kollagen I-Bindung als

MMP-2. Die Zugabe von (GPO)₁₀ bewirkte eine jeweilige Schwächung der Assoziation sowie der Bindungsstärke insgesamt. Dargestellt sind jeweils zwei repräsentative Kurven (n = 6).

Ein Vergleich der in PBS-Puffer erhaltenen Daten (Tab. 5A, S. 53) der proMMP-2-Kollagen I-Bindung \pm (GPO)₁₀ mit denen in Tris-Puffer+Ro28-2653 (Tab. 6), zeigte jeweils stärkere Bindungen (also niedrigere K_D -Werte) in PBS-Puffer. In beiden Puffersystemen war die MMP-Aktivität inhibiert. Die Bindungsstärke lag in PBS-Puffer bei proMMP-2 um den Faktor 10 und nach (GPO)₁₀-Zusatz um den Faktor 26 über der in Tris-Puffer+Ro28-2653 gemessenen Bindungsstärke. Bei aktiviertem MMP-2 war der Unterschied noch deutlicher. Zeigte MMP-2 in PBS-Puffer eine 15fach stärkere Bindung gegenüber dem Wert in Tris-Puffer+Ro28-2653, lag der Unterschied nach (GPO)₁₀-Zusatz um den Faktor 130.

4.2 ProMMP-2 bindet an Kollagen in fibrotischem Lebergewebe und kann durch (GPO)₁₀ freigesetzt werden

Im Hinblick auf eine Anwendung von (GPO)₁₀ als Modulator der Gelatinasen-Kollagen Bindung bzw. der MMP-Aktivierung sollte (GPO)₁₀ in den folgenden Versuchsreihen in *in situ* Experimenten eingesetzt werden.

Als erstes wurden die (GPO)₁₀-vermittelten Effekte auf die Bindung von proMMP-2 an humanes zirrhotisches Lebergewebe untersucht.

Sirius-Rot-Anfärbung von Kollagen in den verwendeten Gewebeproben zeigte deutlich in das Gewebe eingelagerte kollagene Stränge (**Abb. 25A**). Mit dem Fluorophor Cy2-markiertes proMMP-2 zeigte eine hohe Bindungspräferenz an die kollagene Struktur (**Abb. 25B**). Vorinkubation des Schnittes selbst bzw. von 0,83 μ M proMMP-2 im Eppendorf-Reaktionsgefäß mit jeweils 8,3 μ M (GPO)₁₀ bewirkte dagegen eine nahezu vollständige Bindungsinhibition (**Abb. 25C**). In **Abb. 25D** wurde vorgebundenen Cy2-markiertes proMMP-2 (wie in **Abb. 25B**) mit (GPO)₁₀ nachbehandelt. (GPO)₁₀ bewirkte die Ablösung des zuvor Kollagen-gebundenen proMMP-2.

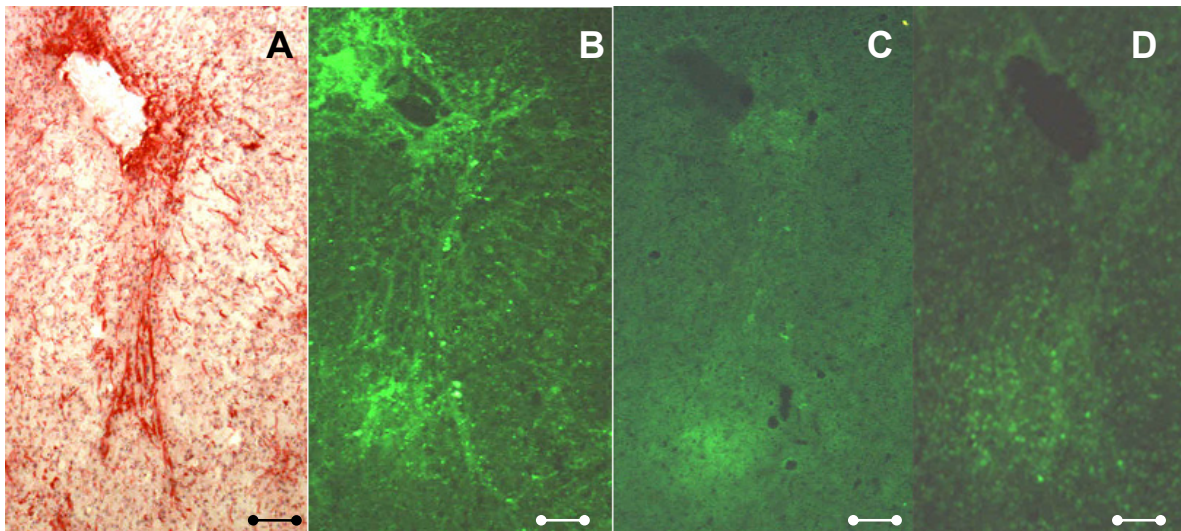


Abbildung 25: Kollagenspezifische Bindung von proMMP-2 auf zirrhotischem Lebergewebe - (GPO)₁₀-vermittelte Bindungshemmung/-lösung. Gefrierschnitte von humaner zirrhotischer Leber wurden mit Sirius-Rot Kollagen-gefärbt (A). Bindungsversuche von Cy2-markiertem proMMP-2 wurden mit Cy2-markiertem proMMP-2 alleine (B) und nach Vorinkubation mit einem 10fachen molaren (GPO)₁₀ Überschuss (C) in Tris-Puffer durchgeführt. Durch Nachinkubation von (B) für 2 h mit (GPO)₁₀ konnte gebundenes proMMP-2 aus der Kollagenbindung gelöst werden (D). Eine Puffernachbehandlung ohne (GPO)₁₀ zeigte keine Ablösung. Die Schnitte wurden durch Licht- und Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet. (●—●) = 200 µm.

Der kompetitive Inhibitor der proMMP-2–Kollagen-Bindung (GPO)₁₀ konnte *in situ* Leberkollagen-assoziiertes proMMP-2 aus der Bindung lösen.

Unter Einbeziehung der vorherigen Ergebnisse ist davon auszugehen, dass der Prozess der Bindungslösung zum einen durch (GPO)₁₀-vermittelte Verdrängung des proMMP-2 und zum anderen durch proMMP-2-Aktivierung und damit einhergehender Bindungsschwächung und/oder Kollagenabbau bewirkt wird.

Ziel der weitergehenden Versuche war die direkte Untersuchung der (GPO)₁₀-vermittelten Aktivitätssteigerung von (pro)MMP-2.

4.3 Einfluss von (GPO)₁₀ auf die Gelatinase-Aktivität

In den vorangegangenen Biacore-Experimenten, die zur Ermittlung von kinetischen Bindungsparametern und K_D-Werten dienten, trat das unerwartete Phänomen der Ligandendegradation (Kollagen I auf dem Chip) durch aktiviertes MMP-2 auf. In weiterführenden Versuchen sollten die Zusammenhänge zwischen Aktivität und

Kollagen-Bindung unter Einfluss von $(\text{GPO})_{10}$ durch Nutzung von Gelatinase-spezifischen Fluoreszenz-Substraten näher charakterisiert werden.

Die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 wurden mit einem spezifischen, fluorimetrischen Substrat inkubiert, wobei durch erhöhte Gelatinase-Aktivität auch mehr Fluorophore des Substrates freigesetzt und als zunehmendes Fluoreszenz-Signal erfasst werden konnten.

4.3.1 $(\text{GPO})_{10}$ setzt Kollagen I-gebundenes proMMP-2/MMP-2 frei und erhöht dessen Aktivität

Der Umsatz von fluorimetrischem Substrat in Gegenwart von proMMP-2 zeigte auf BSA- und Kollagen I-Beschichtung nach etwa 10-20 min eine lineare Zunahme, die nach ca. 1 h abflachte und ein Maximum erreichte (**Abb. 24A u. 24B**). Dabei ist die Aktivität bzw. die Aktivitätszunahme der eigentlich inaktiven Proformen auf den Vorgang der Autoaktivierung zurückzuführen, beschleunigt u.a. durch die Versuchstemperatur von 37°C. Die aufgrund enzymatischer Aktivität bewirkte Fluorophorfreisetzung durch MMP-2 dagegen erreichte eine maximale Steigung ohne vorherige „Anlaufphase“ (**Abb. 24C**).

Das Aktivitätsmaximum von proMMP-2 ohne $(\text{GPO})_{10}$ -Zusatz auf der Kollagen I-Beschichtung (1 $\mu\text{g}/\text{Loch}$) wurde nach 120 min erreicht und lag bei 400 Fluoreszenzeinheiten (**Abb. 24B**). Auf BSA wurde das Maximum nach ca. 110 min erreicht und lag bei ca. 700 Fluoreszenzeinheiten, also um 75% erhöht (**Abb. 24A**). Der Zusatz von $(\text{GPO})_{10}$ bewirkte auf Kollagen I und BSA eine Erhöhung des Fluoreszenzmaximums (vergleiche dicke mit dünner Kurve in **Abb. 24A u. 24C**). Auf Kollagen I um 50% auf 600 Fluoreszenzeinheiten, auf BSA um 10% auf 780 Fluoreszenzeinheiten. Die Geschwindigkeit des Substratumsatzes (die Steigung des Fluoreszenzsignals) auf BSA wurde nicht beeinflusst. Auf Kollagen I zeigte sich eine geringe Zunahme der Geschwindigkeit (**Abb. 24B**).

Auch aktiviertes MMP-2 zeigte in Gegenwart von immobilisiertem Kollagen I eine 25%ige Inhibition der enzymatischen Aktivität gegenüber der BSA-Beschichtung (nicht gezeigt). $(\text{GPO})_{10}$ bewirkte bei MMP-2 eine 18%ige Erhöhung des Fluoreszenzmaximums von 550 auf 650 Fluoreszenzeinheiten (**Abb. 24C**). Der Zeitpunkt des Erreichens des Fluoreszenzmaximums änderte sich nicht, die Kinetik des Substratumsatzes von MMP-2 wurde nicht beeinflusst.

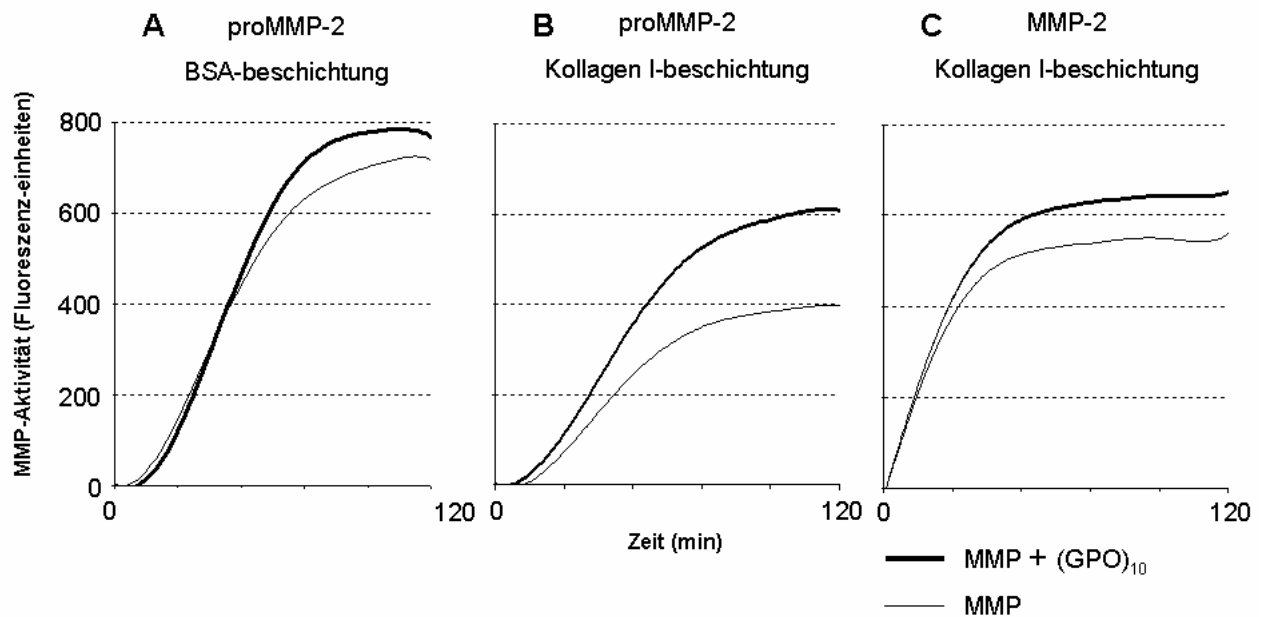


Abbildung 24: $(GPO)_{10}$ steigert die enzymatische Aktivität von (pro)MMP-2. ProMMP-2 (A, B) und MMP-2 (C) wurden mit einem MMP-2-spezifischen Fluoreszenzsubstrat inkubiert. Die Löcher waren mit BSA (A) bzw. mit Kollagen I (B, C) beschichtet. Die Kollagen I-Beschichtung führte zu weniger Substratumsatz. $(GPO)_{10}$ -Zusatz erhöhte den Substratumsatz auf BSA und insbesondere auf Kollagen I. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus $n = 4$ Versuchen.

Entsprechende Versuchsreihen mit proMMP-9 und MMP-9 zeigten keine $(GPO)_{10}$ -vermittelten Effekte auf die Aktivität.

Sowohl die pro- als auch die aktivierte Form von MMP-2 zeigten in Gegenwart von immobilisiertem Kollagen I einen geringeren Substratabbau der Enzyme im Vergleich zu Bedingungen, in denen das in Bindungsstudien „neutrale“ BSA immobilisiert wurde. Dies ist vermutlich auf eine Wechselwirkung der MMPs mit Kollagen I zurückzuführen.

Das Kollagenmimetikum $(GPO)_{10}$ führte in jedem Fall zu erhöhtem (maximalem) Substratabbau, unabhängig vom Aktivierungszustand und der Bindung an eine (Kollagen I)-Matrix. In Gegenwart von immobilisiertem Kollagen I war die maximal erreichbare Aktivität aber immer ca. 30% niedriger als ohne Kollagen I. Die durch $(GPO)_{10}$ vermittelte Aktivitätszunahme von MMP-2 beruht also nicht ausschließlich auf dem Vorgang der Freisetzung, sondern wahrscheinlich auch auf einer direkten Modulation der MMP-Aktivität.

Vor dem Hintergrund eines potentiellen therapeutischen Einsatzes von (GPO)₁₀ sollten dessen MMP-modulierende Effekte auch in einem biologischen System *in vitro* (Zellkultur) untersucht werden.

4.3.2 (GPO)₁₀ und MMP-2 stimulieren die Proliferation von hepatischen Sternzellen (CFSC)

Zunächst wurde der Einfluss von MMP-2 und (GPO)₁₀ auf die Proliferation der hepatischen Sternzelllinie CFSC (Ratte) untersucht. *Benyon et al.* konnten bereits zeigen, dass die Inhibierung von MMP-2 im Serum zu einer Hemmung der DNS-Neusynthese in hepatischen Sternzellen führt [129]. Eine mögliche Schlussfolgerung wäre, dass MMP-2 als auto- und parakriner Faktor Proliferations-stimulierende Eigenschaften besitzt.

CFSC wurden mit proMMP-2, MMP-2 sowie (GPO)₁₀ behandelt und die Proliferation mittels [³H]-Thymidin-Einbau bestimmt. Die **Abbildungen 26 u. 27** zeigen die Proliferationsdaten der unterschiedlich behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Alle Zellen wurden vor der Zugabe der MMPs Serumdepriviert. Als Vergleichswert diente die jeweils eingezeichnete gestrichelte Linie des erhaltenen Maximaleffektes durch Behandlung mit 10% FKS. Die Proliferation konnte dabei gegenüber den unbehandelten Zellen um den Faktor $1,55 \pm 0,03$ gesteigert werden. Die Behandlung mit MMP-2 führte zu einer signifikanten ($P < 0,001$) Proliferations-zunahme um den Faktor $1,20 \pm 0,08$ (**Abb. 26**), was ca. 35% des erhaltenen Maximalwertes durch 10% FKS entsprach. Durch Inkubation mit (GPO)₁₀, welches im Vergleich zu MMP-2 in einem 10fachen molaren Überschuss eingesetzt wurde, konnte die Proliferation um das $1,12 \pm 0,07$ fache gesteigert werden, was 22% des Maximalwertes entsprach. Das „Kontrollpeptid“ GAP dagegen bewirkte keinen Effekt auf die Proliferation (nicht gezeigt). Das Gemisch von MMP-2 und (GPO)₁₀ bewirkte keine weitere Proliferations-steigerung: die Proliferation war um den Faktor $1,17 \pm 0,09$ erhöht (**Abb. 26**).

Zusätzlich wurden die CFSC auch mit proMMP-2 sowie einem Gemisch aus proMMP-2 und (GPO)₁₀ behandelt. Die Behandlung mit proMMP-2 bewirkte eine Proliferations-stimulation auf das $1,09 \pm 0,06$ fache gegenüber unbehandelten Zellen, also 15,5% der maximalen Proliferation durch Behandlung mit 10% FKS. Die Behandlung mit dem Gemisch aus proMMP-2 sowie (GPO)₁₀, auch hier wieder gegenüber proMMP-2 im

10fachen molaren Überschuss, bewirkte eine signifikante ($P < 0,05$) Steigerung der Proliferation auf das $1,17 \pm 0,09$ fache (**Abb. 26**) gegenüber unbehandelten Zellen bzw. 31,2% der maximalen Proliferation. Das proMMP-2-(GPO)₁₀-Gemisch bewirkte damit die annähernd gleiche Proliferations-stimulation wie APMA-aktiviertes MMP-2.

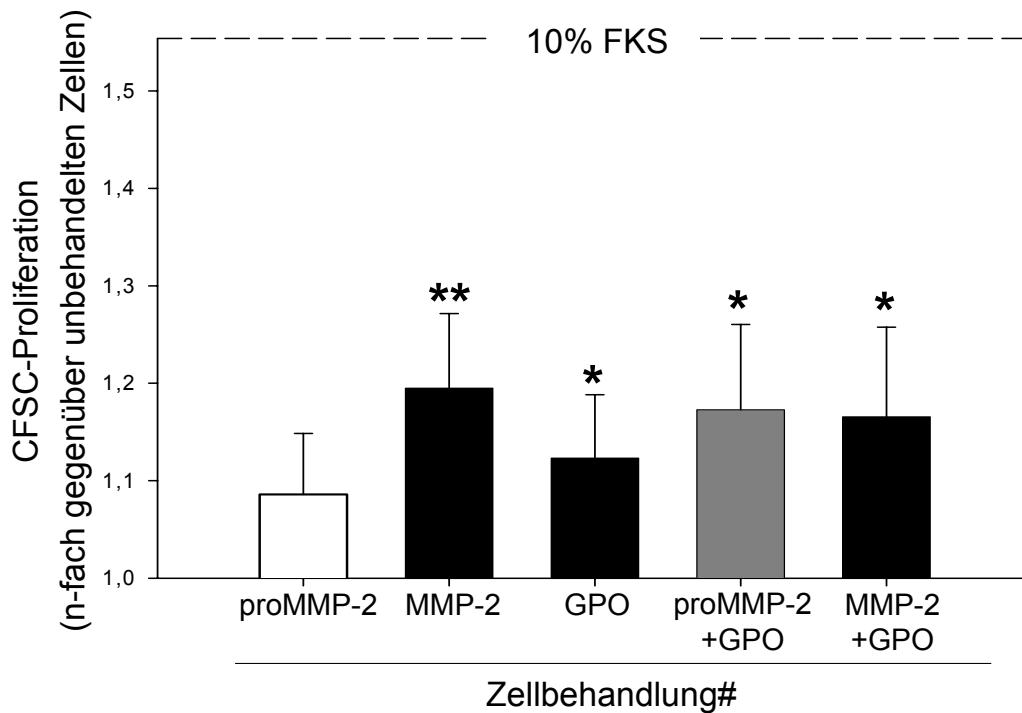


Abbildung 26: MMP-2 und (GPO)₁₀ steigern die Proliferation von CFSC *in vitro*. Ratten-CFSC wurden, wie in Kap. 3.5.4 beschrieben, mit je 17 nM MMP-2 & proMMP-2 sowie 170 nM (GPO)₁₀ (Kontrolle: 170 nM GAP) behandelt. Die dargestellten Werte wurden relativ zu den Werten der unbehandelten Zellen unter Reduktionsbedingungen gesetzt (= 1,0). Das Diagramm zeigt die Mittelwerte aus $n = 6$ identischen Versuchsansätzen.

* / ** Signifikanz ($P < 0,05$ / $P < 0,001$) gegenüber unbehandelten Zellen (0,25% FKS)

Damit konnte zum ersten Mal direkt gezeigt werden, dass MMP-2-Protein Wachstumsstimulierend auf hepatische Sternzellen wirkt. Dies wiederum war ein Hinweis für die Freisetzung und/oder Aktivierung von zugesetztem und auch von den Zellen selbst produziertem, endogenem MMP-2 durch (GPO)₁₀, was in beiden Fällen zu einer gesteigerten DNS-Neusynthese der HSZ geführt hat.

4.3.2.1 Die (GPO)₁₀-induzierte Proliferation von CFSC-Zellen wird durch MMP-2 vermittelt

Um zu zeigen, dass der Proliferationsgewinn tatsächlich aufgrund von aktivem bzw. durch (GPO)₁₀-Behandlung aktiviertem MMP-2 zustande kam, wurde ein Gelatinase-spezifischer Inhibitor eingesetzt.

Durch Zugabe des MMP-2-Inhibitors GM6001 [166] (Ilomastat) zu (GPO)₁₀ konnte die (GPO)₁₀-vermittelte Proliferations-steigerung inhibiert werden (**Abb. 27**). Die CFSC zeigten trotz (GPO)₁₀-Zugabe zu GM6001 die gleiche Proliferation wie nach alleiniger GM6001-Behandlung der Zellen, also eine signifikant ($P < 0,001$) um $41,6 \pm 17,5\%$ verminderte Proliferation gegenüber unbehandelten Zellen.

Die Neutralisation des Inhibitors durch Zugabe von MMP-2-Protein führte zu einer wieder normalen Proliferation der CFSC. Im Vergleich zur Behandlung der Zellen mit GM6001 alleine bewirkte ein Gemisch aus GM6001, MMP-2 und (GPO)₁₀ eine signifikant gesteigerte Proliferation, die tendenziell auch höher als die der unbehandelten Zellen lag (auf den Faktor $1,09 \pm 0,10$ bzw. 16% des Maximalwertes) (**Abb. 27**). Das Kontrollpeptid GAP zeigte diesen Effekt nicht (nicht gezeigt).

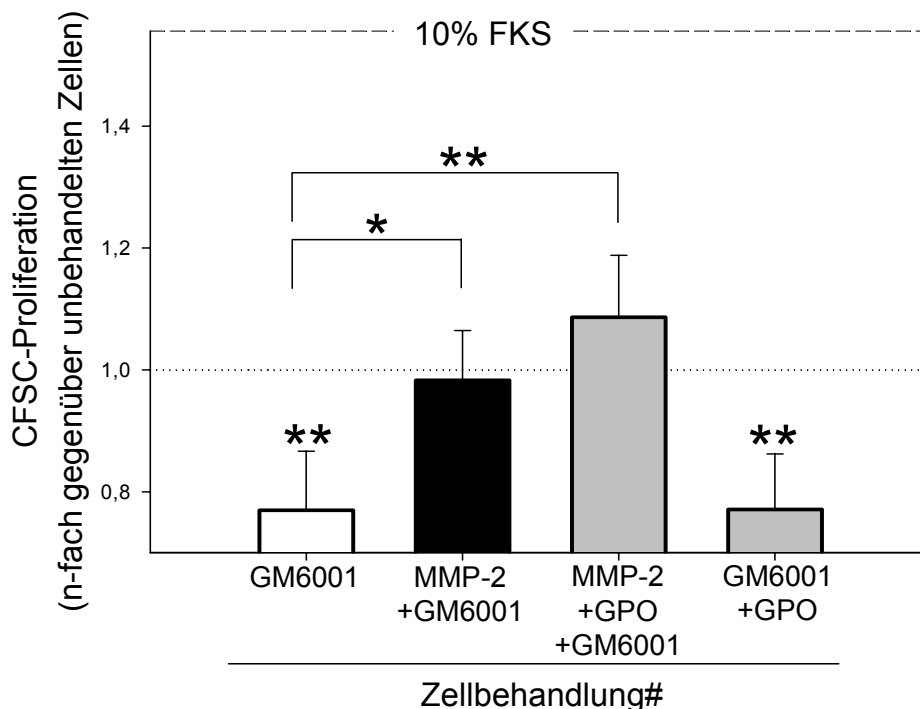


Abbildung 27: Neutralisation des über enzymatische MMP-2-Blockade erzeugten Proliferationsstopps durch Behandlung von CFSC mit MMP-2. CFSC wurden, wie in Kap. 3.5.4 beschrieben, mit $6,4 \mu\text{M}$ GM6001 [166], 17 nM MMP-2 sowie 170 nM (GPO)₁₀ behandelt. Die Aktivität

von MMP-2 mit der gleichen Konzentration konnte in einem Fluoreszenzversuch mit 50% der eingesetzten GM6001-Konzentration vollständig gehemmt werden. Alle Daten wurden in Relation zu den unbehandelten Zellen (= 1,0) gesetzt. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte aus $n = 6$ identischen Versuchsansätzen.

* / ** Signifikanz ($P < 0,05$ / $P < 0,001$) gegenüber GM6001-inhibierten Zellen; GM6001±GPO-behandelte Zellen zeigten einen signifikanten Unterschied gegenüber unbehandelten Zellen (0,25% FKS)

Wie schon von *Benyon et al.* [129] gezeigt und hier bestätigt, führte die Inhibition der enzymatischen Gelatinase-Aktivität zu einem Proliferationsblock der hepatischen Sternzelllinie. Dieser konnte tendenziell durch Zugabe von aktiviertem MMP-2-Protein und stärker noch durch Zugabe von (GPO)₁₀ aufgehoben werden. Die Ergebnisse aus den Biacore-Bindungsstudien (**Abb. 22A**), dem fluorimetrischen Aktivitäts-Assay (**Abb. 24**) sowie dem CFSC-Proliferations-Assay (**Abb. 26 u. 27**) ließen vermuten, dass (GPO)₁₀ seine Wirkung wahrscheinlich über die Aktivierung von endogenem proMMP-2 vermittelte. Dies wurde in einem Migrations-/Invasions-Assay näher untersucht.

4.3.3 Einfluss von (GPO)₁₀ und MMP-2 auf die HT1080-Migration/Invasion *in vitro*

HT1080-Zellen exprimieren MMP-2 sowie andere Matrix-Metalloproteinasen und können so in umlagerndes Gewebe invadieren/migrieren. Ziel des Assays war die Untersuchung einer möglichen Zunahme der Migration/Invasion der Tumorzellen durch (GPO)₁₀-induzierte Aktivierung bzw. Freisetzung von endogenem proMMP-2. Dies wäre ein weiterer Beleg für die MMP-2 spezifische Wirkung von (GPO)₁₀ auf MMP-2 *in vitro*.

4.3.3.1 (GPO)₁₀ und MMP-2 wirken Migrations-fördernd auf HT1080-Zellen *in vitro*

In Versuchen mit einem Zellinvasions-Assay (s. Abb. 18, S. 49) und einem FKS-Konzentrationsgradienten von 0,25% - 10% bewirkte die Zugabe von (GPO)₁₀ eine Steigerung der Invasion auf das $1,21 \pm 0,04$ fache der unbehandelten Zellen (**Abb. 28**). Der MMP-Inhibitor GM6001 bewirkte eine Reduktion der Invasion um ca. 7%. Eine statistische Auswertung war aufgrund des begrenzten Datensatzes nicht möglich.

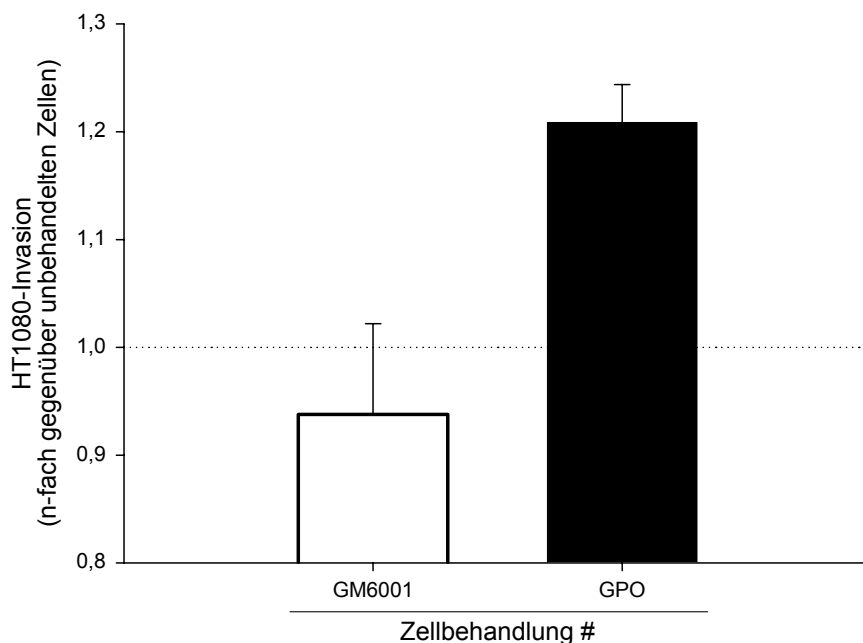


Abbildung 28: $(GPO)_{10}$ fördert die MMP-2-abhängige Invasion von HT1080-Zellen durch eine Basalmembran. In einem Zellinvasions-Assay wurden HT1080-Zellen mit 17 nM $(GPO)_{10}$ bzw. 6,4 μ M GM6001 in einem FKS-Konzentrationsgradienten von 0,25% - 10% behandelt. Die Behandlung mit $(GPO)_{10}$ führte im Vergleich mit unbehandelten Zellen zu einer gesteigerten Migration/Invasion um ca. 20%. Die Inhibition von MMPs mit dem Inhibitor GM6001 führte zu verminderter Migration/Invasion um ca. 7% ($n = 2$).

HT1080-Zellen zeigten in dem verwendeten FKS-Gradienten eine hohe Invasivität, die nur gering durch 6,4 μ M MMP-Inhibitor GM6001 reduziert bzw. durch $(GPO)_{10}$ -Zugabe gesteigert werden konnte. Es folgten weitere Versuche ohne FKS-Gradienten. Die MMP-Inhibition mit GM6001 bewirkte eine Invasionsabnahme um 20% gegenüber unbehandelten Zellen. Die Behandlung mit $(GPO)_{10}$ bzw. MMP-2 bewirkte eine Invasionsverstärkung um das $1,74 \pm 0,41$ - bzw. das $2,69 \pm 0,50$ fache, was 35% bzw. 80% des maximalen Wertes durch den 10% FKS-Gradienten entsprach, welcher eine Invasionsverstärkung um das 3,11fache bewirkte (**Abb. 29**).

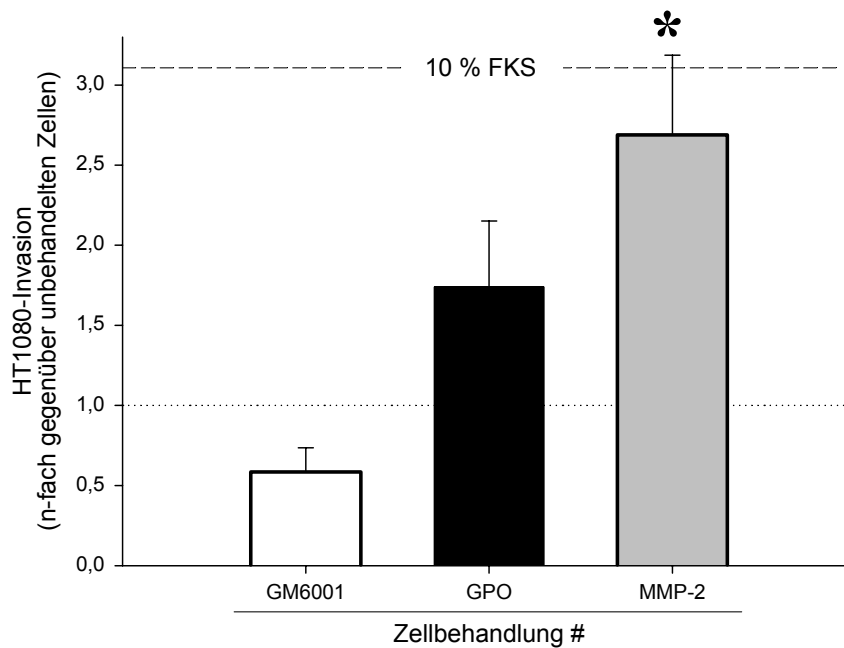


Abbildung 29: $(GPO)_{10}$ - und MMP-2-Behandlung fördern die Migration/Invasion von HT1080-Tumorzellen. In einem Zellinvasions-Assay wurden HT1080-Zellen mit 17 nM $(GPO)_{10}$, 6,4 μ M GM6001 bzw. 1,7 nM MMP-2 behandelt. Obere und untere Kammer enthielten bis auf die Positivkontrolle (unten 10% FKS) jeweils 0,25% FKS. Die Inhibition von MMP-2 führte zu einer Abnahme, die MMP-2-Zugabe zu einer verstärkten Migration/Invasion. Die Behandlung mit $(GPO)_{10}$ führte ebenfalls zu einer gesteigerten Migration/Invasion ($n = 3$).

* Signifikant ($P < 0,05$) gegenüber unbehandelten Zellen (1,0)

Zusammenfassend ergaben sich bezüglich der Gelatinasen und ihrer Wechselwirkung mit Molekülen der EZM folgende Ergebnisse:

1. Insbesondere die Proformen der Gelatinasen MMP-2 u. -9 binden an Kollagen I, den Hauptbestandteil der EZM.
2. Eine ca. 100fach stärkere Gelatinasen-Bindung konnte an das tripelhelikale Kollagenmimetikum $(GPO)_{10}$ beobachtet werden.
3. $(GPO)_{10}$ war in der Lage die Kollagenbindung der Gelatinasen zu schwächen.
4. $(GPO)_{10}$ wirkte zudem proMMP-2-aktivierend.
5. MMP-2-Zusatz bewirkte *in vitro* eine gesteigerte Proliferation und Migration/Invasion von mesenchymalen- und hepatischen Sternzellen.
6. Eine ähnliche Wirkung wurde durch Zugabe von $(GPO)_{10}$ alleine und in Kombination mit proMMP-2 bewirkt.

Teil II: KOLLAGENASEN

Neben den Gelatinasen kommt auch den Kollagenasen eine entscheidende Rolle im hepatischen Gewebsumbau im Rahmen der Fibrogenese bzw. Fibrolyse sowie weiteren pathologischen Vorgängen zu.

Zunächst wurden Bindungsstudien zur Identifizierung potenter Bindungspartner unter den Molekülen der extrazellulären Matrix durchgeführt.

4.4 Kollagen VI ist Bindungsligand aber nicht Substrat für Kollagenasen

In radioaktiven Bindungs-Assays mit immobilisierten EZM-Bestandteilen wurde die Bindung von radioaktiv markiertem Proformen der MMPs -1 und -8 an Kollagene und Kollagenketten untersucht. Dabei zeigten beide Kollagenasen eine hohe Bindungspräferenz für das tripelhelikale Kollagen VI-Fragment (KVI-F) (**Abb. 30**).

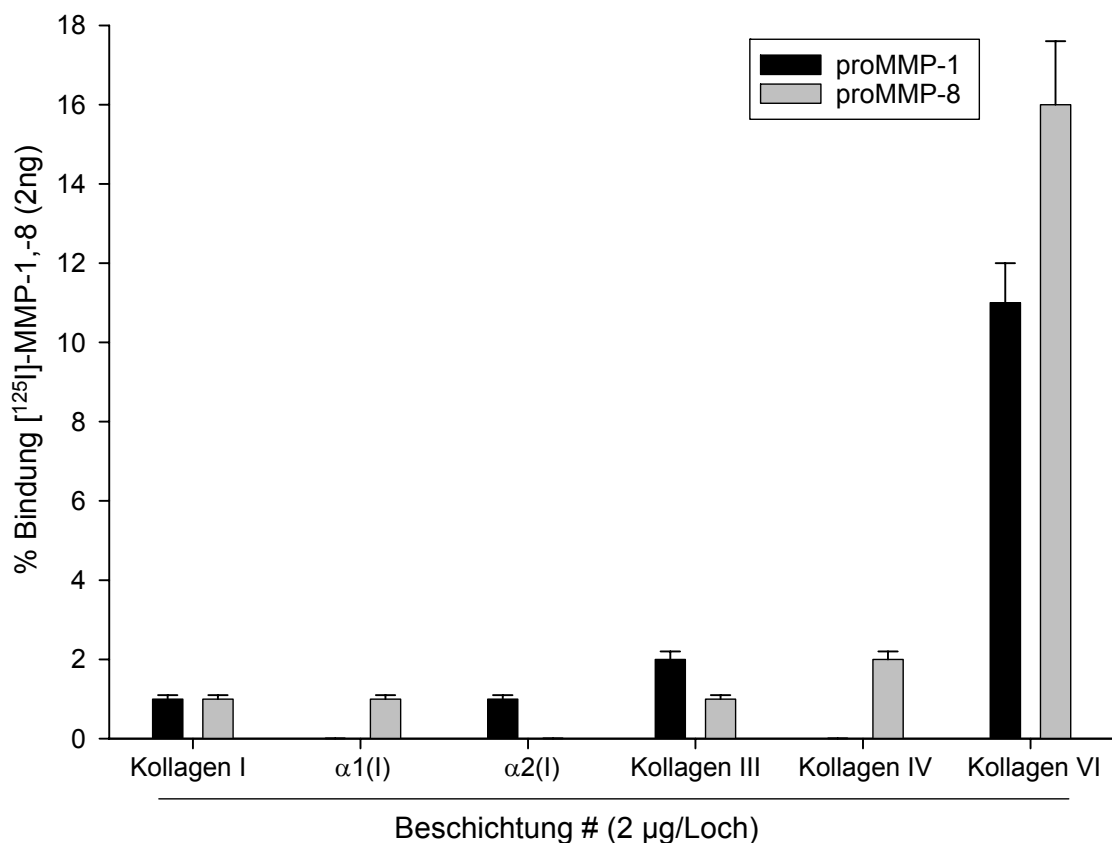


Abbildung 30: Die Matrix-Metalloproteinasen -1 u. -8 binden an tripelhelikales Kollagen VI. Mikrotiterplatten wurden mit Kollagenmolekülen der EZM beschichtet. Die $[^{125}\text{I}]$ -markierten proMMPs -1 und -8 wurden in PBS/0,05% Tween20-Puffer in der Mikrotiterplatte an die Beschichtungen gebunden. Nach Entfernung überschüssiger MMPs konnte durch eine γ -Zählung die Menge an gebundenen

Ergebnisse

Enzymen bestimmt werden. Das tripelhelikale Kollagen VI-Fragment wurde dabei als stärkster Bindungspartner identifiziert ($n = 2$).

Um die proMMP-Bindungsstellen auf dem KVI-F zu identifizieren, wurden die isolierten, durch Reduktion und Alkylierung gewonnenen kollagenen Abschnitte der KVI-Einzelketten ($\alpha 1(VI)$, $\alpha 2(VI)$) sowie das KVI-Kettengemisch (KVI r,a) in weiteren Bindungsversuchen eingesetzt. Der kollagene Abschnitt der $\alpha 2(VI)$ -Kette konnte als stärkster Bindungspartner für die proMMPs -1, -3 und -8 identifiziert werden (**Abb. 31**).

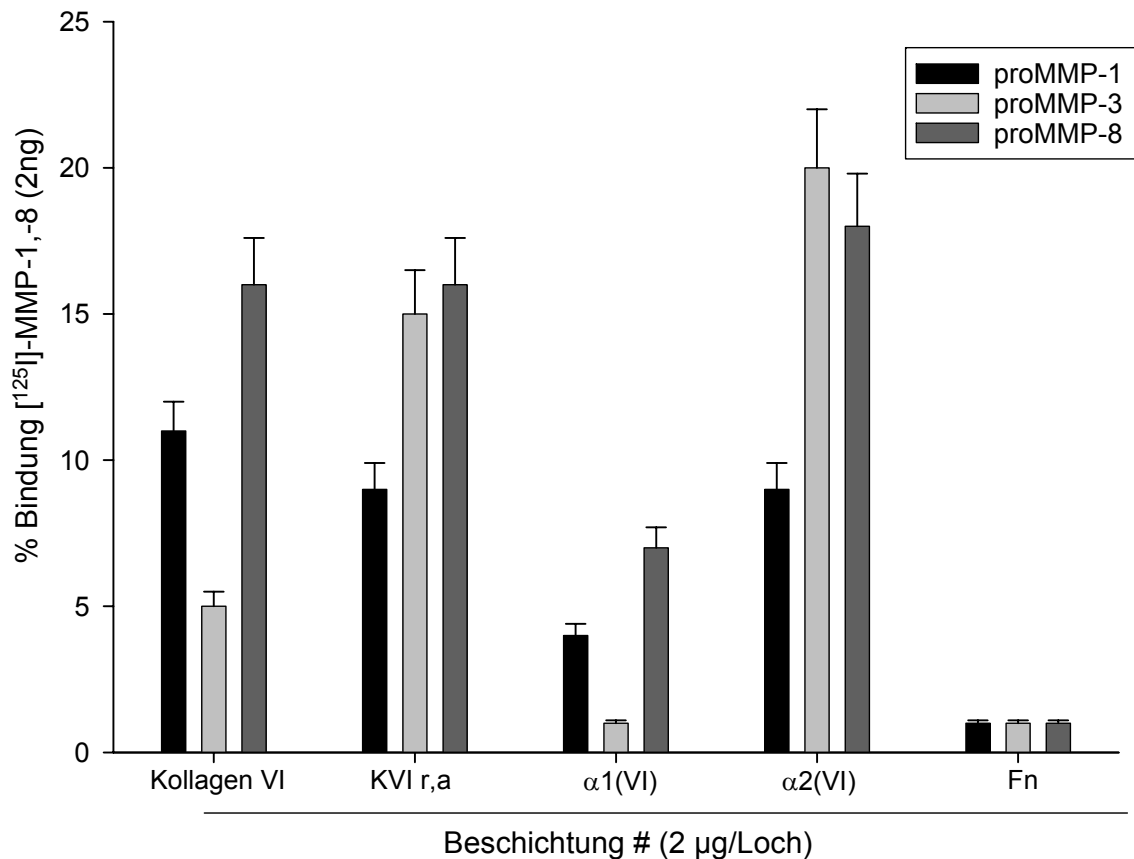


Abbildung 31: Die $\alpha 2(VI)$ -Kette ist extrazellulärer Ligand für die Kollagenasen proMMP-1, -3, -8. Das tripelhelikale KVI-Fragment, das KVI-Kettengemisch sowie die KVI-Einzelketten und Fibronectin (Fn) wurden in einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Die $[^{125}I]$ -markierten proMMPs -1, -3, -8 wurden in den beschichteten Löchern inkubiert. Nach Entfernung überschüssiger MMPs wurde durch eine γ -Zählung die Menge an gebundenen Enzymen bestimmt ($n = 2$).

Das höchste Bindungssignal für die eingesetzten Kollagenasen zeigte sich bei der $\alpha 2(VI)$ -Kette. In einem weiteren Festphasen-Assay sollten das Kollagen VI-Kettengemisch sowie die isolierten Einzelketten als Liganden einer Kollagenasenbindung, in diesem Fall radioaktiv markiertem proMMP-3, eingesetzt werden. Dabei wurde $[^{125}I]$ -markiertes proMMP-3 an die durch SDS-PAGE

aufgetrennten und auf Nitrozellulose übertragenen KVI-Einzelketten gebunden. **Abb. 32** zeigt das Ergebnis der autoradiographischen Auswertung. Die starke Bindungsaffinität von MMP-3 zu $\alpha 2(\text{VI})$ wurde bestätigt, die $\alpha 3(\text{VI})$ -Kette zeigte ein sehr schwaches Bindungssignal. Die $\alpha 1(\text{VI})$ -Kette dagegen zeigte keine Bindung, was die Ergebnisse der Mikrotiterplatten-Festphasenassays bestätigte.

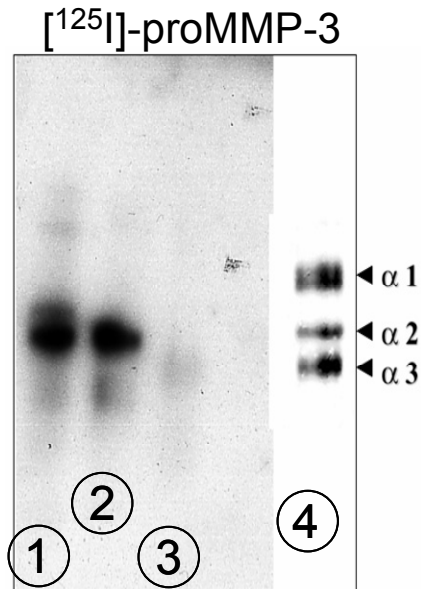


Abbildung 32: Die $\alpha 2(\text{VI})$ -Einzelkette enthält ein Bindungsmotiv für proMMP-3. 2 μg der isolierten KVI-Einzelketten wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet (1 = $\alpha 2(\text{VI})$ -Kette; 2 = KVI r,a; 3 = $\alpha 1(\text{VI})$ -Kette; 4 = KVI-Ketten-Kontrolle). Nach Inkubation mit 0,27 μCi radioaktiv markiertem $[^{125}\text{I}]\text{-proMMP-3}$ zeigte eine radiographische Auswertung die hohe Bindungsaffinität an die $\alpha 2(\text{VI})$ -Kette.

4.4.1 Bestimmung kinetischer Parameter der Kollagenasen-Bindung an die $\alpha 2(\text{VI})$ -Kette mittels Biacore

In einem nächsten Schritt sollten nun die Bindungsstärken der Kollagenasen an den kollagenen Abschnitt der $\alpha 2(\text{VI})$ -Kette näher untersucht werden. Die Kollagenasen wurden in Biacore-Bindungsstudien mit der $\alpha 2(\text{VI})$ -Kette als Bindungspartner eingesetzt. Ziel war die Ermittlung von kinetischen Parametern inklusive der Bindungsstärke.

Im Gegensatz zu den Bindungsversuchen der Gelatinasen an die Kollagen I-Matrix traten bei pro- und aktivierter Form der Kollagenasen keine störenden, kollagenolytischen Effekte auf, was ein weiterer Beleg dafür war, dass KVI-F bzw. die $\alpha 2(\text{VI})$ -Kette nicht Substrat der Kollagenasen sind. Alle Versuche wurden in Tris-Puffer durchgeführt.

Tabelle 7: Bindungsstärken der Kollagenasen MMP-1/-3/-8/13 und Gelatinasen MMP-2/-9 an die immobilisierte $\alpha 2(VI)$ -Kette. Der kollagene Abschnitt der $\alpha 2(VI)$ -Kette wurde auf einem CM5-Sensorchip immobilisiert und die MMPs in Tris-Puffer über den Chip gegeben. Es zeigten sich keine kollagenolytischen Effekte.

	PRO-Form	Akt.-Form
	KD (nM)	KD (nM)
MMP-1	24,6 ± 11,2	130 ± 10,0
MMP-3	37,1 ± 27,5	130 ± 30,0
MMP-8	32,7 ± 16,6	4910 ± 1760
MMP-13	4,94 ± 2,84	160 ± 40,0
MMP-2	300 ± 200	2100 ± 2930
MMP-9	36,8 ± 14,0	190 ± 180

Die K_D -Werte für die $\alpha 2(VI)$ -Bindung von proMMP-1, -3 und -8 lagen im Bereich von 25-40 nM. ProMMP-13 zeigte eine 5-7fach stärkere Bindung (**Tab. 7**). Nach der MMP-Aktivierung wurden die MMP-1- und MMP-3-Bindungsstärken um den Faktor 4-5 erniedrigt, wesentlich stärker die von MMP-8 und MMP-13 (Faktor 50-100) (**Tab. 7**).

Die $\alpha 2(VI)$ -Bindung von proMMP-9 liegt mit einem K_D -Wert von $K_D = 36,8$ nM im Bereich der Kollagenasen. Eine Aktivierung führt zu einer Abnahme der Bindungsstärke um den Faktor 5. ProMMP-2 bindet um den Faktor 10 deutlich schlechter als die anderen MMPs. Eine Aktivierung führt zu einer Abnahme der Bindungsstärke um den Faktor 7. Alle erhaltenen Kurven ähnelten Abb. 12, auf die graphische Darstellung der Kurven wurde daher verzichtet. Es ergaben sich keine Besonderheiten (Kollagenolyse, etc.).

Bei analog durchgeführten Bindungsversuchen mit der katalytischen Domäne von MMP-13 konnte gezeigt werden, dass es keine Assoziation mit der $\alpha 2(VI)$ -Kette gibt.

Zwischen den Signalen der Mess- und Referenzzelle (siehe Abb. 14) zeigte sich kein Unterschied (nicht gezeigt).

4.5 Einfluss von Kollagen VI-Fragmenten auf die Kollagenaseaktivität

Nach Identifizierung von Kollagen VI-Fragmenten/-Ketten als wichtiger Bindungspartner der Kollagenasen wurde untersucht, in welchem Maß die Bindung Einfluss auf die Aktivität der Proformen sowie der APMA-aktivierten Kollagenasen hat. Zunächst wurde der sog. *Typ I Kollagenase Assay* eingesetzt.

4.5.1 Typ I Kollagenase Assay

Der *Typ I Kollagenase Assay* (Chemicon) beruht auf Spaltung von biotinyliertem Kollagen. Über die Freisetzung von biotinylierten Fragmenten kann mittels Biotin-bindender 96-Loch Mikrotiterplatte und entsprechender enzymatischer Farbreaktion die Aktivität der Kollagenasen bestimmt werden (Kap. 3.4.2).

Als erstes sollte der Effekt der Kollagen VI-Ketten auf die Autoaktivierung der Kollagenasen proMMP-1,-8,-13 untersucht werden. Dazu wurden die Proformen zusammen mit jeweils 10fachen molaren Überschüssen des tripelhelikalen Kollagen VI-Fragmentes (KVI-F), des KVI-Kettengemisches (KVI r,a) sowie der $\alpha 2$ -Kette von Kollagen VI ($\alpha 2(VI)$) inkubiert. Die Aktivität der eigentlich inaktiven Proformen ist wahrscheinlich auf teilweise Autoaktivierung (Temperatur, Gefrier-/Auftauvorgänge) zurückzuführen.

Bedingt durch die KVI-Zugabe zeigte sich eine geringere Autoaktivität im Vergleich zu den unbehandelten proMMPs (**Abb. 33**).

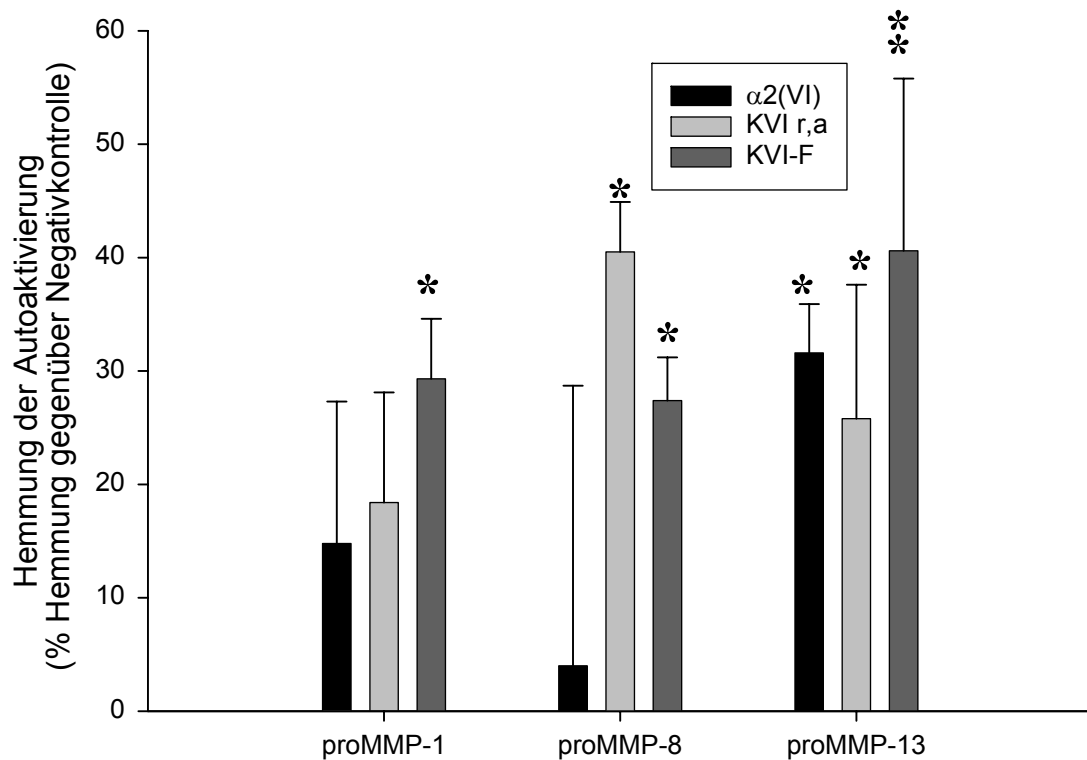


Abbildung 33: KVI-Fragmente hemmen den Prozess der Autoaktivierung der Kollagenasen. Die Proformen der Kollagenasen wurden mit einem jeweils 10fachen molaren Überschuss der KVI-Ketten/-Domänen zusammen mit einem biotinylierten Kollagenase-Substrat inkubiert. Über Freisetzung biotinylierter Fragmente kann die Aktivität bestimmt werden (n = 4).

* / ** Signifikanz (P<0,05 / P<0,001) gegenüber MMPs ohne KVI-Zusatz (= 0% Hemmung)

Bei **proMMP-1** bewirkte KVI-F die stärkste Autoaktivitätsreduktion mit einer Hemmung um 29%. Die $\alpha 2(VI)$ -Kette sowie das KVI-Kettengemisch bewirkten jeweils vergleichbare Aktivitätshemmungen um ca. 16%. Bei **proMMP-8** dagegen zeigte das Kettengemisch mit einer Hemmung um 41% den stärksten Effekt. Die Hemmung durch KVI-F lag mit 27% etwa auf dem gleichen Level wie bei proMMP-1. Die $\alpha 2(VI)$ -Kette zeigte mit einer Hemmung um 4% nur einen geringen Effekt, allerdings mit hoher Standardabweichung. **ProMMP-13** wurde mit einer Autoaktivitäts-reduktion um 41% am stärksten durch KVI-F gehemmt. Die $\alpha 2(VI)$ -Kette und das Kettengemisch KVI r,a bewirkten mit 31% bzw. 26% untereinander vergleichbare Minderungsraten (**Abb. 33**). Betrachtet man die $\alpha 2(VI)$ -vermittelten Effekte, so spiegeln sich die im Biacore-Versuch gefundenen Bindungsstärken auch in den Minderungsraten der Aktivitäten wider (vgl. Tab. 7, S. 72). Bei proMMP-13 zeigte sich die stärkste Aktivitätsminderung und die

stärkste Bindung an die $\alpha 2(VI)$ -Kette. Jeweils gefolgt von proMMP-1 und proMMP-8. Bindung und die Autoaktivierung bzw. –Aktivität der Proformen sind also gekoppelt.

Der gleiche Versuch wurde auch mit den aktivierten Kollagenasen MMP-1,-8,-13 durchgeführt. Zusätzlich wurde die katalytische Domäne von MMP-13 (kMMP-13) eingesetzt. Unter gleichen Bedingungen und bei gleichen eingesetzten, molaren Konzentrationen zeigte das APMA-aktivierte MMP-13 eine stärkere kollagenolytische Aktivität als kMMP-13. Es ergaben sich relative Extinktionswerte von **MMP-13 = 0,135** und **kMMP-13 = 0,214**, wobei ein niedriger Wert für höhere enzymatische Aktivität steht. Den Kollagenasen wurden während des Substratabbaus jeweils 10fache molare Überschüsse des tripelhelikalen Kollagen VI-Fragmentes (KVI-F), des KVI-Kettengemisches (KVI r,a) sowie der $\alpha 2$ -Kette von Kollagen VI ($\alpha 2(VI)$) zugesetzt. **Abbildung 34** zeigt die dadurch bewirkten Veränderungen der Aktivitäten von MMP-1, -8 und -13.

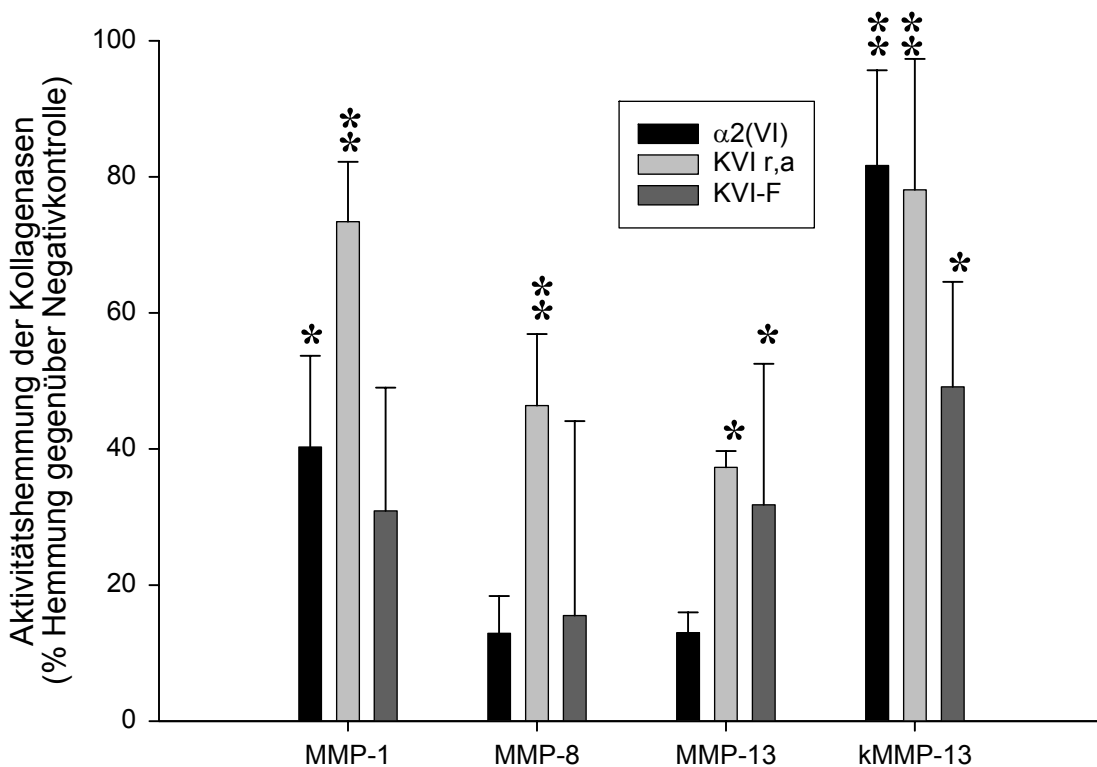


Abbildung 34: Kollagen VI-Fragmente mindern die Aktivität der APMA-aktivierten Kollagenasen MMP-1,-8,-13 sowie der katalytischen MMP-13 Domäne. Die MMPs wurden mit einem jeweils 10fachen molaren Überschuss der KVI-Ketten-/Fragmente zusammen mit einem biotinylierten

Kollagenase-Substrat inkubiert. Über Freisetzung biotinylierter Fragmente mit anschließender enzymatischer Detektion wurde die Aktivität bzw. der Grad der Hemmung bestimmt (n = 4).

** / ** Signifikanz (P<0,05 / P<0,001) gegenüber MMPs ohne KVI-Zusatz (= 0% Hemmung)*

Die jeweils stärksten Aktivitäts-hemmenden Effekte durch Zugabe der KVI-Fragmente zeigten sich bei **kMMP-13**. Die isolierte $\alpha 2(VI)$ -Kette sowie das Kettengemisch bewirkten eine Aktivitätsabnahme um jeweils ca. 80%. KVI-F bewirkte eine Halbierung der kMMP-13-Aktivität um 49%. Bei **MMP-1** zeigte das Kettengemisch mit einer Aktivitätsreduktion um 73% den stärksten Effekt. Die $\alpha 2(VI)$ -Kette bewirkte eine Hemmung um 40%, KVI-F um 31%. Bei **MMP-8** zeigte sich ein ähnliches Ergebnis. Das Kettengemisch bewirkte mit 46% die stärkste Hemmung. Die $\alpha 2(VI)$ -Kette und KVI-F bewirkten eine Aktivitätshemmung um jeweils ca. 13%. Bei dem APMA-aktivierten **MMP-13** dagegen bewirkten KVI-F und das Kettengemisch mit 31% bzw. 37% die stärkste Aktivitätsreduktion. Die $\alpha 2(VI)$ -Kette bewirkte eine Hemmung um 13% (**Abb. 34**).

Bei kMMP-13 zeigte sich also trotz der im Biacore-Versuch nicht stattfindenden Bindung an die $\alpha 2(VI)$ -Kette eine Aktivitätsreduktion durch die KVI-Fragmente. Neben der Bindungs-gekoppelten Aktivitätshemmung scheint noch ein zweiter, Bindungs-unabhängiger Wirkmechanismus zu existieren.

Zusammenfassend zeigten das Kettengemisch sowie die $\alpha 2(VI)$ -Kette die stärkste Aktivitätsminderung bei kMMP-13. Gefolgt von MMP-1, -8 und MMP-13. Trotz der deutlich schlechteren Bindung der aktivierten Kollagenasen gegenüber den Proformen (siehe Tab. 7, S. 72), haben die KVI-Ketten mit bis zu 70-80% Aktivitätsminderung einen starken Aktivitäts-modulierenden Effekt.

4.5.2 Fluorimetrischer Aktivitäts-Assay

Für die MMPs -8 und -13 wurde der KVI-vermittelte, aktivitätsmindernde Effekt zusätzlich unter Nutzung von jeweils spezifischen Fluoreszenz-Substraten untersucht. Für MMP-13 und kMMP-13 wurde im Gegensatz zum *Kollagenase-Aktivitäts-Assay* außerdem zwischen KVI-Exposition *in Lösung* und *als Beschichtung* unterschieden. Dabei lagen die zugegebenen KVI-Ketten/-Fragmente jeweils in 10fachen molaren Überschüssen gegenüber den Enzymen vor.

Für APMA-aktiviertes **MMP-13** zeigte sich bei KVI-Zugabe *in Lösung* ein insgesamt stärkerer aktivitätsmindernder Effekt als bei einer KVI-Beschichtung (**Abb. 35**).

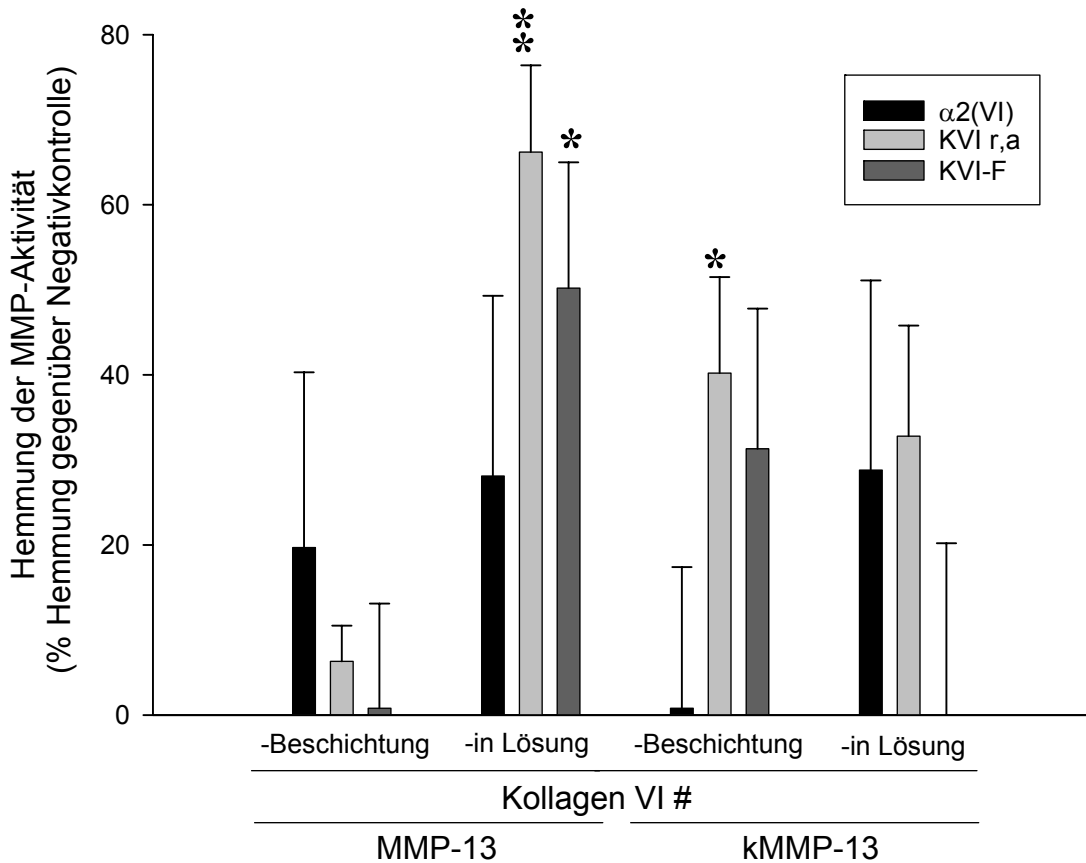


Abbildung 35: Expositionsabhängigkeit der Hemmung von MMP-13 / kMMP-13 durch KVI-Fragmente. APMA-aktiviertes MMP-13 sowie die katalytische MMP-13-Domäne kMMP-13 wurden mit 10fachen molaren Überschüssen von KVI-Fragmenten und einem fluorimetrischen MMP-13-Substrat inkubiert. Dabei erfolgte die KVI-Exposition entweder als Beschichtung der Mikrotiterplatte oder als Zusatz *in Lösung* ($n = 4$).

* / ** Signifikanz ($P < 0,05$ / $P < 0,001$) gegenüber MMPs ohne KVI-Zusatz (= 0% Hemmung)

Das Kettengemisch bewirkte *in Lösung* eine Aktivitätsreduktion um 66%. KVI-F bewirkte eine Hemmung um 50%. Durch die $\alpha 2(VI)$ -Kette konnte die MMP-13-Aktivität mit 28% um ein Drittel reduziert werden.

Lagen die KVI-Ketten/-Fragmente als Beschichtung vor, bewirkte die $\alpha 2(VI)$ -Kette eine Aktivitätsreduktion um 19%. Das Kettengemisch sowie KVI-F beeinflussten die MMP-Aktivität nur gering bzw. gar nicht mit 6% bzw. 1% Aktivitätshemmung.

Die Aktivitäts-modulierenden Effekte *in Lösung* auf **kMMP-13** zeigten einen hemmenden Einfluss der $\alpha 2(VI)$ -Kette bzw. des Kettengemisches und keinen Effekt

durch KVI-F (**Abb. 35**). Die kMMP-13-Aktivität wurde durch die $\alpha 2(\text{VI})$ -Kette um 29% und durch das Kettengemisch um 33% reduziert.

Auch nach KVI-Beschichtung zeigte das Kettengemisch mit einer Aktivitätsreduktion um 40% den stärksten hemmenden Effekt auf kMMP-13. Im Gegensatz zum Einsatz *in Lösung* bewirkte KVI-F *als Beschichtung* eine kMMP-13-Aktivitätsreduktion um 31%. Ein Aktivitäts-modulierender Effekt durch eine Beschichtung der $\alpha 2(\text{VI})$ -Kette trat im Gegensatz zu APMA-aktiviertem MMP-13 nicht auf, den Biacore-Versuch bestätigend.

Die Daten des Fluoreszenz-Assays (*in Lösung*) wiesen einige Gemeinsamkeiten mit denen des *Typ I Kollagenase Assays auf* (vgl. Abb. 34 & 35). So zeigte das Kettengemisch bei MMP-13 den jeweils stärksten Aktivitäts-hemmenden Effekt, gefolgt von KVI-F und der $\alpha 2(\text{VI})$ -Kette. Bei kMMP-13 waren die Aktivitäts-modulierenden Effekte von Kettengemisch und $\alpha 2(\text{VI})$ -Kette etwa gleich stark ausgeprägt. KVI-F zeigte eine deutlich schwächere bzw. gar keine Hemmung der kMMP-13-Aktivität.

Die Unterschiede zwischen den Assays liegen insbesondere in der Verfügbarkeit des MMP-Substrates. Im Fluoreszenz-Assay wird ein MMP-13-spezifisches Substrat verwendet, in dem die Aminosäure-Spaltsequenz direkt zugänglich ist. Im *Typ I Kollagenase Assay* dagegen wird „intaktes“, biotinyliertes Kollagen verwendet, dessen Degradation zunächst die Entwindung der Ketten bedingt (siehe Kap. 1.2.1.2).

Neben der Verfügbarkeit des MMP-Substrates liegt ein weiterer Unterschied in der Verfügbarkeit des KVI. Im Gegensatz zu KVI *in Lösung*, wo KVI dreidimensional verfügbar ist, erfordert die zweidimensionale KVI-Verfügbarkeit durch KVI-*Beschichtung* eine höhere KVI-Bindungsaffinität des zu beeinflussenden Enzyms.

Auch mit pro- bzw. MMP-8 wurden fluorimetrische Aktivitätsstudien durchgeführt. Die Effekte durch KVI-Ketten bzw. dem tripelhelikalen Fragment wurden nach Exposition *in Lösung* auf pro- und aktivierte Form untersucht. Die proMMP-8-(Auto)aktivierung wurde durch die $\alpha 2(\text{VI})$ -Kette bzw. dem Kettengemisch um etwa 30% reduziert. KVI-F zeigte keinen Einfluss auf die Aktivität (**Abb. 36**).

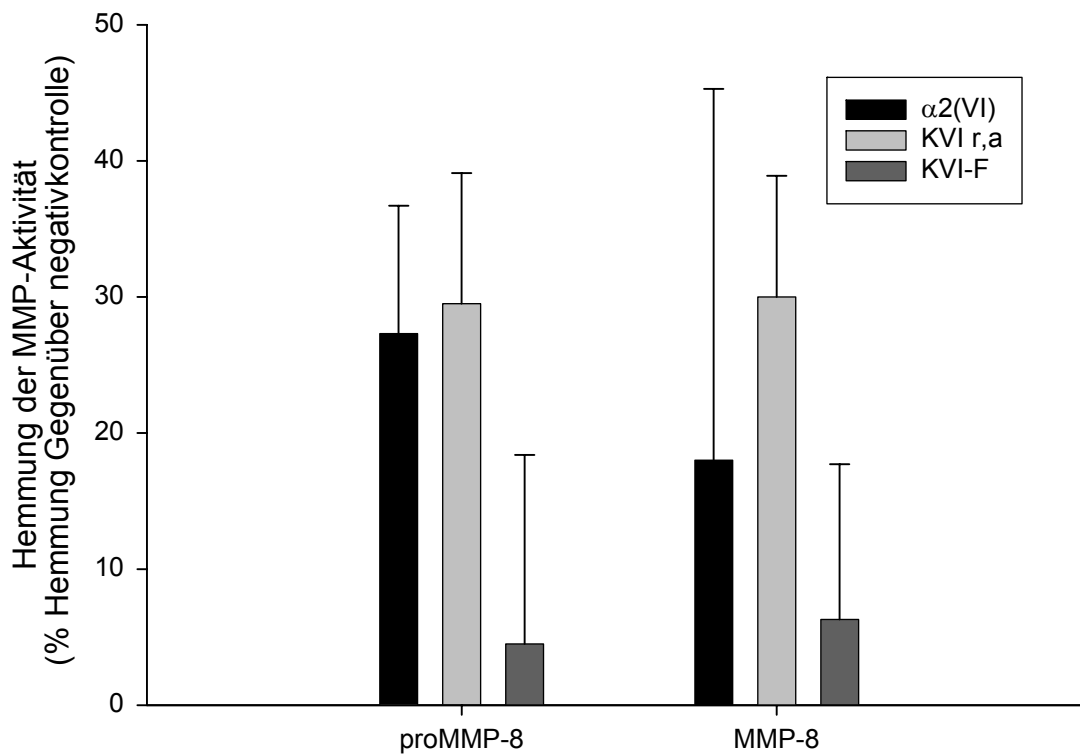


Abbildung 36: KVI-Fragmente hemmen die enzymatische Aktivität bzw. (Auto)aktivierung von MMP-8 und proMMP-8. APMA-aktiviertes MMP-8 sowie proMMP-8 wurden mit jeweils mit 10fachen molaren Überschüssen der KVI-Fragmente in Lösung und einem fluorimetrischen MMP-8 Substrat inkubiert ($n = 3$).

Für die Hemmung der Aktivität von aktiviertem MMP-8 ergab sich ein ähnliches Ergebnis. Die $\alpha 2(VI)$ -Kette bewirkte eine Hemmung um 18%, das Kettengemisch um 30%. KVI-F bewirkte eine geringere Aktivitätsreduktion um ca. 6% (**Abb. 36**).

Der Vergleich der Daten des fluorimetrischen mit denen des *Typ I Kollagenase Assays* zeigte einige Abweichungen der Ergebnisse. Die hemmenden Effekte im *Typ I Kollagenase Assay* waren für proMMP-8 und MMP-8 im Mittel etwas stärker ausgeprägt als im fluorimetrischen Assay. Bei proMMP-8 und MMP-8 zeigte das Kettengemisch den stärksten (Auto)aktivitäts-hemmenden Effekt mit ca. 40% Aktivitätsreduktion im *Typ I Kollagenase-* und ca. 30% Aktivitätsreduktion im fluorimetrischen Assay. Die Aktivitäts-modulierenden Effekte der $\alpha 2(VI)$ -Kette waren im Fluoreszenzversuch etwas geringer als die des Kettengemisches.

Zusammenfassend zeigten die Festphasen- und die Biacore-Bindungsassays eine Bindungspräferenz der Kollagenasen an Kollagen VI wobei die KVI-Einzelketten $\alpha 1(VI)$ und insbesondere $\alpha 2(VI)$ als Bindungsliganden identifiziert wurden. Die latenten Proformen zeigten eine stärkere Bindung als die aktivierten MMPs. Durch Mischung der Kollagenasen mit KVI-Fragmenten, bzw. den KVI-Einzelketten konnte die enzymatische Aktivität gehemmt werden. Die aktiven Kollagenasen kMMP-13 und MMP-1 wurden am stärksten in ihrer Aktivität gehemmt. Das Kettengemisch sowie die $\alpha 2(VI)$ -Kette bewirkten die stärkste Aktivitätsminderung. Bei den Proformen wurden proMMP-8 und -13 am stärksten durch die Ketten gehemmt. Bei den Proformen bewirkte auch das KVI-F, im Gegensatz zu den aktivierten Kollagenasen, eine ähnlich starke Aktivitätsminderung wie die KVI-Einzelketten, insbesondere bei proMMP-13.

Zusammenfassend ergaben sich bezüglich der Kollagenasen und ihrer Wechselwirkung mit Molekülen der EZM folgende Ergebnisse:

1. Kollagen VI dient als Bindungsligand der jeweiligen Proformen der Kollagenasen MMP-1,-3,-8 u. -13 sowie der Gelatinasen MMP-2 u. -9. Kollagen VI stellt dabei kein MMP-Substrat dar.
2. Die MMP-Bindung an Kollagen VI erfolgt insbesondere über die Einzelkette.
3. Die Kombination des Einzelkettengemisches bzw. der $\alpha 2(VI)$ -Kette mit den Kollagenasen führte zu einer Hemmung der Kollagenase-Autoaktivierung sowie der enzymatischen MMP-Aktivität.