

## 5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war, die Bindungsstärken und darauf basierend die mögliche Modulierbarkeit von Kollagenbindungen ausgewählter MMPs zu ermitteln. Neben diesen Untersuchungen zur Freisetzung Kollagen-gebundener MMPs sollte auch die mögliche Modulation der MMP-Aktivierung bzw. –Aktivität durch Kollagenmimetika, die in der Arbeitsgruppe als Kollagen-bindend identifiziert worden waren, untersucht werden. Zusätzlich wurden daraus resultierende Effekte auf zelluläre Prozesse untersucht. Aufgrund der teilweise divergenten EZM-Bindungspräferenz der MMPs werden zunächst die Ergebnisse bezüglich der Gelatinasen, anschließend die der Kollagenasen diskutiert.

### **5.1 Die Bindungsstärke ( $K_D$ ) der Proformen der Gelatinasen an Kollagen I liegt im mikromolaren Bereich**

Vor dem Hintergrund, dass die EZM als potentieller Speicher von Matrix-Metalloproteinasen fungiert, wurde Kollagen I in Biacore-Bindungsstudien als potenter Bindungspartner der Gelatinasen bestätigt und die Bindungen durch Ermittlung der jeweiligen kinetischen Bindungskonstanten auch quantifiziert. Dabei zeigten die jeweiligen Proformen eine Puffer-abhängige, stärkere Kollagenassoziation (kleinere  $K_D$ -Werte) als die entsprechenden aktivierten Enzyme. Die Bindungsstärken lagen im niederen mikromolaren Bereich, ähnlich wie er auch für viele andere Protein-Protein-Interaktionen, besonders bei EZM-Molekülen beschrieben wurde [167].

Die Größenordnung der erhaltenen Bindungsdaten der proMMPs steht auch in Einklang mit früheren Biacore-Bindungsdaten anderer Arbeitsgruppen. *Ottl et al.* nutzten Kollagenmimetika, die Gelatine- ( $T_m = 9^\circ\text{C}$ ; mit  $(\text{GPO})_3$ -Sequenz) bzw. Kollagen- ( $T_m = 41^\circ\text{C}$ ; mit  $(\text{GPO})_5$ -Sequenz) ähnlich waren [78]. Im Unterschied zum Kollagenmimetikum  $(\text{GPO})_{10}$  ( $T_m = 60^\circ\text{C}$ ) wiesen diese Peptide jedoch MMP-typische Spaltsequenzen auf. Dabei ermittelten *Ottl et al.* für die Bindung von proMMP-2 an das tripelhelikale Kollagenmimetikum einen  $K_D$ -Wert von  $0,67 \mu\text{M}$  und an das denaturierte Heterotrimer den Wert  $K_D = 0,81 \mu\text{M}$  ( $T = 22^\circ\text{C}$ ); d.h. wie in den eigenen Versuchen, eine starke Bindung an das Kollagen-ähnliche Peptid. Im Gegensatz zu eigenen Versuchen unterschieden *Ottl et al.* aber zwischen einem Assoziations- (Tris-Puffer)

und einem Dissoziationspuffer (EDTA/Tween-haltig), weshalb ein Vergleich mit den eigenen Daten nur bedingt möglich ist (siehe Kap. 5.1.1). Die stärkere Bindung der jeweiligen Proformen von MMP-2 und -9 beruht vermutlich auf dem unterschiedlichen strukturellen Aufbau der Enzyme. In den letzten zehn Jahren gelang die Aufklärung der dreidimensionalen Strukturen diverser MMPs [43, 81, 168-170]. Dabei zeigte sich, dass die latenten Proformen in einem sog. „*closed-state*“ vorliegen, welcher durch das über der katalytischen Domäne gefaltete Propeptid bewirkt wird (vgl. auch Abb. 3). Durch die sich hierdurch ergebende Konformation der Proformen sind deren kollagene Bindungsdomänen möglicherweise besser für potentielle Bindungspartner zugänglich. Die kollagenen Bindungsdomänen bestehen aus den sog. „Exosites“, also Domänen außerhalb der katalytischen Domäne. Dazu zählen die *collagen binding domain* CBD, welche aus den drei CBD-Subdomänen Col-1,-2 und -3 besteht, sowie die Hämopexindomäne, der bei der Kollagenbindung im Gegensatz zur Bindung an Gelatine nur eine untergeordnete Rolle zukommt.

Die aktiven Enzyme liegen im Gegensatz zu den Proformen in einem „*open-state*“ vor [29]. Durch diese Konformationsänderung wird das aktive Zentrum zugänglich für Substrate, während die „Exosites“ durch die Konformationsänderung „gestaucht“ werden, also schlechter zugänglich sind [29].

### **5.1.1 Die Wahl des Puffersystems beeinflusst die Bindungskinetiken der MMP-Kollagen-Bindungen**

Vorhergehende MMP-EZM- bzw. Protein-EZM-Bindungsstudien sowie Biacore-Experimente wurden jeweils in PBS-Puffer durchgeführt. Die Annäherung der Daten/Messungen an physiologisch-ähnliche Bedingungen erforderte die Verwendung unterschiedlicher Puffer, was zu teilweise deutlichen Unterschieden der erhaltenen  $K_D$ -Werte führte. Die jeweils stärkste Bindung zeigte sich in PBS-Puffer, gefolgt von Tris-Puffer+MMP-Inhibitor und dem Tris-Puffer ohne Inhibitor.

Das physiologisch ähnlichste Puffersystem stellt der Tris-Puffer dar. Allerdings führte die bekannte wenn auch geringe kollagenolytische Aktivität von MMP-2 zu einem Absinken der Dissoziationskurve unterhalb der Nulllinie, woraus sich ein gegenüber dem PBS-Puffer ca. 250fach erhöhter  $K_D$ -Wert der (pro)MMP-2-Bindung an Kollagen I ableiten ließ. Durch Zusatz eines MMP-Inhibitors wurde diese Kollagenolyse unterbunden und der  $K_D$ -Wert auf einen nur noch ca. 10fach erhöhten Wert gesenkt.

Der MMP-Inhibitor blockiert das katalytische Zentrum, welches nicht mehr potentiell an der Kollagenbindung beteiligt ist, die so nur noch von der CBD abhängig ist [79]. Das katalytische Zentrum scheint also einen geringen Anteil an der Kollagenbindung bzw. – Bindungsstärke der Gelatinasen zu haben.

Ottl *et al.* konnten zwar zeigen, dass die MMP-2-Bindung an Kollagen durch Bildung eines Aktivitäts-inhibierenden TIMP-2-Komplexes nicht beeinflusst wird [78], allerdings bindet der natürliche MMP-Inhibitor TIMP-2 - im Gegensatz zu dem hier verwendeten MMP-Inhibitor Ro28-2653 - nicht direkt an das katalytische Zentrum sondern hindert Substrate durch seine sterische Anordnung an dem Zugang zu dem katalytischen Zentrum [112, 171, 172].

Die pufferabhängigen Bindungsunterschiede bei den aktivierten Enzymen waren noch ausgeprägter. Zeigte sich bei proMMP-2 in PBS-Puffer eine 10fach stärkere Bindung als in Tris-Puffer mit Inhibitor-blockiertem katalytischen Zentrum, war sie bei aktiviertem MMP-2 dagegen sogar um den Faktor 15 erhöht. Aufgrund der geänderten Konformation des aktivierten Enzyms („open-state“ - s.o.) und der Blockierung des katalytischen Zentrums ist die Bindung in Tris-Puffer+Inhibitor also deutlich schlechter.

Die unterschiedlichen Bindungsstärken in PBS-Puffer bzw. Tris-Puffer+Inhibitor erklären sich so möglicherweise über die Verfügbarkeit der Kollagenbindungsstellen auf Seiten der MMPs. In PBS-Puffer steht primär die CBD und in Teilen auch das katalytische Zentrum der Kollagenbindung zur Verfügung, was zu einer insgesamt stärkeren Bindung führt, da aufgrund im PBS-Puffer fehlender  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen keine enzymatische Aktivität möglich ist. Zusätzlich könnten die fehlenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aber auch eine andere räumliche Anordnung der MMPs bedingen, wodurch das (Kollagen)-Bindungsverhalten ebenfalls beeinflusst werden könnte.

Auch aus diesem Grunde wurden die Bindungsstudien der Kollagenasen an deren nicht-Substrat Kollagen VI ausschließlich in dem mehr physiologischen Tris-Puffer durchgeführt (siehe Kap. 5.7).

### **5.2 (GPO)<sub>10</sub> schwächt die Kollagen I-Bindung der Gelatinasen**

Zur Untersuchung einer möglichen Modulation der Kollagen-Gelatinase Interaktion wurden Biacore-Bindungsstudien mit Kollagenmimetika durchgeführt. Es wurde eine hohe, im nanomolaren Bereich liegende, Affinität von proMMP-2 an das Kollagenmimetikum (GPO)<sub>10</sub> bestimmt ( $K_D = 7,46 \text{ nM}$ ). Die Bindungsstärke lag in Tris-

Puffer um den Faktor 100 über der der Kollagen I-Bindung von proMMP-2 sowie der von *Ottl et al.* gezeigten Kollagenmimetikum-Bindung (Peptid enthielt (GPO)<sub>5</sub>) von proMMP-2 [78]. Letzteres ist ein weiterer Hinweis dafür, dass die rigide Sekundärstruktur „Kollagen-Tripelhelix“, in diesem Fall gebildet durch die Aminosäure-Sequenz (Glycin-Prolin-Hydroxyprolin)<sub>10</sub>, eine spezifische kollagene Bindungsstruktur für proMMP-2 darstellt und (GPO)<sub>10</sub> damit für Bindungskompetitorstudien sehr geeignet ist.

Durch Mischen von (pro)MMP-2 u. -9 mit einem den MMPs gegenüber 10fach molaren Überschuss von (GPO)<sub>10</sub> konnten die jeweiligen Bindungen an Kollagen I geschwächt bzw. blockiert werden. Im Vergleich zu den Daten in PBS-Puffer waren die Bindungshemmenden (GPO)<sub>10</sub>-Effekte auf proMMP-2 und MMP-2 in Tris-Puffer(+MMP-Inhibitor), also mit blockiertem katalytischem Zentrum, deutlich stärker ausgeprägt.

Die durch (GPO)<sub>10</sub> bewirkte Erhöhung der  $K_D$ -Werte, also Schwächung der Bindungsstärke, ist bei pro- zu aktiviertem MMP-9 deutlicher als bei pro- zu aktiviertem MMP-2. Dies weist auf eventuelle strukturelle bzw. funktionelle Unterschiede der jeweiligen CBDs der Gelatinasen hin.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, dass aktiviertes MMP-2 aufgrund der geänderten Konformation gegenüber proMMP-2 („open-/closed-state“ – s.o.) eine deutlich schlechtere Kollagenbindung als proMMP-2 zeigt. Der Zusatz des MMP-Inhibitors schwächt eine mögliche Beteiligung des katalytischen Zentrums an der Bindungsstärke, wodurch die Kollagenbindung noch stärker von der Kollagenbindenden „Exosite“ abhängig ist. Diese wiederum wird durch die (GPO)<sub>10</sub>-Bindung blockiert, was zu weiterer Verringerung der Bindungsstärke bzw. Verdrängung zuvor gebundener Bindungspartner führt. Die erhaltenen Daten legen somit nahe, dass (GPO)<sub>10</sub> ein potenter Modulator der MMP-Kollagen I-Bindung ist.

### **5.3 (GPO)<sub>10</sub> löst und aktiviert an Kollagen I-gebundenes bzw. gespeichertes proMMP-2 (dualer Wirkmechanismus)**

Die Aktivität von pro- bzw. aktiviertem MMP-2 in Abhängigkeit von der Speicherung bzw. Bindung an Kollagen I wurde in einem fluorimetrischen Aktivitäts-Assay näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der Fluoreszenz-Substratumsatz von Kollagen-gebundenen proMMP-2 bzw. aktiviertem MMP-2 um 43 bzw. 27% reduziert

war gegenüber der Kontrolle mit einer BSA-Matrix. Unter Einbeziehung der Biacore-Versuche lässt dies den Schluss zu, dass proMMP-2 und zu geringem Anteil auch aktiviertes MMP-2 an die Kollagen I-Matrix binden und in dieser gespeicherten Form nicht bzw. nur in geringem Maße für den Substratabbau zur Verfügung stehen. Der geringere Substratumsatz durch an Kollagen I-gebundenes proMMP-2 deutet auch auf eine reduzierte (Auto)aktivierung hin, wie sie auch von anderen Arbeitsgruppen diskutiert wurde [173].

Die in den Biacore-Versuchen gezeigten, verstärkt kollagenolytischen Aktivitäten von proMMP-2 durch  $(\text{GPO})_{10}$  auf proMMP-2 ließen eine  $(\text{GPO})_{10}$ -induzierte Erhöhung des Fluoreszenz-Substratumsatzes erwarten. Dies konnte durch Zugabe eines 10fach molaren  $(\text{GPO})_{10}$ -Überschusses gezeigt werden. Vermutlich schwächt  $(\text{GPO})_{10}$  die proMMP-2-Kollagen I-Bindung und setzt proMMP-2 frei, so dass dessen Konzentration *in Lösung* zunimmt. Es kommt dann zu der (Auto)aktivierung des Enzyms. Alternativ könnte primär die  $(\text{GPO})_{10}$ -induzierte Aktivierung im Vordergrund stehen, was mittelbar zu der Freisetzung des MMP-2 führt.

Die für proMMP-2 gezeigten, durch  $(\text{GPO})_{10}$ -vermittelten aktivierende Effekte, wurden für proMMP-9 nicht beobachtet. Beide Gelatinasen zeigen also ein unterschiedliches Verhalten gegenüber Kollagen I bzw. den  $(\text{GPO})_{10}$ -vermittelten Effekten. Auch dies ist vermutlich durch die strukturellen Unterschiede der Gelatinasen bedingt. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz von der Prodomäne von proMMP-2 und proMMP-9 zeigt in Position 424 (Thr bzw. Arg), dass nur bei proMMP-9 eine Seitenkette der Aminosäure Arg424 leicht von der so genannten S1'-Bindungstasche des katalytischen Zentrums abgewinkelt ist. Ein weiterer Unterschied liegt in der Interaktion der CBD mit der katalytischen Domäne. Bei proMMP-9 besteht im Gegensatz zu proMMP-2 kein Kontakt zwischen der CBD-Subdomäne Col-2 und der katalytischen Domäne [174]. Wahrscheinlich kommt der CBD von proMMP-9 ausschließlich eine Bindungsfunktion zu, so dass strukturelle Veränderungen wie die Anlagerung von  $(\text{GPO})_{10}$  zu stärker ausgeprägten Bindungsmodulationen führen.

Im Vergleich zu einer BSA-Beschichtung führte die Kollagen I-Beschichtung der Mikrotiterplatten auch bei MMP-2 zu einer verminderten Degradation des Fluoreszenz-Substrates mit Gelatinase-spezifischer Spaltstelle. Wie im Biacore-Versuch gezeigt, ist Kollagen I auch Substrat von MMP-2. Interessant war die Frage, warum  $(\text{GPO})_{10}$  auch auf der nicht MMP-bindenden BSA-Beschichtung eine (geringere) Erhöhung des Fluoreszenzsignals bei proMMP-2 bewirkte. Dies könnte neben der Kollagen-

Bindungsverdrängung durch einen direkten Wirkmechanismus im Sinne einer Aktivierung durch  $(\text{GPO})_{10}$  bedingt sein (siehe unten).

Die im Biacore-Versuch bzw. in der Mikrotiterplatte (Fluoreszenz-Assay) beobachteten Bindungs-modulierenden Eigenschaften von  $(\text{GPO})_{10}$  wurden *in situ* näher charakterisiert. Fluoreszenzmarkiertes Cy2-proMMP-2 zeigte dabei eine selektive Bindung an kollagene Septen in zirrhatischen Gewebsschnitten. Dies bestätigt die Arbeitshypothese von Kollagenen als Speicher für proMMP-2. Zusätzlich wurden die Schnitte und das Cy2-proMMP-2 selbst, vor der Kollagenbindung mit  $(\text{GPO})_{10}$  vorinkubiert, wodurch sich die Kollagenbindung von Cy2-proMMP-2 inhibieren ließ. Durch Behandlung von Kollagen-gebundenem Cy2-proMMP-2 mit  $(\text{GPO})_{10}$  konnte die Bindung nahezu vollständig gelöst werden. Die Nach- bzw. Vorinkubationsbehandlungen mit  $(\text{GPO})_{10}$  bestätigen den Bindungs-hemmenden bzw. -lösenden Effekt von  $(\text{GPO})_{10}$  auf die proMMP-2-Kollagen-Bindung. Letzteres Ergebnis bestätigen die Relevanz der vorherigen Versuchsergebnisse und bilden damit die Basis in Hinblick auf den potentiellen Einsatz von  $(\text{GPO})_{10}$  *in vivo*.

Neben der Modulation der MMP-Bindung an Kollagen I zeigten die Ergebnisse des fluorimetrischen Assays, dass  $(\text{GPO})_{10}$  auch direkt die Enzymaktivität/-aktivierung beeinflusst. In den Biacore-Kollagen I-Bindungsstudien mit proMMP-2 und -9 in Tris-Puffer ohne Inhibitorzusatz zeigte  $(\text{GPO})_{10}$ -behandeltes proMMP-2 nach kurzer Kollagen I-Assoziation kollagenolytische Aktivität gegenüber der Kollagen I-Matrix, die im gleichen Zeitraum etwa 20% der Aktivität von vermessenen aktiviertem MMP-2 entsprach. Bei proMMP-9 zeigte sich dagegen keine  $(\text{GPO})_{10}$ -vermittelte kollagenolytische Aktivität. Allerdings deutet der Nulllinienverlauf des Bindungssignals über die Zeit (siehe Abb. 22) auf eine inhibierende Wirkung von  $(\text{GPO})_{10}$  auf die Kollagen I-proMMP-9-Bindung hin.

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse lassen sich auch die im Fluoreszenz-Versuch beobachteten,  $(\text{GPO})_{10}$ -vermittelten enzymatischen Aktivitätssteigerungen auf BSA deuten: Diese beruhen nicht auf Freisetzung von gebundenem proMMP-2 sondern auf direkter Aktivierung der proMMP-2-Moleküle. Die an einer Kollagen I-Matrix gebundenen proMMP-2-Moleküle dagegen werden durch  $(\text{GPO})_{10}$  freigesetzt und aktiviert, wobei beide Effekte Hand in Hand gehen.

Zusammengefasst weisen die Ergebnisse auf einen dualen Wirkmechanismus von  $(\text{GPO})_{10}$  hin. Dieser beruht auf der Bindungskompetition von  $(\text{GPO})_{10}$  mit

Kollagenbindungsstellen von proMMP-2, bzw. der direkten (GPO)<sub>10</sub>-Anbindung an die CBD-Subdomänen Col-1, Col-2 [82, 83] und Col-3 von proMMP-2 wodurch einerseits zu der Freisetzung von Kollagen-assoziiertem proMMP-2 durch Verdrängung des/der an insbesondere das Col-2-Modul gebundenen Kollagens/Gelatine durch (GPO)<sub>10</sub> kommt. Andererseits führt die Verdrängung des Propeptids von der Propeptid-Bindungsstelle auf dem Col-3-Modul zu einer (GPO)<sub>10</sub>-vermittelten Aktivierung von proMMP-2. Die Verdrängung führt zu Schwächung der Interaktion des Propeptids mit dem katalytischen Zn<sup>2+</sup>-Ion, was zur Aktivierung führt [175]. Dadurch kommt es zu stark verminderter Kollagen-Bindungsstärke sowie kollagenolytischer Aktivität.

Die Kollagen I-Bindungsinhibition von proMMP-9 durch (GPO)<sub>10</sub> deutet darauf hin, dass (GPO)<sub>10</sub> mit der CBD interagiert. Dabei wird aber ausschließlich das Bindungsverhalten und nicht, wie im Fluoreszenzversuch bestätigt, die Aktivität bzw. Aktivierung von proMMP-9 beeinflusst.

#### **5.4 (GPO)<sub>10</sub> und MMP-2 wirken Proliferations-stimulierend auf hepatische Sternzellen**

Aufgrund der Wachstumsinhibition hepatischer Sternzellen durch die Blockierung der enzymatischen Aktivität von MMP-2 wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen eine Proliferations-fördernde Aktivität von MMP-2 vermutet [129, 176, 177]. Erstmals konnte in dieser Arbeit aber durch direkte Zugabe von aktiviertem MMP-2 zu CFSC die Proliferations-fördernde Wirkung gezeigt werden. Wie MMP-2 selbst die Proliferation der hepatischen Sternzellen fördert ist noch unklar. Die durch (GPO)<sub>10</sub>-Zugabe alleine beobachtete und in Kombination mit proMMP-2 noch verstärkte mitogene Wirkung dagegen könnte unter Berücksichtigung der vorherigen Versuchsergebnisse auf zwei Wegen erklärt werden, die beide letztendlich auf der MMP-2-Aktivierung basieren:

Vor Behandlung bleibt den Zellen im Zeitraum von 48 h genügend Zeit, um eine sie umgebende Kollagen-Matrix aufzubauen. Im Medium vorhandene und von den Zellen sezernierte Zytokine bzw. proMMPs könnten so sowohl an der Matrix als auch auf den Zellen gespeichert werden. (GPO)<sub>10</sub> konkurriert durch seine hohe Kollagenbindungsaffinität mit den Zytokinen um die entsprechenden Matrix-Bindungsstellen. Wie gezeigt, werden dabei auch die Kollagen-gebundenen proMMP-2-Moleküle freigesetzt und aktiviert, was zu erhöhter Proliferation der CFSC führt. Der

MMP-2-spezifische Effekt von (GPO)<sub>10</sub> konnte durch den Einsatz eines MMP-2-Inhibitors bestätigt werden. Das über MMP-2 Aktivität freigesetzte Arsenal von stimulierenden Kollagenfragmenten und freigesetzten Zytokinen könnte aber auch indirekt die Proliferation der HSZ, z.B. über den Kollagenrezeptor DDR2 stimulieren. Dieser wird durch exo- und endogenes Kollagen I stimuliert (phosphoryliert), was zu verstärkter Expression von MMP-2 und so zu erhöhter Proliferation führt [176, 177].

### **5.5 (GPO)<sub>10</sub> aktiviert endogenes proMMP-2 und fördert so die Migration/Invasion von HT1080-Zellen**

Die Migration/Invasion der HT1080-Zellen durch eine Matrigel-Matrix ist Gelatinase-gesteuert [178]. Der Zusatz von (GPO)<sub>10</sub> zu HT1080-Zellen bewirkte eine fast zweifache Zunahme der Invasion durch eine Matrigel-Matrix. Die MMP-2-Abhängigkeit dieses Vorgangs wurde durch Invasionshemmung mit dem MMP-Inhibitor GM6001 (Ilomastat) sowie durch signifikante Invasionsverstärkung durch exogenes MMP-2 gezeigt. Unter Einbeziehung der vorherigen Ergebnisse zeigte dies, dass (GPO)<sub>10</sub> einerseits durch Freisetzung von HT1080-sezernierten, Matrix-gebundenem proMMP-2 und andererseits durch dessen Aktivierung die MMP-abhängige, invasive Aktivität verstärkt.

### **5.6 (GPO)<sub>10</sub> als Grundlage einer anti-fibrotischen Strategie**

In ihrer Gesamtheit bestätigen die Ergebnisse die Arbeitshypothese von Kollagenen als Speicher mit "Schutzfunktion" für die latenten Proformen der Gelatinasen. (GPO)<sub>10</sub> ist ein kompetitiver Inhibitor der proMMP-Kollagen Bindung und bewirkt die Freisetzung und Aktivierung von proMMP-2. Zudem werden zelluläre Funktionen wie Proliferation und Invasion, direkt und/oder indirekt über die MMP-2-Aktivierung durch (GPO)<sub>10</sub> verstärkt. Die Hauptproduzenten (fibrotischer) extrazellulärer Matrix aber auch von MMPs wie proMMP-2 sind die hepatischen Sternzellen. Die meisten auf der Matrix lokalisierten proMMP-2-Moleküle sind demnach im perizellulären Raum der HSZ zu erwarten. (GPO)<sub>10</sub> stellt so einen rationalen Ansatzpunkt einer pro-fibrolytischen Therapie durch verstärkte MMP-Aktivierung/Aktivität während der Leberfibrose dar (vgl. Kap. 5.8). Der Einsatz von (GPO)<sub>10</sub> als Therapeutikum setzt aber, nicht zuletzt durch das Invasions-fördernde Potential, auch eine hohe Organspezifität voraus, um systemische bzw. mögliche Tumor-induzierende Nebenwirkungen auszuschließen. Um

diese Organspezifität in Bezug auf die Leber zu erzielen, existieren bereits verschiedene Ansätze: So kann eine Kopplung des jeweiligen Wirkstoffes an Trägersubstanzen die organspezifische Verteilung verstärken. *Beljaars et al.* haben Methoden beschrieben, mit denen Therapeutika selektiv bis an die hepatischen Sternzellen geschleust werden können [179, 180]. Dabei wurde humanes Serumalbumin (HSA) zum einen mit Mannose-6-Phosphat gekoppelt. Mit diesem Konstrukt wurde eine Selektivität von 70% bezogen auf HSZ in der Leber erreicht [180]. Zum anderen wurde ein zyklisches Peptid, welches an den auf HSZ-lokalisierten Kollagen VI-Rezeptor bindet, an HSA gekoppelt. So wurde eine Selektivität von 73% insbesondere gegenüber aktivierten HSZ erreicht [179]. Ein derartiger Ansatz ist auch für (GPO)<sub>10</sub> denkbar.

### **5.7 Durch Bindung an das nicht-MMP-Substrat Kollagen VI werden die Kollagenasen in ihrer Aktivierung und Aktivität gehemmt**

Auch bei der Untersuchung der Kollagenasen lag der Schwerpunkt der Studien zunächst auf den Aspekten der Bindung. So wurden die Kollagenasen MMP-1, -8, -13 sowie MMP-3 hinsichtlich ihrer Matrixbindung untersucht. Dabei wurden aus dem Spektrum der Matrixmoleküle das nicht-MMP-Substrat Kollagen VI und im speziellen ein tripelhelikales Fragment von Kollagen VI bzw. die isolierten kollagenen Abschnitte der KVI-Einzelketten als potente Bindungspartner der Proformen identifiziert. Die Bindungsstärken lagen im niederen nanomolaren Bereich. In Biacore-Bindungsstudien zur Ermittlung von Bindungskinetiken mit der  $\alpha 2(\text{VI})$ -Kette als starkem Bindungsliganden zeigte sich, wie auch bei den Gelatinasen, eine höhere Bindungsstärke der latenten Proformen gegenüber den aktivierten MMPs, wahrscheinlich bewirkt durch die unterschiedliche dreidimensionale Struktur der Enzyme, wie bei den Gelatinasen beschrieben (s.o.). Interessanterweise zeigte auch die Gelatinase proMMP-9 eine starke  $\alpha 2(\text{VI})$ -Bindung, deren Stärke in der gleichen Größenordnung wie die der MMPs-1, -3 u. -8 lag. Kollagen VI könnte damit für die Kollagenasen eine ähnliche Speicherfunktion zukommen wie Kollagen I für die Gelatinasen.

Aufgrund ihrer Kollagenase-Bindungsaffinität waren das tripelhelikale Kollagen VI-Fragment sowie die Einzelketten auch bezüglich ihrer möglichen Aktivitätsmodulierenden Eigenschaften von Interesse. Dabei zeigte sich ein Aktivitäts-

minderndes Potential sowohl in einem fluorimetrischen-, als auch in einem auf Biotin-gekoppelten Kollagenasesubstrat basierenden Aktivitäts-Assay. Im fluorimetrischen Assay konnte für MMP-13 zudem zwischen Bindungs-abhängiger Hemmung durch *immobilisiertes KVI* und weitestgehend Bindungs-unabhängiger Hemmung durch *KVI in Lösung* unterschieden werden. Die Bindungsstudien zeigten, dass KVI-F bzw. die KVI-Ketten *immobilisiert* und *in Lösung* die Aktivität der Kollagenasen blockieren. Dies führte zu der Hypothese, dass die Kollagenasen aufgrund ihrer Bindung an KVI-F bzw. die KVI-Ketten in ihrer enzymatischen Aktivität gehemmt sind.

Wie auch bei den Gelatinasen wurden die Kollagenase-Proformen daraufhin hinsichtlich ihrer (Auto)aktivierung in Gegenwart von KVI-Fragmenten untersucht. Dabei zeigten Proformen ohne KVI-Zusatz eine MMP-typische Autoaktivierung. Die KVI-Fragmente konnten den Grad der Autoaktivierung senken. Ähnlich wie die Kollagen I-Bindung der Gelatinasen erfüllt die Kollagenasen-Bindung an Kollagen VI-Fragmente somit ebenfalls eine Art „Schutzfunktion“ bezüglich der Aktivierung der Kollagenasen.

Um einen Einblick in den möglichen Mechanismus der MMP-Aktivitätsmodulation zu erhalten, wurden zusätzliche MMP-Aktivitätsstudien mit der isolierten katalytischen Domäne von MMP-13 durchgeführt. Dabei zeigte sich eine noch stärkere  $\alpha 2(\text{VI})$ -vermittelte Minderung der Aktivität im Vergleich zum APMA-aktivierten MMP-13. Der katalytischen Domäne fehlt die Kollagen-bindende Hämopexindomäne. Im Biacore-Versuch zeigte sich keine Bindung der katalytischen Domäne an die auf dem Sensor-Chip-immobilisierte  $\alpha 2(\text{VI})$ -Kette. Die katalytische MMP-13-Domäne weist keine weiteren MMP-Domänen auf, so dass Substrate bzw. Bindungspartner ohne mögliche sterische Hinderungen an das katalytische Zentrum gelangen können, welches somit blockiert wird. Bei genügend kleinen oder strukturell „günstig“ geformten Bindungspartnern, wie den KVI-Ketten, könnte dieser direkte blockierende Effekt des katalytischen Zentrums auch bei nativem MMP-13 auftreten: Das aktive Zentrum von MMP-13 [181, 182] ähnelt dem von MMP-1 [183] und MMP-3 [184]. Die Taschenöffnung besitzt einen Durchmesser von ca. 5 Å, so dass einzelne Polypeptidketten bzw. entsprechend kleine Molekülseitenketten in die Taschen passen. Im Fall der katalytischen MMP-13-Domäne könnte z.B. der eingesetzte kollagene Abschnitt der  $\alpha 2(\text{VI})$ -Kette (Länge ca. 30 nm) sterisch ungehindert direkt mit dem katalytischen Zentrum assoziieren. Der kollagene Abschnitt der  $\alpha 2(\text{VI})$ -Kette trägt wie auch  $(\text{GPO})_{10}$  keine MMP-spezifische Spaltsequenz, so dass trotz Lokalisation am bzw.

im katalytischen Zentrum keine Kettendegradation, sondern nur die Blockierung der enzymatischen Aktivität erfolgt.

Kollagen VI-Ketten bzw. –Fragmente und daraus abgeleitete Mimetika stellen durch ihre Modulation von MMP-Aktivitäten die Möglichkeit der gezielten Beeinflussung von MMP-assoziierten, pathologischen Vorgängen dar. Ihre Aktivitäts-hemmenden Eigenschaften stehen im Gegensatz zu denen des MMP-2-aktivierenden Kollagenmimetikums (GPO)<sub>10</sub>. Ob und welche KVI-Fragmente neben einem möglichen Einsatz durch exogene Zugabe auch *in vivo* durch körpereigene Degradationsprozesse entstehen und wirken können, ist bisher nicht geklärt.

### **5.8 Kollagenfragmente und –mimetika als potentielle Therapeutika im Kontext gängiger Therapieansätze**

Das Maß der Fibroseresolution mit begleitender Matrixdegradation wird über das TIMP-MMP-Gleichgewicht bestimmt. Für die Resolution der Leberfibrose werden in der Fachliteratur zur Zeit gegensätzliche Therapieansätze diskutiert, die auf Modulation dieses TIMP-MMP-Gleichgewichtes basieren.

Eine Verschiebung des Gleichgewichtes zugunsten der MMPs führt zu einem erhöhten Anteil an freien und damit proteolytisch aktiven MMPs. Eine Resolution der Fibrose durch Matrixabbau wäre möglich. *Limuro et al.* konnten nach MMP-1-Überexpression in Ratten eine Fibroseresolution beobachten [185], genauso wie *Siller-Lopez et al.*, durch gezielte adenovirale Überexpression von MMP-8 [186]. Die Erhöhung der MMP-Konzentration durch Freisetzung und Aktivierung von Matrix-gebundenen latenten proMMPs stellt in diesem Kontext einen ergänzenden Ansatz dar.

Ein möglicher Ansatz auf Basis der Hemmung von MMP-Aktivität wurde durch *Van Lint et al.* beschrieben [187]: MMP-8 *knock out*-Mäuse zeigten eine Resistenz gegenüber TNF-induzierter, letaler Hepatitis. Die Hemmung der MMP-8-Aktivität durch selektive Inhibitoren, wie z.B. durch Kollagen VI-Analoga, stellt so einen möglichen therapeutischen Ansatzpunkt dar.

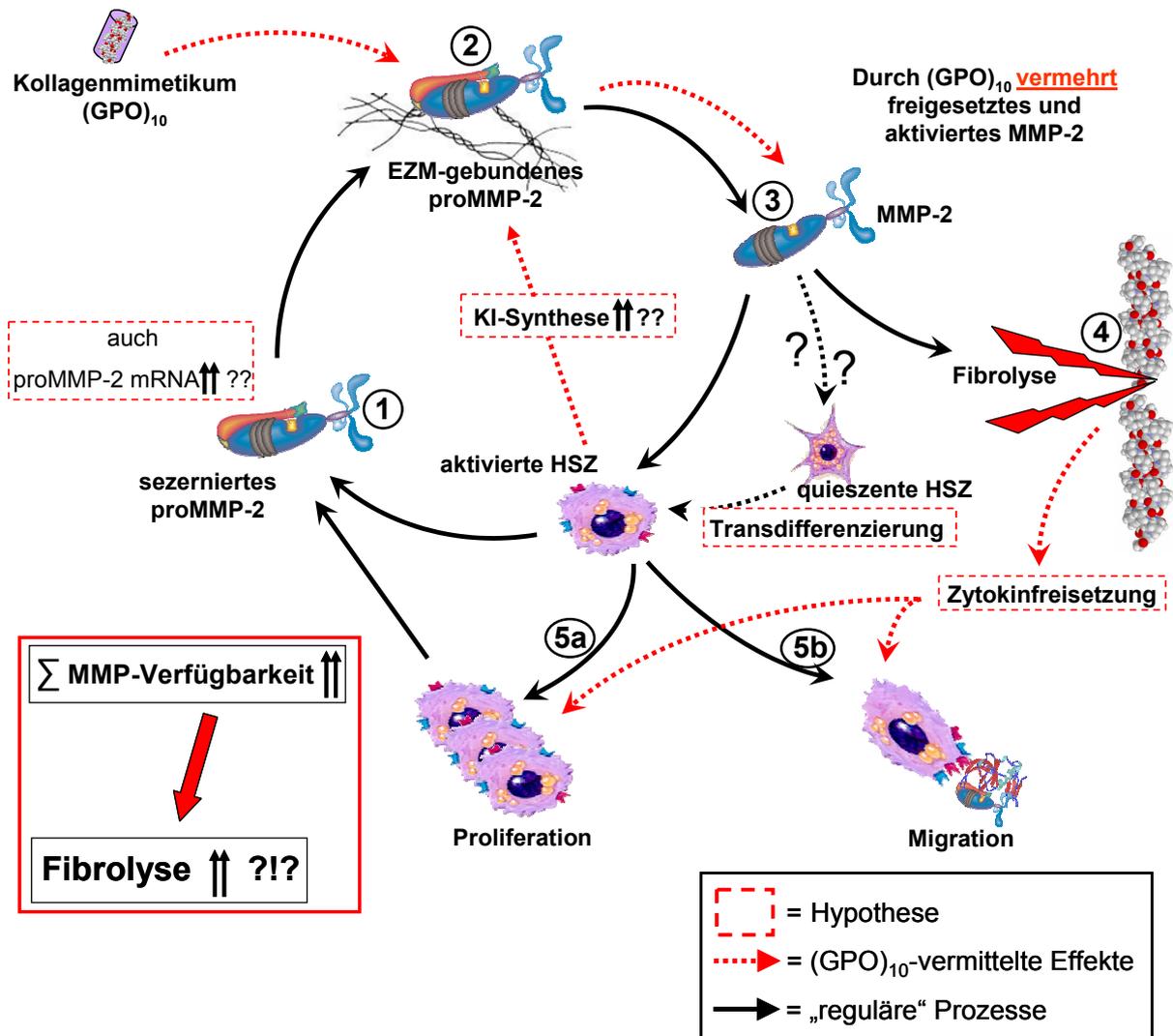
Eine vermehrte Expression von MMP-Inhibitoren TIMP-1 und -2 könnte aber auch durch Inhibition der MMPs zu weiterer Matrix-Akkumulation beitragen. In diesem Kontext diskutierten *Arthur et al.* einen profibrogenen Effekt von TIMP-1 durch mögliche Hemmung der Apoptose von aktivierten HSZ, z.B. durch Hemmung von möglicherweise proapoptotischen MMP-9 [188, 189]. Dadurch, so das Argument, würde die HSZ als

Hauptfibrogenesezelle weiteren Matrix-Aufbau betreiben. Weitere Studien und die eigenen Ergebnisse zeigten tatsächlich, dass sowohl TIMP-1 und auch MMP-2 Wachstums-/Überlebensfaktoren für HSZ darstellen [129, 176, 177, 189].

Daraus abgeleitet wurden therapeutische Ansätze, die nicht auf vermehrter Expression, sondern auf Eliminierung von TIMP-1 basieren. Die dadurch bewirkte erhöhte MMP-1 und -8-Aktivität fördert die Apoptose der HSZ, die aufgrund des Verlustes ihrer perizellulären Matrix die Liganden für ihre antiapoptotischen Adhäsionsmoleküle verlieren [190]. Hintergrund der angestrebten HSZ-Apoptose ist die Entfernung der HSZ als Hauptquelle der Matrixsynthese. Problematisch erscheint jedoch die Tatsache, dass die HSZ in der Leber auch die Hauptproduzenten der MMPs darstellen. Inwieweit die Daten und insbesondere die Zeitabläufe der Tier-Fibrose- bzw. -Resolutionsmodelle auf den Menschen übertragbar sind, ist unklar. In Tier-Fibrose-Modellen entsteht die Fibrose/Zirrhose in der Regel in einem Zeitraum von ca. 4 Wochen, während der Entstehungsprozess im Menschen meist mehrere Jahre bis Jahrzehnte beansprucht. Es ist davon auszugehen, dass der Prozess des Gewebsumbaus im Menschen auch während der Resolution einen weit größeren zeitlichen Rahmen beansprucht.

Die Einordnung der Ergebnisse dieser Arbeit in den Kontext anti-fibrotischer Strategien ist abhängig von der Zugrundelegung unterschiedlicher gängiger Therapiekonzepte. Eine wichtige Erkenntnis ist die Funktion der EZM als Reservoir von latentem proMMP-2. Die gezielte lokale Freisetzung und Aktivierung von proMMP-2 durch  $(GPO)_{10}$  könnte einen lokalen Kollagenabbau bewirken. Zum anderen könnten  $(GPO)_{10}$  und aktiviertes MMP-2 auch die HSZ stimulieren. Diese könnte vermehrt MT1-MMP exprimieren, welches ebenfalls kollagenolytisch aktiv ist. Zudem würde so die Bildung von proMMP-2-aktivierenden Komplexen (vgl. auch Abb. 5) begünstigt. Denkbar wäre eine zielgerichtete Migration der stimulierten HSZ (siehe auch Ergebnisse bezüglich der Invasionsverstärkung durch  $(GPO)_{10}$ ) entlang der Kollagenfibrillen, welche mit Matrixdegradation und gleichzeitiger Freisetzung/Aktivierung von proMMPs, aber auch anderer EZM-gebundener Wachstumsfaktoren [12] einhergeht. Das Konzept ist in **Abb. 37** nochmals zusammenfassend dargestellt.

Ein ähnliches Bild zeigt sich bei den Kollagen VI-Ketten. Die Ketten-vermittelte Hemmung der Aktivität von MMPs würde kollagenolytische Aktivität gegenüber der fibrotischen Kollagen-Matrix inhibieren. Zudem könnte die MMP-Hemmung auch indirekt die MMP-1 u. -8-vermittelte Apoptose-Induktion inhibieren, was je nach theoretischer Betrachtungsweise als potentiell positiv oder negativ zu bewerten ist (s.o.) (**Abb. 38**).



**Abbildung 37: Schematische Darstellung eines möglichen (GPO)<sub>10</sub>-basierten anti-fibrotischen Therapieansatzes.** Von hepatischen Sternzellen (HSZ) sezerniertes proMMP-2 (1) wird an Kollagenen temporär gespeichert und vor Aktivierung geschützt (2). Im Fall der Freisetzung kann es zur Aktivierung des Enzyms kommen (3). Dies führt zu Fibrolyse (4) sowie Migration und Proliferation der HSZ (5a, b). (GPO)<sub>10</sub> setzt Kollagen-gebundenes proMMP-2 frei (6) und aktiviert es (7). Es kommt zu vermehrter Fibrolyse (8). Durch die Fibrolyse könnten weitere Matrix-assoziierte Zytokine/proMMPs freigesetzt werden (9), die ebenfalls die HSZ stimulieren. Die Summe der verfügbaren MMPs wird erhöht, die Fibrolyse weiter verstärkt.

Den MMPs kommt nicht nur bei der Leberfibrose sondern auch bei zellspezifischen Vorgängen wie Invasion, Migration und Angiogenese eine entscheidende Bedeutung zu. So dringen Tumorzellen u.a. durch MMP-Sekretion invasiv in Gewebe ein, woran neben den Gelatinasen auch Kollagenasen wie MMP-13 beteiligt sind [191, 192]. Gängige therapeutische Ansatzpunkte sind die Synthese spezifischer MMP-13-Inhibitoren sowie die Inhibierung der Signaltransduktionswege, die die MMP-13-

Expression in Tumorzellen vermitteln [193]. Der  $\alpha 2(\text{VI})$ -Kette bzw. dem Kettengemisch kommt so neben dem möglichen leberspezifischen Ansatz auch eine potentielle Bedeutung für die Invasion und Metastasierung von Tumoren zu: Die Hemmung kollagenolytischer Aktivität könnte zu einer Invasionshemmung und damit zu einer Unterdrückung von Metastasenbildung führen, wodurch die KVI-Ketten einen neuen Ansatz für die Behandlung von Neoplasien darstellen (**Abb. 38**).

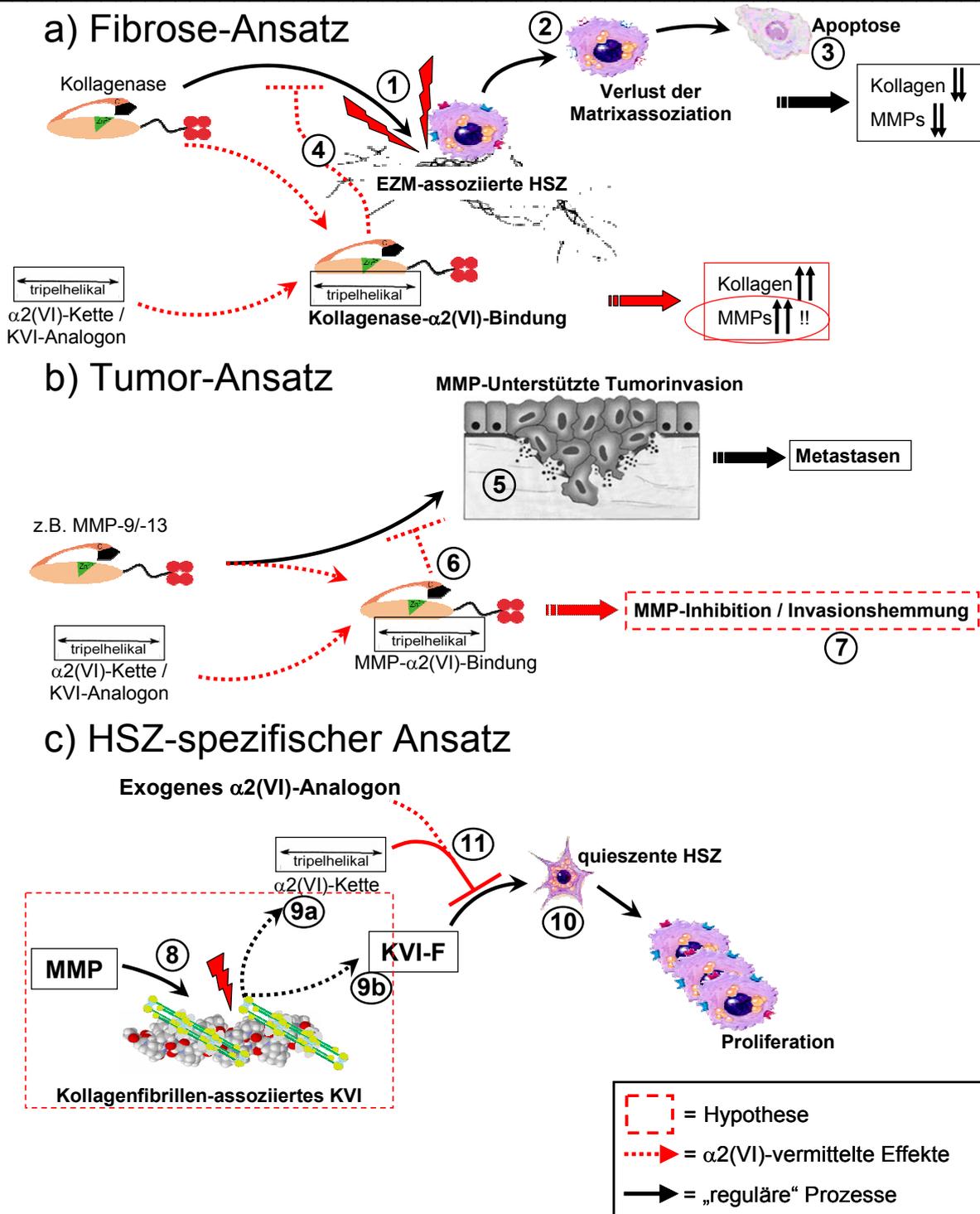
Es ist bekannt, dass nicht nur Zellen den Aufbau der Matrix modulieren, sondern auch umgekehrt die EZM selbst zelluläre Prozesse aktiv beeinflusst [194]. Dies ist besonders evident bei der Epithel-Mesenchym-Transition (EMT), die u.a. beim hepatozellulären Karzinom (HCC) auftritt [195, 196]. So konnte z.B. durch eine induzierte Expression von MMP-3 in normalen Brust-Epithelzellen die Bildung eines transformierten, Fibroblasten-ähnlichen Phänotyps bewirkt werden, also eine EMT. Zusätzlich konnte MMP-3 durch Expression in Brustdrüsen von transgenen Mäusen als natürlicher Tumorpromotor identifiziert werden [197]. Der epitheliale Phänotyp von MMP-3-behandelten Zellen geht verloren. MMP-3 könnte also durch direkte Mutationsinduktion in den Zellen zur Tumorentstehung beitragen. Aber auch in den eigenen Versuchen nicht eingesetzte MMPs sind an der Tumorentstehung beteiligt. So spaltet z.B. MMP-7 zahlreiche Zytokin- und Matrix-bindende Proteine auf Zellen und im Serum, was in der Summe zur Entstehung und Weiterentwicklung von Tumoren beiträgt [198, 199]. Gao *et al.* identifizierten MMP-1 und MMP-7 dabei sogar als verantwortlich für die Generierung eines HCC-begünstigenden Milieus [200]. Die MMP-Inhibition, auch wieder durch Kollagen VI-Ketten bzw. -Analoga, könnte die Degradation von stabilisierenden Matrix-Adhäsionsmolekülen der Zellen unterdrücken und damit dem Vorgang der EMT entgegenwirken.

Auf dem Weg zur möglichen Etablierung der KVI-Ketten, bzw. Ketten-Analoga als Inhibitoren der Bindung und der Aktivität/Aktivierung der Kollagenasen sind künftig noch weitere Versuchsreihen nötig. So erfordern beispielsweise die teilweise ebenfalls starken Aktivitäts-hemmenden Effekte des Kettengemisches weitere Untersuchungen. Die bisherigen Ergebnisse weisen durch die unterschiedlich starken inhibitorischen Effekte auf die Kollagenasen darauf hin, dass es keinen auf den KVI-Einzelketten basierenden Universalinhibitor für alle Kollagenasen gibt, sondern dass für die einzelnen MMPs auch unterschiedliche Inhibitorstrukturen nötig sind. Dabei sind für die Zukunft u.a. weitere Versuche mit Peptiden aus Fragmenten der  $\alpha 2(\text{VI})$ -Kette geplant,

um die Kollagen-spezifischen Sequenzen zu lokalisieren. Ziel ist, ähnlich wie auch bei (GPO)<sub>10</sub>, MMP- und organspezifische, synthetische Kollagenmimetika herzustellen.

Abseits der MMP-spezifischen Wirkungen von Kollagen VI-Fragmenten/-Ketten müssen in diesem Kontext auch die schon in Kap. 1.1.1.2 beschriebenen Ergebnisse der Arbeitsgruppe bezüglich deren mitogener Wirkung auf Zellen in Betracht gezogen werden. So konnte gezeigt werden, dass KVI-F die Proliferation verschiedener mesenchymaler Zelltypen inklusive der HSZ induzieren kann [201]. Zusätzlich zu dem starken mitogenen Effekt inhibierte KVI-F die Apoptose von serumdeprivierten HSZ [20]. Die mitogenen Effekte von KVI-F konnten durch Vorinkubation mit der  $\alpha 2(\text{VI})$ - oder  $\alpha 3(\text{VI})$ -Kette aufgehoben werden. Keinen Effekt bewirkte die  $\alpha 1(\text{VI})$ -Kette. Die inhibierende Wirkung geschieht wahrscheinlich durch Blockierung des KVI-Rezeptors [19]. Je nach Grad der Kollagen VI-Degradation könnten also auch die freigesetzten Kollagen-Fragmente/-Ketten neben der MMP-Ebene auch direkt auf Zellebene regulierend in physiologische und pathologische Prozesse eingreifen. Mit dem pro-mitogenen bzw. antiapoptotischen KVI-F und der entgegengesetzt wirkenden  $\alpha 2(\text{VI})$ -Kette stehen somit potentiell zwei weitere Regulierungsansätze zur Modulation der Fibrogenese/Fibrolyse zur Verfügung (**Abb. 38**).

Zusammengefasst liefern die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit die Grundlage für den Einsatz von z.B. (GPO)<sub>10</sub> und KVI-Kettenfragmenten bzw. strukturell ähnlichen Analoga im Fibrose-/HCC-Tiermodell. Diese *in vivo*-Studien werden auch eine weitergehende Bewertung der zum Teil gegensätzlichen Effekte der Fragmente hinsichtlich Tumorprogression und Fibroseresolution ermöglichen.



**Abbildung 38: Schematische Darstellung KVI-basierter Therapieansätze.** a) Fibrose-Ansatz: Kollagenasen spalten Adhäsionsmoleküle der HSZ (1), es kommt zu Ablösung der Zellen von der schützenden Matrix (2). Dies führt im Endeffekt zur Apoptose der HSZ (3), es werden keine Matrix sowie Matrix-degradierende Enzyme mehr sezerniert. Mit der  $\alpha 2(VI)$ -Kette könnte die Aktivität der Kollagenasen inhibiert (4) und damit die Spaltung der Adhäsionsmoleküle unterbunden werden. Die Vitalität der Zellen und damit insbesondere die MMP-Synthese bleibt erhalten. b) Tumor-Ansatz: Invasive Tumorzellen nutzen MMPs (hauptsächlich Gelatinasen aber auch MMP-13) um Basalmembranen etc. zu durchdringen (5). Es kommt zu Metastasenbildung. Die Inhibition der MMPs, z.B. durch MMP-Bindung an die  $\alpha 2(VI)$ -

## Diskussion

---

Kette (6), könnte die Invasivität der Tumorzellen hemmen (7). c) HSZ-spezifischer Ansatz: Kollagenfibrillen-assoziiertes Kollagen VI wird durch MMPs gespalten (8), was möglicherweise zu Freisetzung von Kollagenfragmenten bzw. -Ketten führt (9a & 9b). Tripelhelikale Kollagenfragmente wirken Proliferations-stimulierend auf quieszente HSZ (10). Freigesetzte KVI-Ketten, bzw. exogene Kettenanaloge könnten dem entgegenwirken (11).