

Medizinische Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

Campus Benjamin Franklin  
aus der Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und  
Rheumatologie  
Direktor Prof. Dr. Martin Zeitz

**Die extrazelluläre Matrix von fibrotischem Lebergewebe  
speichert Gelatinaseproformen über die Bindung an die  
Tripelhelix von Kollagenen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der  
medizinischen Doktorwürde  
Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von Marion Bettina Muche, geb. Seja  
aus Münster/Westfalen

Referent: Prof. Dr. R. Somasundaram

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. K. Danker

Gedruckt mit Genehmigung der  
Charité - Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 19.09.2008

**Teile der vorliegenden Dissertation fanden Einfluss in folgenden Kurzbeiträgen:**

Rühl M, Freise Ch, **Seja M**, Erben U, Schuppan D, Farndale R, Zeitz M, Somasundaram R. GPO<sub>10</sub>, a collagen mimetic effectively promotes activation of collagen bound pro-matrixmetalloproteinase-2 in fibrotic liver tissue. *J Hepatol.* 44:130, Suppl. 2, 2006

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

Rühl M, **Seja M**, Freise Ch, Erben U., Schuppan D., Farndale R, Zeitz M, Somasundaram R. ProMMP-2 bindet an Kollagene der Leber und wird durch das Kollagenmimetikum (GPO)<sub>10</sub> freigesetzt sowie aktiviert–Bestimmung der Bindungsstärken und Messung der Aktivität des freigesetzten proMMPs mittels Surface-Plasmon-Resonance und Fluorimetrie. *Zeitschr. Gastroenterol.* 43:75, 2005

Rühl M, Freise Ch, **Seja M**, Dagdelen, T, Farndale R, Zeitz M, Somasundaram R. Mesenchymale und hepatische Sternzellen werden durch das Kollagenmimetikum (GPO)<sub>10</sub> über eine spezifische Aktivierung von proMMP-2 in ihrer Proliferation und Migration stimuliert. *Zeitschr. Gastroenterol.* 44:77, 2006

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

Schuster A, Ruehl M, Farndale R, Knight G, **Seja M**, Zeitz M, Schuppan D , Somasundaram R. Screening for inhibitors of the MMP-2/-9 — Collagen interaction as antifibrotic agents by surface plasmon resonance. *Journal of Hepatology*. 38:85, 2003

Rühl M, **Seja M**, Freise C, Erben U, Schuppan D, Farndale R, Zeitz M, Somasundaram R. Das Kollagenmimetikum GPO setzt Leberkollagen-gespeichertes proMMP-2 frei, was zu einer Generierung von aktivem MMP-2 und erhöhter Zellmobilität/-invasivität führt. *Zeitschrift für Gastroenterologie*; 01, 2006

**Folgende Manuskripte sind in Vorbereitung:**

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

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

Meinen Eltern und meinem Mann

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	8
1.1. Leberzirrhose und -fibrose .....	8
1.2. Extrazelluläre Matrix (EZM).....	9
1.3. Matrixmetalloproteinasen (MMPs).....	12
1.3.1. Nomenklatur.....	12
1.3.2. Domänenstruktur und -funktion .....	14
1.3.3. Regulation der Expression .....	16
1.3.4. Regulation der Aktivität und Aktivierung .....	17
1.3.5. Kollagenbindung von Gelatinasen .....	19
1.4. MMPs und therapeutische Ansätze.....	20
1.5. Fragestellung .....	21
2. Material und Methoden.....	22
2.1. Reagenzien.....	22
2.2. Materialien und Geräte.....	24
2.3. Kollagene und Kollagenmimetika .....	25
2.4. Immunhistologie.....	26
2.4.1. Gewebeproben.....	26
2.4.2. APAAP-Färbung.....	27
2.5. Aktivierung latenter MMPs .....	29
2.6. Bestimmung der enzymatischen Aktivität von MMPs .....	30
2.6.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	30
2.6.2. Zymographie .....	31
2.6.3. Fluorimetrie .....	32
2.7. Bindungsstudien mit immobilisierten Proteinen .....	33
2.7.1. Radioaktive Markierung von (pro)MMPs.....	33
2.7.2. Mikrotiterplattenformat.....	35
2.7.3. Liganden-blot auf Nitrozellulosemembranen.....	36

2.7.4.	Dot-blot auf Nitrozellulosemembranen.....	38
2.8.	Mathematische und statistische Auswertung.....	38
3.	Ergebnisse .....	40
3.1.	Lokalisation der proMMP-Bindung in der fibrotischen Leber .....	40
3.2.	Aktivierung latenter MMPs .....	42
3.3.	Charakterisierung der [ <sup>125</sup> I]-markierten (pro)MMPs.....	43
3.4.	Bindung von (pro)MMP-2/-9 an EZM-Bestandteile .....	46
3.4.1.	Bindung von proMMPs an isolierte Kollagene und Glykoproteine.....	46
3.4.2.	Abhängigkeit vom MMP-Aktivierungsstatus.....	48
3.5.	Eingrenzung einer kollagenen Konsensusbindungsstruktur .....	49
3.5.1.	Bindung an Fragmente aus Kollagen Typ I.....	49
3.5.2.	Bindung an synthetische tripelhelikale Peptide.....	51
3.6.	Konzentrationsabhängigkeit der MMP-Bindung .....	52
3.7.	Inhibition der Bindung von proMMP-2 an Kollagene.....	55
3.7.1.	Inhibition der proMMP-2-Bindung an Kollagen Typ I.....	55
3.7.2.	Inhibition der proMMP-2-Bindung an die α1(I)-Kette.....	56
3.7.3.	Inhibition der proMMP-2-Bindung an (GPO) <sub>10</sub> .....	58
3.8.	Wirkung von (GPO) <sub>10</sub> auf die proMMP-Bindung .....	60
3.9.	Sättigbarkeit der (pro)MMP-Kollagen-Bindung .....	61
3.9.1.	(pro)MMP-2.....	61
3.9.2.	(pro)MMP-9.....	63
4.	Diskussion.....	65
5.	Zusammenfassung.....	76
6.	Literaturverzeichnis .....	79
7.	Danksagung.....	87
8.	Lebenslauf .....	88
9.	Erklärung.....	89

## **1. Einleitung**

### **1.1. Leberzirrhose und -fibrose**

Die Leberzirrhose ist der Endzustand verschiedener Lebererkrankungen, bei denen die kontinuierliche Leberzellschädigung über viele Jahre einen knotigen Umbau des gesamten Leberparenchyms mit Ausbildung von Regeneratknoten und Bindegewebssepten sowie Entwicklung von Gefäßverbindungen im Sinne intrahepatischer und extrahepatischer portokavaler Shunts bewirkt, durch den die normale Architektur und Zirkulation der Leberläppchen zerstört wird. Dies führt zum Ausfall der normalen Synthese-, Exkretions-, Biotransformationsfunktion der Leber. In Europa und USA sind 40-60% der Leberzirrhosen auf Alkoholabusus und ca. 30% auf chronische Virushepatitiden zurückzuführen, seltenere Ursachen stellen Erkrankungen wie Autoimmunhepatitiden, die primär biliäre Zirrhose oder primär sklerosierende Cholangitis und metabolisch-hereditäre Erkrankungen wie die Hämochromatose dar (1).

Der geschätzte volkswirtschaftliche Schaden, vor allem durch Arbeitsunfähigkeit, Arbeitsausfall, vorgezogene Berentung und hohe stationäre Kosten im Endstadium der Erkrankung, beläuft sich auf rund 4 Milliarden Euro pro Jahr. Dem volkswirtschaftlichen Schaden steht ein relativ geringer Aufwand für Medikamente gegenüber. Mit 0,2% des Medikamenten-Budgets sind die chronischen Lebererkrankungen, z.B. verglichen mit den Herz-Kreislauf-Erkrankungen, deutlich unterrepräsentiert. Ein entscheidender Grund dafür ist, dass bislang keine effektive antifibrotische Therapie vorhanden ist (2). Eine Ursache für die geringe Effektivität der bisherigen Therapie ist vor allem die bis vor kurzem unzureichende Kenntnis über die molekularen Mechanismen der Organfibrosierung.

Der Leberzirrhose geht die Leberfibrose, per definitionem eine quantitative Vermehrung der extrazellulären Matrix (EZM) ohne endgültige Zerstörung der Leberarchitektur, voraus. Bei der Fibrosierung der Leber spielen die vermehrte Synthese und Ablagerung von Bindegewebe kombiniert mit einem verminderten Abbau die entscheidende Rolle (3, 4).



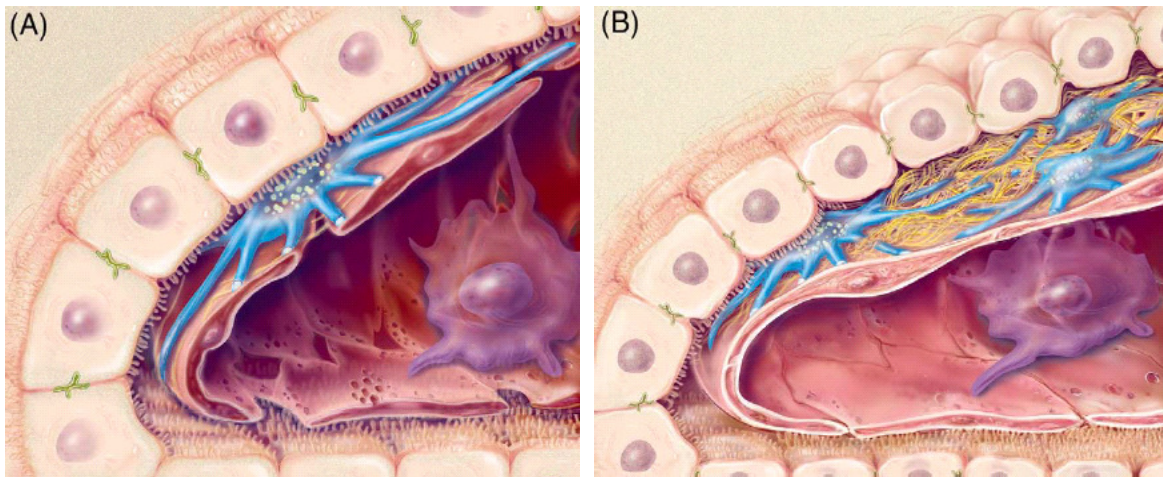


Abbildung 1: **Entwicklung der Leberfibrose.** (A) Normale sinusoidale Architektur mit einer hepatischen Sternzelle HSZ (blau) mit perinukleären Vitamin-A-Tropfen. Die EZM ist nur niedrig dicht und daher nicht hervorgehoben. (B) Bei einer Leberschädigung kommt es zur Vermehrung der HSZ, einer Akkumulation von dichter EZM (gelb), einem Verlust von Mikrovilli der Hepatozyten (weiß) und einem Verschluss der endothelialen Fenestrae. Aus (5).

Aktiviert hepatische Stammzellen (HSZ), die sich im Disse'schen Raum der Leber befinden, sind neben portalen Myofibroblasten, die wegen ihrer Ähnlichkeit zu den HSZ im Folgenden unter diesen subsumiert werden sollen, die wesentliche Quelle der fibrotischen EZM (6). Nach akutem oder chronischem Leberschaden durchlaufen die HSZ einen Aktivierungsprozess hin zu einem Phänotyp, der durch eine gesteigerte Proliferation, Beweglichkeit, Kontraktilität und Synthese von Bestandteilen der EZM gekennzeichnet ist. Dieser Aktivierungsprozess wird durch eine Vielzahl proinflammatorischer, proliferationsfördernder und fibrogener Zytokine initiiert und aufrechterhalten (7). Durch die netzartige Anhäufung von Proteinen der EZM, vor allem von Kollagen Typ I (KI) und Kollagen Typ III im Leberparenchym wird die normale Architektur zerstört. Als Konsequenz kommt es zur verringerten hepatozellulären Funktion und zu erhöhtem intrahepatischem Blutflusswiderstand, welche zur hepatischen Insuffizienz und portalen Hypertension führen kann (4).

## 1.2. Extrazelluläre Matrix (EZM)

Unter der EZM versteht man vereinfacht alle Strukturen, die den Raum zwischen den Zellen der verschiedenen Gewebe ausfüllen. Da tierische Zellen keine Zellwand besitzen, bilden sie, um den Zusammenhalt der Zellen im Gewebe zu verstärken, um

die Zellen herum ein komplexes Netzwerk aus Proteinen und Kohlehydraten, die EZM. Das geht weit über mechanische Funktionen, wie den Schutz und Einbettung der Organe, Bildung eines Gerüsts für Adhäsion und Migration oder Ausbildung von Gleitlagern in den Gelenken, hinaus. Die EZM nimmt einen großen Einfluss auf die Modulation der umgebenden Organe, deren Homöostase und übernimmt regulative Aufgaben bei der Embryogenese, der Zellproliferation, -migration und -differenzierung, bei der fibrogenen Aktivierung und Deaktivierung und innerhalb des Immunsystems (8).

Die EZM zeigt eine typische Zusammensetzung in erster Linie aus Kollagenen, nichtkollagenen Glykoproteinen und Proteoglykanen. Die in der Leber vorkommenden EZM-Moleküle sind in Abbildung 2 zusammengefasst.

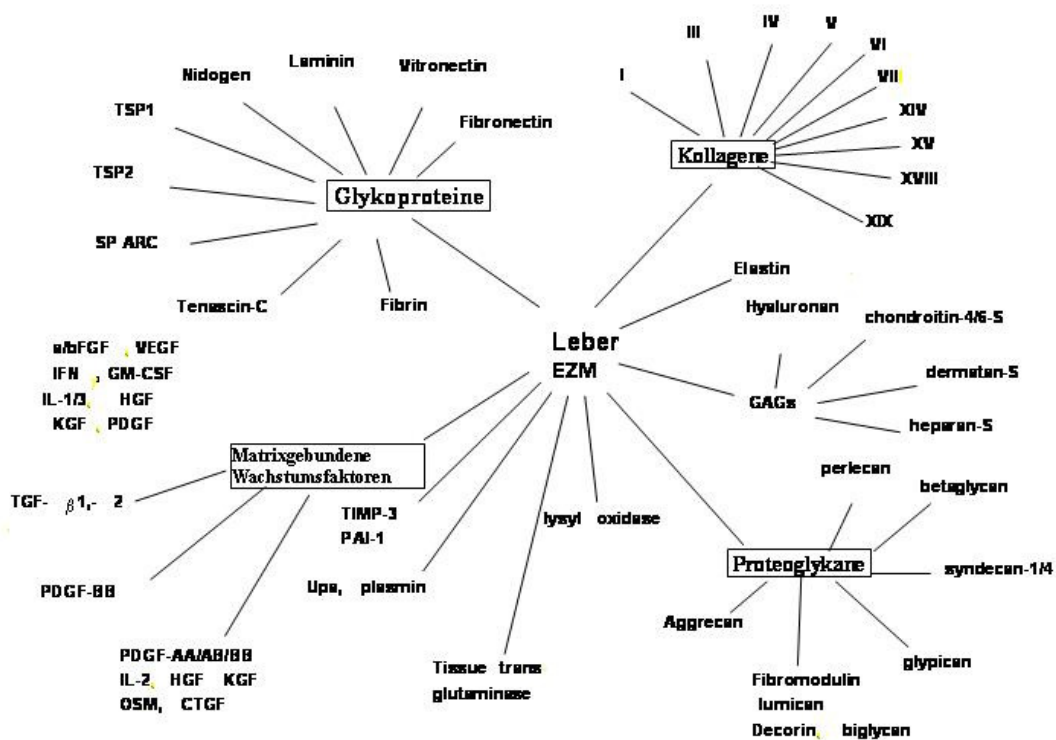


Abbildung 2: **Komponenten der EZM der Leber und ihre Gruppenzuordnung.** BM - Basalmembran, CTGF - Bindegebswachstumsfaktor, FGF - Fibroblasten-Wachstumsfaktor, GAGs - Glukosaminoglykane, GM-CSF - Granulozyten-Makrophagen-Wachstumsfaktor, HGF - menschlicher Wachstumsfaktor, IFN - Interferon, IL - Interleukin, KGF - Keratinozyten-Wachstumsfaktor, OSM - Oncostatin M, PAI - Plasminogenaktivator-Inhibitor, PDGF - aus Thrombozyten stammender Wachstumsfaktor, S - Sulfat, SPARC - sezerniertes, Cystein-reiches saures Protein, TGF - transformierender Wachstumsfaktor, TIMP - gewebespezifischer Inhibitor von Metalloproteinasen, TSP - Thrombospondin, Upa - Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp, VEGF - Wachstumsfaktor für vaskuläre Endothelien. Modifiziert nach (8).

Quantitativ machen Kollagene den größten Anteil der EZM-Moleküle aus und sind auch die am häufigsten vorkommenden Proteine bei Säugetieren, wo sie etwa ein Viertel des Gesamtproteinhaushalts darstellen (9). Die 20 bisher bekannten Kollagene, von denen 10 in der Leber vorkommen, können zwei Hauptklassen zugeordnet werden: den fibrillenbildenden Kollagenen mit der "klassischen" so genannten Kollagenstruktur einer durchgehenden Tripelhelix oder den sehr heterogenen, nichtfibrillären Kollagenen mit verschiedenen nichtkollagenen Domänen, die die Tripelhelixstruktur nur in bestimmten Molekülanteilen aufweisen (8-10). Entscheidend für die tripelhelikale Struktur ist dabei die kollagene Sequenz Glycin-X-Y, wobei letztere beide Aminosäuren häufig durch Prolin und Hydroxyprolin besetzt werden. Es ist üblich, diese Sequenzen im Einbuchstabencode für die Aminosäurereste darzustellen. Bei ‚n‘ Wiederholungen der o.g. Sequenzen wären diese z.B. als  $(GPO)_n$  oder  $(GPP)_n$  bezeichnet. Die großen Pyrrolidinringe der Prolin- und Hydroxyprolinreste behindern sich sterisch gegenseitig. So gestatten sie den Peptidketten eine nur geringe Drehung in sich und stabilisieren dadurch die aus drei Ketten entstehende Tripelhelix. Prädestinierend für die Entstehung der Tripelhelix ist Glycin, das an Stelle einer raumgreifenden Seitenkette nur einen einzelnen Wasserstoffrest enthält und so optimal in das enge Innere einer Tripelhelix passt. Der elektronegative Sauerstoff der Prolinreste sowie die Hydroxylgruppe der Hydroxyprolinreste begünstigen die Ausbildung intramolekularer Wasserstoff-Brückenbindungen, welche die drei Polypeptidketten miteinander verknüpfen. Lysin- und Hydroxylysinreste tragen zur Bildung kovalenter Bindungen innerhalb und zwischen den Tropokollagen-Molekülen bei und sind damit für die Zugfestigkeit des Kollagens entscheidend (11)

Neben den Kollagenen enthält die EZM auch Proteoglykane, bestehend aus einem Glykoprotein, dem so genannten Core Protein, mit Glykosaminoglykanseitenketten sowie Glykoproteine, Eiweiße, die einen Kohlenhydratanteil von mehr als 5% kovalent gebunden halten. Vertreter dieser Gruppe sind z.B. Vitronektin, Tenascin, Fibronectin und Laminin. In einer erweiterten Definition der EZM, die den vielfältigen Funktion der EZM verstärkt Rechnung trägt, werden auch matrixassoziierte Moleküle erfasst: Sie bildet einen Speicher für Moleküle, die spezifisch von der EZM gebunden werden, wie bestimmte Zytokine wie z.B. Oncostatin M (12). Dieses wird auch als Crinopexy bezeichnet (13).

Die EZM unterliegt einem ständigen, kontrollierten Abbau, Umbau und Aufbau. Man spricht hier geradezu von einem *Tissue Remodelling*. Der Abbau von Komponenten der EZM ist für biologische Prozesse, wie die des Wachstums, der Embryogenese oder der Wundheilung notwendig. Unter physiologischen Bedingungen ist der Abbau der EZM zeitlich und räumlich begrenzt und wird von endogenen Inhibitoren kontrolliert. In vielen pathologischen Situationen bedingt massiver EZM-Abbau durch Proteinasen Gewebszerstörung. So ist z.B. die Gelenkzerstörung in rheumatoider Arthritis vor allem durch die erhöhte Proteinaseaktivität bedingt, welche nicht durch endogene Inhibitoren in Schach gehalten wird (14).

Proteolytische Enzyme sind entweder Exopeptidasen, die eine oder mehrere Aminosäuren vom Amino- oder Carboxyterminus des Proteins abspalten oder Endoproteinasen, die innerhalb der Peptidkette angreifen (15). Bisher gibt es wenig Hinweise für eine Rolle der Exopeptidasen in der EZM-Degradation (14). Die Endoproteinasen werden nach ihrem katalytischen Mechanismus in vier Klassen eingeteilt, in die Aspartat-, Cystein-, Serin- und Metalloproteinasen; die weitere Einteilung erfolgt nach charakteristischen Aminosäuresequenzen oder auch Motiven, welche im katalytischen Zentrum integriert sind. Vertreter aus jeder dieser vier Gruppen sind bekannt dafür, EZM-Makromoleküle abzubauen, wobei jedoch die Matrixmetalloproteinasen (MMPs) die wichtigsten Prozesse vermitteln, die zum Abbau und Umbau der EZM führen (8, 16).

### **1.3. Matrixmetalloproteinasen (MMPs)**

#### **1.3.1. Nomenklatur**

Die MMPs bilden eine Familie von bisher mindestens 25 bekannten Proteasen. Ursprünglich wurden die einzelnen Mitglieder nach dem Hauptsubstrat benannt und in verschiedene Gruppen unterteilt (Tabelle 1).

Tabelle 1: **Gruppenzuordnung und Substratspezifität von MMPs.** Agg - Aggrecan; Ela - Elastin; Gel - Gelatine; Fib - Fbrin; Fn - Fibronectin; Koll - Kollagen, Typ; Lam - Laminin, PG - Proteoglykane; Ame - Amelogenin; \*Substrate nicht beschrieben. (nach (17, 18))

Gruppe	Bezeichnung	Agg	Ela	Gel	Koll	Lam	MMP	And.
Kollagenasen	MMP-1 Kollagenase 1	+			I-III, VII, VIII, X		2, 9	
	MMP-8 Kollagenase 2	+	+	+	I-III, V, VII, VIII, X	+		
	MMP-13 Kollagenase 3	+		+	I-IV			
Gelatinasen	MMP-2 Gelatinase A	+	+	+	I-V, VII, X, XI	+	9,13	
	MMP-9 Gelatinase B	+	+	+	IV, V, VII, X, XIV			
Stromelysine	MMP-3 Stromelysin 1			+	I, III, IV, IX- XI	+	7, 8, 13	PG
	MMP-10 Stromelysin 2	+	+	+	III-V		1,8	
	MMP-11 Stromelysin 3	+				+		
	MMP-12 Elastase		+	+	IV	+		
Membrane-type (MT)-MMPs	MMP-14 MT1-MMP	+	+	+	I-III	+	2, 13	
	MMP-15 MT2-MMP			+		+	2	
	MMP-16 MT3-MMP						2	
	MMP-17 MT4-MMP			+				Fib
	MMP-24* MT5-MMP							
	MMP-25* MT6-MMP							
Matrilysine	MMP-7 Matrilysin	+	+	+			2, 9	
	MMP-26 Matrilysin Endometase	2,		+	IV			
Ungruppiert	MMP-19 RASI-1	+		+	IV	+		
	MMP-20 Enamelysin	+						Ame
	MMP-23* CA-MMP							
	MMP-28* Epilysin							

Im Unterschied zur Gruppe der „echten“ Kollagenasen, die natives Kollagen spalten, degradieren die Gelatinasen denaturiertes Kollagen, die Gelatine. Zu den Substraten der Stromelysine gehören nicht-kollagene Matrixproteine und Proteoglykane. Bei einer vierten Gruppe der MT-MMPs sind nicht bevorzugte Substrate, sondern ihre Membranbindung entscheidend für die Zuordnung. Inzwischen ist bekannt, dass die meisten der Enzyme an verschiedenste Substrate binden, inklusive an die inaktiven Proformen anderer Mitglieder der Familie und dass die Substratspezifitäten überlappen können. In der neueren Nomenklatur wurde daher versucht, mit der Verbindung zwischen Name und Funktion zu brechen, indem allen MMPs fortlaufende Nummern gegeben wurden, so z.B. MMP-2 für Gelatinase A. Es gibt jedoch Lücken und Überschneidungen, z.B. sind MMP-4 und -6 noch nicht beschrieben und MMP-5 ist identisch mit MMP-2 (19).

### **1.3.2. Domänenstruktur und -funktion**

Komplexe Moleküle wie MMPs werden in Untereinheiten gegliedert. Unter einer Domäne versteht man dann eine funktionell und strukturell autonome Region innerhalb eines Proteinmoleküls, die wiederum aus Modulen zusammengesetzt sein können (20, 21). Module sind kleiner als Domänen, bestehen meist aus 40-100 Aminosäureresten und werden durch eine oder mehrere Disulfidbrücken stabilisiert. Die Abbildung 3 illustriert die Domänenstruktur von Kollagenasen, Gelatinasen und MT-MMPs.

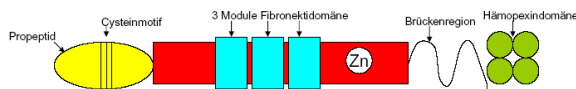
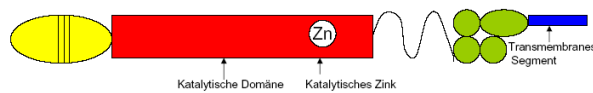
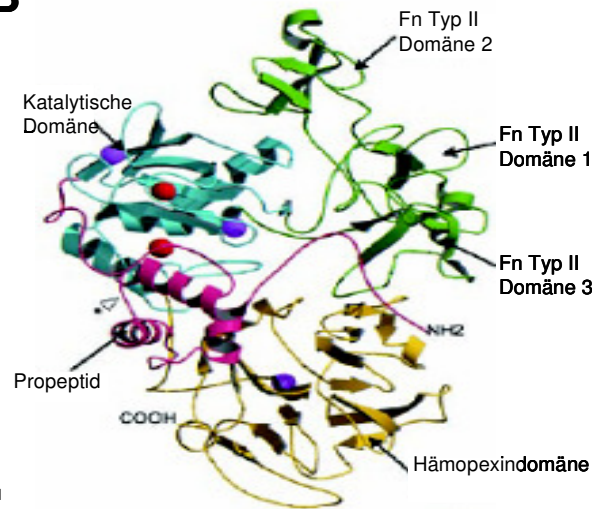
**A****Kollagenasen/Stromelysine:****Gelatinasen:****MT-MMPs:****B**

Abbildung 3: **Domänenstruktur verschiedener MMPs.** (A) Strukturell gemeinsam sind den Kollagenasen, Gelatinasen und MT-MMPs das Propeptid (gelb) mit seinem charakteristischen Cystein-Motiv (schwarze Linien), die katalytische Domäne mit dem katalytischen Zinkion (Zn) und die Hämopexindomäne (grüne Propellerflügel), welche mit der katalytischen Domäne über die Brückenregion (schwarz) verbunden ist. Die Gelatinasen haben außerdem noch zusätzlich eine Fibronektindomäne (hellblau), welche in der katalytischen Domäne inseriert ist. Kollagenasen und Gelatinasen sind sezernierte MMPs im Gegensatz zu den membranständigen MT-MMPs, welche über ein transmembranäres Segment (dunkelblau) in der Zellmembran verankert sind. Nach (17, 18, 22-24). (B) Schleifen stellen helikale Strukturen und gerade Abschnitte Falblattstrukturen dar. Eine Seitenkette der Prodomäne inseriert in eine Tasche des dritten Fibronektin-Moduls COL-3. Nach (25).

Das aminoternale Propeptid erhält die Enzymlatenz aufrecht und wird zur Aktivierung des Enzyms in der Regel abgespalten (26). Die katalytische Domäne enthält das aktive Zentrum, welche das Substrat spaltet. Eine charakteristische Aminosäuresequenz bindet über die darin liegenden Histidinreste das katalytische Zinkion, stellt also ein Zinkbindungsmotiv dar. Die Substratbindungsstelle der katalytischen Domäne der Gelatinasen ist mit ca. 5 Å zu eng für ein tripelhelikales Kollagenmolekül mit einem ungefähren Durchmesser von 15 Å. Außerhalb des katalytischen Zentrums gibt es weitere kollagenbindende Domänen, die Hämopexin- und Fibronektindomäne, die man dann als *Exosites* bezeichnet. Sie modulieren und erweitern das substratspezifische Profil der MMPs, indem sie zusätzliche Kontaktstellen bilden (27).

Die carboxyterminale Hämopexindomäne der Kollagenasen ist verantwortlich für die Bindung von Kollagen und der gewebespezifischen Inhibitoren der MMPs (TIMPs; *Tissue Inhibitor of Matrixmetalloproteinase*). Bei den Gelatinasen hingegen ist die Hämopexindomäne nicht für die Kollagenbindung verantwortlich, sie bindet die TIMPs, Heparin und Fibronectin (28). Sie ist mit der katalytischen Domäne über eine Brückensequenz oder Hinge Region verbunden, die wichtig ist im Zusammenspiel mit der Hämopexindomäne (26, 29). Die Hinge-Domäne nimmt eine tripelhelikale Struktur an und bildet den so genannten Prolin-*Zipper*, welcher mit der Kollagen-Tripelhelix interagiert und diese so weit aufweicht, dass sie für die katalytische Domäne zugänglich wird (30-32).

Die Gelatinasen haben in der katalytischen Domäne eine Fibronectindomäne, die aus den drei Cystein-reichen, sich wiederholenden Modulen COL-1, COL-2 und COL-3 besteht. Diese Strukturen ähneln den kollagenbindenden Typ II-Wiederholungen von Fibronectin und können gleichzeitig mehrere Kollagenmoleküle bzw. Abschnitte eines Moleküls binden. Auch die isolierte Prodomäne bindet an COL-3, hat aber eine geringere Bindungsaffinität wie wenn im vollständigen Molekül vorliegend. Das ist ein wichtiger Hinweis darauf, dass die Tertiärstruktur eine wesentliche Rolle für das Bindungsverhalten spielt (31-33).

### **1.3.3. Regulation der Expression**

Die Regulation der MMP-Aktivität wird streng kontrolliert. Es sind vier Ebenen bekannt (18). Die erste Kontrollebene ist die Transkription, die unter dem Einfluss bestimmter Zytokine steht (26). Die meisten MMPs werden in normalen adulten Geweben nur gering exprimiert, aber z.B. während der Embryogenese oder bei Umbauvorgängen im Rahmen von Entzündung, Wundheilung, Fibrogenese, Tumordinvasion oder Metastasierung hochreguliert (18, 26, 34). Speziell in hepatischen Sternzellen (HSZ) reguliert z.B. der profibrogene transformierende Wachstumsfaktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) die Basalmembran-abbauende Gelatinase MMP-2 hoch, wirkt jedoch inhibitorisch auf die Kollagenasen MMP-1, MMP-3 und die Gelatinase MMP-9. Über die zweite Ebene, die der Translation zu den proMMPs ist bisher wenig bekannt (34). Die dritte Ebene, die posttranslationale Prozessierung der proMMPs zu den biologisch aktiven MMPs, ist hingegen gut untersucht. Hierbei spielt sowohl die Kontrolle der MMP-Sekretion, als



auch die Aktivierung von den latenten MMPs eine Rolle. So wird MMP-9 in tertiären Granula von zirkulierenden Neutrophilen gespeichert und nach Aktivierung der Neutrophilen durch inflammatorische Mediatoren freigegeben (35). Die vierte Ebene der Regulation wird durch die aus zwei Domänen bestehenden physiologischen Inhibitoren der MMPs, die TIMPs, bestimmt. Die aminoterminal Domäne der TIMPs inhibiert durch die Interaktion mit der katalytischen Domäne der MMPs diese sehr effizient (26). Die carboxyterminale Domäne bindet die latenten Formen der Gelatinasen A und B. Bislang konnten 4 dieser Inhibitoren identifiziert werden, wobei TIMP-2 bevorzugt an proMMP-2 bindet und TIMP-1 an proMMP-9.

#### 1.3.4. Regulation der Aktivität und Aktivierung

Wie andere proteolytische Enzyme auch, werden die MMPs als inaktive Proenzyme oder Zymogene synthetisiert. Mit Ausnahme der MT-MMPs, die intrazellulär durch Furin im trans-Golgi-Netzwerk aktiviert werden und bereits aktiviert sezerniert werden, erfolgt bei allen anderen MMPs die Abspaltung des Propeptids zur Aktivierung des Enzyms in mehreren Schritten außerhalb der Zelle (Abbildung 4).

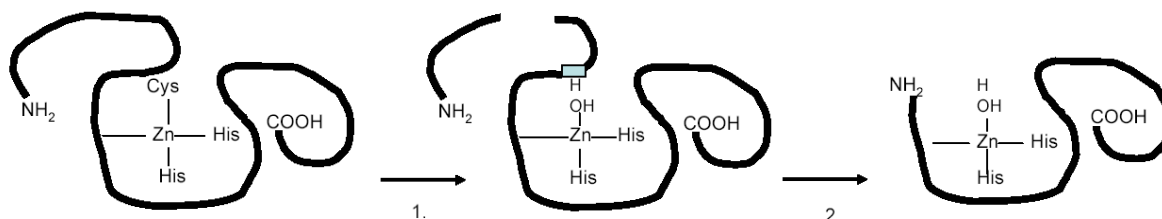


Abbildung 4: **Aktivierung latenter MMP durch Abspaltung des Propeptids.** NH<sub>2</sub> - Aminoterminal, COOH - Carboxyterminal, Zn - Zinkion, His - Histidin, Cys - Cystein. Nach (36).

Die Prodomäne enthält als charakteristisches Motiv die so genannte *Cysteine Switch Sequence* mit der Aminosäurefolge RRCG(N/V)D. Die Thiolgruppe des Cysteinrestes bindet koordiniert an das Zink-Ion der katalytischen Domäne. Eine Unterbrechung dieser Bindung durch den ersten Schritt, eine Spaltung in der Mitte des Propeptids, leitet die Aktivierung ein. Die Interaktion der Zink-Ions in der katalytischen Domäne mit dem Cysteinrest ist also entscheidend für die Aufrechterhaltung der Latenz von MMPs.

(29, 36). Die Dissoziation des Propeptids wird sowohl autokatalytisch durch bereits aktivierte MMPs als auch durch andere Proteinasen, wie Plasmin, Furin oder Urokinase moduliert (19). Durch andere MMPs wird dann das Propeptid vollständig abgespalten und das katalytische Zentrum ganz freigelegt.

Unter physiologischen Bedingungen kann proMMP-2 durch einen einzigartigen perizellulären Mechanismus aktiviert werden, der in der Abbildung 5 schematisch gezeigt ist.

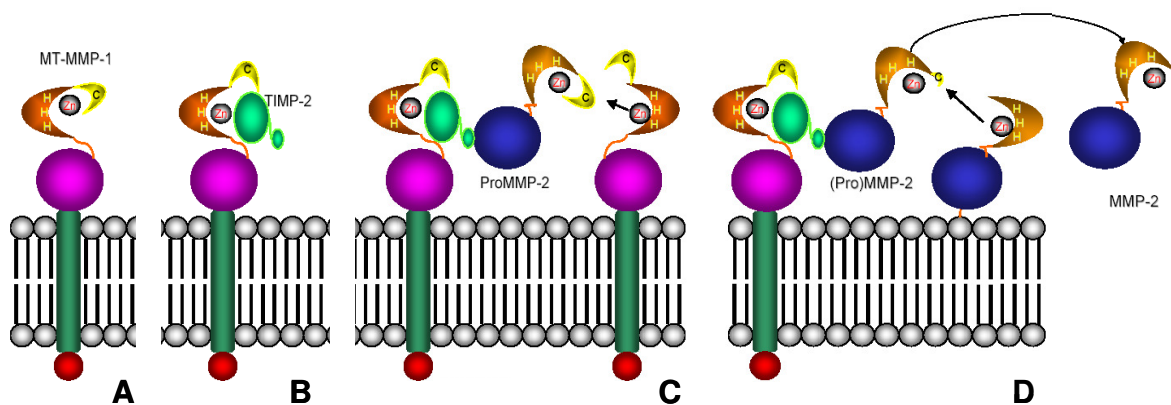


Abbildung 5: **Aktivierung von MMP-2.** (A und B) Membranständiges MT-MMP-1 bildet mit TIMP-2 und einem proMMP-2 einen Komplex und inhibiert so seine Aktivität. (C) Über seinen Carboxyterminus bindet es gleichzeitig an die Hämopexindomäne eines freien bzw. Matrix-assoziiert vorliegenden proMMP-2. Ein benachbartes freies, nicht inhibiertes MT-MMP-1 aktiviert das proMMP-2 teilweise durch fast vollständiges Entfernen des Propeptids. (D) Der verbleibende Anteil des Propetids wird durch ein anderes, bereits aktiviertes MMP-2 Molekül, was entweder frei oder benachbart an die Zelloberfläche gebunden vorliegt, entfernt. Schließlich entsteht ein vollständig aktiviertes MMP-2. Nach (37, 38).

In Abhängigkeit vom lokalen molaren Verhältnis zwischen MMP-2 und TIMP-2 wird aktiviertes MMP-2 entweder von der Zelloberfläche abgegeben, bleibt an der Zelloberfläche gebunden oder wird durch ein anderes TIMP-Molekül inhibiert (37, 38).

Voll aktivierte MMPs sind in Abwesenheit eines Substrats oder eines TIMP instabil und zerfallen im Verlauf autolytisch in Fragmente (36). So bildet sich bei der Aktivierung von MMP-9 durch MMP-3 in Anwesenheit von TIMP zunächst eine stabile Intermediärform mit einer Größe von 82 kDa. Bei TIMP-freiem Enzym kommt es nach 24 h zur Autolyse und durch den Verlust der katalytischen Domäne entsteht ein inaktives 50-kDa-Fragment (39). Auch aktiviertes MMP-2 ist in Abwesenheit eines Substrates instabil und wird autolytisch in mehrere inaktive Fragmente gespalten (40). Diese autolytische

Inaktivierung könnte ein alternativer Mechanismus für die posttranslationale Kontrolle der MMP-2-Aktivität sein (41).

Das unterstreicht die besondere Bedeutung der in dieser Arbeit zu untersuchenden Speicherung von MMPs in der EZM, da hier die MMPs einerseits bei intakter EZM vor Autodegradation geschützt wären und andererseits bei Matrixdegradation vermehrt zur Verfügung stünden.

Offen ist, ob für die Aktivierung der MMPs das Propeptid vollständig abgespalten werden muss. Aus Geweben kann proteolytisch aktives MMP-9 extrahiert werden, welches sich in einer Zymographie nach der elektrophoretischen Auftrennung vom Molekulargewicht her als Proform darstellt, die ca. 10 kDa größer ist als das MMP-9 ohne sein Propeptid. Von proMMP-9 wird angenommen, dass eine Bindung an Kollagen Typ IV bzw. Gelatine zu einer Konformationsänderung führen kann, die das katalytische Zentrum teilweise freilegt und so eine katalytische Aktivität des Enzyms trotz nicht abgespaltenen Propeptids möglich machen könnte (42, 43).

### **1.3.5. Kollagenbindung von Gelatinasen**

Der Ausgangspunkt der Überlegung, dass die EZM ein Speicher für Gelatinasen sein könnte, waren Arbeiten, in denen Gelatinasen mit Dissoziationskonstanten (KD) im Bereich niedriger molarer Konzentrationen an Kollagene banden, die bis dahin nicht als Substrate beschrieben waren (44-46). Die Bereiche auf den Kollagenen, an die MMPs binden können, wurden mittels Cyanbromid (CB)-erzeugter Spaltprodukte der  $\alpha 1$ -Kette von Kollagen I [ $\alpha 1(I)$ ] und einer rekombinanten Fibronectin-II-Domäne von MMP-2 eingegrenzt (47-49).

Für die latente und aktivierte Form der Gelatinasen wurde eine Bindung an Kollagen Typ I und IV, Gelatine und Laminin gezeigt, schwach auch noch an Fibronectin und Heparansulfat. Während die Proform besser an KI und Gelatine band, wurde die aktivierte Form eher mit Kollagen Typ IV und Laminin assoziiert gefunden (45).

#### **1.4. MMPs und therapeutische Ansätze**

Bei neoplastischen Erkrankungen wäre die Hemmung der MMPs mit ihren multiplen biologischen Wirkungen wie Tumorwachstum, Neovaskularisation und Metastasierung primäres Ziel. Erste therapeutische Überlegungen im Zusammenhang mit der Nutzung der endogenen MMP-Inhibitoren stammen daher auch aus der onkologischen Forschung. Die Ergebnisse waren jedoch enttäuschend, da anscheinend die TIMPs neben der MMP inhibierenden Wirkung auch eine direkte, stimulierende Wirkung auf die Tumorgenese haben können, was sie als Therapeutikum unbrauchbar macht (50). Es wurden Inhibitoren auf der Basis von Hydroxamaten und auch Tetrazyklin-Derivate entwickelt (51). Hier sind die therapeutischen Erfolge offenbar durch die geringe Spezifität der Substanzen auf der Ebene der MMP-Subtypen gering. Die Blockade erfasst zwar das aktive, Matrix-abbauende Zentrum des Enzyms, jedoch nicht die übrigen MMP-Domänen, die Effekte auf Proliferation, Differenzierung und Apoptose haben können. Perspektivisch wäre daher eine Kombination von Inhibitoren mit Angriffspunkten an verschiedenen Domänen der MMPs interessant (27).

Auch in der Leberfibrose ergeben sich differenzierte Expressions- und Aktivitätsmuster der MMPs, bzw. TIMPs, die kaskadenartig aufeinander wirken.

Beim Menschen werden in der frühen Phase der Leberschädigung proMMP-3 und proMMP-1, sowie Plasminogenaktivatoren vom Urokinasetyp durch aktivierte HSZ produziert. Die Aktivatoren wandeln wiederum Plasminogen in Plasmin um, welches seinerseits proMMP-1 und proMMP-3 durch Abspaltung der Prodomäne aktiviert. Das Stromelysin MMP-3 schädigt die Basalmembran, indem es Kollagen Typ IV degradiert und aktiviert darüber hinaus MMP-1, sowie MMP-9. In der frühen Phase überwiegen also die Faktoren des EZM-Abbaus (34).

In der späteren Phase überwiegt der matrixakkumulierende Phänotyp. Fällt die Lebernoxie nicht weg, kommt es also zur andauernden Schädigung, ändert sich das Expressionsmuster der aktivierten HSZ. Sie bilden proMMP-2, sowie MT-MMP-1 und TIMP-2, die eine zentrale Rolle bei der MMP-2-Aktivierung spielen. In hoher Konzentration hemmt, in niedriger Konzentration aktiviert TIMP-2 proMMP-2. Je stärker das Verhältnis zugunsten des TIMPs verschoben ist, umso stärker ist die zu beobachtende Fibrosierung (52). Ebenfalls durch die HSZ gebildetes TIMP-1 inhibiert

direkt interstitielle Kollagenasen und damit den Abbau fibrillärer Kollagene. Bei fibrotischen Erkrankungen mit erwünschter Fibrolyse ist der Einsatz von TIMP-Antagonisten, wie z.B. Sequenzen aus MMP-9, grundsätzlich denkbar (53).

Neben der Veränderung der EZM durch die gelatinolytische Aktivität ist MMP-2 auch ein Proliferationsfaktor für die HSZ (54).

### **1.5. Fragestellung**

Mit der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob MMPs in der EZM gespeichert und damit in ihrer lokalen Aktivität modulierbar sind. Hierzu sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- 1) Sind Matrixmetalloproteinasen *in situ* mit der extrazellulären Matrix fibrotischen Lebergewebes assoziiert?
- 2) An welche isolierten EZM-Moleküle und daraus abgeleitete Strukturen binden MMPs *in vitro*?
- 3) Ist die Bindung vom Aktivierungszustand der MMPs abhängig?
- 4) Lässt das Bindungsverhalten Rückschlüsse auf eine Konsensusbindungssequenz zu?
- 5) Kann die Bindung von MMPs durch (synthetische) Strukturanaloga inhibiert werden und in welcher Größenordnung liegt die Stärke der Bindung?

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Reagenzien

#### Reagenz

(7-Methoxycoumarin-4-yl)Acetyl-Pro-Leu-Gly-Leu-(3-[2,4-Dinitrophenyl]-L-2,3-Diaminopropionyl)-Ala-Arg-NH<sub>2</sub> (Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH<sub>2</sub>)

6-Amino-n-Hexanonsäure

Aceton

Acrylamid

Alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase (APAAP)-Komplex Maus

Amidoschwarz

Ammoniumbikarbonat (ABC)

Ammoniumperoxydisulfat (APS)

Aprotinin

Borsäure

Bovines Serumalbumin (BSA)

Bromphenolblau

Brückenantikörper; Kaninchen anti Maus

Calciumchlorid

Chloroform

Coomassie Brilliant Blue-G250, Gebrauchslösung "Bio-Safe Coomassie Stain"

Coomassie Brilliant Blue-R250

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Elektrophoreseprobenpuffer, dreifach konzentriert

Essigsäure

Fast Red Kit (Flasche A: Tabletten aus Fast Red, Naphtolphosphat, Levamisol; Flasche B: 100 mM Tris-HCl, pH 8,2)

Fibrinogen

Fibronectin

Fötale Kälberserum (FKS)

Glycerol

#### Hersteller

Bachem, Weil am Rhein, DE

Sigma, Deisenhofen, DE

J.T.Baker, Deventer, NL

Merck, Darmstadt, DE

DAKO, Hamburg, DE

Serva, Heidelberg, DE

Merck

Sigma

Sigma

Merck

Sigma

Merck

DAKO

Sigma

Sigma

BioRad, München, DE

Merck

Sigma

BioRad

Merck

DAKO

Chemicon, Temecula, US

Chemicon

Biochrom, Berlin, DE

Sigma

Glycin	Sigma
Grundmedium RPMI 1640 (10x)	Invitrogen, Groningen, NL
Harnstoff	Merck
Irrelevantes Maus-IgG	DAKO
Kaisers Glyceringelatine	Merck
<b>Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>
2-Mercaptoethanol	Sigma
mAb spezifisch für humanes MMP-2, Klon 75-7F7	Oncogene, Cambridge, US
mAb spezifisch für humanes MMP-9, Klon 4H3	R&D Systems, Minneapolis, US
Methanol	J.T. Baker
Meyers Hämalaun-Lösung	Merck
N,N`-Methylen-bisacrylamid	Pharmacia, Gebstedt, DE
N,N,N`,N`-Tetramethylethylenamin (TEMED)	Sigma
Natriumazid	Merck
Natriumchlorid	Sigma
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Sigma
N-succinimidyl-3-(4-Hydroxy-3-[ <sup>125</sup> I]-iodophenyl) propionate (Bolton Hunter Reagenz), spezifische Aktivität: 2200 Ci/mmol	DuPont NEN, Boston, US
p-Aminophenyl-Quecksilberacetat (APMA)	Sigma
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Sigma
Polyoxyethylen-23-Laurylether (Brij 35)	Sigma
Polyoxyethylenesorbitan Monolaurat (Tween 20)	Sigma
Polyoxyethylenesorbitan Monooleat (Tween 80R)	Sigma
Ponceaurot	Serva
pro-MMP-2, human rekombinant	Invitex, Berlin, DE
pro-MMP-9, human rekombinant	Invitex
Sulfosalicylsäure	Merck
Tosyl-L-phenylalaninchlormethylketon (TPCK)-Trypsin	Sigma
Trichloressigsäure (TCA)	Merck
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)-Base	Sigma
Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Hydrochlorid (Tris-HCl)	Sigma
Triton-X 100	Sigma

## 2.2. Materialien und Geräte

### Material

Blotkammer für Proteintransfer "Fastblot"  
Brutschrank mit CO<sub>2</sub>  
Cellophanbögen  
  
Durchlichtmikroskop "BX51"  
Einwegpipetten; Nennvolumina 5, 10 und 25 ml  
  
Expositionskassette "Hypercassette TM"  
  
Fettstift „DAKO Pen“  
Feuchte Kammer „Eigenbau“  
Filterpapier für Blot  
Fluorescence Microplate Reader „FLx800“  
  
Heizplatte, maximale Temperatur 70 °C  
  
Kammer für die vertikale Gelelektrophorese „Mini-Protean II“  
Kryostat "CM 3050"  
Mikrotiterplatten, 96 wells  
Mikrotiterplatten; Polystyrol; Immulon 2HB  
Removawell Strips  
Oberschalenwaage „VI-4800“  
Objektträger (unbehandelt oder mit Aminopropyltriethoxysilan behandelt) und Deckgläschen  
pH-Meter "Portamess"  
Präzisionswaage „BP210D“  
Reaktionsgefäße; 1,5 und 2 ml  
Röntgenfilm „Biomax MS Film“  
Rührer "Reax 2000"  
Säule für Gelfiltration mit Sephadex G25, Typ PD-10  
Scanner "Studio Scan II si"  
Schüttler "TPM-2"  
Transfermembran für Western-blot, Nitrocellulose, 0,45 µm

### Hersteller

Biometra, Göttingen, DE  
Heraeus, Hanau, DE  
Ann Arbor Plastics, Ann Arbor, US  
Olympus, Hamburg, DE  
BD Biosciences, Heidelberg, DE  
Amersham Pharmacia, Freiburg, DE  
DAKO  
Charité, Berlin, DE  
Bio-Rad  
BioTek Instruments, Winooski, US  
Harry Gestigkeit, Düsseldorf, DE  
BioRad  
  
Leica, Bensheim, DE  
Dynex, Chantilly, US  
Dynatech, Chantilly, US  
  
AccuLab, Göttingen, DE  
Menzel Gläser, Braunschweig, DE  
  
Knick, Berlin, DE  
Sartorius, Göttingen, DE  
Eppendorf, Hamburg, DE  
Kodak, Stuttgart, DE  
Heidolph, Schwabach, DE  
Amersham, Freiburg, DE  
Agfa, Köln, DE  
Sarstedt, Nürmbrecht, DE  
Bio Rad



Verstärkerfolie für Autoradiographie „Biomax Transcreen HE Kodak Intensifying Screens“	Kodak
Zähler für $\gamma$ -Strahlung „ $\gamma$ -Counter“	Berthold, Bad Wildbach, DE
Zentrifuge für Reaktionsgefäße "Biofuge Pico"	Heraeus
Zentrifugenröhrchen; 50 und 15 mL	Nunc, Naperville, US
Zymographiegel; Fertiggel mit 10% Acrylamid und 10% Gelatine	Bio-Rad

### 2.3. Kollagene und Kollagenmimetika

Die nativen Kollagene der Typen I - VI und XIV, sowie die Einzelketten von KI, hier mit  $\alpha 1(I)$  bzw.  $\alpha 2(I)$  bezeichnet, wurden in der eigenen Arbeitsgruppe nach Standardprotokollen aus humanen Plazenten isoliert (12, 55-57). Durch Reduktion und Alkylierung (12, 55-57) wurden die nativen Kollagene denaturiert und die einzelnen Ketten isoliert.

Definierte Fragmente von  $\alpha 1(I)$  wurden durch Spaltung mit Cyanbromid (CB), welches hinter der Aminosäure Methionin spaltet, ebenfalls nach in der Arbeitsgruppe etablierten Standardprotokollen hergestellt (58). Abbildung 6 zeigt schematisch die Lage der einzelnen CB-Fragmente der  $\alpha 1(I)$  Kette. CB1-Fragment befindet sich auf dem Propeptid und ist nicht dargestellt.

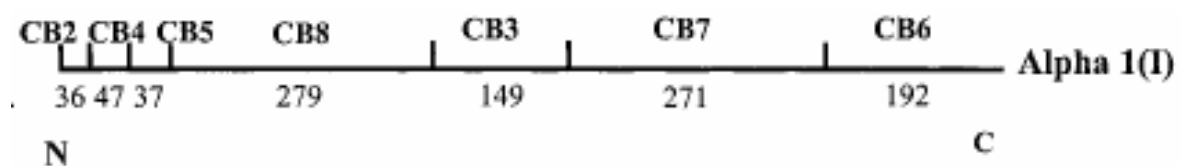


Abbildung 6: **Schematische Darstellung der CB-Fragmente von  $\alpha 1(I)$ .** Die Zahlen in der unteren Reihe stehen für die Anzahl der Aminosäurereste des entsprechenden Fragments. N: Aminoterminus, C: Carboxyterminus. Aus [Thomson, 2003 #1133]:

Alle Kollagene, die kollagenen Einzelketten und CB-Fragmente wurden mit Konzentrationen von jeweils 2 mg/ml in 150 mM Essigsäure gelöst und bis zur Verwendung bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

In Kooperation mit Dr. R.W. Farndale und Dr. C.G. Knight (Department of Biochemistry, University of Cambridge) wurden synthetische auf der Kollagenstruktur basierende Peptide (Kollagenmimetika), mit den in der Tabelle 2 dargestellten Aminosäuresequenzen hergestellt bzw. eingesetzt (59, 60).

Tabelle 2: Struktur synthetischer Kollagenanaloga (Kollagenmimetika). Dargestellt ist die Kurzschriftweise, die Sequenz/Struktur, die Anzahl der Aminosäurereste (AS), das Molekulargewicht (MW) sowie die Rigidität ( $T_m$  1/2) der Kollagenmimetika. Die Aminosäuresequenzen sind im Einbuchstabencode wiedergegeben. O steht für Hydroxyprolin.

Name	Sequenz	AS	MW (g/mol)	$T_m$ 1/2 (C°)
(GPO) <sub>10</sub>	H-GCO-(GPO) <sub>10</sub> -GCOG-NH <sub>2</sub>	37	3291,6	82,3
(GPP) <sub>10</sub>	H-GCP-(GPP) <sub>10</sub> -GCPG-NH <sub>2</sub>	37	3099,6	45,8
GPP`	H-GPC-(GPP) <sub>5</sub> -GFOGER-(GPP) <sub>5</sub> -NH <sub>2</sub>	39	3700,0	43
GAP	H-GAC-(GAP) <sub>5</sub> -GFOGER-(GAP) <sub>5</sub> -NH <sub>2</sub>	42	3389,8	linear

## 2.4. Immunhistologie

### 2.4.1. Gewebeproben

Proben humaner zirrhotischer Leberexplantate wurden von Prof. Dr. P. Neuhaus, Berlin, freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Abschnitte des Lebergewebes wurden in PBS eingebettet, bei -196°C in flüssigem Stickstoff schockgefroren und die Blöcke bei -80°C aufbewahrt. Für die Färbung wurden die Proben im Kryostaten 5 µm dünn geschnitten. Die Schnitte wurden auf silanisierten Objektträgern aufgenommen, 3 min bei 80°C im Wärmeschrank erhitzt und anschließend 1 h an der Luft getrocknet. Die so vorbehandelten Schnitte wurden 10 min in Aceton fixiert und bis zur Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

## 2.4.2. APAAP-Färbung

Zur Visualisierung antigener Strukturen wurde die Färbung mit dem alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase (APAAP)-Komplex gewählt (61).

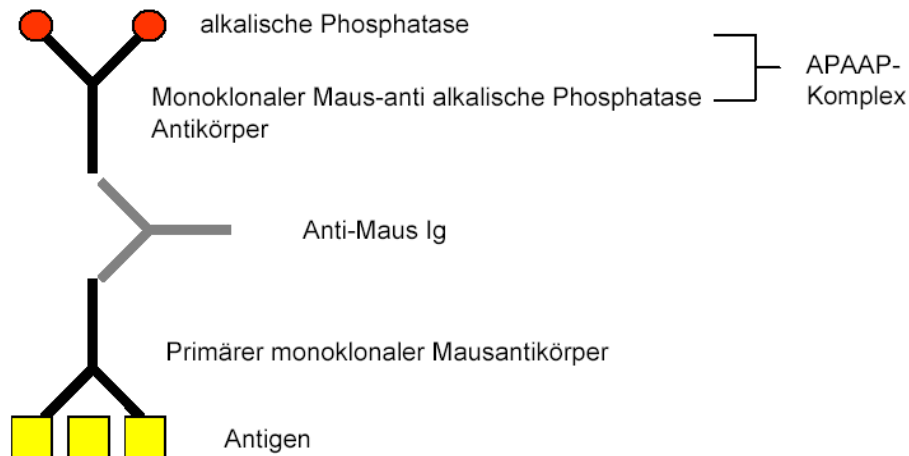


Abbildung 7: **Schematischer Aufbau eines Maus-spezifischen APAAP-Komplexes.**

Enthält die zu untersuchende Gewebeprobe das entsprechende Antigen, so bindet ein spezifischer Primärantikörper daran. Ein Maus-spezifischer, so genannter Brückenantikörper verbindet die Fc-Teile des primären Antikörpers mit einem Immunkomplex, der aus alkalischer Phosphatase und einem ebenfalls aus der Maus stammenden Antikörper gegen die alkalische Phosphatase besteht. Über den Umsatz eines chromogenen Substrates durch die alkalische Phosphatase wird die Bindung des Komplexes lichtmikroskopisch sichtbar gemacht.

*Puffer und Lösungen:*

PBS/Tween            0,05% (v/v) Tween 20 in PBS

RPMI-I (zum Verdünnen des 1. Antikörpers und des APAAP-Komplexes)

5 mL RPMI 1640 (10x), 5 mL FKS (hitzeinaktiviert),  
50 mg Natriumazid wurden in 40 ml *A. bidest.* gelöst und der  
pH-Wert mit 40-50 µL gesättigter NaOH auf 7,4-7,6  
eingestellt. Lösung wurde mit *A. bidest* auf 50 mL aufgefüllt.

RPMI-II (zum Verdünnen der Brückenantikörper)

1 Teil Humanserum (hitzeinaktiviert), 7 Teile RPMI-I

TBS- 0,9 g Tris-Base; 6,85 g Tris-HCl; 8,78g NaCl mit *A. bidest. ad*

Waschpuffer 1 L

Fast-Red-Lösung Unmittelbar vor der Verwendung wurde eine Fast-Red<sup>®</sup>-Tablette in 2 mL 100 mM Tris-HCl (pH 8,2) aufgelöst. Die Menge reichte für bis zu 8 Gewebeschnitte.

Nach dem Auftauen und Trocknen wurden die Schnitte humaner zirrhotischer Leber 5 min mit Chloroform nachfixiert, für 30 min in PBS/Tween blockiert. Für eine Vorinkubation wurden die Schnitte für 1 h bei Raumtemperatur mit 25 ng des entsprechenden proMMP inkubiert. Alle nachfolgenden Inkubationsschritte erfolgten mit einem Volumen von 50 µL pro Schnitt innerhalb von 30 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wurden die Objektträger mit reichlich TBS-Waschpuffer für 1-2 min gewaschen und in diesem belassen. Nach dem erstmaligen Benetzen wurde darauf geachtet, dass die Schnitte nicht antrockneten.

Zunächst wurden die Primärantikörper für MMP-2 bzw. MMP-9 so in RPMI-I aufgenommen, dass für jeden Schnitt 50 µL Antikörperlösung zur Verfügung standen. Die Mischungsverhältnisse ergaben sich aus den Herstellerangaben. Die Schnitte wurden mit der Antikörperlösung inkubiert. Als Negativkontrolle diente ein irrelevanter Antikörper aus der Maus. In den nächsten Schritten folgten der Brückenantikörper, der im Verhältnis 1:20 in RPMI-II verdünnt wurde, und anschließend der APAAP-Komplex der im Verhältnis 1:40 in RPMI-I verdünnt war. Nach dem letzten Waschschrift wurde auf jeden Schnitt ein Tropfen frisch hergestellter Fast-Red<sup>®</sup>-Lösung aufgetropft. Nach ca. 10 min wurde die Reaktion durch Abwaschen mit Leitungswasser gestoppt.

Für die Kern-Gegenfärbung wurden die Schnitte mit 40 mL Meyers Hämalaun-Lösung für 30-60 sec inkubiert und anschließend ca. 5 min in Leitungswasser gebläut. Alle Schnitte wurden mit auf 50 °C erwärmter Glyceringelatine eingedeckt und anschließend lichtmikroskopisch bei Objektvergrößerungen zwischen 10- und 40fach ausgewertet.

## 2.5. Aktivierung latenter MMPs

### *Puffer und Lösungen:*

proMMP-Lösungen	200 µg/mL proMMP-2 bzw. proMMP-9 in PBS
Aktivierungspuffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 200 mM NaCl, 5 mM CaCl <sub>2</sub>
Brij-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 200 mM NaCl, 5 mM CaCl <sub>2</sub> , 0,002% (w/v) Brij 35
Trypsin-Lösung	0,5 mg TPCK-Trypsin auf 1 mL Aktivierungspuffer, bei -20°C aufbewahrt.
Aprotinin-Lösung	1 mg Aprotinin auf 1 mL Aktivierungspuffer, bei -20°C aufbewahrt
APMA-Lösung	40 mM APMA in DMSO; bei -20°C aufbewahrt.

Die Aktivierung der MMP erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

ProMMP-2 wurde nur durch APMA, nicht durch Proteinase aktiviert. Zu 10 µL proMMP-2-Lösung wurden 19 µL Brij-Puffer und 1 µL 40 mM APMA-Lösung gegeben und das Gemisch 1 h bei 37°C inkubiert.

Zu 10 µL proMMP-9-Lösung wurden 20 µL Trypsinlösung und 70 µL Aktivierungspuffer gegeben und das Gemisch 20 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die enzymatische Aktivität des Trypsins durch die Zugabe von 10 µL Aprotininlösung für 10 min bei 37°C inhibiert.

Um eine Autokatalyse bei Raumtemperatur zu verhindern, wurden aktivierte MMPs in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

## 2.6. Bestimmung der enzymatischen Aktivität von MMPs

### 2.6.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In der SDS-Gelelektrophorese bilden Proteine mit Natriumlaurylsulfat (SDS) negativ geladene Komplexe mit konstanten Masse-Ladungsverhältnissen. Damit unterscheiden sich Proteine nur noch in ihrer Grösse und haben vergleichbare hydrodynamische Eigenschaften. Im elektrischen Feld wandern sie zur Anode und der Molekularsiebeffekt einer porösen Polyacrylamidmatrix trennt sie nach ihrem Molekulargewicht auf. Die Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) in ein Gemisch aus Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid startet eine Radikalreaktion, die zu einer Polymerisation der Acrylamid-Monomere führt. TEMED wirkt als Katalysator und das bifunktionelle Bisacrylamid vermittelt die Quervernetzung (62).

Diese Methode wurde zur Beurteilung des Erfolgs der Aktivierung der proMMPs und für Bindungsstudien mit definierten Kollagenen und Fragmenten verwendet.

#### *Puffer und Lösungen*

Trenngel-Lösung (Acrylamid)	(10%	16,2 g Tris-Base, 40,2 g Acrylamid, 540 mg Bisacrylamid, 400 mg SDS, 325 µL TEMED ad 394 ml <i>Aqua dest.</i> ; pH 8,3
Sammelgel-Lösung (Acrylamid)	(4%	4,8 g Tris-Base, 9,6 g Acrylamid, 0,13 g Bisacrylamid, 240 mg SDS und 6 µL TEMED ad 231 ml <i>Aqua dest.</i> ; pH 6,6
APS-Lösung		80 mg APS ad 10 ml <i>Aqua dest</i>
Elektrophoreselaufpuffer		25 mM Tris-Base (pH 8,3), 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS
Tris-Puffer (pH 6,8)		12 g Tris-Base ad 100 mL <i>Aqua dest.</i> ; pH 6,8
Probenpuffer 4-fach (nicht reduzierend)		2,08 ml Tris-Puffer (pH 6,8), 3,84 g Harnstoff, 1,2 g SDS, 900 mg Glycerol, 4 mg Bromphenolblau ad 14 mL <i>Aqua dest.</i>
Probenpuffer 4-fach (reduzierend)		10 mL Probenpuffer 4-fach (nicht reduzierend), 150 µL 2-Mercaptoethanol

Für das Trenngel wurden 4,9 mL der Trenngel-Lösung mit 112,5 µL APS-Lösung versetzt und in die vorbereitete Gelkammer pipettiert. Nach dem Überschichten des Gels mit *Aqua dest.* wurden dem Gel 2 h Zeit zum Polymerisieren gelassen. Das Wasser wurde abgeschüttet, dann wurden 1,5 mL Sammelgel-Lösung mit 125 µL APS-Lösung gemischt und das Trenngel damit überschichtet. Mit einem eingesteckten Kamm für die Auftragesaschen wurde das Sammelgel ebenfalls für 2 h polymerisiert. Die in die Taschen aufgetragenen Proteinlösungen mit 1-10 ng Gesamtprotein wurden zunächst mit einer angelegten Spannung von 80 V über 10 min im Sammelgel konzentriert und anschließend ca. 50 min bei 180 V elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Sichtbarmachung der Proteine wurden die Gele aus der Kammer entnommen und über Nacht in etwa 300 mL Färbelösung „Bio-Safe Coomassie Stain“ unter Schwenken inkubiert. Die Gele wurden 1 h in *Aqua dest* entfärbt und anschließend in Cellophanbögen eingelegt und an der Luft getrocknet.

### 2.6.2. Zymographie

Die Zymographie gestattet eine Zuordnung proteolytischer Aktivität zu Proteinen bestimmter Größe, die in einer SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Als Substrat der Gelatinasen enthalten die entsprechenden Gele Gelatine. Eine an die Renaturierung der Proteine anschließende Proteinfärbung färbt die Gelatine mit Ausnahme der Stellen, an denen das Substrat durch die Wirkung der MMPs abgebaut wurde. Diese erscheinen in der Darstellung weiß (63).

#### *Puffer und Lösungen:*

Elektrophoreselaufpuffer	25 mM Tris-Base (pH 8,3), 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS
Renaturierungspuffer	2,5% (v/v) Triton X-100 in PBS
Entwicklungspuffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 200 mM NaCl, 5 mM CaCl <sub>2</sub> , 0,02% (w/v) Brij 35
Färbelösung	0,5% (w/v) Coomassie Blue R-250 in 40% (v/v) Methanol/ 10% (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung	40% (v/v) Methanol/10% (v/v) Essigsäure
Fixierlösung	30% (v/v) Methanol/5% (v/v) Glycerol

Proben, mit jeweils 1 ng proMMPs bzw. der aktivierte Form der Poteine wurden in einem Fertiggel mit 10% Polyacrylamid und 10% Gelatine bei 120 Volt über ungefähr 90 min aufgetrennt. Zum Entfernen des SDS wurden die Gele aus der Kammer entnommen und zunächst dreimal 10 min in 100 mL Renaturierungspuffer gewaschen. Über Nacht wurden sie in 100 mL Entwicklungspuffer bei 37°C geschwenkt, damit die im Gel liegenden Enzyme die Gelatine abbauen konnten. Das im Entwicklungspuffer enthaltene Calcium ist hierbei für die Aktivität essentiell. Anschließend wurden die Gele mindestens 1 h bei Raumtemperatur in 100 mL Färbelösung inkubiert, innerhalb von 2 h sukzessive mit 5x 100 mL Entfärbelösung entfärbt und abschließend für 15 min mit 100 mL Fixierlösung behandelt. Hierbei bauen auch die in Höhe der Proformen gelaufenen proMMPs Gelatine ab, da sie über Nacht bei 27°C eine Autoaktivierung durchlaufen. Die Gele wurden zwischen Cellophanbögen gepackt; getrocknet und gescannt. Für die densitometrische Auswertung wurden die Bilder invertiert und mit dem Programm NIH-Image (Version 2.1 für Macintosh; National Institutes of Health, Bethesda, US; <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/Default.html>, Stand: 31.03.2000) bearbeitet. Die aktivierten MMPs waren durch Abspaltung der Prodomäne etwa 10 kDa kleiner als die entsprechende Proform.

### 2.6.3. Fluorimetrie

Die enzymatische Aktivität von MMPs kann durch die Umsetzung eines fluorogenen Substrates quantifiziert werden. Für Gelatinasen dient das Oligopeptid Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH<sub>2</sub> als Substrat. Über die Carboxylgruppe ist hier Mca als Fluorophor gebunden. Bei intaktem Peptid wird seine Fluoreszenz durch den so genannten Quencher Dpa ausgelöscht. Die Spaltung des Substrates zwischen dem Prolin- und dem Leucinrest hebt diese Inhibition auf und nach Anregung bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{\text{ex}} = 328$  nm kann eine bis Faktor 190 verstärkte Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{\text{em}} = 393$  nm detektiert werden (64, 65).



### *Puffer und Lösungen:*

Aktivitätspuffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 200 mM NaCl, 5 mM CaCl <sub>2</sub>
Substratlösung	800 mM Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH <sub>2</sub> in Aktivitätspuffer

In jedes Loch einer 96-Loch-Mikrotiterplatte wurden 150 µL Substratlösung pipettiert und im Fluoreszenz-Reader die Hintergrundfluoreszenz bestimmt. Anschließend wurde in jedes Loch 10 µL MMP-Lösung hinzupipettiert. Diese Lösungen enthielten versuchsabhängig genau 5-40 ng MMP-2 bzw. -9, vorzugsweise 10 ng.

Die Kinetik der Änderung der Fluoreszenzintensität wurde über einen Gesamtzeitraum von 60-120 min mit Messungen alle 20 sec erfasst (Spectra Gemini XS, Softmax Pro Software, Molecular Devices, Wetzlar, Deutschland). Für die Auswertung wurden die entsprechenden Werte der Hintergrundfluoreszenz von den eigentlichen Messwerten abgezogen.

## **2.7. Bindungsstudien mit immobilisierten Proteinen**

### **2.7.1. Radioaktive Markierung von (pro)MMPs**

Die radioaktive Markierung ist eine sensitive und schonende Methode, ein Protein für *in-vitro*- und *in-vivo*-Untersuchungen „sichtbar“ zu machen. Durch die Kopplung, z.B. mit Iod-125, einem  $\gamma$ -Strahler mit einer Halbwertszeit von 13 Tagen, ändern sich die chemischen Eigenschaften des Proteins bzw. Enzyms nicht oder nur marginal. Mit der Bolton-Hunter-Methode wird ein [<sup>125</sup>I]-markierter Ester unter Bildung eines Säureamids an die entsprechenden Gruppen des Proteins gekoppelt (66, 67). Eine Vorbedingung ist die hohe Reinheit des zu markierenden Proteins, die aus Träger (*Carrier*)-freien MMP-Präparationen zur Verfügung standen. Nicht gebundenes radioaktives Material wird mit Hilfe einer Gelfiltration aus dem Reaktionsgemisch entfernt (57).

*Puffer und Lösungen:*

(pro)MMP-Lösungen	200 µg/ml (pro)MMP-2 bzw. (pro)MMP-9 in PBS
Boratpuffer	30 mM Borsäure (pH 8,6)
Glycinpuffer	200 mM Glycin in Boratpuffer
PBS/Tween	0,05% (v/v) Tween 20 in PBS
TCA-Lösung	20% (w/v) TCA
PBS/BSA	1% (w/v) BSA in PBS

Das in Benzin gelöste Bolton-Hunter-Reagenz wurde im Stickstoffstrom bei Raumtemperatur eingedampft und anschließend mit einer Aktivität von 13,3 µCi/mL in Boratpuffer aufgenommen. Jeweils 25 µL dieser Lösung wurden mit 10 µL der entsprechenden (pro)MMP-Lösung gemischt. Nach 45 min bei 4 °C wurde die Reaktion mit 500 µL Glycinpuffer gestoppt und freies Bolton-Hunter-Reagenz gebunden.

Während der Inkubationszeit wurde eine PD-10-Gelfiltrationssäule mit 25 mL PBS/Tween äquiliibriert. Das Reaktionsgemisch wurde auf die Säule aufgetragen, mit PBS/Tween eluiert und das Eluat in zehn Fraktionen à 500 µL gesammelt. Aus jeder Fraktion wurden 2 µL im γ-Counter vermessen. Das radioaktiv markierte Protein erschien meistens in der fünften und sechsten Fraktion, die anschließend zusammengeführt wurden. *Aliquots* wurden bei -20 °C eingefroren und bis zu 2 Wochen in Bindungsstudien eingesetzt.

Zur Bestimmung des Anteils proteingebundener Radioaktivität wurden die Proteine mit TCA irreversibel gefällt. Drei parallele Ansätze mit jeweils 2 µL aus den gesammelten Fraktionen radioaktiv markierter MMPs wurden mit 200 µL PBS/BSA und 200 µL TCA-Lösung versetzt, 30 min bei 4 °C inkubiert und anschließend 5 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Proben der Überstände und des Sediments wurden getrennt im γ-Counter vermessen. In allen Markierungsansätzen waren über 96% der gesamten in der Probe nachweisbaren Radioaktivität mit TCA gefällt, lag also an das Protein gebunden vor.

Die Reinheit des markierten Proteins wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Autoradiographie kontrolliert. Dazu wurde der Blot mit einem Röntgenfilm und einer

Verstärkerfolie in einer Expositionskassette bei -80°C über Nacht exponiert. Nach Erwärmung der gesamten Kassette auf Raumtemperatur wurde der Film entwickelt und die Banden gescannt.

### 2.7.2. Mikrotiterplattenformat

Bestimmte Plastikmaterialien, wie z. B. Polystyrol, haben auf Grund ihrer Ladungsverhältnisse eine große Bindungskapazität für die ebenfalls elektrisch geladenen Proteine. Diese Eigenschaft macht man sich bei den Bindungs- und Inhibitionsstudien zu nutze. Setzt man Kollagene und Kollagenketten in Mengen von 2 µg/Loch im 96-Loch-Mikrotiterplattenformat ein, liegen die Bindungseffizienzen zwischen 21% und 48% des eingesetzten Gesamtproteins (12, 55-57).

*Puffer:*

ABC-Puffer                    50 mM ABC (pH 9;6)

PBS/Tween                    0,05% (v/v) Tween 20 in PBS

PBS

**Bindungsexperimente:** Löcher einer 96-Loch-Mikrotiterplatte wurden mit 2 µg nativen Kollagenen und deren Ketten, CB-Fragmenten und Kollagenmimetika bzw. mit 1 µg Fibronectin und Fibrinogen in 100 µL ABC-Puffer bzw. Fibrinogen in PBS für 12 h bei 4°C inkubiert. Als Kontrolle dienten BSA-beschichtete und unbeschichtete Löcher. Nach dem Waschen mit PBS/Tween wurden die freien Bindungsstellen der Mikrotiterplatten mit PBS/Tween für 1 h bei Raumtemperatur blockiert.

Nach erneutem Waschen wurde in jedes Loch 2 ng [<sup>125</sup>I]-markiertes (pro)MMP-2/-9 mit bekannter spezifischer Radioaktivität pipettiert und 2 h bei 4°C inkubiert. Nicht gebundenes MMP wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS/Tween entfernt. Die in den Löchern verbliebene Aktivität wurde mit einem γ-Counter bestimmt und aus dem Verhältnis zur eingesetzten Gesamtradioaktivität wurde die Bindung der untersuchten Proteine errechnet.

**Inhibitionsexperimente:** Kollagene und abgeleitete Verbindungen wurden wie oben beschrieben in Konzentrationen von 200 ng/Loch auf Mikrotiterplatten immobilisiert. Parallel dazu wurden jeweils 2 ng latentes bzw. aktiviertes [<sup>125</sup>I]-markiertes MMP in PBS/Tween mit unterschiedlichen Mengen von Kollagenen und abgeleiteten Verbindungen gemischt und 2 h bei 4°C in Lösung vorinkubiert. Anschließend wurden die Gemische auf die vorbehandelte Mikrotiterplatte gegeben und die Platte wie oben beschrieben inkubiert, gewaschen und die gebundene Radioaktivität gemessen.

**Sättigungsexperimente:** Kollagene und abgeleitete Verbindungen wurden wie oben beschrieben in Konzentrationen von 200 ng/Loch auf Mikrotiterplatten immobilisiert. Eine konstante Menge von 1-2 ng [<sup>125</sup>I]-markierten MMPs wurde mit ansteigenden Mengen nicht-markierten MMP, das in bis zu 400fachem Überschuss vorliegen konnte, gemischt. Anschließend wurden die Gemische auf die vorbehandelte Mikrotiterplatte gegeben und die Platte wie oben beschrieben inkubiert, gewaschen und die gebundene Radioaktivität gemessen. Für die Auswertung wurde die eingesetzte freie gegen die gebundene Radioaktivität aufgetragen. Aus den daraus resultierenden Graphen wurde die Stärke der Bindung des MMP an die entsprechende immobilisierte Struktur abgeschätzt.

### 2.7.3. Liganden-blot auf Nitrozellulosemembranen

Als *Blotting* bezeichnet man das Binden von Molekülen auf eine Membran, z.B. Nitrozellulose, mit hoher Bindungskapazität für die entsprechende Substanz. Elektrophoretisch aufgetrennte Moleküle können in einem diskontinuierlichen Puffersystem im elektrischen Feld direkt aus dem Gel auf die Membran transferiert werden. Diese Methode wird auch als *Semi Dry Blotting* bezeichnet. Zwei mit Blotpuffer getränkte Filterpapierstapel liegen an den Elektroden an. Dazwischen liegen die Membran und das Gel. Bei horizontal angeordneten Graphitelektroden wandern die Proteine vertikal aus dem Gel in Richtung der Anode zur Nitrozellulosemembran. Da die Proteine dabei unabhängig von Ladung und Größe mit gleicher Geschwindigkeit wandern, ein Effekt, den man als Isotachophorese bezeichnet, ist der Transfer gleichmäßig (68).

### *Puffer und Lösungen:*

Anodenpuffer I	300 mM Tris-Base (pH 10,4), 20% (v/v) Methanol
Anodenpuffer II	30 mM Tris-Base (pH 10,4), 20% (v/v) Methanol
Kathodenpuffer	25 mM Tris-Base (pH 9,4), 20% (v/v) Methanol, 40 mM 6-Amino-n-Hexanonsäure
Amidoschwarz- Lösung	0,1% (w/v) Amidoschwarz, 45% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure
Ponceaurot-Lösung	2% (w/v) Ponceaurot S, 30% (w/v) TCA, 30% (w/v) Sulfosalicylsäure. Unmittelbar vor der Verwendung 1:20 mit <i>A.dest.</i> verdünnt.
Blockierlösung	0,3 % (v/v) Tween 80R in PBS
Waschlösung	0,05 % (v/v) Tween 80R in PBS

Die Transfereinheit wurde zu einem Sandwich aufgebaut: ein zugeschnittenes Filterpapier wurde in Anodenpuffer I getränkt, auf die Anodenplatte platziert. Darauf wurden ein in Anodenpuffer II getränktes Filterpapier, die ebenso behandelte Nitrozellulose und das Gel gelegt. Dieser Stapel wurde durch zwei in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere ergänzt. Zwischen allen Schritten wurden die Luftblasen durch Rollen mit einem Glasspatel entfernt. Die Proteine wurden mit einer Stromstärke von 3-4 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche innerhalb von 1-1,5 h transferiert. Bei allen nachfolgenden Schritten durfte die Membran nicht wieder trocken werden. Die Qualität des Transfers wurde durch Färbung der Nitrozellulosemembran für 5 min mit Ponceaurot-Lösung geprüft. Die Spalte mit den Standardproteinen zur Abschätzung der Molekulargewichte wurde abgeschnitten und separat mit Amidoschwarz gefärbt. Der Rest der Membran wurde 1 h mit Blockierlösung inkubiert, mit reichlich Waschlösung gewaschen und schließlich mit 50 ng [<sup>125</sup>I]-markierten (pro)MMPs in 10 mL Waschlösung für 2 h bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert. Nicht gebundene MMPs wurden durch dreimaliges Waschen mit Waschlösung entfernt. Für die Autoradiographie wurde ein Röntgenfilm mit dem Blot und einer Verstärkerfolie in der Expositionskassette bei -80 °C über Nacht exponiert. Nach Erwärmung der Kassette auf Raumtemperatur wurde der Film entwickelt und das Bild für die weitere Auswertung gescannt.

#### **2.7.4. Dot-blot auf Nitrozellulosemembranen**

Jeweils 3  $\mu\text{L}$  Lösung mit Kollagenen und daraus abgeleitete Strukturen in ansteigenden Konzentrationen wurden auf eine Nitrozellulosemembran getropft und die Membran anschließend kurz an der Luft getrocknet. Freie Bindungsstellen wurden 1 h mit Blockierlösung geblockt und die Membran zweimal für 5 min in Waschlösung gewaschen. Anschließend wurde sie mit  $6 \times 10^5$  cpm (entsprechende ng siehe Tabelle 3) [ $^{125}\text{I}$ ]-markierten (pro)MMPs in 12 mL Waschlösung 2 h inkubiert. Um eine Autoaktivierung von proMMPs weitest möglich zu vermeiden, erfolgte diese Inkubation bei  $4^\circ\text{C}$ . Die Membran wurde dreimal mit Waschlösung gewaschen und die gebundene Radioaktivität wurde wie oben beschrieben in einer Autoradiographie visualisiert.

#### **2.8. Mathematische und statistische Auswertung**

Der Grad der Aktivierung von MMPs aus ihrer entsprechenden Proform wurde aus den densitometrischen Daten nach der folgenden Formel abgeschätzt und mit der „Image analysis software“ NIH Version 1.62 (National Institutes of Health, Bethesda, MD) analysiert:

Unkalibrierte OD (optische Dichte) =  $\log_{10}(255 / 255 - \text{Graustufenwert})$  [*Formel 1*]

Die Banden wurden dann über das identische Flächenmodul gemessen und diese Werte in Microsoft-Excel relativ zueinander bezogen. Daraus ergaben sich die prozentualen Veränderungen.

Die Bindung von MMPs an plastikgebundene Proteine wurde aus den Verhältnissen freier und gebundener [ $^{125}\text{I}$ ]-markierter MMPs nach der folgenden Formel ermittelt:

gemessene counts (nach Waschen) / eingesetzte counts [*Formel 2*]

In Sättigungsexperimenten zur Abschätzung der Stärke der Interaktion von MMPs mit immobilisierten Kollagenen und daraus abgeleiteten Verbindungen wurden die Ausgleichsgeraden und -kurven mit dem Programm DeltaGraph (Version 3.5 für Windows; Red Rock, Salt Lake City, US) berechnet.

Alle Untersuchungen erfolgten in experimentellen Gruppen von drei bis sechs Einzelbestimmungen und wurden mindestens zweimal wiederholt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm SigmaStat (Version 2.0; Jandel Scientific, San Rafael, US).

Die Mittelwerte aus den Gruppen wurden nach folgender Formel errechnet:

$$\text{Mittelwert} = \Sigma X_i / n \quad [\text{Formel 3}]$$

n - Anzahl paralleler Ansätze,  $X_i$  - individueller Messwert

Die Standardabweichungen (SD) in den Gruppen mit mindestens drei vergleichbaren experimentellen Ansätzen wurden nach der folgenden Formel abgeschätzt:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} \quad [\text{Formel 4}]$$

n - Anzahl paralleler Ansätze,  $X_i$  - individueller Messwert,  $\bar{X}$  - Mittelwert

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Lokalisation der proMMP-Bindung in der fibrotischen Leber

Um die Hypothese zu überprüfen, ob die Gelatinasen *in situ* an Strukturen der EZM binden, wurden Schnitte von Lebergewebe aus fibrotischen menschlichen Organen direkt oder nach Vorbehandlung mit dem entsprechenden latenten MMP immunhistologisch mit MMP-2- bzw. MMP-9-spezifischen Antikörpern untersucht (Abbildung 8).

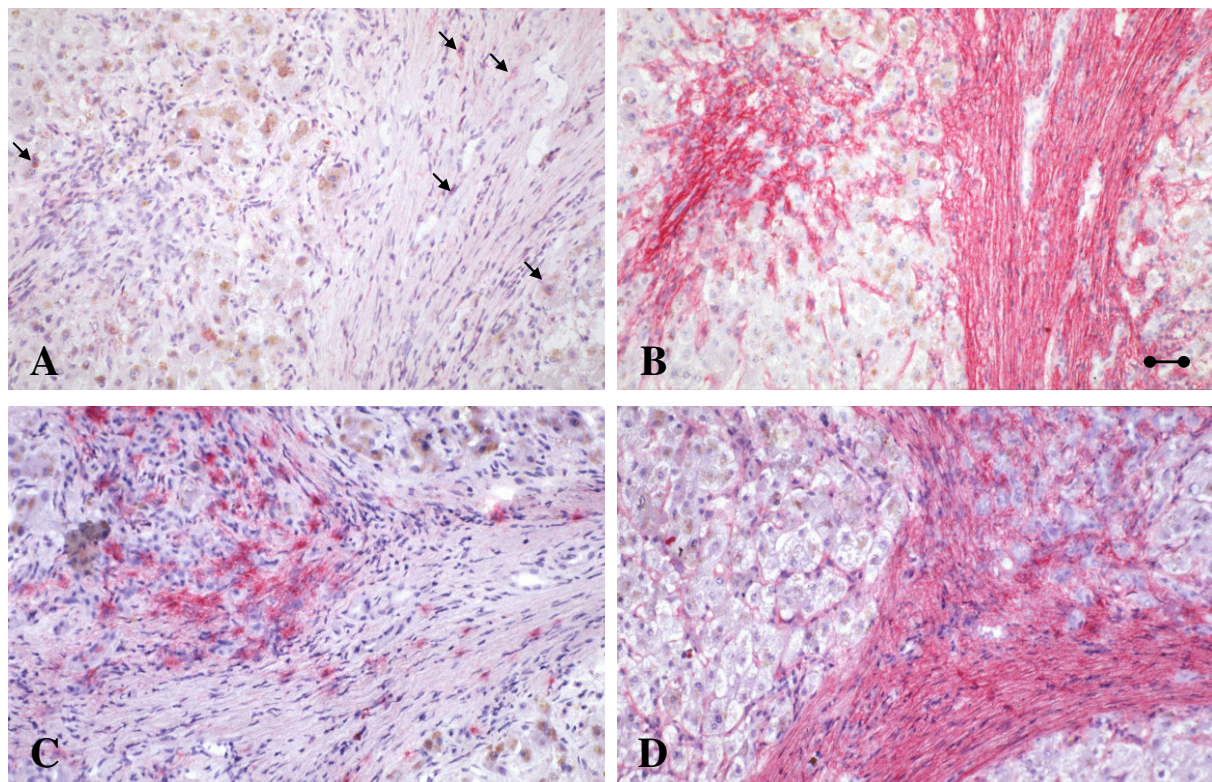


Abbildung 8: ***In-situ*-Nachweis von Gelatinasen im Gewebe humaner fibrotischer Leber.** Acetonfixierte Gefrierschnitte humaner fibrotischer Leber wurden nicht vorbehandelt (A, C) oder wurden mit 25 ng proMMP-2 (B) bzw. proMMP-9 (D) vorinkubiert. Nach dem Waschen der Schnitte wurde die Bindung mit MMP-2- (A, B) bzw. MMP-9-spezifischen mAb (C, D) nach der APAAP-Methode sichtbar gemacht. Die Pfeile markieren Einzelzellen mit schwacher perinukleärer und -zellulärer Bindung des MMP-2-spezifischen mAb. Der schwarze Balken entspricht einer Objektlänge von 10 µm.

Ohne Vorbehandlung der Schnitte war MMP-2 nur vereinzelt zellulär in den fibrotischen Septen und im umgebenden Gewebe nachweisbar (Abb. 8A). Unter den gleichen



Bedingungen fand sich MMP-9 perizellulär neben Kupffer-Zellen in den Septen und gleichzeitig in der Matrix des Regeneratknotens (Abb. 8C). Diese Darstellung deutete darauf hin, dass endogene MMPs außerhalb der produzierenden Zellen im Gewebe gebunden vorliegen können. Um einen Eindruck von der Bindungskapazität extrazellulärer Strukturen für MMPs zu erhalten, wurden Serienschnitte mit proMMP-2 (Abb. 8B) und proMMP-9 (Abb. 8D) vorbehandelt. Im Ergebnis waren beide gleichmäßig stark insbesondere an die fibrotischen Strukturen gebunden.

Die Bindung von proMMP-2/-9 an fibrotische Septen im Lebergewebe zeigte, dass die latenten Formen der Gelatinasen mit EZM-Strukturen assoziieren. Da in der fibrotischen EZM überwiegend Moleküle vorkommen, die nicht als Gelatinasesubstrat beschrieben wurden, wurde in allen nachfolgenden Experimenten mit hochgereinigten EZM-Molekülen und mit synthetischen Kollgenmimetika *in vitro* untersucht, welche EZM-Bestandteile für diese Bindung verantwortlich sind. Ferner sollten die die eigentlichen Bindungsstrukturen genauer eingegrenzt werden.

### 3.2. Aktivierung latenter MMPs

Für die Aktivierung latenter MMPs standen verschiedene Methoden zur Verfügung, die zunächst für die geplanten Versuchsserien optimiert werden mussten. Während beim proMMP-2 die Prodomäne in Gegenwart von APMA effizient und vollständig abgespalten wurde, war diese Methode nicht die günstigste für die Aktivierung von MMP-9. Die Abbildung 9 zeigt den Vergleich des zeitlichen Verlaufes der Aktivierung von MMP-9 durch APMA und durch die Behandlung mit TPCK-Trypsin.

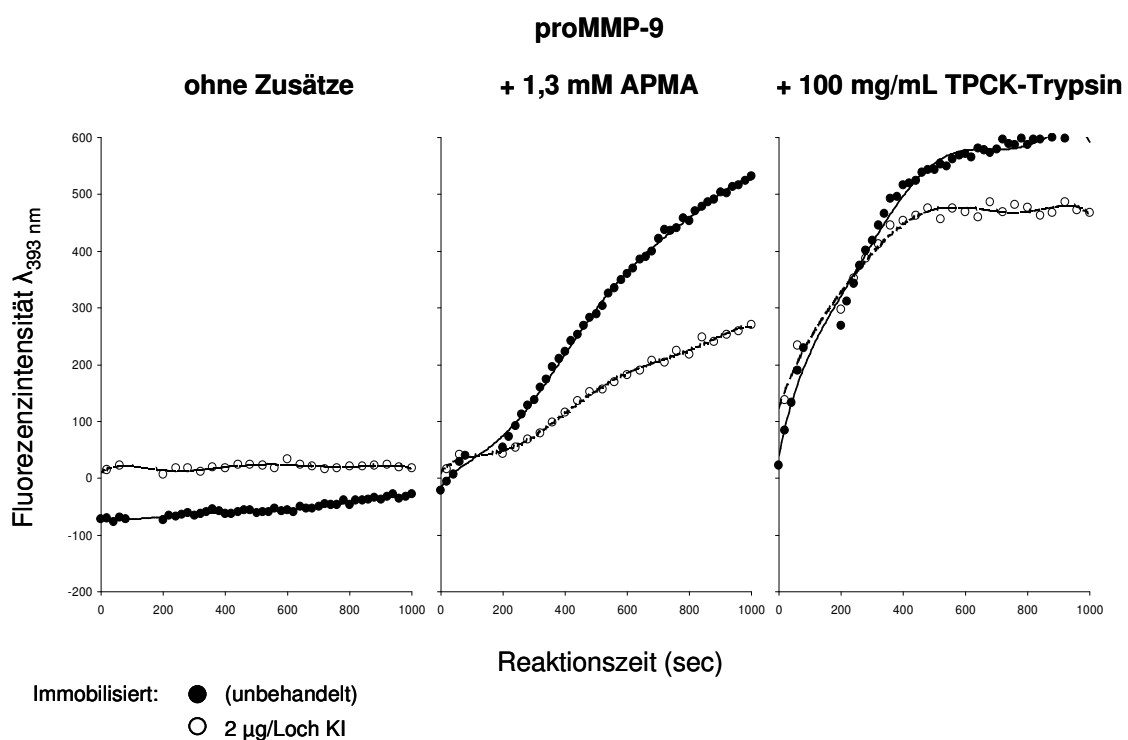


Abbildung 9: **Kinetik der Aktivierung von MMP-9.** In Mikrotiterplatten, die mit KI vorbehandelt waren oder unbehandelt blieben, wurde 40 ng proMMP-9 allein in Aktivierungspuffer oder in Gegenwart von APMA bzw. TPCK-Trypsin pipettiert. Die enzymatische Aktivität wurde alle 20 sec über einen Zeitraum von 17 min fluorimetrisch erfasst.

Ohne Zusatz eines aktivierenden Agens änderte sich die enzymatische Aktivität des proMMP-9 über den gesamten untersuchten Zeitraum nicht wesentlich. Das Proenzym war also unter diesen Bedingungen stabil. Die durch APMA-vermittelte carboxyterminale Autolyse führte letztlich zu einer Aktivierung, die dem Plateaubereich der Aktivierung durch Trypsin entsprach („schwarze“ Kurven, Mitte und rechts).

Während durch die Abspaltung des Propeptids durch Trypsin bereits nach 7 min die Aktivität maximal war, wurde mit APMA dieser Punkt erst zu Ende des Untersuchungszeitraumes erreicht. Über plastikgebundenem KI zeigte das proMMP-9 ohne Zusätze eine schwache enzymatische Aktivität, die über dem Niveau der unbehandelten Kontrolllöcher lag. Deren Höhe änderte sich jedoch im Verlauf nicht. Die Aktivierung mit APMA war durch das KI sowohl zeitlich verzögert als auch in der Höhe reduziert. Das ist ein starker Hinweis darauf, dass das proMMP-9 an KI gebunden sein könnte und so der APMA-vermittelten Autolyse nur begrenzt zugänglich war, bzw. die Autoaktivierung durch KI-Bindung inhibiert wurde. Bei der Behandlung mit Trypsin verringerte sich durch das plastikgekoppelte KI die Höhe des Plateaus der maximalen Aktivierung. Eine denkbare Ursache ist, dass das KI als Substrat für das Trypsin konkurrierte und das fluorogene Substrat deswegen nicht entsprechend umgesetzt werden konnte.

Für die weitere Verfahrensweise bedeutete dies, dass im Interesse einer vollständigen Aktivierung das proMMP-9 erst nach der Markierung mit [<sup>125</sup>I] mit Hilfe von Trypsin behandelt wurde.

### 3.3. Charakterisierung der [<sup>125</sup>I]-markierten (pro)MMPs

Das Bindungsverhalten latenter und aktivierter Gelatinasen sollte mit Hilfe radioaktiv markierter Enzyme untersucht werden. Die Tabelle 3 fasst den Erfolg aller Markierungsansätze zusammen.

**Tabelle 3: Erfolg der Markierung von (pro)MMP-2/-9 durch [<sup>125</sup>I] mit dem Bolton-Hunter-Reagenz.** Nach der Gelfiltration wurde die proteingebundene Radioaktivität der MMP-Fraktionen mit einem  $\gamma$ -Counter bestimmt. Gezeigt sind die spezifischen Aktivitäten aus 12 verschiedenen Markierungsansätzen.

Enzym	Form	Durchschnittlich inkorporierte Radioaktivität (x10 <sup>3</sup> cpm/ng Protein)
MMP-2	Latent	40 - 90
	aktiviert	30 - 80
MMP-9	Latent	10 - 20
	aktiviert	10 - 20

Während für das MMP-2 unabhängig von der vorliegenden Form relativ hohe spezifische Aktivitäten erreicht wurden, waren diese für MMP-9 und seine Proform im Schnitt um den Faktor 2-5 geringer. Dies ist durch die geringere Zahl der im Protein vorliegenden Lysinreste erklärbar.. In allen Fällen war die Markierung ausreichend für die nachfolgenden Bindungsstudien.

Im nächsten Schritt wurde geprüft, ob die Kopplung die Integrität der Moleküle und deren enzymatische Aktivität beeinflusst hatte. (Abbildungen 10 und 11).

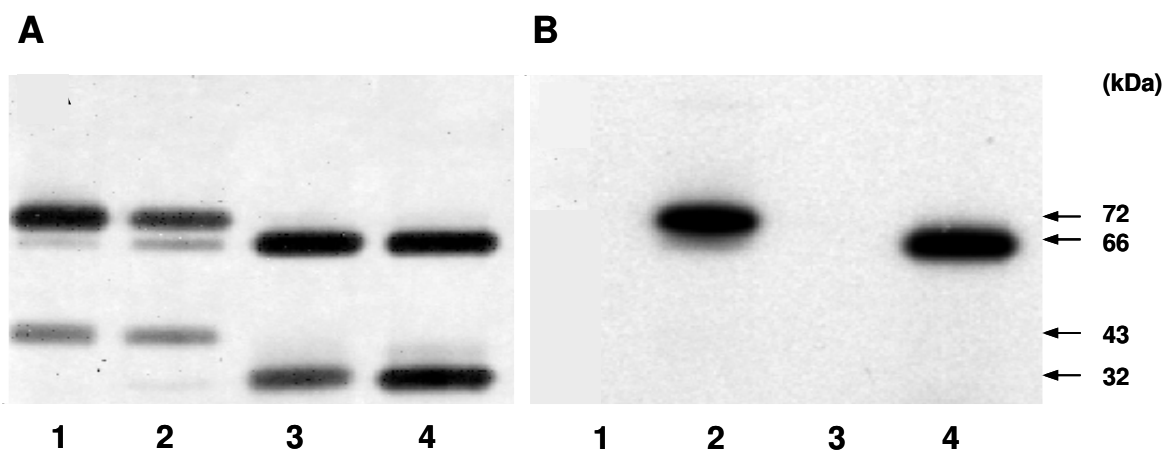


Abbildung 10: **Nachweis der Integrität von (pro)MMP-2 nach der Markierung mit  $[^{125}\text{I}]$ .** Jeweils 1 ng unmarkiertes (Spuren 1 und 3) bzw.  $[^{125}\text{I}]$ -markiertes (pro)MMP-2 (Spuren 2 und 4) wurden in einem Zymographie-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und (A) die Abspaltung der Prodomäne der Gelatinasen mit Coomassie-Brilliant-Blue R250 sichtbar gemacht. (B) Im getrockneten Zymographie-Gel vorhandenes radioaktiv markiertes Material wurde autoradiographisch sichtbar gemacht. Die Größen der Proteine sind angezeigt.

Vollständiges proMMP-2 hat ein Molekulargewicht von etwa 72 kDa. Eine entsprechende Bande stellte sich bei unmarkiertem Proenzym und etwas abgeschwächt auch nach der radioaktiven Markierung dar (Abb. 10A, Spuren 1 und 2). Durch partielle Autolyse wurde bei einem Teil des Proteins die Prodomäne abgespalten, was eine schwache Bande bei etwa 66 kDa ergab. Die Bande mit einem Molekulargewicht von 43 kDa entsprach einer Variante der Proform ohne die Hämopexindomäne. Nach der Behandlung des unmarkierten proMMP-2 mit APMA fehlte dem MMP-2 vollständig die Prodomäne (Abb. 10A, Spuren 3 und 4). Neben der erwarteten Bande bei 66 kDa zeigte sich hier bei 32 kDa ebenfalls eine Variante ohne Hämopexindomäne. In der Autoradiographie stellte sich sowohl bei der latenten als

auch bei der aktivierten Form des Enzyms nur der Anteil dar, bei dem die Hämopexindomäne erhalten war (Abb. 10B, Spuren 2 und 4). Der Anteil der nicht-markierten, definierten MMP-Bruchstücke lag in der densitometrischen Abschätzung im Bereich von 10-35% des Gesamtproteins.

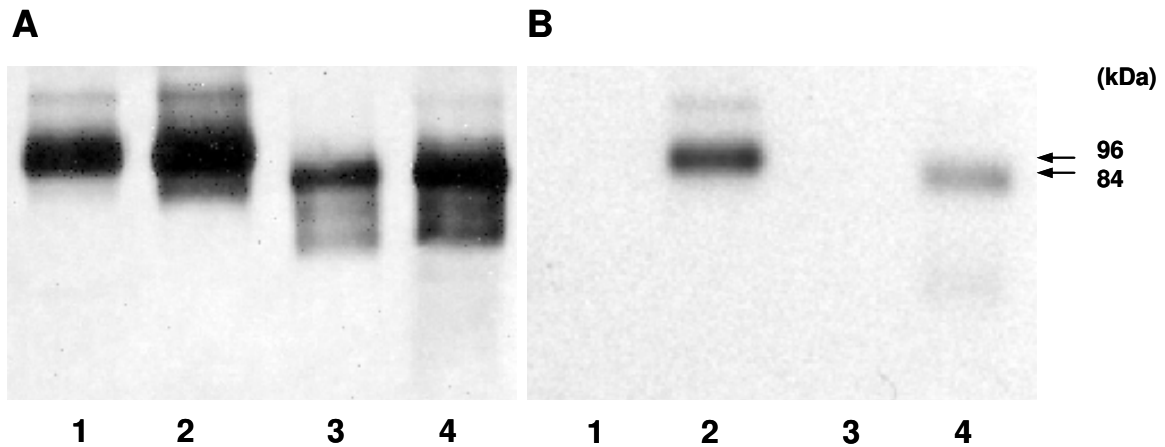


Abbildung 11: **Nachweis der Integrität von (pro)MMP-9 nach der Markierung mit  $[^{125}\text{I}]$ .** Jeweils 1 ng unmarkiertes (Spuren 1 und 3) bzw.  $[^{125}\text{I}]$ -markiertes (pro)MMP-9 (Spuren 2 und 4) wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Die enzymatische Aktivität der Gelatinasen (A) und die radioaktive Markierung (B) wurden wie in Abbildung 10 beschrieben sichtbar gemacht.

Im Gegensatz zum proMMP-2 fand keine Autoaktivierung statt und die Proform stellte sich in einer distinkten Bande bei etwa 96 kDa dar (Abb. 11A, Spuren 1 und 2). Nach der Behandlung mit Trypsin war das Propeptid vollständig abgespalten. Daraus resultierte in der Zymographie eine Bande, die einem Molekulargewicht von 84 kDa entsprach (Abb. 11A, Spuren 3 und 4). Die in der Tabelle 3 gezeigte geringere spezifische Aktivität der (pro)MMP-9-Präparationen spiegelte sich auch in der im Vergleich zum (pro)MMP-2 etwas schwächeren Schwärzung des Films in der Autoradiographie wider (Abb. 11B, Spuren 2 und 4).

Zusammengenommen bestätigten diese Daten, dass bei proMMP-2 durch die Behandlung mit APMA die Prodomäne vollständig abgespalten wurde. Für proMMP-9 war die Inkubation mit Trypsin erfolgreicher. Bei Markierung beider Gelatinasen und ihrer Proformen mit  $[^{125}\text{I}]$  bleibt die Integrität und die Aktivität der Proteine erhalten.

### 3.4. Bindung von (pro)MMP-2/-9 an EZM-Bestandteile

#### 3.4.1. Bindung von proMMPs an isolierte Kollagene und Glykoproteine

Zur Beantwortung der Frage, an welche Bestandteile der EZM die Proformen der Gelatinasen bevorzugt binden, wurde deren Bindung an hoch gereinigte und an Polystyrol immobilisierten Molekülen, die bevorzugt in der EZM der Leber vorkommen, untersucht. Die Abbildung 12 zeigt das Ergebnis eines Screenings mit verschiedenen Glykoproteinen der EZM und Kollagenen.

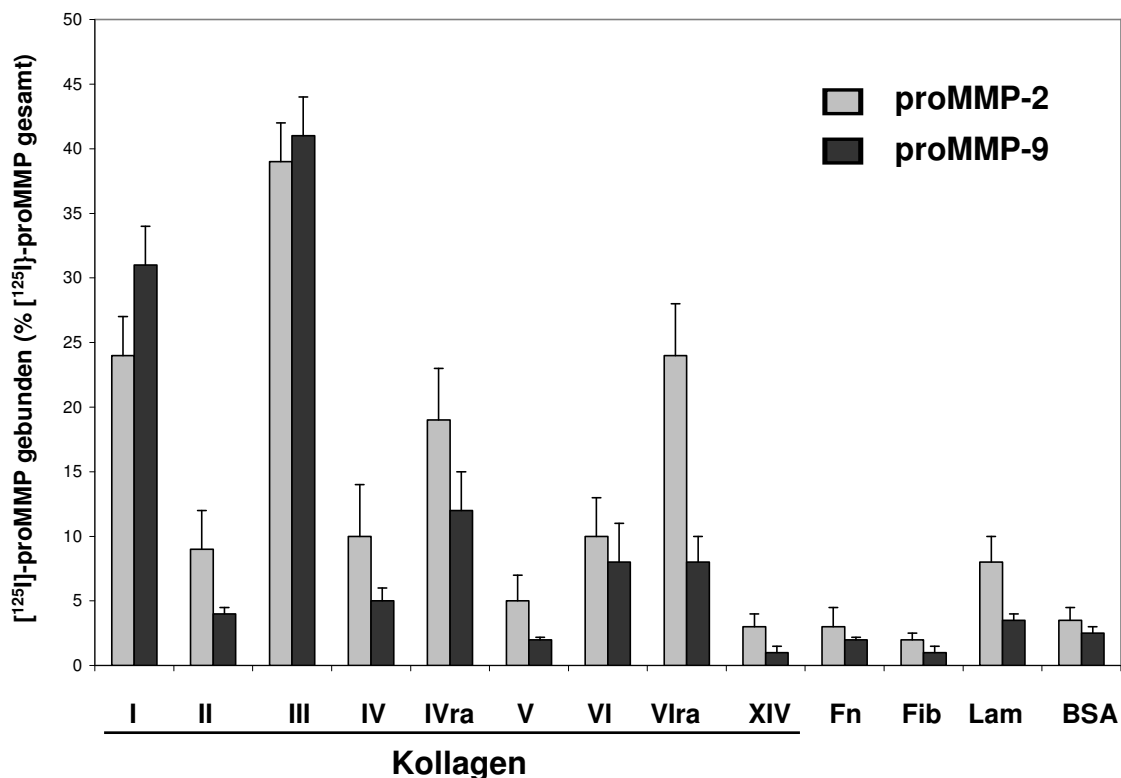


Abbildung 12: **Bindung von pro MMP-2/-9 an immobilisierte Kollagene und Glykoproteine.** Kollagene, zum Teil in reduzierter und alkylierter Form (ra), Fibronectin (Fn), Fibrinogen (Fib), Laminin (Lam) und BSA als Kontrolle wurden in Konzentrationen von 2 µg/Loch in Polystyrol-Mikrotiterplatten immobilisiert. Die so vorbehandelten Löcher wurden mit radioaktiv markierten proMMP-2 bzw. proMMP-9 in ABC-Puffer (pH 9,6) versetzt und die gebundene Aktivität in Relation zur insgesamt eingesetzten Radioaktivität ermittelt (s.a. Material und Methoden). Gezeigt sind die Mittelwerte aus mindestens 5 Versuchen mit Dreifachwerten ± SD.

Durch die Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen während der zweistündigen Inkubation war eine Autoaktivierung der MMPs unwahrscheinlich und es konnte davon ausgegangen werden, dass diese Experimente das Bindungsverhalten der latenten Form beider Enzyme zeigt. Interessanterweise zeigten die interstitiellen Kollagene Typ I und III, die

nicht als eigentliche Substrate der Gelatinasen beschrieben sind, mit 25% bzw. 40% die stärkste Bindung von proMMP-2 und -9. Weniger als 5% von beiden proMMPs waren an das Kontrollprotein BSA gebunden. Damit zeigte proMMP-2 keine relevante Bindung für Fibronectin und Fibrinogen sowie Kollagen V und XIV. Für Kollagen II, IV und VI fand sich eine schwache Bindung im Bereich von 10% der eingesetzten proteingebundenen Aktivität. Eine etwas stärkere Bindung von proMMP-2 als an die nativen Kollagene zeigte sich für die denaturierten Kollagene Typ IV und VI, was ein erster Hinweis für eine Konsensusbindungsstruktur auf den Kollagenen war. Für proMMP-9 zeigte sich keine relevante Bindung für die Glykoproteine und die Kollagene II, IV, V und XIV, lediglich an die denaturierten Kollagene IV und VI und natives Kollagen VI war eine schwache Bindung erkennbar. Um ein potenziell gemeinsames Bindungsmotiv auf den Kollagenen eingrenzen zu können, konzentrierten sich die weiteren Untersuchungen zunächst auf Kollagen Typ I, III und VI.

### 3.4.2. Abhängigkeit vom MMP-Aktivierungsstatus

Um die Abhängigkeit der Kollagenbindung vom Aktivierungsstatus der MMPs zu untersuchen, wurden analog zu den Experimenten mit den Proformen Bindungsstudien mit MMP-2 und -9 nach Aktivierung durchgeführt (Abbildung 13).

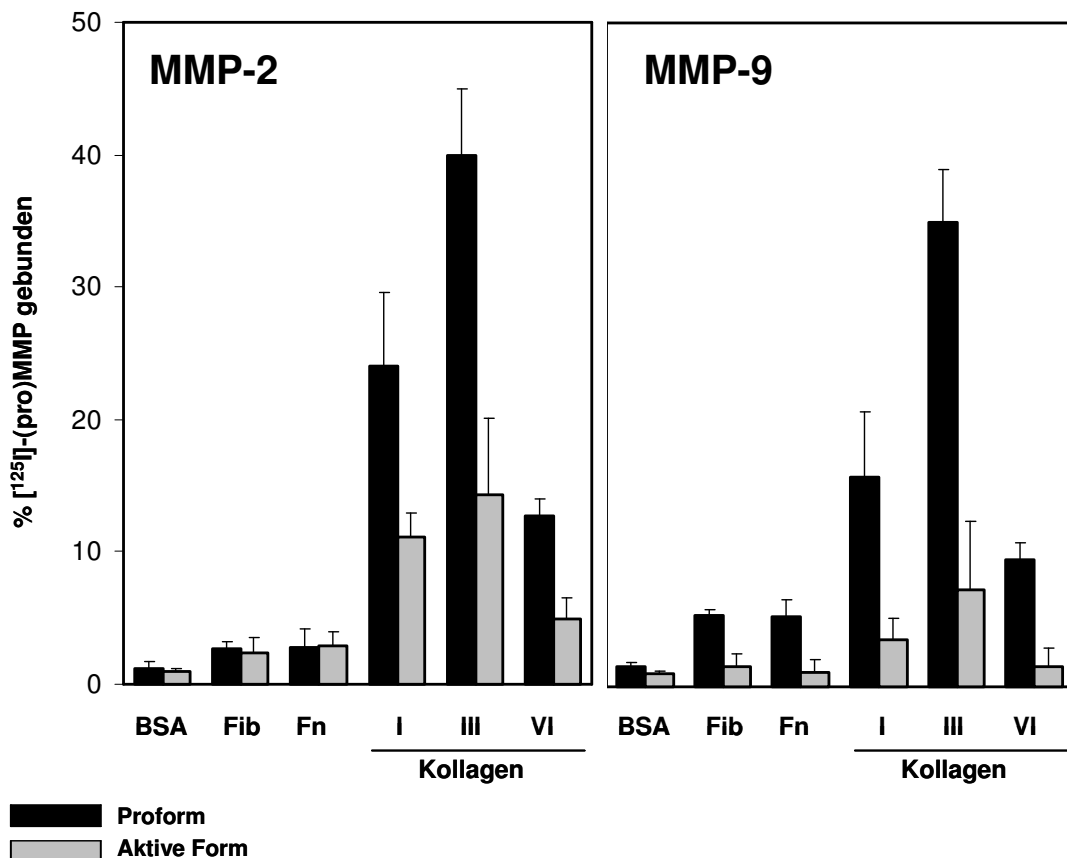


Abbildung 13: **Vergleich der Bindung von latentem und aktiviertem MMP-2/-9 an immobilisierte EZM-Moleküle.** Verschiedene Kollagene, Fibrin (Fib), Fibronectin (Fn) und BSA (Kontrolle) wurden in Konzentrationen von 2 µg/Loch in Mikrotiterplatten immobilisiert. Die so vorbeschichteten Löcher wurden mit radioaktiv markierten pro- bzw. aktiviertem MMP-2 bzw. MMP-9 versetzt und die gebundene Aktivität in Relation zur insgesamt eingesetzten Radioaktivität ermittelt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus mindestens 5 Versuchen mit Dreifachwerten ± SD.

Abbildung 13 zeigt eine eindeutige Bindungspräferenz der Proformen der MMPs gegenüber den aktivierten Formen. So wurden ca. 23 bzw. 40% der Proform von MMP-2 an Kollagen I bzw. III gebunden während aktiviertes MMP-2 nur in der Größenordnung von 10 bis 15% durch die respektiven Kollagene gebunden wurde. Ein



ähnliches Bild zeigte sich für MMP-9, wobei hier die Bindung der Proform an Kollagen I bei ca. 15 bzw. 38 % lag, wohingegen die aktivierte Form nur wenig über der Hintergrundbindung der Kontrollen lag. Die Bindung von proMMP-2/-9 an Kollagen VI lag bei etwa 10% der eingesetzten proteingebundenen Aktivität. Sowohl MMP-2 als auch 9 zeigten eine Bindung von weniger als 5% an Fibrin bzw. Fibronectin und lagen damit im Bereich der Bindung von BSA.

### 3.5. Eingrenzung einer kollagenen Konsensusbindungsstruktur

#### 3.5.1. Bindung an Fragmente aus Kollagen Typ I

Um potentielle Konsensusbindungssequenzen für pro-MMP-2/-9 auf Kollagenen weiter einzugrenzen, wurden Einzelketten und definierte Fragmente von Kollagen I, welches in der Leberzirrhose quantitativ sehr stark exprimiert wird, in Bindungsstudien eingesetzt (Abbildung 14)

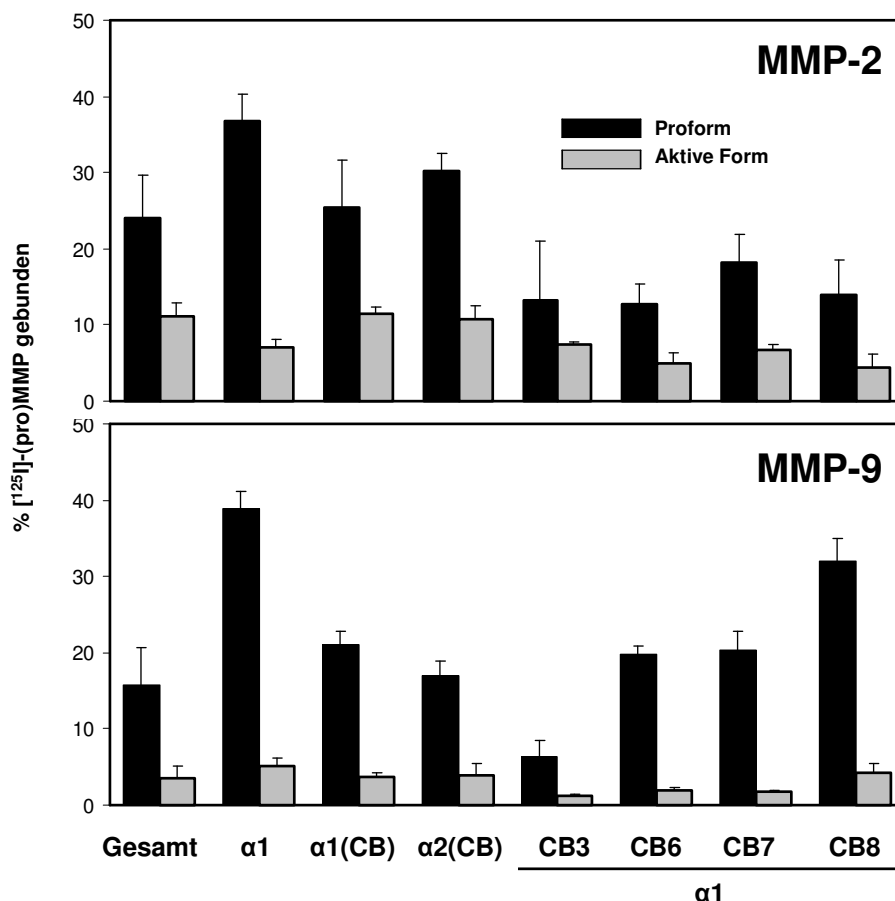


Abbildung 14: **Bindung von (pro)MMPs an Einzelketten und Fragmente von KI.** Einzelketten von KI, komplette Gemische von CB-Fragmenten von  $\alpha 1(\text{I})$  und  $\alpha 2(\text{I})$  sowie isolierte CB-Fragmente von  $\alpha 1(\text{I})$  (CB3, CB6, CB7, CB8) wurden in Konzentrationen von 2  $\mu\text{g}/\text{Loch}$  in Mikrotiterplatten immobilisiert. Die so vorbehandelten Löcher wurden

mit radioaktiv markiertem (pro)MMP-2 bzw. (pro)MMP-9 versetzt und die gebundene Aktivität in Relation zur insgesamt eingesetzten Radioaktivität ermittelt. Im Vergleich dazu die Bindung an Kollagen I (= Gesamt). Gezeigt sind die Mittelwerte aus mindestens 5 Versuchen mit Dreifachwerten  $\pm$  SD.

Unabhängig von der untersuchten Struktur, war auch bei den Einzelketten und Fragmenten von KI die aktivierte Form des entsprechenden MMPs schlechter als die Proform gebunden. Nur maximal 10% bzw. 4-5% der aktivierten Formen von MMP-2 bzw. -9 wurden durch die einzelnen immobilisierten Ketten oder Fragmente von Kollagen I gebunden. Im Gegensatz hierzu war sowohl für proMMP-2 als auch für proMMP-9 die Bindung an die isolierte  $\alpha$ 1(I)-Kette, die eine homogene Tripelhelix bildet, mit bis zu 40% gebundenem [ $^{125}$ I]-markiertem Protein am besten. Wurden die  $\alpha$ 1(I) oder die  $\alpha$ 2(I)-Kette durch CB in definierte kürzere Fragmente gespalten, so lag die Bindung an das immobilisierte Gemisch der jeweiligen CB-Fragmente wieder in der Größenordnung der Bindung an natives KI. Während sich dieser Effekt bei proMMP-2 für jedes der untersuchten isolierten CB-Fragmente der  $\alpha$ 1(I)-Kette wiederholte, war für proMMP-9 eine Präferenz der Bindung an CB8 (ca. 30%) gegenüber CB7 und CB6 deutlich. Die Bindung von proMMP-9 an CB3 lag wieder im Bereich des Hintergrundes. Die Bindung von proMMP-2 an mehrere einzelne KI-Fragmente deutete nicht auf eine singuläre kurze Bindungssequenz sondern vielmehr auf eine gemeinsame kollagene Konsensusstruktur hin, was auch durch Ligandenblotexperimente bestätigt wurde (Abbildung 15)

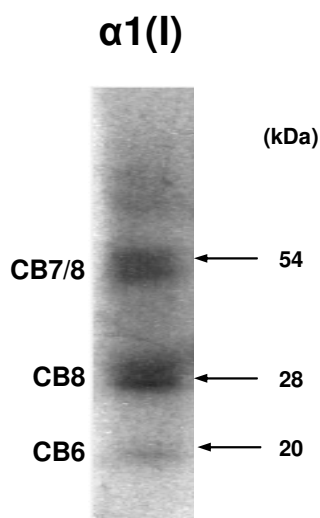


Abbildung 15: **Ligandenblot zur Bindung von [ $^{125}$ I]-proMMP-2 an Fragmente von KI.** Jeweils 2  $\mu$ g von CB-Fragmenten der  $\alpha$ 1-Kette von KI wurden unter reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Übertrag der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurde diese mit [ $^{125}$ I]-proMMP-2 inkubiert und gebundenes Material autoradiographisch sichtbar gemacht. Die Größen der in der Autoradiographie sichtbaren Banden wurden anhand eines im Gel mitgeführten MW-Standards ermittelt und sind angezeigt.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der vollständigen Gemische von CB-Fragmenten der  $\alpha 1(I)$ -Kette zeigte sich unter den Bedingungen des Ligandenblots eine Assoziation des [ $^{125}$ I]-markierten proMMP-2 an bestimmte Fragmente. Aus der  $\alpha 1(I)$ -Kette waren CB7 und CB8 die bevorzugten Partner. Die schwächere Bindung an CB6 war hier überwiegend auf die im Vergleich zu den Bindungsexperimenten mit isolierten CB-Fragmenten im Mikrotiterplattenformat geringeren Mengen dieses Fragmentes zurückzuführen. Das übereinstimmende Bindungsmuster sowohl im Mikrotiterplattenversuch als auch in den Ligandenblots spricht dafür, dass das Immobilisieren der Proteine auf den Plastikflächen der Gefäße die Bindungsstellen für die untersuchten proMMPs auf dem Kollagen nicht verändert

### 3.5.2. Bindung an synthetische tripelhelikale Peptide

Die bereits untersuchten CB-Fragmente des nativen KI unterscheiden sich nicht nur in ihrer Länge, sondern auch in den Eigenschaften ihrer tripelhelikalen Struktur. Da die Fragmente CB6, CB7 und CB8 mehr Wiederholungen des Triplets GPO als typische kollagene Aminosäuresequenz tragen, ist die Rigidität der Tripelhelix höher als z.B. bei dem Fragment CB3. In den nachfolgenden Versuchen wurde daher untersucht, ob die (pro)MMPs an eine vergleichbare synthetische Tripelhelix binden können (Abbildung 16).

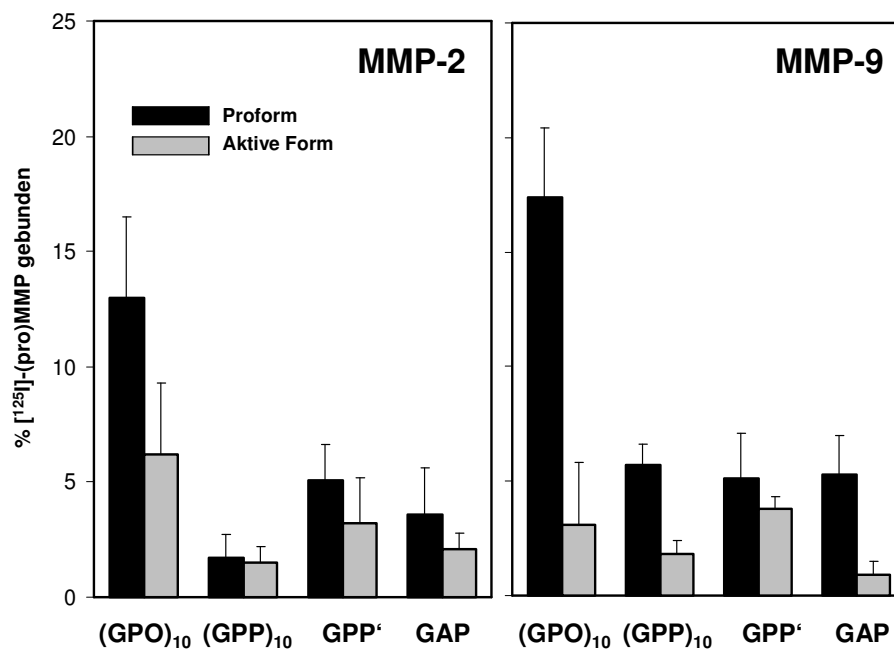


Abbildung 16: **Bindung von (pro)MMP-2/-9 an immobilisierte Kollagenmimetika.** Die synthetischen Kollagenmimetika (GPO)<sub>10</sub>, (GPP)<sub>10</sub>, GPP' und GAP wurden in Konzentrationen von 2  $\mu$ g/Loch in Mikrotiterplatten immobilisiert. Die so vorbehandelten

Löcher wurden mit radioaktiv markierten (pro)MMP-2 bzw. (pro)MMP-9 versetzt und die gebundene Aktivität in Relation zur insgesamt eingesetzten proteingebundenen Radioaktivität ermittelt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus mindestens 5 Versuchen mit Dreifachwerten  $\pm$  SD.

Wie auch schon bei den Kollagenen und den daraus gewonnenen Fragmenten war auch für die immobilisierten Kollagenmimetika die Bindung der Proform stärker als die der aktiven Form beider MMPs. Die meisten der untersuchten Strukturen hielten weniger als 10% der [ $^{125}$ I]-markierten (pro)MMPs zurück und damit lag die Bindung im Bereich der Hintergrundbindung der natürlichen Proteine und Peptide. Maxima der Bindung wurden sowohl für proMMP-2 als auch für proMMP-9 mit  $13,0 \pm 3,5\%$  bzw.  $17,4 \pm 3,0\%$  mit immobilisiertem (GPO)<sub>10</sub> erreicht. Da alle anderen Mimetika weniger rigide Tripelhelices besitzen bestätigte diese Beobachtung den bereits mit den CB-Fragmenten erhobenen Befund, dass die Tripelhelix selbst die entscheidende Konsensusbindungsstruktur sein könnte.

### **3.6. Konzentrationsabhängigkeit der MMP-Bindung**

Im Ligandenblot konnten mit den verwendeten kleinen homogenen Gelen Proteine über den notwendigen Molekulargewichtsbereich nicht hinreichend sauber aufgetrennt werden und die Transfereffizienz auf die Nitrozellulosemembran war nicht reproduzierbar. Daher wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Bindung von (pro)MMPs im direkten Vergleich von hochmolekularen Kollagenen, relativ kleinen Fragmenten und Mimetika mittels Dot-Blots untersucht. Die Abbildung 17 zeigt beispielhaft einen solchen Dot-Blot mit (pro)MMP-9.

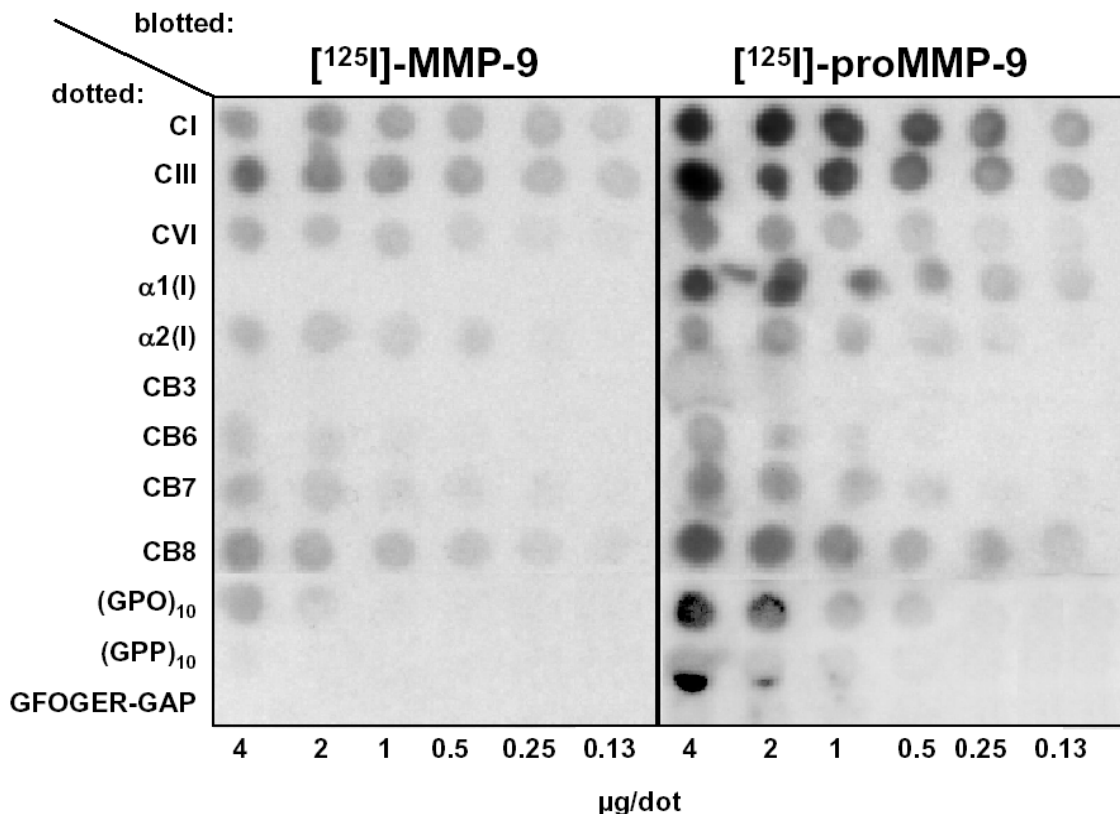


Abbildung 17: **Immobilisierte Kollagene, Kollagenketten, -fragmente und -mimetika.** Verschiedene isolierte Kollagene, Kollagenketten, -fragmente und -mimetika wurden in steigenden Konzentrationen in 150 mM Essigsäure auf eine Nitrozellulosemembran aufgetropft bzw. immobilisiert und diese Membran mit äquimolaren Mengen von aktiviertem [<sup>125</sup>I]-MMP-9 und [<sup>125</sup>I]-proMMP-9 inkubiert. Die nach Waschen auf der Membran verbliebene Aktivität wurde autoradiographisch sichtbar gemacht.

Wie schon im Mikrotiterplattenformat mit 2 µg immobilisierten Kollagene und daraus abgeleiteter Strukturen gezeigt, gab es keine nennenswerte Bindung aktivierter Enzyme. Die Kollagene Typ I und III erwiesen sich einmal mehr als potente Bindungspartner, wobei die Bindung bei abnehmender Konzentration vergleichbar war. Die α1(I)-Kette ist entscheidend an der Bindung der Proform beteiligt. Das mit 279 Aminosäureresten längste CB-Fragment der Kette CB8 bestätigte sich auch hier als Bindungspartner, wobei der Effekt mit 4 µg in etwa dem mit 0,5 µg KI entsprach. Bei den Kollagenmimetika zeigt sich eine klare Präferenz zur Bindung an (GPO)<sub>10</sub>. Die Schwärzung in Abb. 17 beim ersten Dot von (GPP)<sub>10</sub> war ein Artefakt und wurde bei anderen Versuchsansätzen nicht gefunden. Das nicht-tripelhelikale GAP konnte das proMMP-9 nicht binden. Für das MMP-2 und seine Proform wurde in analogen Versuchen ein vergleichbares Bindungsverhalten gefunden (Daten nicht gezeigt).

Auch diese Ergebnisse gestatteten nicht die Festlegung einer primären Konsensussequenz für proMMP-2 bzw. proMMP-9. Vielmehr legten sie die Vermutung nahe, dass letztlich die tripelhelikale Struktur der Nichtsubstrat-Kollagene ein Konsensusbindungsmotiv für die latenten Gelatinasen darstellen und die Rigidität der kollagenen Tripelhelix mit der Bindungsstärke der proMMPs korreliert sein könnte.

### 3.7. Inhibition der Bindung von proMMP-2 an Kollagene

#### 3.7.1. Inhibition der proMMP-2-Bindung an Kollagen Typ I

Um Hinweise auf die Spezifität der Bindung der MMPs an die verschiedenen immobilisierten Kollagene bzw. Fragmente und Mimetika zu erhalten, wurde nachfolgend untersucht, inwieweit diese MMP-Bindung durch tripelhelikale Strukturen blockiert werden kann. Diese Versuche wurden mit den latenten und aktivierten Formen von MMP-2 und MMP-9 durchgeführt. Hierzu wurde KI auf den Mikrotiterplatten immobilisiert und der inhibierende Effekt von gelöstem KI, KI-Ketten/-Fragmente und Kollagenmimetika auf die MMP-Bindung untersucht. Die Abbildung 18 zeigt exemplarisch die Versuche mit proMMP-2.

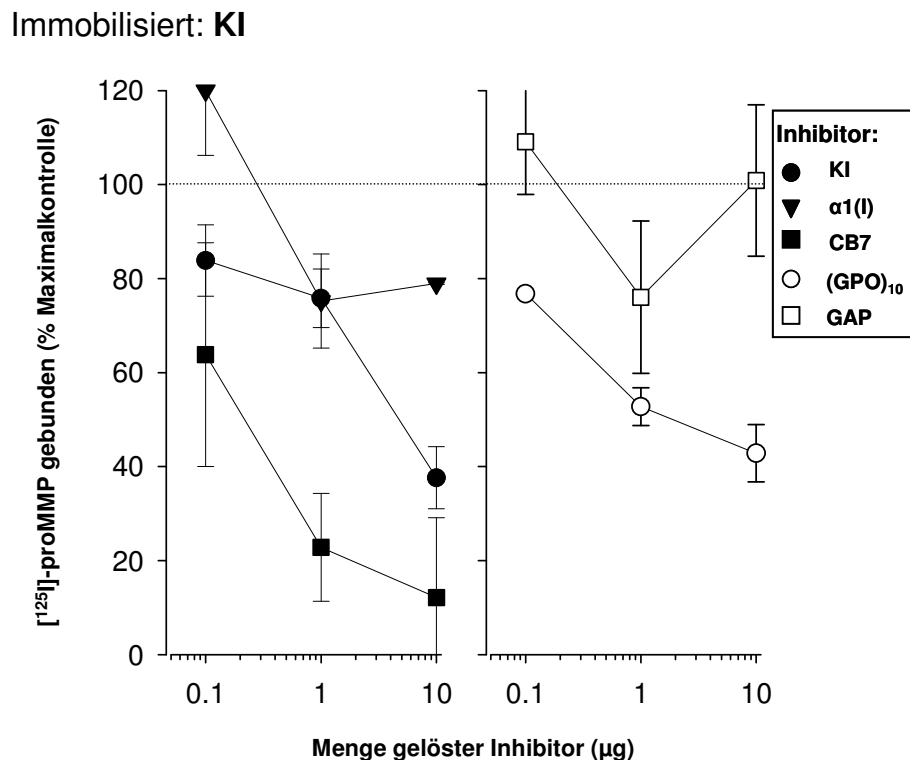


Abbildung 18: **Inhibition der Bindung von proMMP-2 an KI.** In Mikrotiterplatten wurden 200 ng/Loch KI immobilisiert. Die so vorbehandelten Löcher wurden mit einem Gemisch aus [<sup>125</sup>I]-markiertem proMMP-2 und ansteigenden Mengen des entsprechenden Inhibitors (kleines Feld) inkubiert. Die Anteile gebundenen proMMP-2 wurden im Verhältnis zur eingesetzten Gesamtmenge der proteingebundenen Radioaktivität ermittelt. Die Kontrolle ohne Inhibitor entspricht 100%. Jeder Punkt repräsentiert die Mittelwerte ± SD aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit Dreifachbestimmungen.

Im Gegensatz zum linearen GAP inhibierten alle untersuchten Verbindungen, die tripelhelikale Strukturen enthielten, konzentrationsabhängig die Bindung des proMMP-2 an immobilisiertes natives KI. Während von dem gelösten Gesamtmolekül KI etwa 5 µg für eine halbmaximale Inhibition notwendig waren, wurde diese bereits mit 10-20fach geringeren Mengen der homogenen  $\alpha 1(I)$ -Kette erreicht. Bei den hier untersuchten Mengen des Fragmentes CB7 aus der  $\alpha 1(I)$ -Kette lag die maximale Inhibition bei etwa 20%. Mit dem synthetischen  $(GPO)_{10}$  wurde die halbmaximale Inhibition mit etwa 1 µg erreicht. Unabhängig von den sehr unterschiedlichen Molekulargewichten des  $(GPO)_{10}$  im Vergleich zum nativen KI und zur gesamten  $\alpha 1(I)$ -Kette schien die Inhibition also auch hier umso besser, je weiter das Inhibitormolekül auf eine tripelhelikale Struktur reduziert wurde.

### 3.7.2. Inhibition der proMMP-2-Bindung an die $\alpha 1(I)$ -Kette

In den folgenden Experimenten wurde untersucht, wie gelöste tripelhelikale Strukturen die Gelatinasebindung an die immobilisierte  $\alpha 1(I)$ -Kette beeinflussen (Abbildung 19).

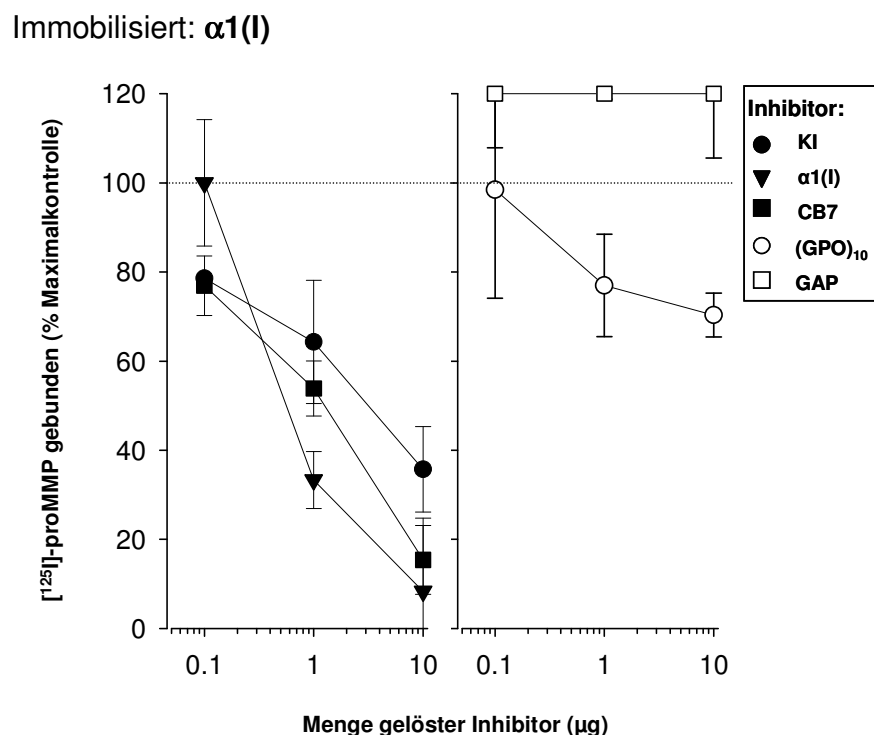


Abbildung 19: **Inhibition der Bindung von proMMP-2 an die  $\alpha 1(I)$ -Kette.** Die  $\alpha 1(I)$ -Kette wurde in aufsteigenden Konzentrationen in Mikrotiterplatten immobilisiert und die Bindung von  $[^{125}I]$ -proMMP-2 in Gegenwart ansteigender Mengen des entsprechenden Inhibitors (kleines Feld) wie in Abbildung 18 beschrieben ermittelt und ausgewertet.



Mit auf die Plastikoberfläche der Mikrotiterplatten immobilisierter  $\alpha 1(I)$ -Kette war die Inhibition der Bindung von proMMP-2 durch die natürlichen Proteine und Fragmente stärker akzentuiert als beim immobilisierten nativem KI. Das aus der  $\alpha 1(I)$ -Kette stammende Fragment CB7 war der potenteste Inhibitor mit einer halbmaximalen Inhibition um 0,6  $\mu\text{g}$  CB7. Die Effizienz der Inhibition der Bindung von proMMP-2 an die immobilisierte  $\alpha 1(I)$ -Kette durch gelöstes KI entsprach mit 3-4  $\mu\text{g}$  etwa der in der Kombination mit immobilisiertem KI. In der homologen Kombination von gelöster und immobilisierter  $\alpha 1(I)$ -Kette war die Kette mit 1-2  $\mu\text{g}$  immer noch ein guter Inhibitor, wenn auch weniger wirksam als in der Inhibition der proMMP-2-Bindung an immobilisiertes KI. Das Kontrollpeptid GAP zeigte wiederum keine Inhibition. Das synthetische  $(\text{GPO})_{10}$  bewirkte eine Inhibition, die jedoch in diesem Fall in der höchsten hier eingesetzten Menge nicht über 25% der proMMP-2-Bindung hinausging. Damit kann gelöstes  $(\text{GPO})_{10}$  die Bindung des proMMP-2 auch an die isolierte tripelhelikale  $\alpha 1(I)$ -Kette seines natürlichen Bindungspartners blockieren.

Auch bezüglich der Bindung des proMMPs an die  $\alpha 1(I)$ -Kette war also der gelöste Inhibitor umso effizienter, je größer der relative Anteil rigider tripelhelikaler Strukturen im Gesamtmolekül war.

Vergleichbare Inhibitionsversuche wurden auch mit aktiviertem MMP-2 durchgeführt und es ergab sich das gleiche Bild der Inhibition der Bindung des Enzyms an die immobilisierte  $\alpha 1(I)$ -Kette bzw. KI durch gelöste tripelhelikale Verbindungen (Daten nicht gezeigt). Das aktivierte MMP wurde auch hier insgesamt wesentlich schwächer an die EZM-Moleküle gebunden. Die maximale Bindung des Enzyms resultierte in etwa 1500 cpm, was einem Drittel der Bindung des [ $^{125}\text{I}$ ]-markierten proMMP-2 entsprach. Auf diesem niedrigeren Niveau wurde ebenfalls eine konzentrationsabhängige Abnahme der Bindung in Gegenwart gelöster Inhibitoren beobachtet. So wurde wiederum bestätigt, dass die Stärke der Bindung zwar durch die An- oder Abwesenheit der Prodomäne beeinflusst wird, die Bindung aber nicht allein durch direkte Interaktionen der  $\alpha 1(I)$ -Kette bzw. des KI mit der Prodomäne der Gelatinase vermittelt wurde.

### 3.7.3. Inhibition der proMMP-2-Bindung an (GPO)<sub>10</sub>

Durch die Immobilisierung des synthetischen tripelhelikalen (GPO)<sub>10</sub> sollte einerseits untersucht werden, ob die beobachtete Inhibition der Bindung von proMMP-2 davon abhängig ist, welche der beiden Komponenten an die Plastikoberfläche gebunden ist bzw. in Lösung vorliegt. Andererseits sollten die Experimente mit der reinen tripelhelikalen Struktur Aussagen gestatten, ob Kollagen-Kollagen-Interaktionen, die möglicherweise die tripelhelikalen Strukturen freilegen oder verdecken könnten, das Bindungsverhalten des proMMP-2 beeinflussen (Abbildung 20).

Immobilisiert: (GPO)<sub>10</sub>

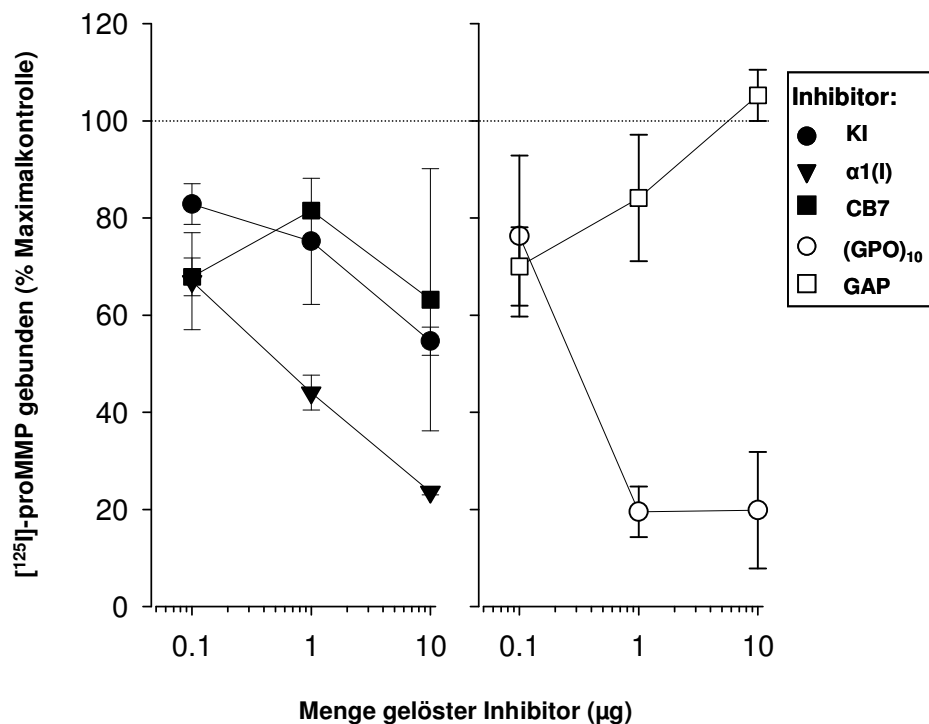


Abbildung 20: **Inhibition der Bindung von proMMP-2 an das synthetische Kollagenmimetikum (GPO)<sub>10</sub>.** (GPO)<sub>10</sub> wurde in aufsteigenden Konzentrationen in Mikrotiterplatten immobilisiert und die Bindung von [<sup>125</sup>I]-proMMP-2 in Gegenwart ansteigender Mengen des entsprechenden Inhibitors (kleines Feld) wie in Abbildung 18 beschrieben ermittelt und ausgewertet.

Das komplexe KI und seine isolierte α1(I)-Kette bewirkten erst mit den größten eingesetzten Mengen eine Inhibition der Bindung von proMMP-2 um 40-45%. Das lag auch im Bereich des Maximums der Inhibition. Bessere Inhibitoren waren dagegen die

kleineren Moleküle mit tripelhelikalen Strukturen, also das CB7-Fragment der  $\alpha 1(I)$  und auch das synthetische  $(GPO)_{10}$  mit einem Halbmaximum der Inhibition um  $0,5 \mu\text{g}$ . In der homologen Kombination mit immobilisiertem und gelöstem  $(GPO)_{10}$  konnten bis zu 80% der Bindung inhibiert werden. Das lineare GAP unterlag Schwankungen im Bereich der Standardabweichungen, hatte aber keine Wirkung in diesem System.

Diese Ergebnisse unterstreichen, dass die Tripelhelix der Kollagene selbst wesentlich an der Bindung der latenten Gelatinasen beteiligt ist.

Zusammenfassend waren KI, die  $\alpha 1(I)$ -Kette und  $(GPO)_{10}$  in jeder der untersuchten homologen Kombinationen von immobilisierter und gelöster Form des entsprechenden Moleküls in der Lage die MMP-Bindung zu inhibieren. Das sprach dafür, dass die Bindungsstellen durch das Immobilisieren nicht wesentlich verändert wurden und unterstrich, dass die Konsensusbindungsstruktur für die Bindung von proMMP-2 in allen diesen kollagenen Strukturen vorlag.

### 3.8. Wirkung von (GPO)<sub>10</sub> auf die proMMP-Bindung

Eine Inhibierbarkeit der Bindung von MMPs durch synthetische Peptide oder Peptidanaloga mit geringem Molekulargewicht wäre eine wichtige Voraussetzung, dass mit Hilfe solcher Verbindungen die MMP-Verfügbarkeit in der Matrix *in vivo* lokal moduliert werden könnte. Da eine Verbindung in Lösung andere Wechselwirkungen eingehen kann als in immobilisierter Form, wurde das synthetische (GPO)<sub>10</sub> im Hinblick auf seine Fähigkeit zur Blockierung der Bindung von proMMP-2 nochmals genauer betrachtet (Tabelle 4).

Tabelle 4: **Einfluss synthetischer Kollagenmimetika auf die Bindung von proMMPs.** Jeweils 200 ng KI,  $\alpha 1(I)$ , bzw. (GPO)<sub>10</sub> wurden in Mikrotiterplatten gebunden. Diese wurden anschließend mit einem Gemisch von [<sup>125</sup>I]-markiertem proMMP-2 und dem entsprechenden Inhibitor 2 h inkubiert. Die Anteile gebundener proMMPs wurden im Verhältnis zur Gesamtmenge des eingesetzten radioaktiven Materials ermittelt. Die residuelle Bindung ergibt sich aus dem Vergleich Bindung mit maximal eingesetzter Inhibitormenge zu der einer Kontrolle ohne gelösten Inhibitor (100%). Gezeigt sind Mittelwert und SD aus drei bzw. 2(\*) Experimenten mit Dreifachwerten.

Immobilisierter Bindungspartner	Gelöster Inhibitor	proMMP-2 gebunden %
Kollagen I	(GPO) <sub>10</sub>	52 ± 8
	GAP	143 ± 59*
$\alpha 1(I)$	(GPO) <sub>10</sub>	67 ± 23
	GAP	98 ± 36
(GPO) <sub>10</sub>	(GPO) <sub>10</sub>	29 ± 16
	GAP	80 ± 26

Das lineare Peptid GAP diente als Kontrolle und interferierte mit der Bindung des proMMP-2 an die immobilisierten Strukturen nicht oder nur geringfügig.

Bezogen auf immobilisiertes KI bzw.  $\alpha 1(I)$  lag das gelöste (GPO)<sub>10</sub> in den Versuchen im 50fachen molaren Überschuss vor. Unter diesen Bedingungen verhinderte es wirkungsvoll eine Bindung des proMMP-2 an die untersuchten homogenen artifiziellen Matrices.

### 3.9. Sättigbarkeit der (pro)MMP-Kollagen-Bindung

#### 3.9.1. (pro)MMP-2

Neben der Inhibierbarkeit liefert die Sättigbarkeit und die daraus abgeleitete Bestimmung der Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) der Bindung Anhaltspunkte zur Spezifität und erlaubt eine Abschätzung der vorhandenen Bindungsstellen pro Molekül. Um zunächst die Größenordnung der Bindungsstärke zu ermitteln, wurden Sättigungsstudien mit den latenten und aktivierten Formen der Gelatinasen und den immobilisierten Bindungspartnern KI,  $\alpha 1(I)$ -Kette und  $(GPO)_{10}$  durchgeführt. Die Abbildung 21 zeigt die für (pro)MMP-2 erhaltenen Kurven.

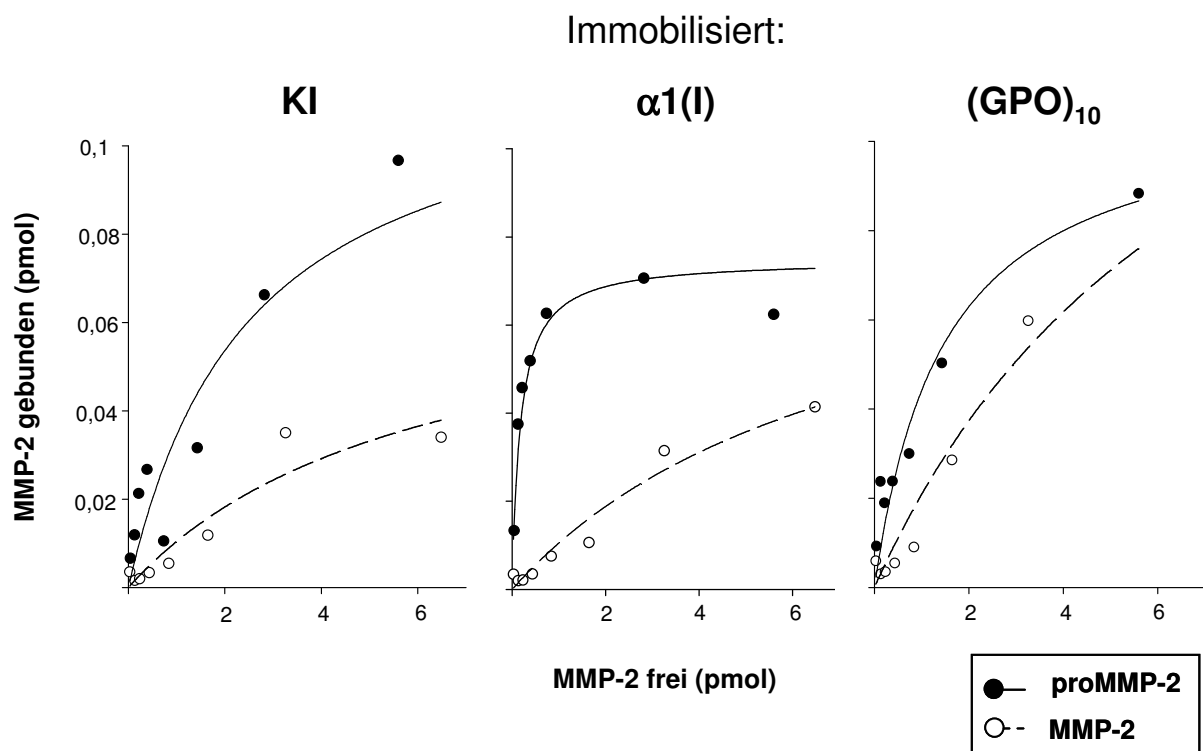


Abbildung 21: **Sättigung der Bindung von (pro)MMP-2 an KI,  $\alpha 1(I)$  und  $(GPO)_{10}$ .**  $1,38 \times 10^{-2}$  pmol [ $^{125}I$ ]-markiertes proMMP-2 bzw.  $1,613 \times 10^{-2}$  pmol [ $^{125}I$ ]-markiertes MMP-2 wurden mit 1-6 pmol des entsprechenden unmarkierten (pro)MMP-2 versetzt und das Gemisch auf 2  $\mu g$ /well immobilisierten KI,  $\alpha 1(I)$ -Kette und  $(GPO)_{10}$  2 h inkubiert. Nach dem Waschen der Platten wurden die Mengen gebundener radioaktiv markierter MMPs bestimmt. Dargestellt sind die Daten eines (von mindestens drei) repräsentativen Experiments.

Im untersuchten Mengenbereich bis 6 pmol proMMP-2 konnte die Bindung an KI und an das synthetische (GPO)<sub>10</sub> nicht gesättigt werden. Ein zu erwartendes Maximum des gebundenen latenten Enzyms läge dann über 0,09 pmol. Im Gegensatz dazu war die Bindung an die  $\alpha$ 1(I)-Kette bereits in Gegenwart von etwa 0,5 pmol freiem proMMP-2 bei einem Plateau um 0,07 pmol gebundenen proMMP-2 zu sättigen.

Auch in diesen Versuchen bestätigte sich die insgesamt schwächere Bindung des aktivierten MMP-2. Bis zu den maximal verwendeten 6 pmol freien MMP-2 war die Bindung an keinen der untersuchten immobilisierten Bindungspartner zu sättigen. Bemerkenswerterweise nähert sich die Kurve über (GPO)<sub>10</sub> der des proMMP-2 an. Damit scheint die Prodomäne entweder ohne Bedeutung für die Bindung selbst zu sein oder das synthetische Peptid verändert seinerseits die Konformation des Enzyms, so dass eine, wenn auch schwache Bindung des aktivierten Moleküls an diese Matrix aus nackter Tripelhelix möglich wird.

Insgesamt ließen diese nicht-linearen Verläufe den Schluss zu, dass mehr als nur eine strukturelle und/oder funktionelle Domäne sowohl auf der Seite des Enzyms als auch bei den tripelhelikalen Strukturen beteiligt sein könnte. In der Tripelhelix der  $\alpha$ 1(I)-Kette könnten stark bindende Strukturen durch eine im Vergleich zum heterogenen KI geänderte Konformation begünstigt sein. Die Rigidität der sekundären Tripelhelixstruktur war ein entscheidender Faktor bei der Bindung.

### 3.9.2. (pro)MMP-9

Analog zu den Experimenten mit (pro)MMP-2 wurde das Bindungsverhalten von MMP-9 und ihrer Proform untersucht (Abbildung 22).

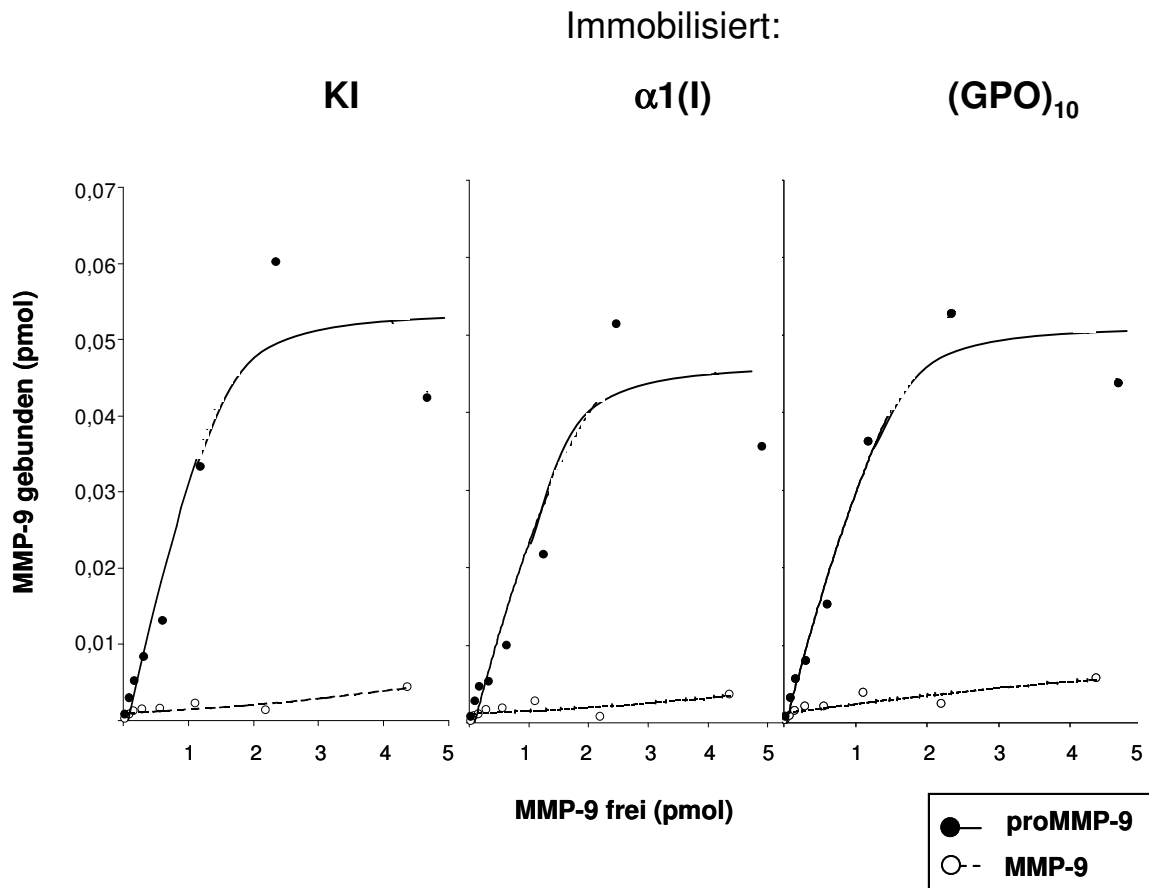


Abbildung 22: **Sättigung der Bindung von (pro)MMP-9 an KI,  $\alpha 1(I)$  und  $(GPO)_{10}$ .**  $1,163 \times 10^{-2}$  pmol  $[^{125}I]$ -markiertes proMMP-9 bzw.  $1,807 \times 10^{-2}$  pmol  $[^{125}I]$ -markiertes MMP-9 wurden wie in Abbildung 21 beschrieben mit ansteigenden Mengen unmarkierten (pro)MMP-9 und die Bindung bestimmt. Dargestellt sind die Daten eines (von mindestens drei) repräsentativen Experimentes.

Unabhängig vom auf die Plastikfläche immobilisierten Molekül wurde mit etwa 2 pmol proMMP-9 bereits eine Sättigung der Bindung erzielt. Kleine Unterschiede gab es in den Maxima der gebundenen proMMP-9. Bei KI und dem synthetischen  $(GPO)_{10}$  waren sie im Bereich um 0,06 pmol etwas höher als bei der  $\alpha 1(I)$ -Kette mit etwa 0,04 pmol.

Das aktivierte MMP-9 war wie aus den Vorversuchen erwartet ein sehr schlechter Bindungspartner. Die Bindung zeigte einen linearen Verlauf, welcher dem einer unspezifischen Bindung entspricht.

Die Sättigbarkeit der Bindung der Proform des MMP-9 und die einheitlichen, nur für den Aktivierungszustand des MMP-9 charakteristischen Verläufe der Bindung an die unterschiedlichen Partner deuteten auf eine im Vergleich zum (pro)MMP-2 geringere Zahl an der Bindung beteiligter Domänen oder sogar auf eine distinkte Domäne hin.



#### 4. Diskussion

Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass die EZM neben der rein mechanischen Funktion als Zusammenhalt der Zellen im Gewebe auch als Speicher für verschiedene Wachstumsfaktoren wie z.B. den Keratinozyten-Wachstumsfaktor, Interleukin-2, Oncostatin M oder den *Platelet-derived Growth Factor* fungieren kann (12, 55-57). Darüber hinaus gab es erste Hinweise, dass MMPs auch an solche Kollagene binden könnten, welche nicht als Substrate dieser Enzyme beschrieben sind (44, 45). Von diesen beiden Punkten ausgehend stellte sich die Frage, ob und wie die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 durch Bestandteile der EZM gebunden werden können.

Pathologische Veränderungen in der EZM-Zusammensetzung und im Matrixumbau führen zu fibrotischen Veränderungen im Gewebe. Deshalb war es zunächst interessant zu untersuchen, ob die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 auch tatsächlich mit der EZM assoziieren. In dieser Arbeit konnten mittels der Immunlokalisation in humaner zirrhotischer Leber MMP-2 und -9 nicht nur intrazellulär (in hepatischen Sternzellen und Kupfer-Zellen) sondern auch Matrix-assoziiert nachgewiesen werden. Damit war gezeigt, dass endogen gebildete MMPs auch außerhalb ihrer exprimierenden Zellen im Bindegewebe vorliegen können.

Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, dass über den Einfluss der für die Färbung notwendigen Fixierungsschritte auf die Interaktion von MMPs mit der EZM wenig bekannt ist. So konnte an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden, dass diese Bilder die tatsächlich *in situ* gebundenen MMP-Mengen nicht vollständig widerspiegeln.

Dies ist in Übereinstimmung mit publizierten Daten und Abbildungen, die sich jedoch in erster Linie auf die Deskription der zellulären Expression konzentrierten und nicht die auch sichtbare Matrixassoziation diskutierten. Die in diesem Zusammenhang publizierten Bilder aus MMP-2- bzw. MMP-9-spezifischen immunhistologischen Nachweisen zeigen immer auch Färbungen außerhalb der exprimierenden Zellen. Da jedoch die genaue Lokalisation der MMPs nicht von primärem Interesse war, wurde dieser Umstand nicht diskutiert, da bei Arbeiten z.B. zur möglichen Beteiligung von MMPs im Rahmen der Entwicklung und Metastasierung von Tumoren das wichtigste Ziel war, prognostische Faktoren auszumachen (69, 70). Auch in anderen Arbeiten

wurde die Expression und die Verteilung von MMP-2 und MMP-9 in Geweben neben den oben genannten onkologischen Aspekten mit sehr unterschiedlichen Fragestellungen bei verschiedenen Krankheitsbildern immunhistochemisch untersucht.

Ein Beispiel hierfür ist das Auge. Wenn durch das Wachstum epithelialer Stammzellen Pterygien entstehen, wird dieser Prozess durch einen massiven Matrixumbau begleitet. Hier ist MMP-2 nicht nur in den die Bowman-Membran begrenzenden Epithelzellen, sondern auch direkt in der noch intakten Membran immunhistochemisch nachweisbar (71). Ein ähnliches Bild ergibt sich in der mit dem Diabetes mellitus assoziierten Retinopathie. Während in den epiretinalen Membranen des gesunden Auges MMP-1 und TIMP-2 zu finden sind, werden in einem Großteil der pathologisch veränderten Strukturen mit Gefäßneubildung und Fibrose zusätzlich MMP-2, -3 und -9 sowie TIMP-1 und -3 offensichtlich auch hier extrazellulär immunlokalisiert (72). Alle diese Untersuchungen stützen die eigenen immunhistologischen Daten einer Assoziation der Gelatinasen mit der Matrix. Die für den immunhistologischen Nachweis verwendeten Antikörper der Klone 42-5D11 und CA-4001 für MMP-2 sowie 56-2A4, 6-6A und GE-213 für MMP-9 (69, 70, 72) unterscheiden *in situ* allerdings nicht zwischen den latenten und den aktivierten Formen der Enzyme. So konnten zunächst keine Aussagen zu Bindungspräferenzen der Varianten dieser Enzyme gemacht werden. Nach einer gezielten Behandlung der Gefrierschnitte des zirrhotischen Lebergewebes nach der Fixierung mit Überschüssen von proMMP-2 bzw. proMMP-9 waren unter Pufferbedingungen, die eine enzymatische Aktivität der MMPs ausschlossen, in beiden Fällen die proMMP-Signale klar und deutlich mit den fibrotischen Septen assoziiert. Die Stärke dieses Signals ließ auf eine besonders hohe Speicherkapazität der EZM für die Proformen der Gelatinasen schließen.

Daraus resultierte die Frage, welche Moleküle nun im Einzelnen an der Matrixbindung der MMPs beteiligt sind. Die EZM der fibrotischen Leber, an der hier *in situ* eine Bindung der latenten Gelatinasen gezeigt wurde, besteht hauptsächlich aus Verbindungen, die zunächst nicht als Substrate für MMP-2 bzw. MMP-9 beschrieben sind. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die in dieser Arbeit gewonnenen Daten denen der Literatur in tabellarischer Form gegenüber gestellt.

Tabelle 6: **Zusammenfassung der Daten zur Bindung von (pro)MMP-2/-9 an Moleküle der EZM.** Beurteilung der Bindungsstärke: „-“ keine Bindung, „+“ schwach, „++“ mittel, „+++“ stark; n.b. nicht bestimmt. Literatur: \*Allan 1994 (44) 3 §Allan1995 (45)4 ¶Olson 1998 (46)

Bindung	proMMP2		proMMP-9	
	<i>Literatur</i> *§,¶	<i>Eigene Daten</i>	<i>Literatur</i> *§,¶	<i>Eigene Daten</i>
An:				
Nativ:				
Kollagen I	+++	+++	+++	++
Kollagen II	n.b.	+	n.b.	+
Kollagen III	n.b.	+++	n.b.	+++
Kollagen IV	++	+	++*/-¶	+
Kollagen V	n.b.	-	n.b.	-
Kollagen VI	n.b.	-	n.b.	-
Laminin	++(+)	+	+++	+
Tenascin	n.b.	-	n.b.	-
Fibronektin	-	-	n.b.	-
Heparin	+	n.b.	+	n.b.
Denaturiert:				
Kollagen I	+++	+++	+++	+++
Kollagen IV	++	++	+++	++
Kollagen VI	n.b.	++	n.b.	+

Wie man an Tabelle 6 sieht, stellten die denaturierten Kollagene als Substrate erwartungsgemäß gute Bindungspartner dar. Im Vergleich zu den bereits publizierten Daten wurde die Interaktion von den Gelatinasen mit verschiedensten, auch bisher noch nicht untersuchten, EZM-Bestandteilen in dieser Arbeit genauer analysiert. So wurde in den hier verwendeten Assays gezeigt, dass die Gelatinaseproformen nur schwach an native Kollagene Typ V und VI sowie an Laminin binden. Ebenfalls wurde erstmalig gezeigt, dass sowohl proMMP-2 als auch proMMP-9 deutlich an Kollagen Typ I und sehr gut an Kollagen Typ III binden. Divergierende Ergebnisse zu den bereits publizierten Daten gab es bei der Bindung von proMMP-9 an Kollagen Typ IV, was durch die Schwäche der Methodik der bereits publizierten Daten zu erklären ist: Allan et al (44, 45) und Olson et al (46) verwendeten Antikörper zum Nachweis (ELISA), wohingegen die Detektierung des radioaktiv markierten MMP eine größere Genauigkeit erzielt.

Die nativen Kollagene Typ I und III sind die hauptsächlich in fibrotischen Geweben vorkommenden Kollagene und keine Substrate für die Gelatinasen. Inzwischen geht man aber von einer mindestens schwachen kollagenolytischen Aktivität durch MMP-2 auf KI aus (73). Im Vergleich zu den Kollagenasen, die einen  $K_m$  Wert im Bereich von 1-2  $\mu$ M haben, ist dieser Wert für MMP-2 deutlich schwächer (74).

Zur Eingrenzung von Strukturen des KI, die mit den Gelatinaseproformen interagieren, standen neben dem nativen Gesamtmolekül bereits isolierte Ketten und unterschiedliche gereinigte CB-Fragmente der  $\alpha$ 1-Kette von KI zur Verfügung. Mit den intakten Proformen von MMP-2 und MMP-9 ergaben sich starke Bindungen an die  $\alpha$ 1-Kette und auch an die  $\alpha$ 2-Kette von KI, was vermuten ließ, dass die Enzyme nicht an eine einzelne Sequenz bzw. Bindungsstelle innerhalb des nativen KI-Gesamtmoleküls binden. Sowohl proMMP-2 als auch proMMP-9 banden an verschiedene CB-Fragmente. Erstmals wurde nachgewiesen, dass das Bindungsverhalten von proMMP-9 an diese Moleküle dem des proMMP-2 ähnelt. Bei beiden Gelatinaseproformen stieg die Stärke der Bindung proportional zur Länge der untersuchten Bindungspartner aus der  $\alpha$ 1-Kette von KI. Beide banden nicht an die mit 36, 47 bzw. 37 Aminosäureresten sehr kurzen CB-Fragmente 2, 4 und 5 (Daten nicht gezeigt). An die Fragmente CB3 und CB6 mit 149 bzw. 192 Aminosäureresten war eine schwächere Bindung nachweisbar. Die stärkste Bindung der proMMPs wurde an CB7 und CB8 gefunden, die mit 271 bzw. 281 Aminosäureresten auch die längsten der Fragmente waren. Dies war ein weiterer

klarer Hinweis dafür, dass die Bindung nicht dem Prinzip der Interaktion eines Rezeptors mit seinem spezifischen Liganden folgt, sondern eher von einer universelleren Bindungsstruktur ausgegangen werden kann. Diese Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit den publizierten Daten von Steffensen und Ottl (48, 49). Steffensen verwandte rekombinante Module, die die Fibronectin-Typ II-Domäne von MMP-2 enthielten und zeigte eine Bindung an ihre Sequenz überlappenden CB-Fragmente von KI. Ottl et al. konnten eine Bindung von MMP-2 an die Fragmente CB7 und CB8 der  $\alpha$ 1-Kette von KI nachweisen. Dabei wurde evident, dass der tripelhelikale dem ungeordneten gelatinösen Zustand bei der Bindung bevorzugt wird (48). Diese sowie die eigenen Daten wiesen somit auf die Bedeutung der kollagenen Tripelhelix hin.

Alle Peptidketten des fibrillären KI enthalten über weite Bereiche die repetitive Aminosäuresequenz Gly-X-Y. An der Position X findet sich meist ein Prolinrest. Das Y steht in der Regel für einen Hydroxyprolin- oder Prolinrest, kann aber auch ein Lysin- oder Hydroxylysinrest sein. Je höher der Anteil der Iminosäurereste Prolin bzw. Hydroxyprolin ist, desto stabiler ist die Tripelhelix. Die Zunahme der Rigidität drückt sich in der Erhöhung der Schmelztemperatur  $T_m$  aus. So liegt der  $T_m$ -Wert von  $(GPP)_{10}$  bei 24 °C und der von  $(GPO)_{10}$ , bei dem ein Prolinrest durch einen Hydroxyprolinrest ersetzt ist, mehr als doppelt so hoch mit 58 °C. Die Tripelhelix wird also durch die Hydroxylierung beträchtlich stabilisiert (11).

Vor diesem Hintergrund ergibt die Analyse der hier verwendeten vier größten CB-Fragmente CB3, CB6, CB7 und CB8 der  $\alpha$ 1-Kette von KI im Hinblick auf ihre tripelhelikalen Strukturen folgendes Bild. Alle Fragmente bilden in Lösung Tripelhelices. In der Sequenz von CB3 liegen vier isolierte GPP- oder GPO-Triplets vor. Die Fragmente CB6, CB7 und CB8 weisen zwischen 9 und 12 dieser Triplets auf. Das CB6-Fragment enthält in seiner Sequenz insgesamt 5 Bereiche mit mehr als zwei GPP- oder GPO-Triplets, während in CB7 und CB8 mehrere einzelne bzw. duplizierte Triplets enthalten sind (75). Somit können die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse unterschiedlicher Bindungsstärken an die verschiedenen CB-Peptide dahingehend interpretiert werden, dass der wesentliche Unterschied der Bindung an die CB-Fragmente nicht in der Primärstruktur lag, sondern in der durch die Verteilung und Zusammensetzung der Gly-X-Y-Triplets begründeten Rigidität der Tripelhelix.

Um die Korrelation zwischen tripelhelikaler Rigidität der aus KI abgeleiteten Strukturen und Stärke der Bindung von proMMP-2 und proMMP-9 weiter zu untermauern, wurden

synthetische Kollagenmimetika eingesetzt. (GPO)<sub>10</sub> hat von den im Mikrotiterplattenformat und im Dot-blot untersuchten Kollagenmimetika die stabilste Tripelhelix und beide Gelatinaseproformen banden bevorzugt an diese Struktur. Die Bindung an (GPP)<sub>10</sub> und (GPP')<sub>10</sub> war vergleichsweise schwächer und es wurde keine Bindung an das GAP gefunden. Wie bei den aus dem nativen KI abgeleiteten tripelhelikalen Strukturen war auch bei den synthetischen Tripelhelices das Ausmaß der Bindung von proMMP-2 und proMMP-9 offensichtlich von der Rigidität der Tripelhelix abhängig. Diese Ergebnisse fügen sich gut in die Daten der Literatur ein, die unter anderen Gesichtspunkten bereits synthetische Peptide in Bindungsstudien verwendet haben. Arbeiten zur Bindung rekombinanter Module aus der Fibronektindomäne von MMP-2 sowie einer isolierten Sequenz ihres Propetids an synthetisches (GPP)<sub>6</sub> und (GPP)<sub>12</sub> zeigten eine bevorzugte Bindung der ersten beiden Module an die tripelhelikalen Kollagenmimetika mit Assoziationsraten von 0,3-0,7 mM<sup>-1</sup> (32). Auch in Bindungsstudien mit Hilfe der *Surface Plasmon Resonance* war auf dem Chip immobilisiertes (GPO)<sub>10</sub> ein guter Bindungspartner für proMMP-2 (48).

Aus der Literatur sind bisher keine systematischen Untersuchungen zur Frage bekannt, ob und inwieweit die Bindung der Gelatinasen an KI vom Aktivierungszustand des Enzyms abhängig ist. Bislang wurden überwiegend die latenten Formen der Gelatinasen untersucht, wobei die Ergebnisse stark vom gewählten experimentellen Ansatz abhängig waren. So wurden in Bindungsexperimenten, die auf dem Prinzip eines *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) beruhen, verschiedene rekombinante, gezielt verkürzte Formen von MMP-2 und MMP-9 an immobilisiertem KI untersucht. Für den Nachweis der Bindung stand u.a. ein Antikörper zur Verfügung, der für den N-Terminus, also die Prodomäne von MMP-9 spezifisch ist. Unter diesen Bedingungen wurde – im Gegensatz zu unseren Ergebnissen - kein Unterschied in der Bindungsstärke zwischen latenten und aktivierten MMPs gezeigt (45). Allerdings sind hier methodische Unterschiede, insbesondere in der Aktivierung der Proformen zu diskutieren. Allan et al. aktivierten MMP-9 mit MMP-3, während hier mit Trypsin (s.u.) aktiviert wurde. Auch die unterschiedlichen Pufferbedingungen könnten hier eine Rolle spielen.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Bindung der latenten und aktivierten Formen beider Gelatinasen zunächst dadurch klar unterschieden, dass die aktiven Formen aus der entsprechenden latenten Proform erzeugt wurden. Die Prodomäne von proMMP-2

wurde in Gegenwart von APMA vollständig abgespalten. Für die proMMP-9-Aktivierung war diese Variante nicht erfolgreich und das Enzym war unter den Standardbedingungen der Reaktion nur unvollständig aktiviert, was den Beobachtungen einer anderen Gruppe entspricht (76). Die Prodomäne der latenten MMP-9 wird mit TPCK-Trypsin vollständig abgespalten und entsprechend ist in den hier gezeigten Zymographie-Gelen und in der Fluorimetrie eine vollständige Aktivierung zu beobachten.

Für den Nachweis der MMP-Bindung an kollagene Strukturen wurde eine sehr empfindliche Methode mit Hilfe [<sup>125</sup>I]-markierter Enzyme gewählt (77). Alle Enzyme wurden nach der Markierung mit dem Isotop [<sup>125</sup>I] auf ihre Integrität und ihre potentielle enzymatische Aktivität geprüft. In der Zymographie und im quantitativen fluorometrischen Nachweis der enzymatischen Aktivität des Enzyms wurde der Verbleib der Prodomäne in den nicht aktivierten MMPs bzw. die Vollständigkeit der jeweiligen Aktivierung gezeigt. In den Bindungsexperimenten waren die untersuchten potentiellen Bindungspartner der Gelatinasen unter nicht denaturierenden Bedingungen auf Nitrozellulosemembranen oder Plastikoberflächen von Mikrotiterplatten gebunden. Unabhängig vom Träger für die Immobilisierung war unter nicht-aktivierenden Bedingungen für die MMPs die Bindung von proMMP-2 und proMMP-9 an Kollagen um den Faktor 4-10 stärker als die der entsprechenden aktivierten Form. Damit kann die Hypothese, nach der die EZM eine Speicherfunktion für Gelatinasen hat, insofern präzisiert werden, als die EZM bevorzugt die Proform speichert. In der latenten Form beider Gelatinasen blockiert die Prodomäne das katalytische Zentrum (25). Da sich die beiden Formen des Enzyms zunächst nur durch die An- oder Abwesenheit der Prodomäne unterscheiden und beide die Fibronektindomäne als bindende Domäne besitzen, könnte das unterschiedliche Bindungsverhalten z.B. auf eine Konformationsänderung nach Verlust der Prodomäne zurückzuführen sein, die andere *Exosites* auf dem Gesamtmolekül für die Bindung verfügbar macht (27, 44).

Die Stärke und Spezifität der in dieser Arbeit beschriebenen Gelatinasen-Kollagen-Interaktion konnte durch Inhibitions- und Sättigungsexperimente belegt werden. Von einer spezifischen Bindung wird gefordert, dass diese konzentrationsabhängig sein muss, sowie antagonisiert und gesättigt werden kann (77). Wie in den Dotblot-Experimenten gezeigt werden konnte, nahm die Bindung der radioaktiv markierten latenten Gelatinasen proportional zur Menge des angebotenen Bindungspartners zu.

Damit war das erste Kriterium für eine spezifische Bindung der proMMPs an die natürlichen und die synthetischen Verbindungen, die tripelhelikale Strukturen enthalten, erfüllt.

Die Inhibierbarkeit der Bindung der latenten und aktivierten MMPs an KI und daraus abgeleitete Strukturen wurde in Experimenten untersucht, in denen die Bindungspartner der MMPs immobilisiert und in Lösung vorlagen. Dazu wurden die (pro)MMPs vor der Zugabe auf die immobilisierten Bindungspartner mit gelöstem KI, Ketten bzw. CB-Fragmenten daraus sowie mit den synthetischen Kollagenmimetika inkubiert. Die Kollagene sind Makromoleküle, bei denen man an experimentelle Grenzen mit der klassischen Methodik eines Festphasenassays im Mikrotiterplattenformat stößt. Schließlich ist auch nicht bekannt, ob und inwieweit durch die Immobilisierung von Proteinen das Molekül denaturiert (78) und die Verfügbarkeit funktioneller Domänen beeinflusst wird (79, 80).

In allen homotypischen Kombinationen, also mit jeweils gleichem gelöstem und immobilisiertem Partner wurde die Bindung der MMPs in den untersuchten Konzentrationsbereichen effizient inhibiert. Das spricht dafür, dass Immobilisierung selbst die Bindungsstellen des Kollagens für die MMPs nicht oder nicht wesentlich verändert. Mit dem natürlichen KI und den daraus gewonnenen Ketten und Fragmenten war die Inhibition der MMP-Bindung umso stärker, je kleiner das Molekül war und umso stärker diese auf die tripelhelikale Struktur reduziert war. Das in der Aminosäuresequenz ähnliche, aber lineare Kontrollpeptid zeigt keine Inhibition. Dass weder das gelöste Fragment CB7 der  $\alpha 1$ -Kette von KI noch das synthetische (GPO)<sub>10</sub> die Bindung an proMMP-2 an KI vollständig aufheben können, ist ein starker Hinweis darauf, dass die Interaktion zwischen der Gelatinaseproform und KI wesentlich, aber nicht ausschließlich, durch die kollagene Tripelhelix vermittelt wird. Hier sind weitere (eventuell Zuckerrest-basierte) Wechselwirkungen zwischen dem Kollagen und den proMMPs als auch der Einfluss von Exosites zu diskutieren.

Die zur Überprüfung der Spezifität der Kollagen-MMP-Bindung durchgeführten Sättigungsexperimente mit KI, der  $\alpha 1(I)$ -Kette und (GPO)<sub>10</sub> zeigten vor allem für die proFormen der MMPs eine limitierte Bindung. Definitionsgemäß erkennt man eine unspezifische Bindung daran, dass diese über einen weiten Bereich proportional zur Konzentration des nicht-gebundenen Moleküls zunimmt. In den Sättigungsexperimenten zeigte aktiviertes MMP-9 einen linearen Verlauf, der dem einer



unspezifischen Bindung entspricht, und die Bindung war insgesamt nur sehr gering. Mit der latenten MMP-9 war eine maximale Bindung an jedes der immobilisierten Moleküle bereits mit etwa 2 pmol proMMP-9 erreicht. Dass proMMP-9 mit allen untersuchten Bindungspartnern einen Sättigungsverlauf zeigt, stützt die Hypothese dieser Arbeit, dass die Tripelhelix mindestens die wesentliche, möglicherweise sogar die einzige Struktur seitens des KI ist, über die die Bindung vermittelt wird.

Im Vergleich zur aktivierten MMP-9 mit nur sehr schwacher unspezifischer Basisbindung wurde mehr proMMP-2 an KI, die  $\alpha 1(I)$ -Kette und  $(GPO)_{10}$  gebunden. Interessanterweise nähert sich die Kurve der aktivierten MMP-2 über  $(GPO)_{10}$  der des latenten Enzyms an. Unter den Bedingungen dieses Assays wurde bei der Bindung von proMMP-2 an KI und  $(GPO)_{10}$  keine Sättigung erreicht, während die Bindung an die  $\alpha 1$ -Kette von KI sättigbar war. Möglicherweise ist die bessere Bindung an die  $\alpha 1(I)$ -Kette im Vergleich zum Gesamtkollagen I durch eine veränderte Konformation zu erklären, die im Falle der  $\alpha 1(I)$ -Kette zu einer verstärkten Präsentation von tripelhelikalen Bindungsdomänen führt.

Ist eine Bindung zu sättigen, kann die Sättigungskurve in eine lineare Auftragung transformiert werden. Aus einer solchen sogenannten Scatchardanalyse kann eine Dissoziationskonstante abgeschätzt werden, die umgekehrt proportional zur Affinität der Bindung ist. Ergibt eine solche Auftragung keinen linearen Verlauf, kann das ebenfalls ein Hinweis darauf sein, dass mehr als eine Struktur an der Bindung beteiligt ist (81). In komplexen biologischen Systemen und bei Makromolekülen ist die Bindung eines Liganden häufig das Ergebnis des Zusammenwirkens spezifischer und unspezifischer Phänomene. Eine direkte Ableitung der Dissoziationskonstante geht unter diesen Bedingungen über die Möglichkeiten einfacher Scatchardplots hinaus. Aus ELISA-Untersuchungen wurden für die Bindung von proMMP-2 und proMMP-9 an KI Dissoziationskonstanten zwischen 10 und 100 pM abgeschätzt (44, 45). Durch rekombinante Fragmente, die im Wesentlichen die Fibronektindomäne als bekannte Kollagen-bindende Domänen der Gelatinasen enthielten, wurde der Einfluss von *Exosites* auf die Bindung verringert. Für die Bindung an KI wurden auch hier Dissoziationskonstanten von 15-300 pM ermittelt (49, 82). Mit Hilfe der *Surface Plasmon Resonance* wurde die Bindung von proMMP-2 und der isolierten Fibronektindomäne an die immobilisierte  $\alpha 1(I)$ -Kette und an synthetische Trimere, die

KI und Gelatine simulieren, untersucht. Die Dissoziationskonstanten für diese Bindungen lagen im mikromolaren Bereich (48).

Inwieweit  $(\text{GPO})_{10}$  die Aktivierung der MMPs beeinflusst, war nicht Gegenstand dieser Arbeit, ist aber ein interessanter Gesichtspunkt für mögliche weitergehende Untersuchungen.

Was sind aber aus Sicht der vorliegenden Arbeit mögliche Ursachen für die Wirkung des KI, der  $\alpha 1(\text{I})$ -Kette oder des  $(\text{GPO})_{10}$  auf das unterschiedliche Bindungsverhalten der latenten und der aktivierten Formen beider Gelatinasen? Von proMMP-2 ist bekannt, dass eine Seitenkette der Prodomäne intramolekular in die Tasche des dritten Fibronectinmoduls COL-3 inseriert (25). Diese Bindung wird durch  $(\text{GPP})_6$  und  $(\text{GPP})_{12}$  nicht aufgehoben und diese Kollagenmimetika binden wiederum bevorzugt an die Module COL-1 und COL-2 (31, 32, 83). Daraus und aus den Ergebnissen der eigenen Inhibitionsversuche ist die folgende Abfolge der Ereignisse denkbar. Die Bindung von KI, daraus direkt abgeleiteten Ketten und Fragmenten, oder des synthetischen  $(\text{GPO})_{10}$  an die Fibronectindomäne des proMMP-2 bewirkt eine Konformationsänderung in latentem MMP-2. Dadurch entsteht eine gewisse Instabilität der räumlichen Anordnung des Propeptids und die Blockade des aktiven Zentrums des Enzyms wird mindestens partiell aufgehoben. Ein auf diese Weise teilaktiviertes proMMP-2 könnte wie die aktivierte MMP-2 in Abwesenheit der Bindung an Kollagen selbst instabil sein. Dann unterliegt es einer schnellen Autodegradation und zerfällt in mehrere Fragmente, die in den experimentellen Ansätzen nicht mehr als bindende Moleküle dargestellt werden können. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung, dass proMMP-9 trotz nicht abgespaltenen Propeptids nach der Bindung an Kollagen IV, wenn auch in verminderter Form katalytisch aktiv sein kann, untermauert (42). Ein weiteres Indiz stammt aus den fluorimetrischen Untersuchungen in Aktivierungsansätzen beider proMMPs (vgl. Abbildung 9). In Gegenwart der Aktivatoren APMA für proMMP-2 bzw. TPCK-Trypsin für proMMP-9 nahm die proteolytische Aktivität langsamer zu, wenn in den Mikrotiterplatten immobilisiertes KI vorlag. Gleichzeitig waren auch hier die Maxima der enzymatischen Aktivität geringer als in den Ansätzen ohne KI. Analog zu Ergebnissen, die zeigten, dass die Bindung an KI die MMP-2 vor Autolyse schützt (41), könnten die proMMPs durch die Speicherwirkung des EZM-Moleküls vor der Aktivierung geschützt sein. Einschränkend muss man sagen, dass MMP-2 ebenfalls kollagenolytisch wirken kann (73, 74). Damit stünde das aktive Zentrum des Enzyms nicht ausschließlich für die

Spaltung des fluorogenen Substrates zur Verfügung und die geringe Aktivität ist hiermit erklärbar.

Der Gesamtprozess der Aktivierung und der nachfolgenden Schritte, in deren Folge mehrere inaktive Fragmente entstehen, ist besonders für MMP-2 gut untersucht (40, 84). Zunächst entsteht durch die Abspaltung des Propeptids das aktive Enzym mit einem Molekulargewicht von 62 kDa. Die Bindung an den Inhibitor TIMP-2 schützt das aktivierte Enzym vor Autodegradation, indem es die Abspaltung der Hämopexindomäne durch eine selektive Spaltung zwischen den Prolin- und Isoleucinresten in den Positionen 394 und 395 und darüber hinaus eine weitere Spaltung zwischen Glu<sub>414</sub> und Leu<sub>415</sub> verhindert. Ein wichtiger biologischer Nutzen der Bindung der Proformen der Gelatinasen an die EZM könnte sein, dass sie die autokatalytische Aktivierung und Degradation der proMMPs in Abwesenheit des Substrates verhindert. Neben der wenig regulierten, konstanten Expression latenter Gelatinasen und der u.a. über die Stabilität der entsprechenden mRNA regulierten Translation würde die selektive Speicherfunktion der EZM für aktivierbare MMPs einen weiteren Regulationsmechanismus für die schnelle lokale Verfügbarkeit der Enzyme darstellen.

## 5. Zusammenfassung

Der Ausgangspunkt für die hier vorliegende Arbeit war das Interesse an den molekularen Zusammenhängen, die an der Induktion, Aufrechterhaltung und Auflösung einer Fibrose insbesondere in der Leber beteiligt sind. Neben direkten zellulären Interaktionen spielen die Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Leberzellen und der extrazellulären Matrix (EZM) eine zentrale Rolle. Dabei wirken EZM-Bestandteile, wie z.B. die Kollagene, nicht nur direkt auf die Zellen, sondern modulieren deren Aktivität auch indirekt durch die Speicherung von anderen Molekülen, wie z.B. Wachstumsfaktoren (Crinopexy). Neben Wachstumsfaktoren wurde auch für verschiedene Matrixmetalloproteinasen (MMPs), welche wesentlich am physiologischen und pathologischen Umbau der EZM beteiligt und auch therapeutisch von großem Interesse sind, eine Speicherung in der EZM hypothesiert. So wurde in ersten Versuchen gezeigt, dass z.B. die Gelatinasen MMP-2 und -9 an Kollagen I binden, ohne dass dieses ein primäres Substrat dieser MMPs darstellt. Basierend auf der Hypothese, dass die EZM MMPs speichern kann, war Zielsetzung dieser Arbeit, die Interaktion bzw. die Speicherung von MMPs in der EZM weiter zu untersuchen, potentielle Bindungsstellen auf den Hauptkomponenten der EZM, nämlich den Kollagenen, zu analysieren und diese Bindung ggf. direkt - z.B. mit Peptidanaloga - zu modulieren.

Methodisch wurden mit Hilfe spezifischer monoklonaler Antikörper in *in situ*-Färbungen (APAAP) von EZM-gebundenen MMP-2 und -9 auf humaner zirrhotischer Explantat-Leber durchgeführt. Zur weiteren *in vitro* Analyse der MMP-Kollagen-Interaktion wurden hochaufgereinigte EZM-Bestandteile (Kollagene, Kollagenketten, Cyanbromid-abgebaute Kollagenfragmente) sowie synthetische Kollagenmimetika generiert bzw. eingesetzt. Diese Komponenten wurden in verschiedenen Festphasen/Inhibitionsassays (96-Lochplatten, dot-blot) mit [<sup>125</sup>I]-markierten pro und aktivierten MMPs inkubiert und die Bindungsstärke analysiert. Zuvor wurde u.a. mittels Zymographie gezeigt, dass die Markierung der latenten und aktivierten Gelatinasen mit [<sup>125</sup>I] die Integrität der Proteine, ihren Aktivierungsstatus und die potentielle enzymatische Aktivität nicht beeinträchtigt. Durch Etablierung eines Fluorimetrie-Aktivitätsassays konnte der Einfluss der MMP-Kollagen-Bindung auf die Aktivität der MMPs untersucht werden.

Immunhistologisch wurde zunächst *in situ* in fibrotischem Lebergewebe nachgewiesen, dass endogene MMPs auch außerhalb der produzierenden Zellen im Gewebe gebunden vorliegen. Wurden die Schnitte mit proMMP-2 bzw. proMMP-9 vorinkubiert,

zeigte sich eine bevorzugte und starke Bindung der latenten Gelatinasen an fibrotische Strukturen der Leberschnitte. In den Festphasenassays banden [<sup>125</sup>I]-markierte proMMPs bevorzugt an die Kollagene Typ I und III aber nur sehr schwach an andere untersuchte EZM-Bestandteile. Die Proformen beider Enzyme wurden im Gegensatz zu den entsprechenden aktivierten Formen sehr stark durch die gereinigten Matrixmoleküle gebunden. Damit wurde erstmals deutlich gezeigt, dass die Bindung von Gelatinasen an Nichtsubstrat-Kollagene vom Aktivierungszustand des MMPs abhängig ist, die EZM also einen Speicher für die latenten Gelatinasen darstellt. Des Weiteren konnte in einem fluorimetrischen Aktivitätsassay für MMP-9 gezeigt werden, dass die Aktivierung selbst ebenfalls durch die Bindung an Kollagen unterdrückt wird. Die Bindungsversuche mit definierten Fragmenten von KI sowie synthetischen Kollagenmimetika, die sich im Wesentlichen durch den Anteil und die Rigidität vorhandener tripelhelikaler Strukturen unterschieden, zeigten, dass mit Zunahme des Anteils tripelhelikaler Strukturen (Zunahme in der Reihenfolge KI,  $\alpha$ 1-Kette von KI [ $\alpha$ 1(I)], CB8- bzw. CB7-Fragment von  $\alpha$ 1(I)), die Fähigkeit latente Gelatinasen zu binden, zunahm. So lag die Annahme nahe, dass nicht eine charakteristische Primärstruktur, sondern die Sekundärstruktur „kollagene Tripelhelix“ selbst als Konsensusstruktur für die Bindung der proMMPs fungiert. Dies wurde dadurch bestätigt, dass die Proformen beider Enzyme auch an das synthetische Kollagenpeptid Glycin-Prolin-Hydroxyprolin (GPO)<sub>10</sub> binden und (GPO)<sub>10</sub> allein effizient die Bindung der proMMPs an immobilisiertes KI blockieren kann. Bereits bei geringen Mengen proMMP-9 wurde eine Sättigung der Bindung an immobilisiertes KI,  $\alpha$ 1(I) bzw. (GPO)<sub>10</sub> beobachtet. Das trifft für proMMP-2 nicht zu. Hier war nur die Bindung an die  $\alpha$ 1(I) im untersuchten Konzentrationsbereich zu sättigen. Diese Beobachtung ist möglicherweise auf Unterschiede in den Bindungsmechanismen und die Anzahl der daran beteiligten Strukturen zurückzuführen, was der Gegenstand weiterer Untersuchungen ist.

Somit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die tripelhelikale Struktur von Kollagenen die Konsensusbindungsstruktur für latente Gelatinasen darstellt. Durch Modulation mittels spezifischer (synthetischer) Peptide könnte es gelingen, diese latenten MMPs lokal zu aktivieren und somit die Fibrose/Zirrhose lokal im Sinne einer fibrolytischen Therapie zu modulieren. Ein Fernziel könnte sein, die interaktiven Peptidsequenzen und das synthetische (GPO)<sub>10</sub> gegebenenfalls auch in Kombination

mit bekannten MMP-Inhibitoren nicht nur auf ihre anti-fibrotischen sondern auch anti-neoplastischen Eigenschaften *in vivo* zu testen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Bahr MJ, Manns MP. (1999) [Liver cirrhosis]. Internist (Berl). **40**, 1308-22
2. Brown R, De Cock E, Colin X, Antonanzas F, Iloeje UH. (2004) Hepatitis B Management Costs in France, Italy, Spain, and the United Kingdom. J Clin Gastroenterol. **38**,
3. Knittel T, Saile B, Ramadori G. (1998) Fibrogenesis. Pathophysiology and therapeutic approaches. Internist (Berl). **39**, 238-46
4. Bataller R, Brenner DA. (2001) Hepatic stellate cells as a target for the treatment of liver fibrosis. Semin Liver Dis. **21**, 437-51
5. Friedman SL. (2003) Liver fibrosis- from bench to bedside. Journal of Hepatology. **38**, S38-53
6. Knittel T, Muller L, Saile B, Ramadori G. (1997) Effect of tumour necrosis factor-alpha on proliferation, activation and protein synthesis of rat hepatic stellate cells. J Hepatol. **27**, 1067-80
7. Pinzani M, Marra F. (2001) Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. Semin Liver Dis. **21**, 397-416
8. Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, Hahn EG. (2001) Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. Semin Liver Dis. **21**, 351-72
9. Schuppan D. (1990) Structure of the extracellular matrix in normal and fibrotic liver: collagens and glycoproteins. Semin Liver Dis. **10**, 1-10
10. Schuppan D, Riecken EO. (1990) Molecules of the extracellular matrix: potential role of collagens and glycoproteins in intestinal adaptation. Digestion. **46 Suppl 2**, 2-11
11. Junqueira LC, Carneiro J. Histologie. Springer Verlag, 1991.
12. Somasundaram R, Ruehl M, Schaefer B, Schmid M, Ackermann R, Riecken EO, Zeitz M, Schuppan D. (2002) Interstitial collagens I, III, and VI sequester and modulate the multifunctional cytokine oncostatin M. J Biol Chem. **277**, 3242-6
13. Feige J, Baird A. (1995) Crinopexy: extracellular regulation of growth factor action. Kidney Int Suppl. **49**, 15-8
14. Ruddy S. Kelley's Textbook of Rheumatology. Saunders, 2001.
15. Stocker W, Bode W. (1995) Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins. Curr Opin Struct Biol. **5**, 383-90

16. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. (1993) Matrix metalloproteinases: a review. Crit Rev Oral Biol Med. **4**, 197-250.
17. Stamenkovic I. (2000) Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. Semin Cancer Biol. **10**, 415-33
18. Sternlicht MD, Werb Z. (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Annu Rev Cell Dev Biol. **17**, 463-516
19. Woessner JF, Jr. (2001) MMPs and TIMPs. An historical perspective. Methods Mol Biol. **151**, 1-23.
20. Bork P, Koonin EV. (1996) Protein sequence motifs. Curr Opin Struct Biol. **6**, 366-76
21. Bork P, Downing AK, Kieffer B, Campbell ID. (1996) Structure and distribution of modules in extracellular proteins. Q Rev Biophys. **29**, 119-67
22. Egeblad M, Werb Z. (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nature Rev Cancer. **2**, 161-74.
23. Matrisian LM. (2000) Quick guide. Matrix metalloproteinases. Curr Biol. **10**, R692.
24. McCawley LJ, Matrisian LM. (2001) Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! Curr Opin Cell Biol. **13**, 534-40.
25. Morgunova E, Tuuttila A, Bergmann U, Isupov M, Lindqvist Y, Schneider G, Tryggvason K. (1999) Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: activation mechanism revealed. Science. **284**, 1667-70
26. Nagase H, Woessner JF. (1999) Matrix Metalloproteinases. J Biol Chem. **274**, 21491-21494
27. Overall CM. (2001) Matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules and exosites. Overview and experimental strategies. Methods Mol Biol. **151**, 79-120.
28. Wallon UM, Overall CM. (1997) The hemopexin-like domain (C domain) of human gelatinase A (matrix metalloproteinase-2) requires Ca<sup>2+</sup> for fibronectin and heparin binding. Binding properties of recombinant gelatinase A C domain to extracellular matrix and basement membrane components. J Biol Chem. **272**, 7473-81



29. Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. (1990) The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. Proc Natl Acad Sci U S A. **87**, 5578-82
30. De Souza S, Pereira H, Jacchieri S, Brentani R. (1996) Collagen/collagenase interaction: does the enzyme mimic the conformation of its own substrate? Faseb J. 927-30
31. Gehrman M, Briknarova K, Banyai L, Patthy L, Llinas M. (2002) The col-1 module of human matrix metalloproteinase-2 (MMP-2): structural/functional relatedness between gelatin-binding fibronectin type II modules and lysine-binding kringle domains. Biol Chem. **383**, 137-48
32. Gehrman ML, Douglas JT, Banyai L, Tordai H, Patthy L, Llinas M. (2004) Modular autonomy, ligand specificity, and functional cooperativity of the three in-tandem fibronectin type II repeats from human matrix metalloproteinase 2. J Biol Chem.
33. Banyai L, Tordai H, Patthy L. (1994) The gelatin-binding site of human 72 kDa type IV collagenase (gelatinase A). Biochem J. **298 ( Pt 2)**, 403-7
34. Benyon RC, Arthur MJ. (2001) Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. Semin Liver Dis. **21**, 373-84
35. Hasty KA, Pourmotabbed TF, Goldberg GI, Thompson JP, Spinella DG, Stevens RM, Mainardi CL. (1990) Human neutrophil collagenase. A distinct gene product with homology to other matrix metalloproteinases. J Biol Chem. **265**, 11421-4
36. Nagase H. (1997) Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. Biol Chem. **378**, 151-60.
37. Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI. (1995) Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. J Biol Chem. **270**, 5331-8
38. Deryugina EI, Ratnikov B, Monosov E, Postnova TI, DiScipio R, Smith JW, Strongin AY. (2001) MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin alphavbeta3 promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. Exp Cell Res. **263**, 209-23.
39. Shapiro SD, Fliszar CJ, Broekelmann TJ, Mecham RP, Senior RM, Welgus HG. (1995) Activation of the 92-kDa gelatinase by stromelysin and 4-aminophenylmercuric acetate. Differential processing and stabilization of the

- carboxyl-terminal domain by tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP). J Biol Chem. **270**, 6351-6
40. Bergmann U, Tuuttila A, Stetler-Stevenson WG, Tryggvason K. (1995) Autolytic activation of recombinant human 72 kilodalton type IV collagenase. Biochemistry. **34**, 2819-25.
  41. Ellerbroek SM, Wu YI, Stack MS. (2001) Type I collagen stabilization of matrix metalloproteinase-2. Arch Biochem Biophys. **390**, 51-6
  42. Bannikov GA, Karelina TV, Collier IE, Marmer BL, Goldberg GI. (2002) Substrate binding of gelatinase B induces its enzymatic activity in the presence of intact propeptide. J Biol Chem. **277**, 16022-7
  43. Toth M, Chvyrkova I, Bernardo MM, Hernandez-Barrantes S, Fridman R. (2003) Pro-MMP-9 activation by the MT1-MMP/MMP-2 axis and MMP-3: role of TIMP-2 and plasma membranes. Biochem Biophys Res Commun. **308**, 386-95
  44. Allan JA, Docherty AJ, Murphy G. (1994) The binding of gelatinases A and B to type I collagen yields both high and low affinity sites. Ann N Y Acad Sci. **732**, 365-6
  45. Allan JA, Docherty AJ, Barker PJ, Huskisson NS, Reynolds JJ, Murphy G. (1995) Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. Biochem J. **309 ( Pt 1)**, 299-306
  46. Olson MW, Toth M, Gervasi DC, Sado Y, Ninomiya Y, Fridman R. (1998) High affinity binding of latent matrix metalloproteinase-9 to the alpha2(IV) chain of collagen IV. J Biol Chem. **273**, 10672-81
  47. Ottl J, Battistuta R, Pieper M, Tschesche H, Bode W, Kuhn K, Moroder L. (1996) Design and synthesis of heterotrimeric collagen peptides with a built-in cystine-knot. Models for collagen catabolism by matrix-metalloproteases. FEBS Lett. **398**, 31-6
  48. Ottl J, Gabriel D, Murphy G, Knauper V, Tominaga Y, Nagase H, Kroger M, Tschesche H, Bode W, Moroder L. (2000) Recognition and catabolism of synthetic heterotrimeric collagen peptides by matrix metalloproteinases. Chem Biol. **7**, 119-32
  49. Steffensen B, Wallon UM, Overall CM. (1995) Extracellular matrix binding properties of recombinant fibronectin type II-like modules of human 72-kDa gelatinase/type IV collagenase. High affinity binding to native type I collagen but not native type IV collagen. J Biol Chem. **270**, 11555-66

50. Jiang Y, Goldberg ID, Shi YE. (2002) Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. Oncogene. **21**, 2245-52
51. Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. (2002) Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. Science. **295**, 2387-92.
52. Vaillant B, Chiaramonte MG, Cheever AW, Soloway PD, Wynn TA. (2001) Regulation of hepatic fibrosis and extracellular matrix genes by the th response: new insight into the role of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. J Immunol. **167**, 7017-26
53. Roeb E, Behrmann I, Grotzinger J, Breuer B, Matern S. (2000) An MMP-9 mutant without gelatinolytic activity as a novel TIMP-1-antagonist. Faseb J. **14**, 1671-3
54. Benyon RC, Hovell CJ, Da Gaca M, Jones EH, Iredale JP, Arthur MJ. (1999) Progelatinase A is produced and activated by rat hepatic stellate cells and promotes their proliferation. Hepatology. **30**, 977-86
55. Ruehl M, Somasundaram R, Schoenfelder I, Farndale RW, Knight CG, Schmid M, Ackermann R, Riecken EO, Zeitz M, Schuppan D. (2002) The epithelial mitogen keratinocyte growth factor binds to collagens via the consensus sequence glycine-proline-hydroxyproline. J Biol Chem. **277**, 26872-8
56. Somasundaram R, Schuppan D. (1996) Type I, II, III, IV, V, and VI collagens serve as extracellular ligands for the isoforms of platelet-derived growth factor (AA, BB, and AB). J Biol Chem. **271**, 26884-91
57. Somasundaram R, Ruehl M, Tiling N, Ackermann R, Schmid M, Riecken EO, Schuppan D. (2000) Collagens serve as an extracellular store of bioactive interleukin 2. J Biol Chem. **275**, 38170-5
58. Mutschler. Arzneimittelwirkungen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1996.
59. Knight CG, Morton LF, Onley DJ, Peachey AR, Ichinohe T, Okuma M, Farndale RW, Barnes MJ. (1999) Collagen-platelet interaction: Gly-Pro-Hyp is uniquely specific for platelet Gp VI and mediates platelet activation by collagen. Cardiovasc Res. **41**, 450-7
60. Knight CG, Morton LF, Peachey AR, Tuckwell DS, Farndale RW, Barnes MJ. (2000) The collagen-binding A-domains of integrins alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) recognize the same specific amino acid sequence, GFOGER, in native (triple-helical) collagens. J Biol Chem. **275**, 35-40

61. Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, Pulford KA, Stein H, Mason DY. (1984) Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). J Histochem Cytochem. **32**, 219-29
62. Laemmli. (1970) Nature. **227**, 680-685
63. Oliver GW, Leferson JD, Stetler-Stevenson WG, Kleiner DE. (1997) Quantitative reverse zymography: analysis of picogram amounts of metalloproteinase inhibitors using gelatinase A and B reverse zymograms. Anal Biochem. **244**, 161-6
64. Knight CG. (1991) A quenched fluorescent substrate for thimet peptidase containing a new fluorescent amino acid, DL-2-amino-3-(7-methoxy-4-coumaryl)propionic acid. Biochem J. **274**, 45-8
65. Knight CG, Willenbrock F, Murphy G. (1992) A novel coumarin-labelled peptide for sensitive continuous assays of the matrix metalloproteinases. FEBS Lett. **296**, 263-6
66. Bolton AE, Hunter WM. (1972) A new method for labelling protein hormones with radioiodine for use in the radioimmunoassay. J Endocrinol. **55**, 269-274
67. Bolton AE, Hunter WM. (1973) The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a <sup>125</sup>I-containing acylating agent. Biochem J. **133**, 529-39
68. Kyhse-Andersen J. (1984) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. J Biochem Biophys Methods. **10**, 203-9
69. Aglund K, Rauvala M, Puistola U, Angstrom T, Turpeenniemi-Hujanen T, Zackrisson B, Stendahl U. (2004) Gelatinases A and B (MMP-2 and MMP-9) in endometrial cancer-MMP-9 correlates to the grade and the stage. Gynecol Oncol. **94**, 699-704
70. Yagasaki H, Kawata N, Takimoto Y, Nemoto N. (2003) Histopathological analysis of angiogenic factors in renal cell carcinoma. Int J Urol. **10**, 220-7
71. Di Girolamo N, Wakefield D, Coroneo MT. (2000) Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors at the advancing pterygium head. Invest Ophthalmol Vis Sci. **41**, 4142-9

72. Salzman J, Limb GA, Khaw PT, Gregor ZJ, Webster L, Chignell AH, Charteris DG. (2000) Matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in fibrovascular membranes of proliferative diabetic retinopathy. Br J Ophthalmol. **84**, 1091-6
73. Aimes RT, Quigley JP. (1995) Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. J Biol Chem. **270**, 5872-6
74. Patterson ML, Atkinson SJ, Knauper V, Murphy G. (2001) Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. FEBS Lett. **503**, 158-62
75. Fietzek PP, Kuhn K. (1976) The primary structure of collagen. Int Rev Connect Tissue Res. **7**, 1-60
76. Murphy G, Crabbe T. (1995) Gelatinases A and B. Methods Enzymol. **248**, 470-84
77. Rehm H. Proteinbiochemie/Proteomics, 2002.
78. Butler JE, Ni L, Nessler R, Joshi KS, Suter M, Rosenberg B, Chang J, Brown WR, Cantarero LA. (1992) The physical and functional behavior of capture antibodies adsorbed on polystyrene. J. Immunol. Methods. **155**, 77
79. Dierks SE, Butler JE, Richerson HB. (1986) Altered recognition of surface-adsorbed compared to antigen-bound antibodies in the ELISA. Mol. Immunol. **23**, 403
80. Hollander Z, Katchalski-Katzir E. (1986) Use of monoclonal antibodies to detect conformational alterations in lactate dehydrogenase isoenzyme 5 on heat denaturation and on adsorption to polystyrene plates. Mol.Immunol. **23**, 927
81. Feldman H. (1972) Mathematical theory of complex ligand-binding systems at equilibrium. Analyt Biochem. **48**, 317-338
82. Steffensen B, Xu X, Martin PA, Zardeneta G. (2002) Human fibronectin and MMP-2 collagen binding domains compete for collagen binding sites and modify cellular activation of MMP-2. Matrix Biol. **21**, 399-414
83. Briknarova K, Gehrman M, Banyai L, Tordai H, Patthy L, Llinas M. (2001) Gelatin-binding region of human matrix metalloproteinase-2: solution structure, dynamics, and function of the COL-23 two-domain construct. J Biol Chem. **276**, 27613-21

84. Howard EW, Banda MJ. (1991) Binding of tissue inhibitor of metalloproteinases 2 to two distinct sites on human 72-kDa gelatinase. Identification of a stabilization site. J Biol Chem. **266**, 17972-7
85. Lein M, Jung K, Ortel B, Stephan C, Rothaug W, Juchem R, Johannsen M, Deger S, Schnorr D, Loening S, Krell HW. (2002) The new synthetic matrix metalloproteinase inhibitor (Roche 28-2653) reduces tumor growth and prolongs survival in a prostate cancer standard rat model. Oncogene. **21**, 2089-96
86. Siller-Lopez F, Sandoval A, Salgado S, Salazar A, Bueno M, Garcia J, Vera J, Galvez J, Hernandez I, Ramos M, Aguilar-Cordova E, Armendariz-Borunda J. (2004) Treatment with human metalloproteinase-8 gene delivery ameliorates experimental rat liver cirrhosis. Gastroenterology. **126**, 1122-33; discussion 949.  
Write to the Help Desk NCBI | NLM | NIH Department of Health & Human Services Privacy Statement | Freedom of Information Act | Disclaimer
87. Murphy FR, Issa R, Zhou X, Ratnarajah S, Nagase H, Arthur MJ, Benyon C, Iredale JP. (2002) Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. J Biol Chem. **277**, 11069-76

## **7. Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Rajan Somasundaram und Herrn Dr. Martin Rühl möchte ich für die Überlassung dieser Arbeit und sehr für die hervorragende Betreuung danken. Bei Frau Dr. Ulrike Erben stehe ich tief in der Schuld für die kritische Durchsicht und Korrektur der Arbeit. Durch die freundschaftliche Atmosphäre in der Arbeitsgruppe machte es sehr viel Freude zu arbeiten.

Der Sonnenfeld-Stiftung möchte ich für die Finanzierung dieser Arbeit im Rahmen eines zweijährigen Promotionsstipendiums danken. Insbesondere bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. H.J. von Villiez möchte ich mich bedanken, der mich mit seiner Persönlichkeit und seinem persönlichen Engagement tief beeindruckt hat.

Frau Renate Ackermann und Frau Kathrin Thomsen-Mund möchte für die Einarbeitung in die Methoden danken.

Meinen Eltern möchte ich für die Finanzierung meines Studiums und ihre Unterstützung danken und meinen Freunden und meinem Mann für Ihre Geduld mit mir (insbesondere bei Erwähnung des Themas „Doktorarbeit“).

## **8. Lebenslauf**

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



## **9. Erklärung**

Ich, Marion Bettina Muche (geb. Seja), erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Die extrazelluläre Matrix von fibrotischem Lebergewebe speichert Gelatinaseproformen über die Bindung an die Tripelhelix von Kollagenen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, der 29.10.2007

Marion Bettina Muche