

**KLONIERUNG, EXPRESSION UND CHARAKTERISIERUNG
EINZELNER DOMÄNEN DER GELATINASEN**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Universität Bielefeld von

Jörg Stute

Arbeitsgruppe Prof. Dr. H. Tschesche
Biochemie I, Fakultät für Chemie
Universität Bielefeld
Bielefeld 2002

*Diese Arbeit ist Tanja gewidmet.
Auf ihre Unterstützung konnte ich immer zählen.
Für ihre Nachsicht, Ermutigung und Kritik
möchte ich mich herzlich bedanken.*

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 1998 bis September 2002 an der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld angefertigt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. H. Tschesche, dass er mir das Thema dieser Arbeit zur selbständigen Bearbeitung überlassen hat und für die Unterstützung, die er meiner Arbeit zukommen ließ. Besonders möchte ich mich für sein Verständnis während meines Zivildienstes von November 1998 bis November 1999 bedanken.

Herrn Prof. Dr. K. Kleesiek möchte ich für die freundliche Übernahme des Korreferats danken.

Mein aufrichtiger Dank gilt allen Mitarbeitern des Arbeitskreises Biochemie I für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Kollegialität, die sie mir entgegengebracht haben. Besonders zu erwähnen sind an dieser Stelle meine Laborkollegen Frau M. Mahne, Herr A. Henke, Herr Dr. A. Kocourek und Herr Dr. L. Schwetmann. Bedanken möchte ich mich ferner auch bei Frau C. Hübel und Herrn Dr. B. Stratmann, die mit ihrer steten Hilfsbereitschaft und den zahlreichen Anregungen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein großer Dank gilt meinem Blockpraktikanten Herrn I. Goldbeck für seine präparative Unterstützung und Herrn M.-O. Luther für die Durchführung der Protein-Sequenzierungen. Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Dr. U. Bierfreund (Firma Biacore), Frau Dr. S. Schrader und Frau Dr. K. Stembera für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung und bei Frau Dr. A. Barwinski und Herrn J. Kleimann für die Hilfestellungen bei der Auswertung der Biacore-Messungen. Darüber hinaus möchte ich mich für die stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung von Herrn Dr. H. Wenzel und Herrn R. Beckmann herzlich bedanken.

Frau M. Mahne, Herrn O. Hiller, Herrn Dr. A. Kocourek sowie Tanja und meiner Mutter danke ich für die Durchsicht dieser Arbeit.

Last but not least möchte ich mich bei allen aufrichtig bedanken, die durch Ratschläge, Kritik und Ermutigung zum Erstellen dieser Dissertation beigetragen haben. An erster Stelle sind hier meine Eltern zu nennen, die mich während der gesamten Zeit durch ihren moralischen Beistand und ihre Rücksicht unterstützt haben. Aber auch meinen Schwiegereltern und guten Freunden, die mir während der gesamten Zeit zur Seite standen, bin ich außerordentlich dankbar.

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	III
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	IX
Kapitel 1 Einleitung	1
1.1 Die extrazelluläre Matrix	1
1.2 Matrix Metalloproteinasen	3
1.2.1 Regulation der Matrix Metalloproteinasen	7
1.2.1.1 Regulation der Genexpression	8
1.2.1.2 Aktivierung latenter MMPs	8
1.2.1.3 Inhibierung der Matrix Metalloproteinasen	11
1.2.2 Substrate der Matrix Metalloproteinasen	13
1.2.2.1 Katalysemechanismus der MMPs	15
1.2.3 Matrix Metalloproteinasen in biologischen Prozessen	16
1.2.3.1 Physiologische Prozesse	17
1.2.3.2 Pathologische Prozesse	18
1.3 Die Gelatinasen	19
1.3.1 Die Gelatinase A	19
1.3.2 Die Gelatinase B	20
1.3.3 Einfluss der Fibronectin-ähnlichen Domäne	22
1.3.4 Wechselwirkungen der proGelatinasen mit TIMPs	23
1.3.5 Aktivierung der proGelatinase A	25
1.3.6 Interaktionen der Gelatinasen mit Integrinen	29
1.4 Biomolekulare Interaktionsanalyse	31
Kapitel 2 Zusammenfassung der Arbeit	33

Kapitel 3	Experimenteller Teil	36
3.1	Kultivierung von Zellen	36
3.1.1	<i>Escherichia coli</i>	36
3.1.2	<i>Pichia pastoris</i>	36
3.2	Molekularbiologische Methoden	37
3.2.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	37
3.2.2	DNA-Gelelektrophorese	38
3.2.3	Reinigung amplifizierter DNA	38
3.2.4	Klonierung mittels "TA cloning"	39
3.2.5	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	39
3.2.6	Klonierungsexperimente	40
3.2.7	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	40
3.2.8	Transformation von <i>Pichia pastoris</i>	41
3.2.9	Expression rekombinanter Proteine	42
3.2.9.1	<i>Escherichia coli</i>	42
3.2.9.2	<i>Pichia pastoris</i>	43
3.3	Proteinbiochemische Methoden	44
3.3.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	44
3.3.2	Automatisierte Protein-Sequenzierung	45
3.3.3	Western Blot	45
3.3.4	Reinigung rekombinanter Proteine	46
3.3.5	Aktivierung denaturierter Proteine	48
3.3.6	Aktivitätsnachweis durch Zymographie	49
3.3.7	Aktivitätstests mit synthetischen Substraten	49
3.3.8	Proteolytische Spaltung von Proteinen	50
3.3.9	Darstellung von Protein-Komplexen	50
3.3.10	Gelelektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen	51
3.3.11	Ultrafiltration	51
3.3.12	Bestimmung der Proteinkonzentration	52

3.4	Biomolekulare Interaktionsanalyse	53
3.4.1	Immobilisierung der Liganden	53
3.4.2	Bindung der Analyten	53
3.4.3	Regeneration der Chipoberfläche	54
3.4.4	Analyse der Reaktionsstufen	54
3.4.5	Bestimmung der Dissoziationskonstanten	54
Kapitel 4	Beschreibung der Ergebnisse	56
4.1	Die Fibronectin-ähnliche Domäne der Gelatinase A	57
4.2	Die Hämopexin-ähnliche Domäne der Gelatinase A aus <i>E. coli</i>	59
4.2.1	Überführung der Hämopexin-ähnlichen Domäne in die native Konformation	59
4.2.2	Charakterisierung der Hämopexin-ähnlichen Domäne	59
4.3	Die Hämopexin-ähnliche Domäne der Gelatinase A aus <i>P. pastoris</i>	61
4.3.1	Amplifizierung der cDNA	61
4.3.2	Klonierung in den Expressionsvektor pPICZ α A	62
4.3.3	Etablierung eines Expressionssystems in <i>Pichia pastoris</i>	63
4.3.4	Reinigung des Expressionsproduktes	63
4.4	Die Hämopexin-ähnliche Domäne der Gelatinase B aus <i>P. pastoris</i>	65
4.4.1	Amplifizierung der cDNA	65
4.4.2	Klonierung in den Expressionsvektor pPICZ α A	65
4.4.3	Etablierung eines Expressionssystems in <i>Pichia pastoris</i>	66
4.4.4	Reinigung des Expressionsproduktes	67
4.5	Bereitstellung eines Komplexes aus der Hämopexin-ähnlichen Domäne der Gelatinase B und rekombinantem TIMP-1	69

4.6	Biomolekulare Interaktionsanalyse	71
4.6.1	Biacore-Messungen	71
4.6.1.1	Komplexe aus Hämopexin-ähnlichen Domänen und TIMPs	72
4.6.1.2	Komplex aus proGelatinase B und TIMP-1	74
4.6.1.3	Untersuchungen zu Komplexen mit TIMP-4 und Integrinen	75
4.6.2	Bestimmung von Bindungsmechanismen und Dissoziationskonstanten	75
4.7	Die katalytische Domäne der Gelatinase B	81
4.7.1	Amplifizierung der cDNA	81
4.7.2	Klonierung in den Expressionsvektor pPICZ α A	82
4.7.3	Etablierung eines Expressionssystems in <i>Pichia pastoris</i>	83
4.7.4	Aufreinigung und Charakterisierung	84
Kapitel 5	Diskussion und Ausblick	85
5.1	Die Fibronectin-ähnliche Domäne der Gelatinase A	85
5.2	Die katalytische Domäne der Gelatinase B	86
5.3	Die Hämopexin-ähnliche Domäne der Gelatinase A	87
5.4	Die Hämopexin-ähnliche Domäne der Gelatinase B	90
5.5	Ausblick	93
Kapitel 6	Literaturverzeichnis	94
Kapitel 7	Anhang	109
7.1	Stämme und Vektoren	109
7.1.1	<i>Escherichia coli</i> Stämme	109
7.1.1.1	<i>E. coli</i> [JM 109]	109
7.1.1.2	<i>E. coli</i> [XL1 blue MRF ⁺]	109

7.1.1	<i>Escherichia coli</i> Vektoren	110
7.1.2.1	pCR TM -2.1-TOPO	110
7.1.2.2	pGEM TM -T	111
7.1.3	<i>Pichia pastoris</i> Stämme	111
7.1.4	<i>Pichia pastoris</i> Vektor pPICZ α A	112
7.2	Oligonukleotide	113
Lebenslauf		114

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Allgemein

Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
BMGY	“buffer glycerol-complex medium”
BMMY	“buffer methanol-complex medium”
bp	Basenpaare
Brij	Polyoxyethylenether
BSA	Rinderserumalbumin
b-TIMP-2	Boviner “tissue inhibitor of metalloproteinases”-2
cDNA	"copy"-Desoxyribonukleinsäure
CHO-Zellen	“chinese hamster ovary”-Zellen
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
Dpa	3-(2,4-Dinitrophenyl)-L-2,3-Diaminopropionyl
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extrazelluläre Matrix
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	N-Ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
GSSG	Glutathion oxidiert

72-Fib	Fibronectin-ähnliche Domäne der Gelatinase A
72-Häm	Hämopexin-ähnliche Domäne der Gelatinase A
72-Häm-F	"forward-primer" für 72-Häm
72-Häm-R	"revers-primer" für 72-Häm
92-Häm	Hämopexin-ähnliche Domäne der Gelatinase B
92-Häm-F	"forward-primer" für 92-Häm
92-Häm-R	"revers-primer" für 92-Häm
92-KaDo	Katalytische Domäne der Gelatinase B
92-KaDo-F	"forward-primer" für 92-KaDo
92-KaDo-R	"revers-primer" für 92-KaDo
IB	"inclusion bodie"
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasen
K_d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilo-Dalton
<i>lac Z</i>	β -Galaktosidasegen
LMW	"low molecular weight"
M	Molar
mA	Milliamper
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	"messenger"-Ribonukleinsäure
MT	"membrane type"
NBT	4-Nitrotetrazoliumchloridblau
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte

PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAI	Inhibitor des Plasminogen-Aktivators
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	Negativer Logarithmus der Protonenkonzentration
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RU	“response unit”
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>T4</i>	Bakteriophage <i>T4</i>
<i>T7</i>	Bakteriophage <i>T7</i>
TIMP	"tissue inhibitor of metalloproteinases"
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)diamin
Triton X-100	Octylphenol-polyethylenglykol
UF	Ultrafiltration
u-PA	Urokinase-Plasminogen-Aktivator
v/v	Volumenverhältnis
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktosid
YPDS	“yeast extract peptone dextrose sorbitol medium”

DNA-Basen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

Aminosäuren

A	Alanin	Ala
C	Cystein	Cys
D	Aspartat	Asp
E	Glutamat	Glu
F	Phenylalanin	Phe
G	Glycin	Gly
H	Histidin	His
I	Isoleucin	Ile
K	Lysin	Lys
L	Leucin	Leu
M	Methionin	Met
N	Asparagin	Asn
P	Prolin	Pro
Q	Glutamin	Gln
R	Arginin	Arg
S	Serin	Ser
T	Threonin	Thr
V	Valin	Val
W	Thryptophan	Trp
Y	Tyrosin	Tyr

Kapitel 1 Einleitung

1.1 Die extrazelluläre Matrix

Im multizellulären Organismus fügen sich autonome Zellen zu verschiedenen Geweben und Organen zusammen. Die hierbei entstehenden Zellzwischenräume werden durch die extrazelluläre Matrix (ECM) ausgefüllt. Diese bildet ein hochorganisiertes, komplexes Netzwerk aus Strukturglykoproteinen, Proteoglykanen und verschiedenen Kollagenen mit besonderen mechanischen Eigenschaften aus und ermöglicht darüber hinaus den Zellen eine gegenseitige Kommunikation (Cawston 1996).

Die Strukturglykoproteine des extrazellulären Raumes, wie z.B. Fibronectin, Elastin und Laminin, zeichnen sich durch Oligosaccharid-Einheiten aus. Diese Kohlenhydrate haben einen entscheidenden Einfluss auf die Struktur dieser Proteine. Die Glykoproteine verknüpfen verschiedener ECM-Komponenten und ermöglichen dadurch eine gegenseitige Kommunikation. Besonders wichtig sind hierbei die adhäsiven Glykoproteine, die gleichzeitig mehrere Fragmente binden können (Ehrig et al. 1990; Bornstein et al. 1991).

Die Proteoglykane, wie Decorin, Perlecan und Aggrecan, sind große Komplexe aus Kohlenhydraten und Proteinen, bei denen der Oligosaccharid-Anteil ca. 95% beträgt. Sie besitzen eine flaschenbürstenartige Struktur, die auf die Anheftung der Kohlenhydrate an ein Hyaluronatfilament zurückgeht. Da viele Kohlenhydrate acylierte Amino-Gruppen enthalten, werden sie auch als Glykosaminglykane bezeichnet. Aufgrund ihrer Polarität und der hohen negativen Ladungsdichte binden die Proteoglykane interstitielle Flüssigkeit und osmotisch aktive Kationen, wodurch sie hydratisierte Gele ausbilden, die für die Druckfestigkeit des entsprechenden Gewebes verantwortlich sind (Ruoslahti 1989). Dieser gelartige Aufbau der extrazellulären Matrix ermöglicht den Transport wasserlöslicher Moleküle und die Wanderung von Zellen.

Die Kollagene sind extrazelluläre Strukturproteine mit einer eigenen charakteristischen Struktur. Die Tertiärstruktur wird aus drei linksdrehenden α -Helices aufgebaut, die sich zu einer rechtsdrehenden Tripel-Helix zusammenlagern. Die Primärstruktur beinhaltet jeweils das wiederkehrende $[\text{Gly-X-Y}]_n$ -Sequenz-Motiv. Während die Y Position meistens von Hydroxy-Prolin oder Hydroxy-Lysin eingenommen wird, findet man in der Position X, aber auch manchmal in Y, häufig ein Prolin. Die modifizierten Aminosäuren dienen der

Quervernetzung und damit der Strukturstabilität. Die Kollagene bilden unlösliche Aggregate und übernehmen so die Stabilität des Gewebes (Brown & Timpl 1995; Cawston 1996).

Bis vor wenigen Jahren galt die Struktur der extrazellulären Matrix als stabil und inert und es wurde angenommen, sie erfülle nur die Stützfunktion des Gewebes. Heute weiß man, dass es sich bei der ECM um ein dynamisches System handelt, welches einem ständigen Auf- und Abbau einzelner Matrixkomponenten unterliegt. Durch diese Veränderungen sind physiologische Prozesse wie Wachstum, Wundheilung und Angiogenese, aber auch pathologische Befunde wie rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose und Tumormetastasierung gekennzeichnet. Während sich im gesunden Organismus Matrixaufbau und -abbau die Waage halten, liegt bei den pathologischen Erkrankungen ein Ungleichgewicht vor (Kreis & Vale 1994, Docherty et al. 1992).

Für dieses fein regulierte System aus Katabolismus und Anabolismus sind die Matrix degradierenden Proteinase und ihre natürlichen Inhibitoren von entscheidender Bedeutung. Je nach Art ihrer katalytischen Zentren lassen sich diese Proteinase in fünf Gruppen unterteilen: Die Serinproteasen, die Cysteinproteasen, die Aspartatproteasen, die Threoninproteasen und die Metalloproteasen. Eine wichtige Unterklasse der Metalloproteasen sind die Matrix Metalloproteasen (MMPs) oder auch Matrixine (Matrisian 1990, Birkedal-Hansen et al. 1993). Diese zeigen bevorzugt eine Aktivität gegenüber Bestandteilen der ECM und übernehmen somit eine Hauptfunktion bei deren Umbau.

1.2 Matrix Metalloproteinasen

Extrazelluläre Proteinasen spielen eine entscheidende Rolle in zahlreichen entwicklungs- und krankheitsrelevanten Prozessen. Die Degradierung extrazellulärer Proteine ist dabei für die individuelle Zelle ein wichtiger Faktor in Bezug auf die Kommunikation mit ihrer Umgebung und eine normale Entwicklung und Funktion. Seit Gross und Lapiere 1962 beobachteten, dass diffusionsfähige Enzyme aus Kaulquappenschwänzen Gele aus nativem tripelhelikalem Kollagen zerstören konnten, wurden verschiedene Mitglieder einer Enzymfamilie entdeckt, die aufgrund ihrer Fähigkeit zum Abbau extrazellulärer Proteine und zur Unterscheidung von anderen verwandten Metalloproteasen, Matrix Metalloproteinasen genannt wurden (Stöcker et al. 1995).

Die Matrix Metalloproteinasen (MMPs) bilden eine Enzymfamilie von strukturverwandten, zinkabhängigen Endopeptidasen, die in Kombination fast alle Proteine der ECM degradieren können. Somit kommt ihnen eine entscheidende Rolle in physiologischen und pathologischen Prozessen zu. Bisher konnten 22 humane MMPs charakterisiert werden (Tabelle 1).

Klasse	Name der Enzyme
Kollagenasen	Interstitielle Kollagenase (MMP-1) Neutrophile Kollagenase (MMP-8) Kollagenase-3 (MMP-13)
Stromelysine	Stromelysin-1 (MMP-3) Stromelysin-2 (MMP-10) Stromelysin-3 (MMP-11) Matrilysin (MMP-7) Makrophagen Elastase (MMP-12)
Gelatinasen	Gelatinase A (MMP-2) Gelatinase B (MMP-9)
Membranständige MMPs	MT1-MMP (MMP-14) MT2-MMP (MMP-15) MT3-MMP (MMP-16) MT4-MMP (MMP-17) MT5-MMP (MMP-24) MT6-MMP (MMP-25)
Andere MMPs	RASI-1 (MMP-19) Enamelysin (MMP-20) MMP-23 Endometase (MMP-26) MMP-27 Epilysin (MMP-28)

Tabelle 1: Die Familie der humanen Matrix Metalloproteinasen (Sternlicht & Werb 2001)

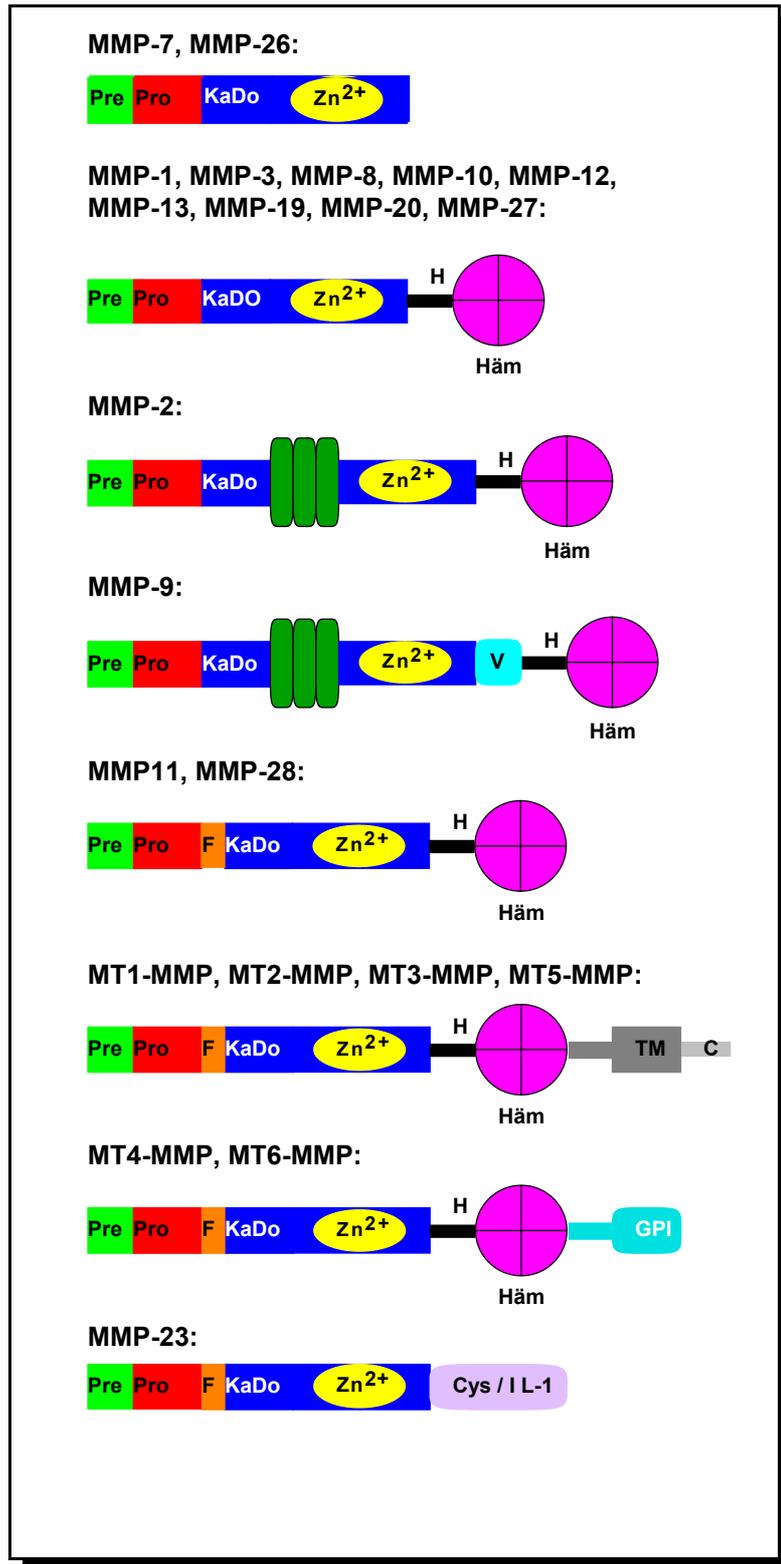


Abbildung 1: Domänenstruktur der humanen Matrix Metalloproteinasen (Pre, Signalpeptid; Pro, Propeptid; F, Furin-Spaltstelle; Fib, Fibronektin-ähnliche Domäne; V, Typ V Kollagen-Domäne; H, "hinge"-Region; Häm, Hämapexin-ähnliche Domäne; TM, Transmembran-Domäne; C, Cytoplasmatischer Teil; GPI, Glykophosphatidylinositol-Anker; Cys / IL-1, Cystein-/Prolin-reiche und Interleukin-1 Rezeptor-ähnliche Domäne) (modifiziert nach Sternlicht & Werb 2001).

Basierend auf ihrer Struktur und Substratspezifität werden die Matrix Metalloproteinasen in fünf Klassen eingeteilt: Kollagenasen, Stromelysine, Gelatinasen, membranständige MMPs und andere MMPs.

Obwohl die in diesen Klassen auftretenden Struktur motive hoch konserviert sind, bewirken mehrere signifikante Unterschiede eine große Funktions- und Substratvielfalt (Abbildung 1). Alle MMPs haben ein Signalpeptid (oder Pre-Domäne), das zur Ausschleusung aus der Zelle in den extrazellulären Raum dient.

Die Pro-Domäne besteht aus 80 bis 90 Aminosäuren und enthält eine konservierte PRCGXPD-Sequenz. Die Wechselwirkung des Cystein-Restes mit dem katalytischen Zink-Atom führt zur Latenz des Enzyms (Abbildung 2). Bei der Abspaltung der Pro-Domäne wird diese Komplexierung - auch als "cysteine-switch"-Mechanismus bezeichnet - aufgehoben und das Enzym aktiviert (Springmann et al. 1990).

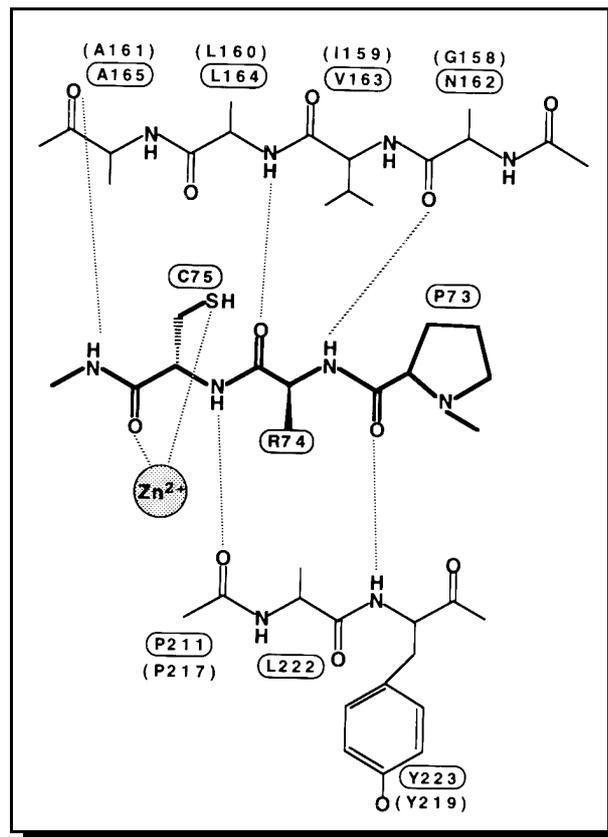


Abbildung 2: Interaktion der Pro-Domäne der MMP-3 mit der "active site". Die in Klammern angegebenen Aminosäuren beziehen sich auf die entsprechenden Reste in der MMP-8 (Abbildung nach Becker et al. 1995).

Die katalytische Domäne enthält das konservierte HExGHxxGxxHS-Motiv. Abbildung 3 zeigt, wie die drei Histidin-Reste das Zn(II)-Ion in der “active site” koordinieren (Bode et al. 1994). Von dem Glutamat-Rest wird angenommen, dass er das für die Katalyse essentielle Wassermolekül im aktiven Zentrum komplexiert (Spurlino et al. 1994).

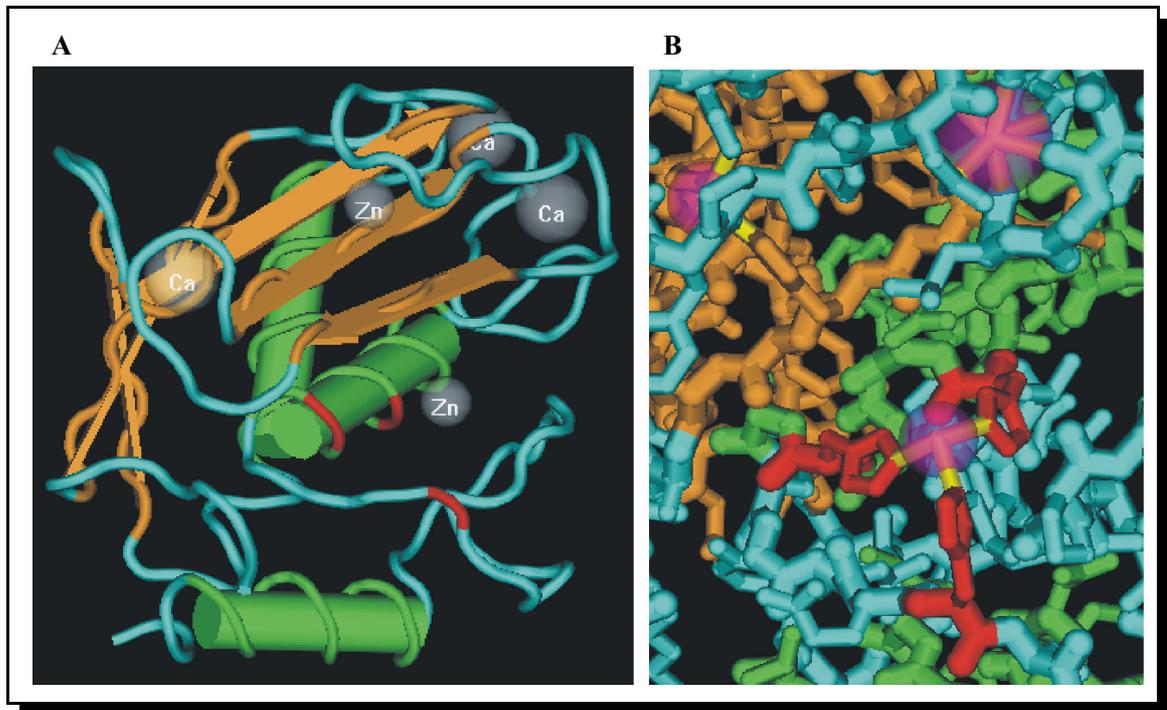


Abbildung 3: Kristallstruktur der katalytischen Domäne der Gelatinase A ohne Fibronectin-ähnliche Domäne. A) Ribbon-Struktur: In grün die α -Helices und in beige die β -Faltblätter, in rot markiert die Positionen der drei Zink-koordinierenden Histidine. B) Detaildarstellung mit Protein-Seitenketten: In rot die Seitenketten der Histidine (nach Dhanaraj et al. 1999).

Die Gelatinasen sind durch eine zusätzliche Fibronectin-ähnliche Domäne gekennzeichnet. Sie besteht aus drei Abschnitten, die zum Typ II Modul des Fibronectins homolog sind. Diese Domäne beeinflusst die Aktivität gegenüber Gelatin und Typ IV Kollagen (Strongin et al. 1993, Murphy et al. 1994).

Mit Ausnahme von Matrilysin, Endometase und der MMP-23 besitzen alle Matrix Metalloproteinasen eine Hämapexin-ähnliche Domäne. Diese zeigt Sequenz-Homologien zu dem Serum-Protein Hämapexin und dem Glykoprotein Vitronectin. Die Hämapexin-ähnliche Domäne beeinflusst die Substratbindung, wie z.B. von Kollagenen, und bestimmt somit die Substratspezifität. Bei den Gelatinasen ermöglicht sie die Interaktion der latenten Enzyme mit den “tissue inhibitors of metalloproteinases” (TIMPs), den natürlichen MMP-Inhibitoren.

Die MMP-23 verfügt anstelle der Hämapexin-ähnlichen Domäne über eine Cystein/Prolin-reiche und Interleukin-1 Rezeptor-ähnliche Domäne (Velasco et al. 1999).

Die "hinge"-Region stellt ein Verbindungsglied zwischen der katalytischen Domäne und den C-terminalen Domänen dar, das als flexibles "Scharnier" postuliert wird. Dieser Region wird durch einen "sandwich"-Mechanismus eine essentielle Bedeutung bei der Substrathydrolyse nachgesagt. Die Bindung von ECM-Molekülen an die Hämapexin-ähnliche Domäne führt demnach zur Konformationsänderung in der "hinge"-Region, die das Substrat in das aktive Zentrum der katalytischen Domäne bewegt, so dass das Enzym das Zielmolekül "sandwich"-artig umschließt. (Tschesche 1995, Gomis-Rüth et al. 1996). Die Gelatinase B enthält in der "hinge"-Region noch eine 54 Aminosäuren große Insertion, die eine Sequenz-Homologie zum α_2 -Strang des Typ V Kollagens aufweist. Über die Funktion dieser Domäne konnten allerdings noch keine Erkenntnisse gewonnen werden.

Die membranständigen MMPs besitzen für die Verankerung in der Zellmembran eine C-terminale Transmembran-Domäne und einen kurzen cytoplasmatischen Teil (MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP und MT5-MMP) oder eine hydrophobe Region, die als Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) dient (MT4-MMP und MT6-MMP) (Itoh et al. 1999, Kojima et al. 2000).

1.2.1 Regulation der Matrix Metalloproteinasen

Viele physiologische und pathologische Prozesse werden von einer Umstrukturierung der extrazellulären Matrix begleitet. Die hierfür mitverantwortlichen Matrix Metalloproteinasen unterliegen einer strengen Aktivitätskontrolle, sowohl auf genetischer als auch auf proteinchemischer Ebene (Abbildung 4). Die Transkription und Expression von MMP-Genen wird durch eine Reihe von stimulierenden oder hemmenden Faktoren kontrolliert und die in latenter Form sezernierten Enzyme müssen extrazellulär aktiviert werden. Schließlich werden die aktiven MMPs durch ihre natürlichen Inhibitoren gehemmt, so dass ihre Aktivität zeitlich und örtlich begrenzt wird.

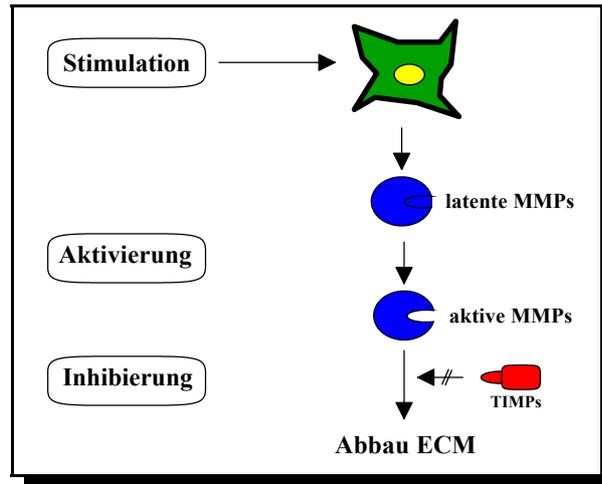


Abbildung 4: Regulation der Matrix Metalloproteinasen

1.2.1.1 Regulation der Genexpression

Mit Ausnahme der Gelatinase A, die konstitutiv exprimiert und durch einen besonderen Aktivierungsmechanismus kontrolliert wird, werden alle MMPs auf der Ebene der Transkription reguliert. Neben der "TATA-Box" enthalten MMP-Gene induzierbare Promotor-Sequenzen. So bewirken u.a. Cytokine und Wachstumsfaktoren die Bindung des Transkriptionsfaktors AP-1 ("activator protein-1"), einem Dimer aus Jun und Fos Proteinen, an den entsprechenden Promotor TRE ("12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat responsive element"), was zu einer Aktivierung der Transkription führt.

Neben dem TRE-Element unterstützt das PEA-3-Element ("polynoma enhancer activator"), welches Transkriptionsfaktoren der Ets-Klasse bindet, die MMP-Expression. Weiterhin sind Promotorsequenzen wie z.B. Bindungsstellen für SP-1 und $\text{NF-}\kappa\text{B}$ bekannt. Über die TRE-Sequenz kann die MMP-Produktion auch negativ gehemmt werden. Steroide stimulieren z.B. Faktoren, die auf den AP-1-Transkriptionskomplex einwirken und diesen so hemmen. Zusätzlich enthalten MMP-Gene inhibitorische Elemente wie die TIE-Sequenz.

1.2.1.2 Aktivierung latenter MMPs

Die meisten Matrix Metalloproteinasen werden als inaktive Vorstufen (Zymogene) von den Zellen sezerniert und später proteolytisch aktiviert. Anders verhält es sich bei den

MT-MMPs, Stromelysin-3, MMP-23 und Epilysin, die am Ende der Pro-Domäne eine RX(K/R)R-Sequenz enthalten. Diese Enzyme können bei der Ausschleusung aus dem Golgi-Apparat durch Furin-ähnliche Proteinasen aktiviert werden (Pei & Weiss 1995, Sato et al. 1996).

Die Latenz der proMMPs wird durch den freien Cystein-Rest der Pro-Domäne hervorgerufen, welcher die vierte Koordinationsstelle für das katalytische Zn(II)-Ion bildet. Bei der Aktivierung der MMPs muss diese Cystein-Zink-Interaktion aufgebrochen werden. Van Wart postulierte für diese extrazelluläre Aktivierung den "cysteine-switch"-Mechanismus (Van Wart & Birkedal-Hansen 1990). Bei einer *in vitro* Aktivierung durch Quecksilberverbindungen und andere thiolmodifizierende Reagenzien reagieren diese mit dem teilweise dissoziierten Cysteinrest. Dieses verhindert eine Reassoziierung des Cysteins mit dem Zink-Ion und ein für die Katalyse essentielles Wassermolekül kann an das Zink koordinieren. Es kommt zur Abspaltung eines Pro-Domänen-Fragments und die Pro-Domäne wird durch das bereits aktive Intermediat oder schon aktive MMPs vollständig entfernt (Abbildung 5).

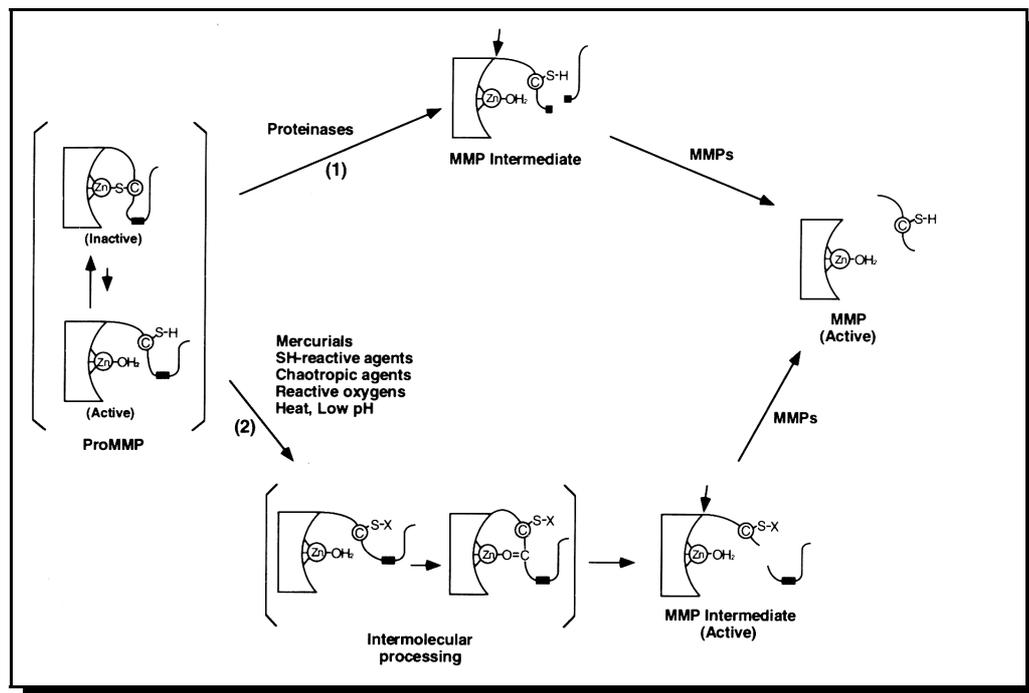


Abbildung 5: Schrittweise Aktivierung der proMMPs. 1) Aktivierung durch Proteinasen: Eine "Aktivator-Proteinase" spaltet einen Teil der Pro-Domäne ab. Hierdurch wird die Cystein-Zink-Bindung aufgehoben und es kommt zur vollständigen Abspaltung der Pro-Domäne. 2) Nicht-Proteolytische Aktivierung: Das teilweise dissoziierte Cystein reagiert mit thiolmodifizierenden Reagenzien oder die proMMP-Struktur wird durch denaturierende Einflüsse, wie z.B. Hitze oder niedrige pH-Werte, zerstört. Dieses resultiert in einer teilweisen Abspaltung der Pro-Domäne, in deren Anschluss die komplette Domäne durch bereits aktive MMPs oder ein Intermediat entfernt wird (Abbildung nach Nagase 1997).

In vivo spalten Serinproteinasen, wie z.B. Trypsin oder Plasmin, aber auch aktive MMPs einen N-terminalen Teil der Pro-Domäne ab, was zu einer Destabilisierung der Cystein-Zink-Interaktion führt. Ein Wassermolekül kann somit das Zink-Ion koordinieren und es kommt zu einer vollständigen autoproteolytischen oder durch aktive MMPs hervorgerufenen Abspaltung der Pro-Domäne.

Die Gelatinase A (MMP-2) besitzt in der Familie der Matrix Metalloproteinasen eine Sonderstellung. Zum einen kann sie aufgrund der fehlenden RX(K/R)R-Sequenz nicht intrazellulär aktiviert werden, zum anderen ist keine Serinprotease bekannt, die die Gelatinase A aktiviert. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die MMP-2 über einen membranständigen ternären Komplex mit einer MT1-MMP und TIMP-2 aktiviert wird (siehe Kapitel 1.3.5).

In Abbildung 6 sind die verschiedenen Aktivierungswege der MMPs noch einmal schematisch zusammengefasst.

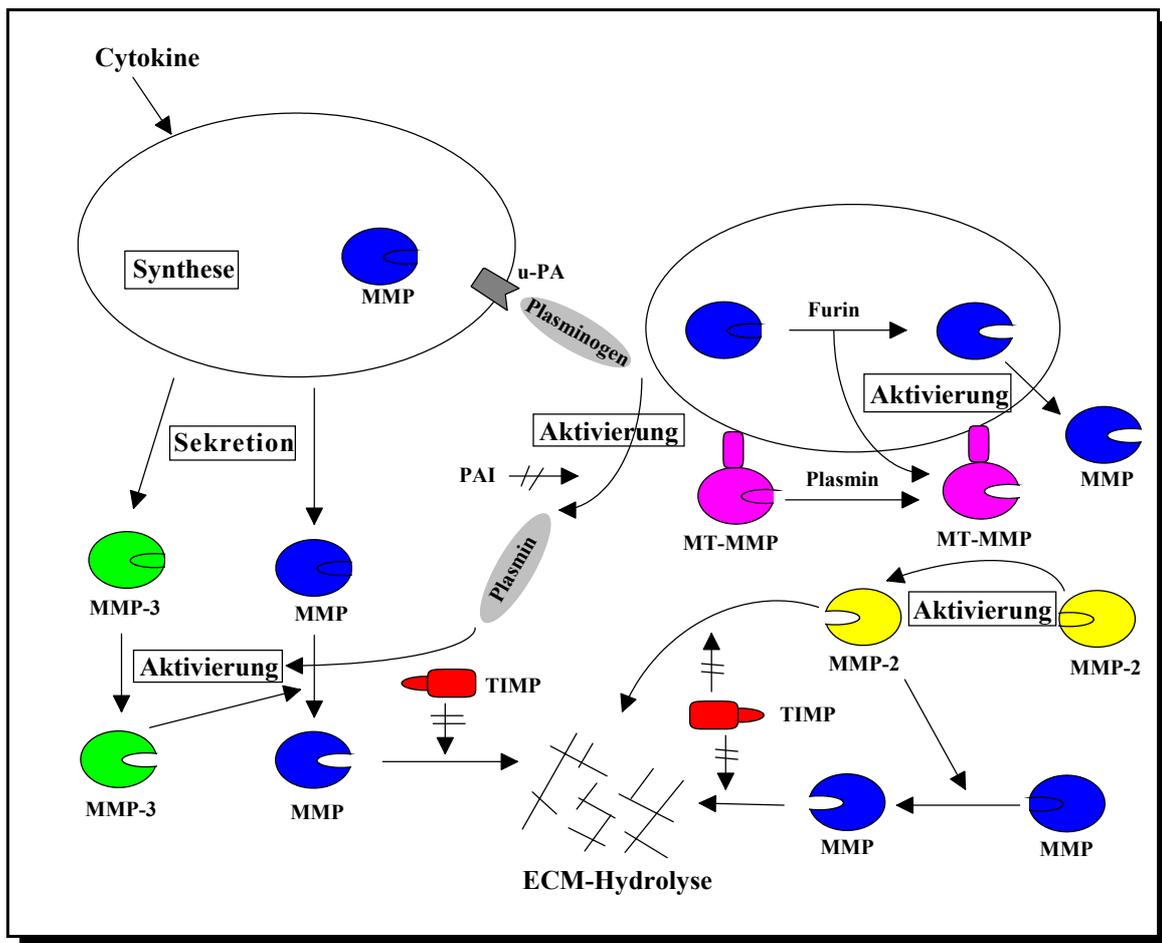


Abbildung 6: Aktivierung der Matrix Metalloproteinasen

1.2.1.3 Inhibierung der Matrix Metalloproteinasen

Neben der Kontrolle der Transkription und der Aktivierung von MMPs ist die Inhibierung von aktiven Enzymen von besonderer Bedeutung. Während ein Gleichgewicht zwischen Aktivität und Inhibierung bei physiologischen Prozessen von großem Interesse ist, führt eine ungehemmte Aktivität zu den bereits angesprochenen pathologischen Erkrankungen.

Die natürlichen Inhibitoren der Matrix Metalloproteinasen sind die "tissue inhibitors of metalloproteinases" (TIMPs). Sie inhibieren die MMPs in einer 1:1 Stöchiometrie. Der erste TIMP wurde 1975 identifiziert und bis heute konnten insgesamt vier Mitglieder dieser Familie charakterisiert werden (Tabelle 2). Sie bestehen aus 184 bis 195 Aminosäuren und weisen eine AS-Homologie von 40-50% auf. Strukturebendes Merkmal sind zwölf hochkonservierte Cysteine, die durch Disulfidbrückenbildung zur Ausbildung einer sechs Schleifen-, zwei Domänen-Struktur führen. Während die drei N-terminalen "loops" die inhibitorische Domäne bilden, kommt es über die C-terminalen "loops" zu zusätzlichen Wechselwirkungen mit den MMPs. Nur TIMP-1 und TIMP-3 besitzen mögliche Glykosylierungsstellen (Asn-X-Ser/Thr) und TIMP-3 ist der einzige TIMP, der über Glykosaminoglykan-Sulfate an Komponenten der extrazellulären Matrix bindet.

	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3	TIMP-4
Zahl der Aminosäuren	184	194	188	195
Molmasse	20,7 kDa	21,8 kDa	21,7 kDa	22,4 kDa
Glykosylierung	+ 8-9 kDa	-	+ 0-7 kDa	-
Komplexbildung mit proGelatinasen	proGelatinase B	proGelatinase A	proGelatinase A proGelatinase B	proGelatinase A
Löslichkeit	+	+	Bindet an ECM	+

Tabelle 2: Übersichtstabelle TIMPs

1997 konnten Gomis-Rüth *et al.* die Kristallstruktur des MMP-3/TIMP-1-Komplexes aufklären. Die schematische Darstellung (Abbildung 7) belegt, dass die N-terminale Domäne mit den ersten fünf Aminosäuren (Cys¹-Thr-Cys-Val-Pro) sowie die Aminosäuren Ser⁶⁸ und Val⁶⁹ im aktiven Zentrum der MMPs binden und diese so inaktivieren (Gomis-Rüth *et al.* 1997).

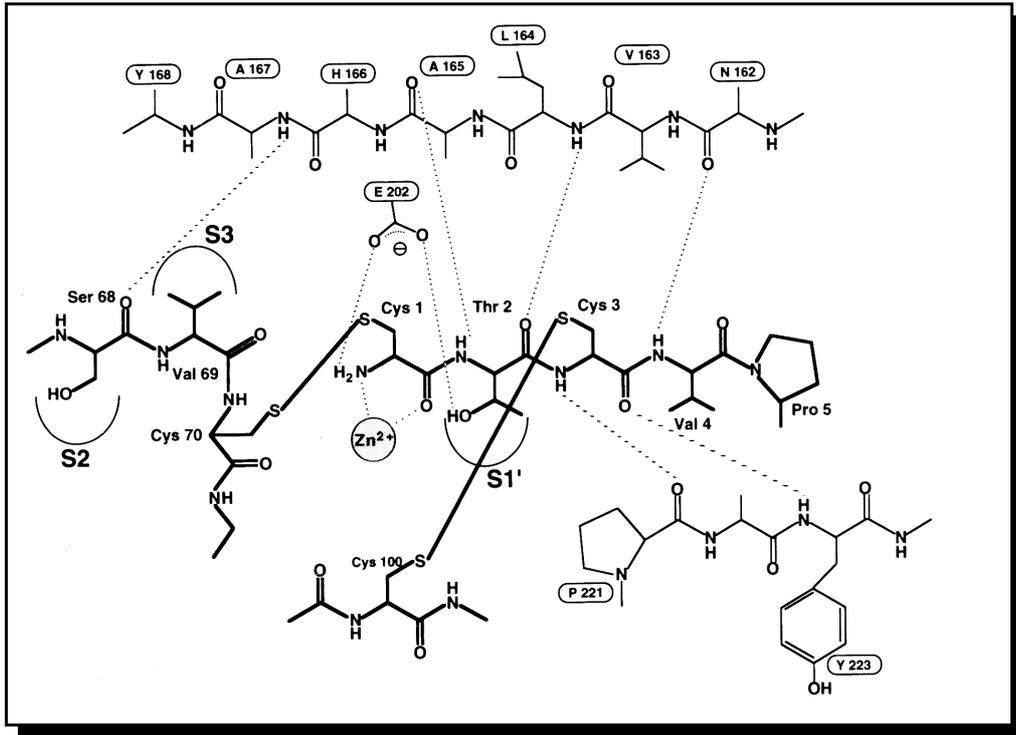


Abbildung 7: Interaktion von TIMP-1 mit dem katalytischen Zentrum der MMP-3 (Gomis-Rüth et al. 1997).

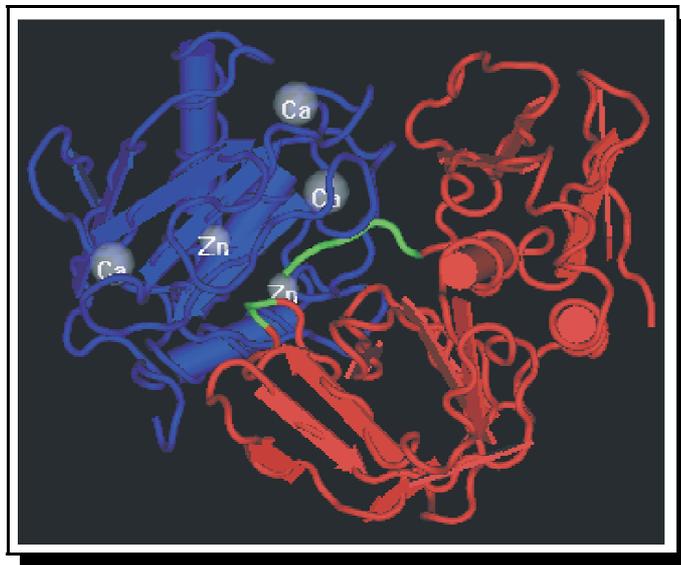


Abbildung 8: Ribbon-Struktur des MMP-3/TIMP-1-Komplexes. In blau die katalytische Domäne der MMP-3 und in rot TIMP-1. Die Aminosäuren Cys¹-Thr-Cys-Val-Pro und Ser⁶⁸ und Val⁶⁹, die mit der “active site” wechselwirken, sind in grün hervorgehoben (Gomis-Rüth et al. 1997).

Neben den natürlichen Inhibitoren wie den TIMPs, aber auch dem α_2 -Macroglobulin, das im Serum mit MMPs einen kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplex bildet, sind synthetische

Inhibitoren von großem Interesse. Diese Inhibitoren können in ein pathologisches MMP-TIMP-Ungleichgewicht eingreifen und bilden somit einen wichtigen Therapieansatz. Bei diesen synthetischen Inhibitoren handelt es sich häufig um substrat-analoge Substanzen, die über Hydroxamate, Carboxylate, Sulfhydryle und Derivate der Phosphorsäure das katalytisch wirksame Zn(II)-Ion komplexieren.

Aufgrund der vorhandenen Kristallstrukturen von MMP-Inhibitor-Komplexen und der Möglichkeit einer computergestützten Strukturanpassung konnten in den letzten Jahren die Inhibitoren in ihrer Spezifität und inhibitorischen Aktivität stark verbessert werden. Hierdurch können die benötigten Inhibitormengen minimiert und die in klinischen Studien beobachteten Nebenwirkungen reduziert werden.

1.2.2 Substrate der Matrix Metalloproteinasen

Eine der wichtigen noch ungelösten Aufgaben im biologischen Verständnis der MMPs ist die Identifizierung ihrer Substrate *in vivo*. Denn auch wenn ein Substrat *in vitro* gespalten wird (Tabelle 3) und dieses Protein während eines biologischen Prozesses degeneriert wird, können andere Faktoren diesen Prozess beeinflussen und regulieren.

MMP	1	2	3	7	8	9	10	11	12	13	14	16	18	19	26
ECM Proteine:															
Aggrecan	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+				
Kollagen I	+	+	-	+	+	-			+	+	+		+	+	-
Kollagen II	+				+	-				+	+				-
Kollagen III	+	+	+	-	+	-	+			+	+	+			
Kollagen IV	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-				+	+
Kollagen V	-	+	+	-	-	+	+			-					
Kollagen VI	-	-	-			-				+					
Kollagen VII	+	+	+												
Kollagen VIII	+														
Kollagen IX	-	-	+							+					
Kollagen X	+	+	+	-						+					
Kollagen XI	+	+	+			+				-					
Kollagen XIV	-		-	-		+				+					
Decorin	-	+	+	+		+									
Elastin	-	+	+	+		+	+		+						-
Entactin / Nidogen	+	+	+	+					+		+				
Fibrillin		+	+			+			+	+	+				
Fibronectin	+	+	+	+	-	-	+		+	+	+	+		+	+
Fibuline		+		+											
Gelatin I	+	+	+	+		+	+		+	+	+			+	+
IGFBPs	+	+	+					+							
Laminin	+	+	+	+		+		-	+		+				-

MMP	1	2	3	7	8	9	10	11	12	13	14	16	18	19	26
Myelin Basis Protein	+	+	+	+		+			+						
Osteonektin		+	+	+		+				+					
Tenascin	+	+	+	+		-								+	
Vitronektin	+	+	+	+		+			+		+				
Andere Proteine:															
α 1-Antichymotrypsin	+	+	+			-									
α 2-Makroglobulin	+	-	+			+		+	+	+	+				
α 1-Proteinaseinhibitor	+	+	+	+		+		+	+		+				+
Casein	+	-	+	+		+	+	-		+				+	-
E-Cadherin			+	+											
Faktor XII					-				+	+	+				
Fibrin	+	+	+			+					+				
Fibrinogen	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+				+
Interleukin 1 α	-	-	-			-									
Interleukin 1 β	+	+	+			+									
proMMP-2											+	+			
proTGF β		+				+									
proTNF α	+	+	+	+		+			+		+				
Plasminogen		+	+	+		+			+						+
Substanz P		+	+		+	+			+						
T Kininogen		-	+			-									

Tabelle 3: Übersichtstabelle MMP-Substrate *in vitro*. Die Symbole zeigen, ob das Substrat gespalten (+) oder nicht gespalten (-) wird (Tabelle nach Sternlicht & Werb 2001, Kocourek 2002).

Zur Bestimmung von *in vivo* Substraten stehen zwei Verfahren zur Auswahl. Zum einen die Bestimmung der Spaltstellen von isolierten Abbauprodukten und zum anderen die Auswirkung von *knockout*-Experimenten auf die Substratspaltung. Bei der ersten Methode werden die *in vivo* Sequenzen mit den *in vitro* gefundenen Spaltstellen verglichen. Da allerdings mehrere MMPs dieselben Bindungen spalten, ist eine eindeutige Zuordnung oft nicht möglich. Außerdem kommt es häufig zu einer Verfälschung der MMP-Spaltstellen, da diese durch Einwirkungen von anderen Matrix-Enzymen verändert werden können. Bei der zweiten Methode wird die Substratspaltung in Abwesenheit bestimmter MMPs beobachtet und so auf die Aktivität dieser Enzyme zurückgeschlossen.

Bis heute konnten erst drei natürliche Substrate der MMPs *in vivo* identifiziert werden:

- ✂ Das interstitielle Kollagen Typ II wird durch die Kollagenase-3 (MMP-13) gespalten (Billinghorst et al. 1997). Aufgrund der gleichen Spaltstellen von vier verschiedenen MMPs konnte erst durch einen spezifischen Inhibitor die entsprechende Matrix Metalloproteinase identifiziert werden.
- ✂ Die Spaltung von Aggrekan durch die Kollagenase-2 (MMP-8) (Fosang et al. 1994). Die *in vivo* Spaltstelle ist hier allerdings nur eine der *in vitro* gefundenen Spaltstellen (Fosang et al. 1993).
- ✂ Das "Link Protein", Bindungsprotein von Aggrekan an Hyaluronsäure, wird durch die Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9), Matrilysin (MMP-7) und Stromelysin-2 (MMP-10) gespalten (Nguyen et al. 1993). Hierbei wurde für die Gelatinase B eine andere Spaltstelle identifiziert (His¹⁶-Leu) als bei den drei anderen MMPs (Leu²⁵-Leu).

1.2.2.1 Katalysemechanismus der MMPs

Basierend auf dem bekannten Katalysemechanismus von Thermolysin und Strukturvergleichen mit den katalytischen Domänen der Matrix Metalloproteinasen postulierten Spurlino *et al.* 1994 und Becker *et al.* 1995 den entsprechenden Mechanismus für die MMPs (Abbildung 9).

Der Glutamat-Rest im aktiven Zentrum unterstützt den nucleophilen Angriff des für die Katalyse essentiellen Wassermoleküls auf die Carbonylgruppe der zu spaltenden Bindung und es kommt zur Ausbildung eines Hemiketals. Im zweiten Schritt wird die Aminogruppe der Spaltstelle protoniert und durch Wasserstoffbrücken mit Carbonylfunktionen benachbarter Alanin- und Asparagin-Reste stabilisiert. Abschließend kommt es zur Oxidation des Hemiketals und damit zur Spaltung der Bindung.

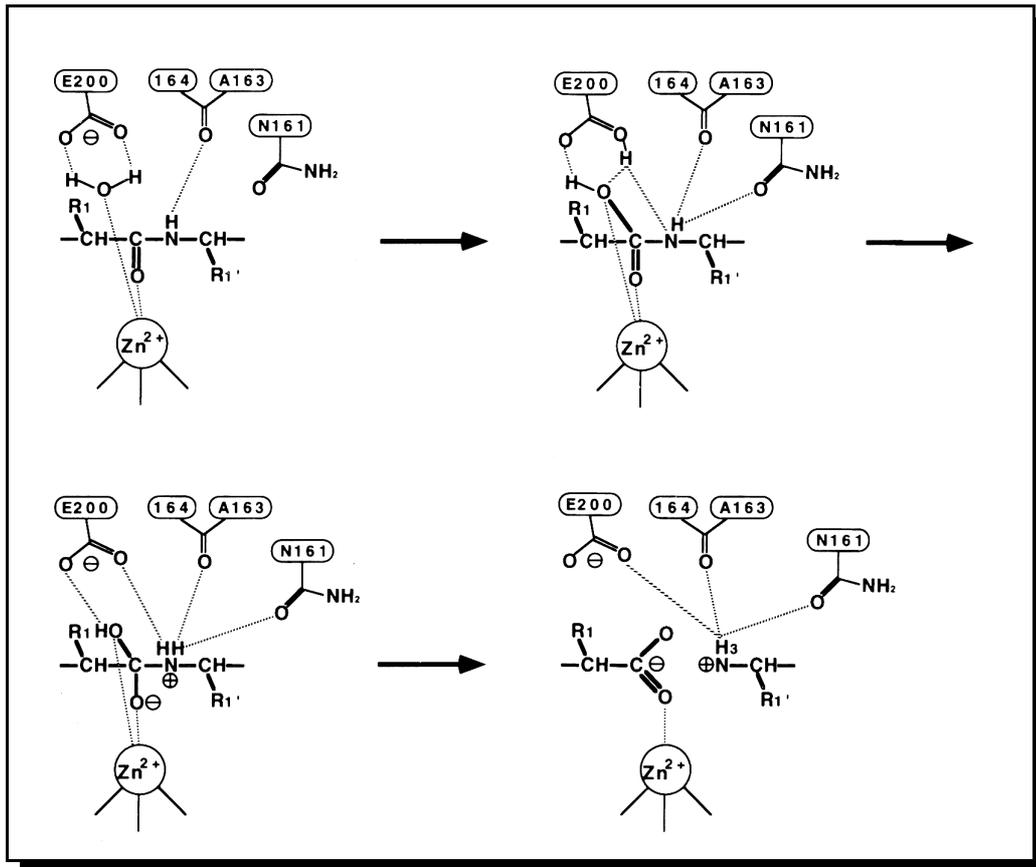


Abbildung 9: Katalysemechanismus der MMPs (nach Spurlino et al. 1994). Die Nummerierung entspricht der MMP-1.

1. Nucleophiler Angriff des Wassermoleküls auf die Carbonylfunktion der Spaltstelle und Ausbildung eines Hemiketals
2. Protonierung und Stabilisierung der Aminogruppe
3. Oxidation des Hemiketals und Spaltung der Bindung

1.2.3 Matrix Metalloproteinasen in biologischen Prozessen

Biologische Prozesse wie Wachstum, Reparatur und Entwicklung sind mit Gewebeveränderungen verbunden. Diese werden durch matrixmodifizierende Enzyme mittels Matrix-Degenerierung und *de novo* Synthese neuer ECM-Komponenten reguliert. Es ist von besonderer Bedeutung, dass die Expression und Aktivierung dieser Enzyme streng kontrolliert wird, so dass die Integrität des Organismus erhalten bleibt. Ein Zusammenbruch dieser Kontrollmechanismen führt zu dramatischen Veränderungen, die zum Ausbruch von Krankheiten führen können.

Die genaue Beteiligung von Matrix Metalloproteinasen an diesen biologischen Prozessen ist schwer zu verifizieren. Die bisherigen Erkenntnisse beruhen auf einer Korrelation von medizinischen Befunden und erhöhter MMP-Expression. Hieraus wurde eine Beteiligung

von MMPs postuliert. Allerdings konnte eine direkte, spezielle Funktion einzelner MMPs, z.B. durch Einsatz von Inhibitoren, noch nicht nachgewiesen werden. Eine Möglichkeit, bestimmten MMPs eine Beteiligung an speziellen Prozessen zuordnen zu können, ist die Untersuchung von *knockout* Mäusen. Die hieraus gewonnenen Erkenntnisse beschränken sich dann allerdings auf das Fehlen bestimmter MMPs und können somit keine eindeutigen Aussagen über die Funktion einer verstärkten MMP-Expression zulassen.

1.2.3.1 Physiologische Prozesse

Der Umbildung der extrazellulären Matrix als Gleichgewichtsreaktion aus Katabolismus und Anabolismus liegt eine Reihe physiologischer Vorgänge zugrunde. So ist eine lokale Degradierung der Matrix für die Migration und Proliferation von Zellen während des Gewebeumbaus von entscheidender Bedeutung. Es wird z.B. während der weiblichen Menstruation eine Änderung der Expression von Matrilysin, Stromelysin-1 und Kollagenase-1 beobachtet (Rodgers et al. 1993 und 1994), während die basalen Keratinozyten am Rand einer Wunde einen erhöhten mRNA-„level“ von Kollagenasen aufweisen und in den Fibroblasten der Dermis sowie im umliegenden Gewebe vermehrt die mRNA von Stromelysin-1 nachweisbar ist (Saarialho-Kere et al. 1994). Die Synthese von Kollagenasen durch Osteoblasten ist ein wichtiger Schritt im Knochenwachstum (Gack et al. 1995). MT1-MMP und Gelatinase A sind von entscheidender Bedeutung bei der Embryogenese (Ota et al. 1995). Allerdings findet man bei all diesen Prozessen das fein regulierte Gleichgewicht aus Aktivität und Inhibierung.

Gleichgewicht		Ungleichgewicht	
Angiogenese	Organbildung	Aneurysmen	Metastasierung
Brustentwicklung	Ovulation	Arteriosklerose	Multiple Sklerose
Embryogenese	Uterusentwicklung	Chronische Wunden	Osteoarthritis
Knochenwachstum	Wundheilung	Coreale Ulceration	Osteosklerose
Makrophagenfunktion	Zahnung	Fibrosen	Parodontose
Menstruation	Zervixdilatation	Glomerulonephritis	Rheumatoide Arthritis
Neutrophilenfunktion		Krebsinvasion	Skleroderma

Tabelle 4: Übersichtstabelle von physiologischen und pathologischen Prozessen, die auf ein Gleichgewicht bzw. Ungleichgewicht von MMPs und TIMPs zurückzuführen sind (Tabelle erweitert nach Ries & Petrides 1995).

1.2.3.2 Pathologische Prozesse

Im Gegensatz zum Gleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs in den physiologischen Prozessen liegt den pathologischen ein Ungleichgewicht zugrunde. Die Beteiligung von MMPs bei diesen Erkrankungen lässt sich in drei Bereiche einteilen: Gewebeerstörung, fibrotische Erkrankungen und Schwächung der Matrix-Stabilität. Die bedeutendsten Krankheitsbilder umfassen das Tumorgeschehen, die Multiple Sklerose und die rheumatoide Arthritis.

Verschiedene Matrix Metalloproteinasen konnten in großer Menge in tumorumgebenden Stroma-Zellen identifiziert werden. Weiterhin konnte eine signifikante positive Korrelation zwischen der MMP-Expression und verschiedenen Tumormarkern für eine schlechte Prognose und geringe Überlebenswahrscheinlichkeit gefunden werden (Sternlicht & Bergers 2000). Von besonderem Interesse in diesem Zusammenhang sind die Kollagenase-1, Stromelysin-1, die Gelatinasen und die MT1-MMP.

Die rheumatoide Arthritis stellt die häufigste chronisch entzündliche Erkrankung des Bindegewebes dar. Hauptcharakteristikum dieser Krankheit ist eine fortschreitende Zerstörung der Matrix-Strukturen in den Gelenken und der damit einhergehende Funktionsverlust. Als Ursache ist eine erhöhte Aktivität der Kollagenasen und Gelatinasen zu sehen, wobei aber auch beinahe alle anderen MMPs involviert sind (Okada et al. 1990, Cawston et al. 1994).

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems, charakterisiert durch eine Demyelinisierung (Schädigung der Myelinscheide), axonalen Verletzungen und dem Verlust neurologischer Funktionen. In diesem Krankheitsbild kommt den Matrix Metalloproteinasen die Aufgabe der Zerstörung der Basalmembran der Blut-Hirn-Schranke zu. Hierdurch können autoreaktive T-Zellen zum zentralen Nervensystem vordringen und die Myelinscheide beschädigen. In diesem Zusammenhang ist die Gelatinase B von besonderem Interesse (Bar-Or et al. 1999).

1.3 Die Gelatinasen

In der Familie der Matrix Metalloproteinasen nehmen die Gelatinasen eine Sonderstellung ein. Diese Ausnahmestellung beruht nicht nur auf ihrer Fähigkeit, das Typ IV Kollagen der Basalmembran abzubauen und somit einen entscheidenden Beitrag zur Tumormetastasierung zu leisten, sondern lässt sich vielmehr an vier Punkten festmachen:

- ‡ Eine besondere Substratspezifität und Aktivität, die durch die zusätzliche Fibronektin-ähnliche Domäne bestimmt wird.
- ‡ Eine besondere Wechselwirkung mit den TIMPs aufgrund der Möglichkeit einer Interaktion der latenten Enzyme mit ihren Inhibitoren über die Hämapexin-ähnliche Domäne.
- ‡ Eine besondere Variante der Aktivierung der Gelatinase A über einen ternären Komplex, bestehend aus proGelatinase, MT1-MMP und TIMP-2.
- ‡ Bindung der Gelatinasen an Integrine über die Hämapexin-ähnliche Domäne.

In diesem Kapitel soll, neben den allgemeinen Eigenschaften der Gelatinasen, besonders auf diese Punkte und die damit verbundene Sonderstellung eingegangen werden.

1.3.1 Die Gelatinase A

Die vermeintliche Entdeckung der Gelatinase A (MMP-2; EC 3.4.24.24) gelang 1972 Harris und Klein, als sie eine Gelatinaseaktivität in rheumatoidem Synovialgewebe beobachteten (Harris & Klein 1972). Allerdings erkannten sie nicht, dass es sich hierbei um ein noch unbekanntes Enzym handelte. 1978 konnten Sellers *et al.* eine Gelatinaseaktivität im Kulturmedium von Kaninchenknochen nachweisen und zeigen, dass dieses Enzym nicht mit der Kollagenase-1 oder Stromelysin-1 identisch war (Sellers *et al.* 1978). Im folgenden Jahr entdeckten Liotta *et al.* ein ähnliches Enzym, welches in einem Mäusetumor das Typ IV Kollagen der Basalmembran abbaute (Liotta *et al.* 1979). 1988 veröffentlichten Collier *et al.* dann die Sequenz der proGelatinase A (Collier *et al.* 1988).

Das Gen der Gelatinase A ist auf dem Chromosom 16q13 lokalisiert und wird in verschiedenen Zellen, wie z.B. Fibroblasten, Keratinozyten, Endothelzellen, Chondrozyten,

Osteoblasten und Monozyten exprimiert. Das latente Protein hat ein Molekulargewicht von 72.000 und besteht aus 631 Aminosäuren.

Nach der Veröffentlichung der Strukturen von Hämopexin-ähnlicher und katalytischer Domäne (Libson et al. 1995, Gohlke et al. 1996, Dhanaraj et al. 1999), gelang es 1999 Morgunova und Kollegen, die gesamte Struktur der proGelatinase A aufzuklären (Abbildung 10).

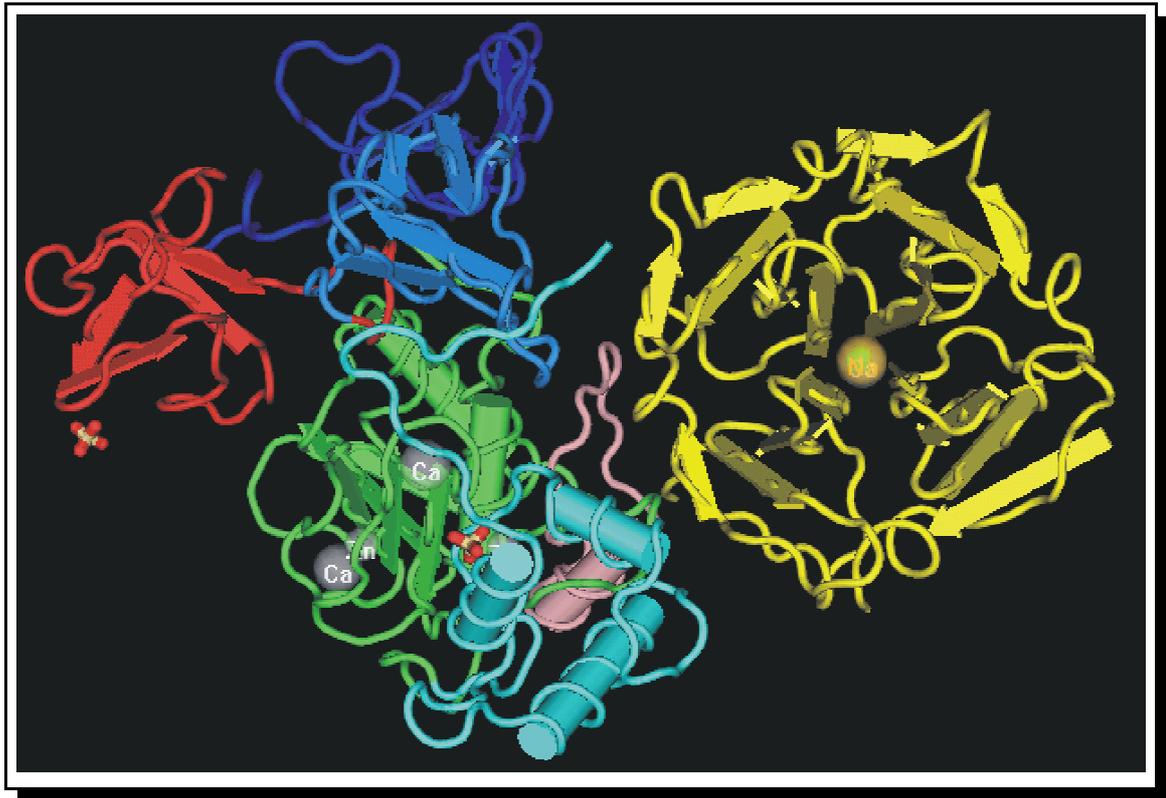


Abbildung 10: Kristallstruktur der proGelatinase A (Morgunova et al. 1999). Die einzelnen Domänen sind in verschiedenen Farben dargestellt: Pro-Domäne (türkis), katalytische Domäne (grün), Fibronectin-ähnliche Domäne (rot und blau), "hinge"-Region (rosa) und Hämopexin-ähnliche Domäne (gelb).

Deutlich ist auch die vierblättrige β -Propeller-Struktur der Hämopexin-ähnlichen Domäne mit dem zentralen Ionenkanal zu erkennen.

1.3.2 Die Gelatinase B

1974 entdeckten Soparta und Danczewicz eine Gelatinaseaktivität in polymorphkernigen Leukozyten (Soparta & Danczewicz 1974). Ein ähnliches Enzym, das Typ V Kollagen spalten konnte, wurde in Kaninchen-Makrophagen gefunden (Mainardi et al. 1980). 1983 konnten Rantala-Ryhänen und Kollegen erstmals die Gelatinase B (MMP-9, EC 3.4.24.35)

aus polymorphkernigen Leukozyten isolieren und charakterisieren (Rantala-Ryhänen et al. 1983). Sechs Jahre später gelang Wilhelm *et al.* die Aufklärung der cDNA-Sequenz (Wilhelm et al. 1989).

Das Gen der Gelatinase B ist auf dem Chromosom 20q12-q13 lokalisiert und wird u.a. in Makrophagen, polymorphkernigen Leukozyten, Keratinozyten, Trophoblasten und Osteoclasten exprimiert. Im Gegensatz zur Gelatinase A wird sie aber nicht konstitutiv synthetisiert, sondern wird Zelltyp-abhängig durch unterschiedliche Stimuli induziert. So wird z.B. die Gelatinase B für eine schnelle Immunantwort in den Granula der Neutrophilen gespeichert, während z.B. Monozyten die MMP-9 *de novo* synthetisieren.

Die latente Form besteht aus 688 Aminosäuren und hat eine Molmasse von 92 kDa. In Neutrophilen findet man drei Formen der Gelatinase B: Ein 92 kDa Monomer, ein Homodimer (ca. 200 kDa) und einen Komplex mit kovalent gebundenem Lipokalin (130 kDa) (Triebel et al. 1992, Tschesche et al. 1992).

Rowell *et al.* konnten 2002 die Struktur eines Komplexes der katalytischen Domäne der MMP-9 mit einem peptidischen reversen Hydroxamatinhibitor aufklären (Abbildung 11). Diese Struktur zeigt eine sehr große Homologie zu den anderen bereits bekannten Strukturen der katalytischen Domänen der Matrix Metalloproteinasen.

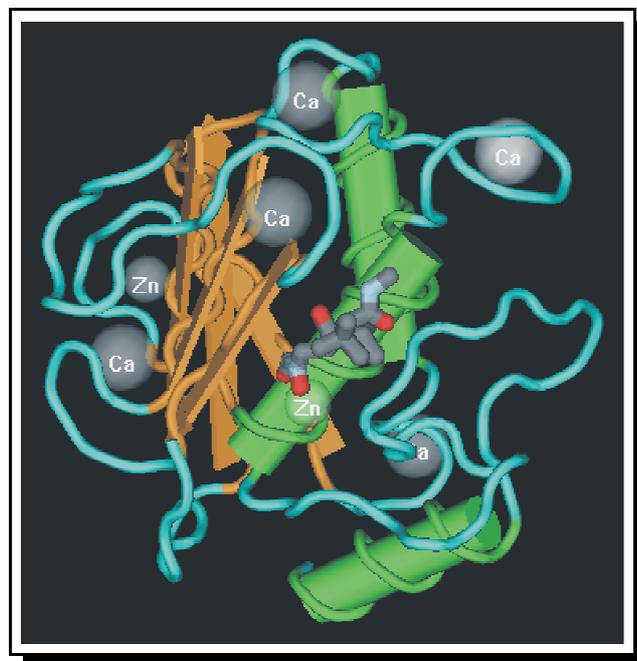


Abbildung 11: Ribbon-Struktur der katalytischen Domäne der MMP-9. In grün sind die α -Helices und in beige die β -Faltblatt-Strukturen dargestellt. In die "active site" eingelagert ist ein peptidischer reverser Hydroxamatinhibitor (nach Rowell et al. 2002).

1.3.3 Einfluss der Fibronectin-ähnlichen Domäne

Die Fibronectin-ähnliche Domäne besteht aus drei Untereinheiten, die jeweils homolog zum Typ II Modul des Fibronectins und in die katalytische Domäne eingelagert sind. Über diese Domäne sind die Gelatinasen in der Lage, denaturiertes Kollagen (Gelatin) zu binden. Eine Deletion der Fibronectin-ähnlichen Domäne führt sowohl zur signifikanten Aufhebung der gelatinolytischen Kapazität als auch zur Unterdrückung der Bindungsfähigkeit von Kollagen. Dieses beeinflusst allerdings nicht die Spaltung von Peptiden oder die Bindung von TIMPs (Murphy et al. 1994). Steffensen *et al.* identifizierten 1995 zwei Bindungsstellen für Gelatin und natives Typ I Kollagen in der Fibronectin-ähnlichen Domäne (Steffensen et al. 1995).

Untersuchungen von Patterson und Kollegen zeigten, dass die Fibronectin-ähnliche Domäne für eine effiziente Spaltung des nativen Typ I Kollagens verantwortlich ist, da eine Deletionsmutante nur noch 38% der Aktivität der Wildtyp-Form der Gelatinase A zeigte. Dieses unterstreicht den Einfluss der Domäne auf die Enzym-Substrat-Bindung und führt zu der Hypothese, dass dieses Modul an der Auffaltung fibrillärer Substrate partizipiert. Weiterhin kam es bei der Deletionsmutante nicht zum weiteren Abbau der klassischen $\frac{3}{4}$ und $\frac{1}{4}$ Fragmente, wie es bei der Wildtyp-Form beobachtet wurde, was den Einfluss auf die Aktivität der Gelatinasen bestätigt (Patterson et al. 2001).

Den Einfluss der Fibronectin-ähnlichen Domäne auf die fibrilläre Substratspezifität untersuchten auch O'Farrell und Pourmotabbed an der Gelatinase B. So war eine Deletionsmutante nicht mehr in der Lage, fibrilläres Typ V und Typ XI Kollagen zu binden und zu spalten. Eine weitere Studie zeigte sogar, dass ein chimäres Enzym bestehend aus der Kollagenase-1 und der Fibronectin-ähnlichen Domäne der Gelatinase B in der Lage war, Typ V Kollagen zu spalten, wo hingegen die Kollagenase-1 kein Typ V Kollagen spaltet (O'Farrell & Pourmotabbed 1998 und 2000).

Einen ganz anderen Einfluss hat die Fibronectin-ähnliche Domäne auf die Aktivierung der proGelatinase A. Zum einen besteht eine Wechselwirkung zwischen der Fibronectin-ähnlichen Domäne und der Pro-Domäne, wie auch Abbildung 10 veranschaulicht, was zu einer weiteren Stabilisierung führt. Zum anderen interagiert sie während der Aktivierung mit dem "MT-loop" der MT1-MMP, was die Aktivierungsrate beeinflusst (English et al. 2001).

1.3.4 Wechselwirkungen der proGelatinasen mit TIMPs

Eine Besonderheit der Gelatinasen beruht auf ihrer Fähigkeit, in latenter Form Komplexe mit den TIMPs auszubilden. Hierbei kommt es zu einer Wechselwirkung der Hämopexin-ähnlichen Domänen der Gelatinasen und den C-terminalen Domänen der TIMPs. Allerdings sind nicht alle Kombinationen von Gelatinase und TIMP möglich. Bis heute sind Komplexe der proGelatinase A mit TIMP-2, -3 und -4 sowie von proGelatinase B mit TIMP-1 und -3 bekannt (Stetler-Stevenson et al. 1989, Overall et al. 1999, Butler et al. 1999, Bigg et al. 1997, Wilhelm et al. 1989). In diesen Komplexen mit 1:1 Stöchiometrie ist die inhibitorische Domäne des TIMPs nicht in die Bindung involviert und frei zugänglich, so dass diese Komplexe als Inhibitoren für aktive MMPs dienen können (Kolkenbrock et al. 1997).

Howard *et al.* konnten den proMMP2/TIMP-2-Komplex isolieren und zeigen, dass die Gegenwart von TIMP-2 eine Autokatalyse unterdrückte, aber keinen Einfluss auf die Gelatinolyse hatte (Howard et al. 1991, Howard und Banda 1991). Es wurde vermutet, dass dem TIMP in diesem Komplex die Aufgabe eines Stabilisierungsfaktors zukommt. Hierfür spricht, dass die 10-fache TIMP-2 Menge benötigt wird, um eine MMP-2 Variante ohne Hämopexin-ähnliche Domäne zu hemmen (Fridman et al. 1992).

Overall *et al.* konnten zeigen, dass sich im Bereich der Hämopexin-ähnlichen Domäne der Gelatinase A zwei Bindungsstellen für TIMP-2 befinden (Overall et al. 1999 und 2000). Ein Lysincluster im Bereich der Module III und IV bildet mit seinem starken Dipolmoment eine "docking site" für das TIMP-2. Aufgrund der starken Dipolwechselwirkung kommt es so schon frühzeitig zu einer korrekten Orientierung der beiden Bindungspartner, bevor die eigentliche Interaktion stattfindet. Die inhibitorische TIMP-Interaktion mit der "active site" der Gelatinase A wird dann durch eine weitere Wechselwirkung mit der Hämopexin-ähnlichen Domäne stabilisiert. Diese "stabilisation site", die bei fast allen MMPs gefunden wird, befindet sich auf der entgegengesetzten Seite der Domäne zwischen den Modulen I (Val⁵⁰⁹-Thr⁵¹¹) und II (Ser⁵⁴⁶-Gly⁵⁵¹).

Morgunova und Kollegen veröffentlichten 2002 die Kristallstruktur des proMMP-2/TIMP-2-Komplexes (Morgunova et al. 2002). Für die Interaktion von Proenzym und Inhibitor sind zwei Bindungsregionen verantwortlich. Zum einen bindet der GH-"loop" des TIMP an das Modul IV der Hämopexin-ähnlichen Domäne der proMMP. Zum anderen interagiert der C-terminale Teil des Inhibitors mit den Modulen III und IV der

Hämopexin-ähnlichen Domäne. Wie Abbildung 12 A veranschaulicht, sind die katalytische Domäne der proMMP-2 und die inhibitorische Domäne des TIMP-2 voneinander abgewandt, so dass eine inhibitorische Interaktion ausgeschlossen wird und beide Bindungspartner voll aktiv bleiben.

Die Stabilität des Komplexes beruht hauptsächlich auf hydrophoben Wechselwirkungen. Hervorzuheben ist hier die Interaktion des Met¹⁴⁹ des TIMP-2 mit dem Phe⁶²¹ der proMMP-2 sowie der Kontakt des Phe¹⁸⁸ des Inhibitors mit einer hydrophoben Tasche an der Oberfläche der Hämopexin-ähnlichen Domäne (Abbildung 12 B und C). Zusätzlich stabilisieren polare und elektrostatische Wechselwirkungen den Komplex. Hierbei kommt den bereits angesprochenen Lysinresten der Hämopexin-ähnlichen Domäne eine große Bedeutung zu.

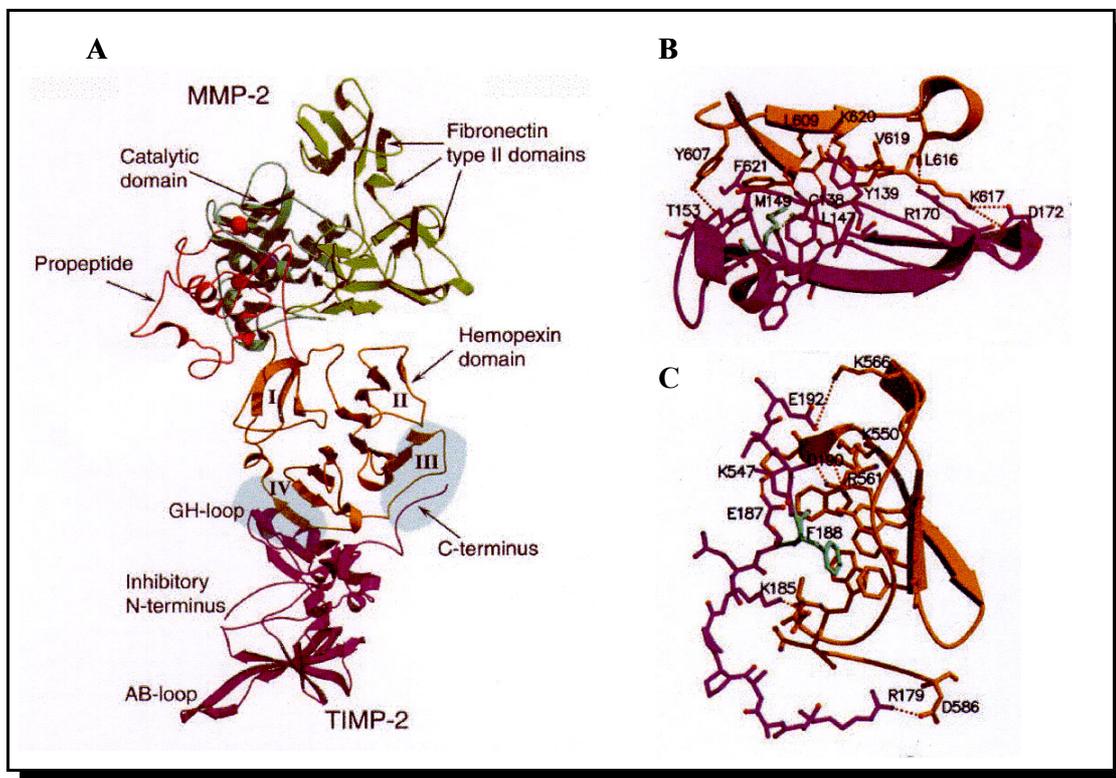


Abbildung 12: Ribbon-Struktur des proMMP-2/TIMP-2-Komplexes (Morgunova et al. 2002). A) Gesamtstruktur: Die Proteinase und der Inhibitor interagieren über die C-terminalen Domänen. Die “active site” der MMP-2 und die inhibitorische Domäne des TIMP-2 sind voneinander abgewandt. Die grauen Bereiche an den Modulen III und IV der Hämopexin-ähnlichen Domäne verdeutlichen die beiden Bereiche der Interaktion. B) Detailansicht der Wechselwirkung des GH-”loops” des TIMP-2 (magenta) mit dem Modul IV der Hämopexin-ähnlichen Domäne (orange). Das Met¹⁴⁹ des TIMP (grün), ein wichtiger Rest in der hydrophoben Interaktion, wechselwirkt mit dem Phe⁶²¹ der proMMP-2. C) Der C-Terminus des TIMP-2 (magenta) bindet an die Module III und IV der Hämopexin-ähnlichen Domäne. Das Phe¹⁸⁸ (grün) liegt in einer hydrophoben Tasche, die durch aromatische Seitenketten an der Oberfläche der Hämopexin-ähnlichen Domäne gebildet wird.

Durch die Entdeckung der MT1-MMP 1994 durch Sato *et al.* erlangte der proMMP-2/TIMP-2-Komplex eine neue Bedeutung. Während der Aktivierung der proGelatinase A auf der Zellmembran bildet sich ein ternärer Komplex aus MT1-MMP, TIMP-2 und proMMP-2, in dem der TIMP über die inhibitorische Domäne mit der "active site" der MT1-MMP und über die C-terminale Domäne mit der Gelatinase interagiert.

Über die Bedeutung der anderen proGelatinase/TIMP-Komplexe ist nicht sehr viel bekannt. Der proMMP-2/TIMP-4-Komplex spielt ebenfalls eine Rolle bei der Aktivierung der proGelatinase A, hat aber nicht die gleiche Funktion wie der entsprechende TIMP-2-Komplex. Für den proMMP-9/TIMP-1-Komplex konnte gezeigt werden, dass er während der proGelatinase-Aktivierung über die inhibitorische Domäne des TIMPs mit Stromelysin-1 zu einem ternären Komplex interagiert (Ogata *et al.* 1995).

1.3.5 Aktivierung der proGelatinase A

Seit der Entdeckung der MT1-MMP 1994 durch Sato *et al.* und der Beobachtung, dass mit der MT1-MMP transfizierte COS-Zellen die proGelatinase A aktivieren können, hat sich die membranständige Aktivierung der proMMP-2 zu einem bedeutenden Forschungsgebiet entwickelt. Bereits 1995 wurde ein Mechanismus für die Aktivierung postuliert, der über einen ternären Komplex aus MT1-MMP, TIMP-2 und proGelatinase A verläuft (Strongin *et al.* 1995). Hierbei bindet die membranständige MT1-MMP an den N-Terminus des TIMP-2, welches dann über die C-terminale Domäne mit der proGelatinase A interagiert (Abbildung 13). Aktiviert wird die proMMP-2 durch eine zweite aktive MT1-MMP, was zu einem 68 kDa Intermediat führt (Spaltung der Bindung Asn³⁷-Leu). Die vollständige Aktivierung erfolgt durch eine autokatalytische intermolekulare (*in trans*) Spaltung der Bindung Asn⁸⁰-Tyr⁸¹ (Abbildung 14) (Will *et al.* 1996, Sato *et al.* 1996 und Atkinson *et al.* 1995). Weitere Forschungsergebnisse zeigten aber, dass die membranständige Aktivierung nicht auf dieses Modell beschränkt ist. Vielmehr sind weitere Faktoren, wie z.B. andere MT-MMPs, TIMP-4 und $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, ebenfalls von Bedeutung. Ebenso wurden verschiedene spezielle Einflüsse, wie die des "MT-loops" und die der Pro-Domäne, der MT1-MMP untersucht.



Abbildung 13: Ribbon-Struktur eines hypothetischen Modells des ternären Komplexes von proMMP-2, TIMP-2 und katalytischer Domäne der MT1-MMP (Morgunova et al. 2002). Diesem Modell liegen die Strukturen des proMMP-2/TIMP-2-Komplexes und des MT1-MMP/TIMP-2-Komplexes zugrunde. Anfärbung für die proMMP-2: Propeptid pink, katalytische Domäne blau, Fibronectin-ähnliche Domäne grün und Hämopexin-ähnliche Domäne orange. Anfärbung für TIMP-2: N-terminale Domäne rotbraun und C-terminale Domäne magenta. Die katalytische Domäne der MT1-MMP ist in hellblau dargestellt.

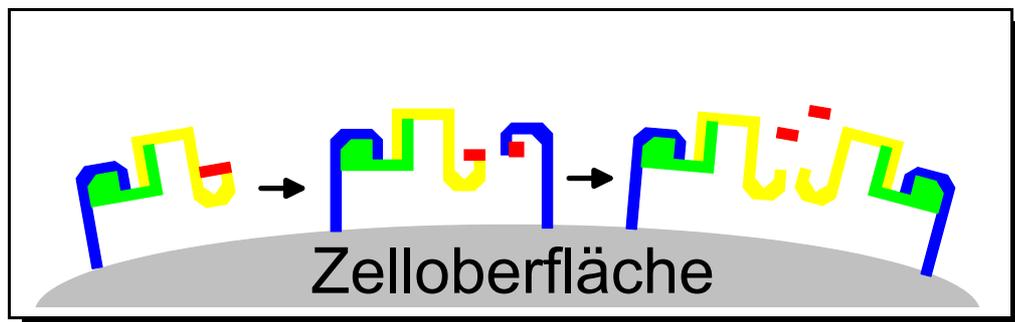


Abbildung 14: Aktivierungsmechanismus der proGelatinase A über den ternären Komplex aus MT1-MMP (blau), TIMP-2 (grün) und proMMP-2 (gelb-rot). Schritt 1: Spaltung zum 68 kDa Intermediat durch zweite aktive MT1-MMP (Spaltung der Bindung Asn³⁷-Leu); Schritt 2: Autokatalytische Spaltung *in trans* zur vollaktivierten 62 kDa Form (Spaltung der Bindung Asn⁸⁰-Tyr)

Neben der MT1-MMP konnte eine Aktivierung der proGelatinase A auch durch andere MT-MMPs gezeigt werden. So konnte die proMMP-2 *in vitro* durch die katalytischen Domänen der MT2-, MT4- und MT5-MMP (Wang et al. 1999, Butler et al. 1997, Kolkenbrock et al. 1997 und Llano et al. 1999) sowie die in Säugetierzellen exprimierten full-length Enzyme MT2-, MT3-, MT5- und MT6-MMP (Morrison et al. 2001, Kang et al. 2000, Pei 1999 und Velasco et al. 2000) aktiviert werden. Morrison *et al.* konnten für die MT2-MMP *in vivo* zeigen, dass diese die proGelatinase A über einen TIMP-2

unabhängigen Weg aktiviert. Diese Aktivierung verläuft wesentlich schneller als bei dem MT1-Mechanismus und kann durch TIMP-2 und TIMP-4 gehemmt werden. Bemerkenswert ist allerdings die Tatsache, dass dieser membranständige Mechanismus abhängig von der Hämapexin-ähnlichen Domäne der proMMP-2 ist, da eine C-terminal verkürzte proMMP-2-Variante nicht aktiviert wird und ein Überschuss an isolierter Hämapexin-ähnlicher Domäne zu einer Blockierung der vollständigen Aktivierung und einer Akkumulation des 68 kDa Intermediats führt (Morrisson et al. 2001). Eine mögliche Erklärung liegt in der RGD-Sequenz der Hämapexin-ähnlichen Domäne der MT2-MMP. Über diese Sequenz könnte eine Bindung der MT2-MMP an Integrine erfolgen, die dann wiederum an die proMMP-2 binden, so wie z.B. das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin an die Hämapexin-ähnliche Domäne der Gelatinase A bindet.

Obwohl TIMP-4 sowohl an die Hämapexin-ähnliche Domäne der Gelatinase A bindet als auch die MT1-MMP inhibiert, hat es nicht die gleiche Bedeutung für die Aktivierung der proGelatinase A wie TIMP-2. Im Gegensatz zu TIMP-2 fördert TIMP-4 nicht die Aktivierung der proMMP-2, inhibiert allerdings die autokatalytische Degradation der MT1-MMP und sorgt somit für eine Akkumulation der MT1-MMP an der Zelloberfläche (Toth et al. 2000). Dieser Effekt kann aber nicht synergistisch genutzt werden, vielmehr reduziert TIMP-4 bei einer Co-Expression mit TIMP-2 die Rate der proMMP-2 Aktivierung (Hernandez-Barrantes et al. 2001).

Ein wichtiger Schritt bei der Aktivierung der proGelatinase A ist die autokatalytische *in trans* Aktivierung zur 62 kDa Form. Deryugina *et al.* untersuchten den Einfluss von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin auf diesen Aktivierungsschritt. Es stellte sich heraus, dass es in Zellen, in denen MT1-MMP und $\alpha_v\beta_3$ -Integrin co-lokalisiert sind, zu einer Kooperation dieser beiden kommt. Hierbei bindet das durch den ternären Komplex und eine aktive MT1-MMP gebildete 68 kDa Intermediat der Gelatinase A an das Integrin und wird dort *in trans* autokatalytisch gespalten. Die 62 kDa Form wird anschließend in das extrazelluläre Gewebe sezerniert. Begünstigt wird dieser Prozess durch die Tatsache, dass das 68 kDa Intermediat im Vergleich zur proMMP-2 und 62 kDa Form besonders gut an das Integrin bindet und im Gegenzug die 62 kDa Form besonders leicht abgegeben wird. Inhibiert wird dieser Prozess durch Vitronectin, einen potentiellen $\alpha_v\beta_3$ -Liganden, der die Bindung des Intermediats an das Integrin und damit die autokatalytische Aktivierung blockiert (Deryugina et al. 2001). Eine Besonderheit der Typ I transmembranständigen MMPs ist eine Insertion von acht Aminosäuren (P¹⁶³YAYIREG¹⁷⁰ bei der MT1-MMP) in der katalytischen Domäne. Dieser

sogenannte “MT-loop” hat zwar keinen Einfluss auf die Aktivität z.B. der MT1-MMP oder deren Inhibierung durch TIMP-2, beeinflusst aber die Kinetik der Aktivierung der proGelatinase A. So benötigt eine entsprechende Deletionsmutante wesentlich länger, um die proMMP-2 zu aktivieren und die Gesamtmenge aktiver MMP-2 liegt nur bei ca. 50% im Vergleich zur Wildtyp-Form. Der “MT-loop” beeinflusst hier die Aktivierungsrate durch eine Interaktion mit der Fibronectin-ähnlichen Domäne der Gelatinase A und über die Assoziationsrate von TIMP-2, indem er die Bindungstasche für den AB-Loop von TIMP-2 mit ausbildet (Abbildung 15) (English et al. 2001).

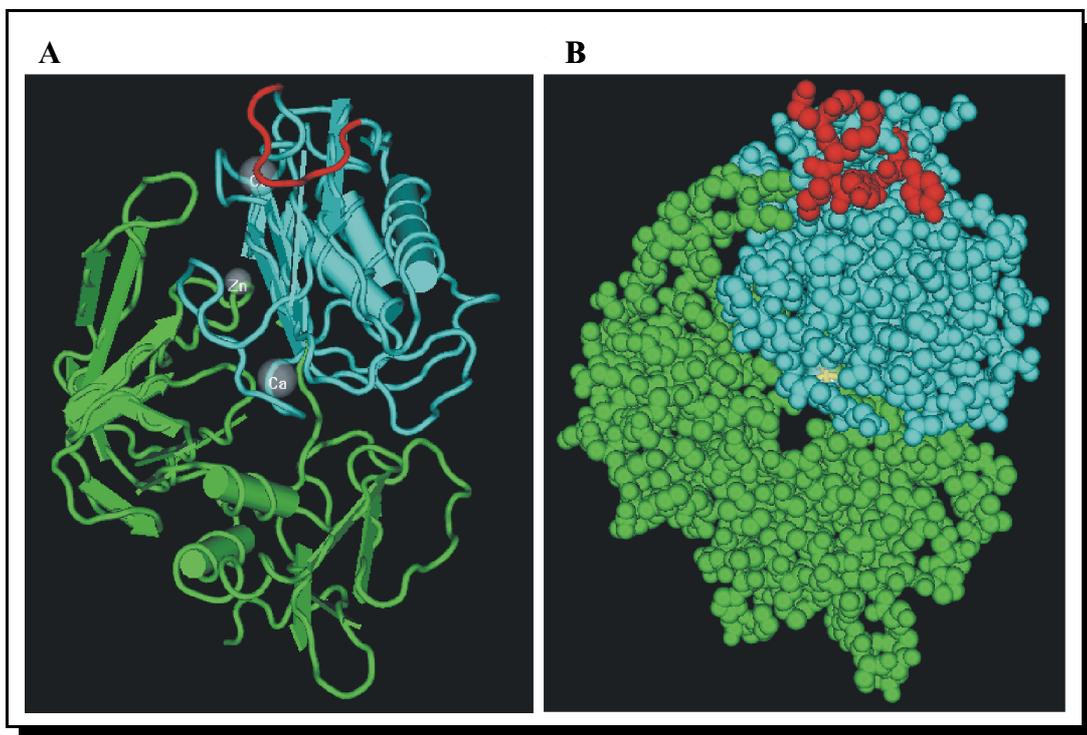


Abbildung 15: Kristallstruktur des MT1-MMP/TIMP-2-Komplexes. In grün dargestellt der TIMP-2, in blau die katalytische Domäne der MT1-MMP. Rot hervorgehoben der “MT-loop”. A) Ribbon-Struktur B) Spacefill-Struktur (Fernandez-Catalan et al. 1998)

Von großem Interesse ist auch der Einfluss der Pro-Domäne der MT1-MMP auf die Aktivierung der proGelatinase A. Cao *et al.* konnten zeigen, dass nur mit der latenten Form transfizierte COS-Zellen in der Lage waren, TIMP-2 an der Zelloberfläche zu binden und damit die Aktivierung der proMMP-2 zu ermöglichen (Cao et al. 1998). Im Gegensatz dazu zeigten andere Forschungsgruppen, dass die Pro-Domäne für die Aktivierung keine Funktion besitzt (Jo et al. 2000), sondern vielmehr nur die aktive Form der MT1-MMP die proGelatinase und damit auch den TIMP binden kann (Lehti et al. 1998). Weiterhin kann

die Aktivierung der proMT1-MMP durch das Calcium-Ionophor Ionomycin inhibiert werden, wodurch auch die proMMP-2 Aktivierung blockiert wird (Yu et al. 1997 und Lehti et al. 1998).

Untersuchungen von Itoh *et al.* und Lehti *et al.* weisen darauf hin, dass eine homophile Komplexbildung der MT1-MMP über ihre Hämopexin-ähnliche Domäne zu einer Akkumulation an der Zelloberfläche führt und damit die Aktivierung der proGelatinase A erleichtert wird (Itoh et al. 2001, Lehti et al. 2002).

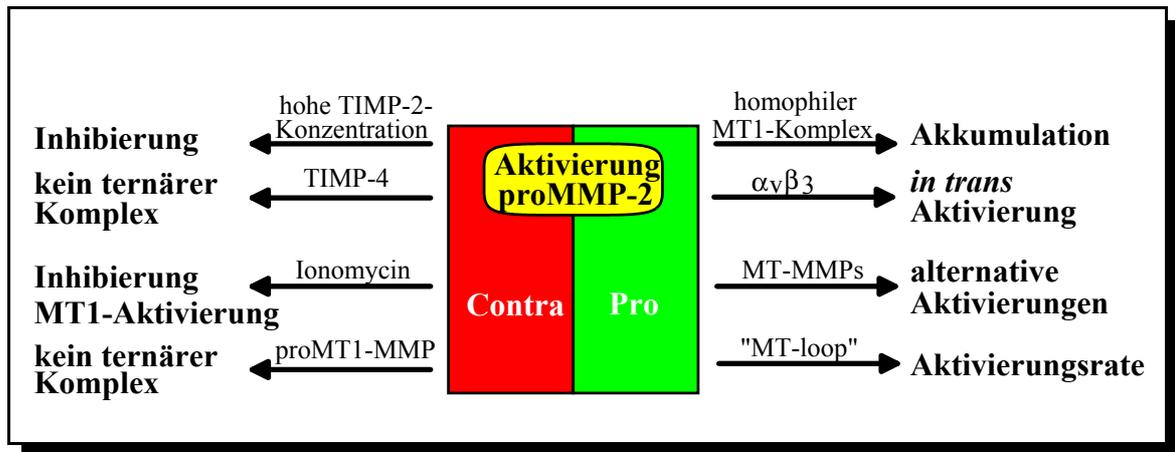


Abbildung 16: Übersicht der positiven und negativen Einflüsse auf die Aktivierung der proGelatinase A.

1.3.6 Interaktionen der Gelatinasen mit Integrinen

Die Integrine sind eine Familie von Membranrezeptoren, die aus α - und β -Untereinheiten bestehen. Insgesamt bilden 15 α - und 8 β -Einheiten mehr als zwanzig verschiedene Heterodimere. Die Integrine regulieren die Interaktion zwischen den Zellen und der extrazellulären Matrix und beeinflussen so die Organisation von Zellen in Organen und Geweben während des Wachstums, aber auch die Zell-Differenzierung und Proliferation. Eine wichtige Rolle kommt den Integrinen auch bei pathologischen Prozessen, wie z.B. bei der Tumormetastasierung, Herzerkrankungen und der rheumatoiden Arthritis zu.

Einige Integrine interagieren mit ihrem Bindungspartner über eine RGD-Sequenz und benötigen für die Ligandenbindung zweiwertige Kationen wie Ca^{2+} , Mn^{2+} oder Mg^{2+} , die die Bindungsaffinität unterschiedlich beeinflussen.

Neben der schon angesprochenen Bedeutung des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins bei der Aktivierung der proMMP-2 kommt diesem Integrin eine besondere Bedeutung im Tumorgeschehen zu. So zeigten Brooks *et al.*, dass die aktive Gelatinase A bei invasiven Zellen an der Zelloberfläche lokalisiert ist. Dabei kommt es zu einer Interaktion von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin mit der MMP-2 über die Hämapexin-ähnliche Domäne. In weiteren Untersuchungen konnte die Bindung zwischen Integrin und MMP-2 durch Zugabe der isolierten Hämapexin-ähnlichen Domäne blockiert werden. Dieses inhibierte die kollagenolytische Aktivität, verhinderte die Neubildung von Blutgefäßen und minimierte das Tumorwachstum (Brooks et al. 1996 und 1998). Ebenso führt eine Unterdrückung der MMP-2/ $\alpha_v\beta_3$ -Interaktion durch organische Moleküle zur Inhibierung der Angiogenese und des Tumorwachstums (Silletti et al. 2001). Deryugina *et al.* konnten zeigen, dass die Affinität zwischen der Gelatinase und diesem Integrin durch eine Modifizierung der β_3 -Untereinheit durch die MT1-MMP noch verbessert wird (Deryugina et al. 2000). Zu beachten ist bei diesen Befunden, dass die Hämapexin-ähnliche Domäne der Gelatinase A keine RGD-Sequenz enthält, und somit ein anderer Bindungsmechanismus vorliegen muss.

Im Gegensatz zur Gelatinase A ist über die Wechselwirkung von Gelatinase B und Integrinen nur sehr wenig bekannt. Agrez *et al.* haben allerdings nachgewiesen, dass bei Dickdarmkrebs eine $\alpha_v\beta_6$ -Integrin Expression zu einer erhöhten Sekretion der MMP-9 führt und mit der Progressivität des Tumorgeschehens korreliert (Agrez et al. 1999).

1.4 Biomolekulare Interaktionsanalyse

Die biomolekulare Interaktionsanalyse (BIA) ermöglicht seit ca. 1990 die Bindungsstudie von Biomolekülen. Die besonderen Vorteile dieser Messtechnik liegen in den geringen Protein- oder DNA-Mengen, die benötigt werden, der Bindungsstudie in Echtzeit, der großen Vielzahl von messbaren Molekülklassen und der Tatsache, dass keine Markierung der Biomoleküle für die Messung notwendig ist. Detektiert wird die Interaktion durch die Oberflächen-Plasmonresonanz (SPR).

Das Prinzip dieser Messung besteht darin, dass bei der totalen inneren Lichtreflektion an der Grenzfläche von Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes (Carboxydextran-Matrix und Glasschicht) sogenannte evaneszierende Wellen auftreten. Diese können Oberflächenelektronen ("surface plasmons") einer dünnen Goldschicht, die zwischen Glas und Matrix liegt, in Schwingungen versetzen. Diese Resonanz bedingt eine Abnahme der Lichtintensität des reflektierten Lichts, diese Änderung wird bei der Oberflächen-Plasmonresonanz bestimmt. Für Licht einer bestimmten Wellenlänge ist diese Resonanz abhängig von einer Funktion aus dem Winkel des eingestrahlt Lichts und dem Brechungsindex der Matrix. Somit kommt es bei einem SPR-Experiment bei einer Änderung des Brechungsindex aufgrund von Wechselwirkungen an der Matrix zu einer Änderung der winkelabhängigen Lichtintensität (Abbildung 17) (Hall 2001).

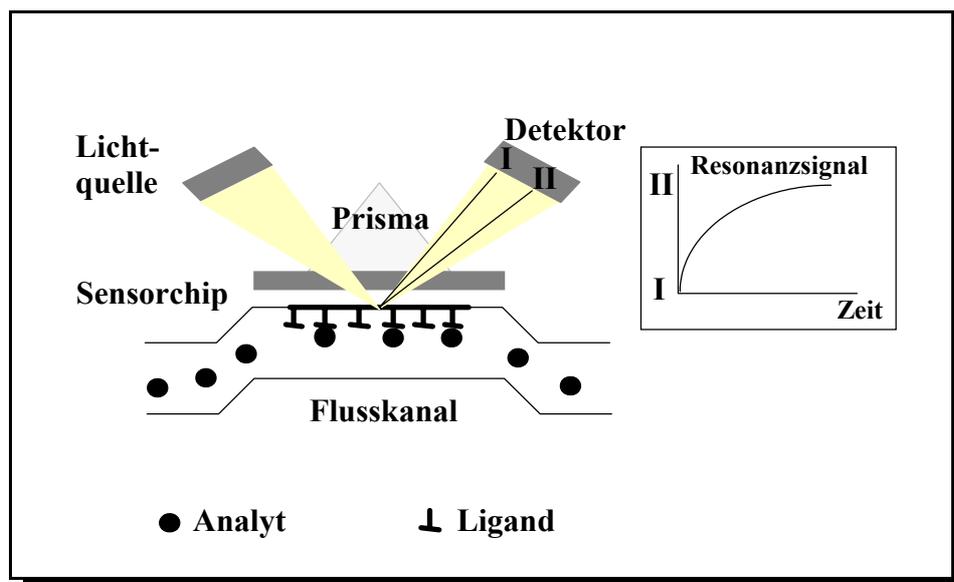


Abbildung 17: Schematische Darstellung eines BIA-Systems (modifiziert nach Jäger 2001).

Bindet ein Analyt an die Ligandenmatrix, so ändert sich mit der Masse auch der Brechungsindex. Somit besteht ein Zusammenhang zwischen der detektierten Oberflächen-Plasmonresonanz und der Massenänderung der Sensorchipmatrix. Dabei entspricht ein Massenunterschied von einem Picogramm/mm² einer Änderung des Messsignals um eine “response unit” (RU).

Jede BIA-Analyse besteht aus drei Schritten: Zuerst wird ein Biomolekül, der sogenannte Ligand, mit der Sensorchipoberfläche kovalent verknüpft (immobilisiert). Es folgt die eigentliche Bindungsstudie bestehend aus der Assoziation der beiden Bindungspartner und der folgenden Dissoziation des Komplexes. Abschließend wird die Chipoberfläche regeneriert, indem der restliche Komplex durch Reagenzien abgebaut wird. Der gebundene Ligand sollte dabei unbeeinflusst bleiben, so dass die immobilisierte Chipoberfläche mehrfach benutzt werden kann.

Da die Bindungskurve, das sogenannte Sensorgramm, eine Auftragung der “response units” gegen die Zeit darstellt (Abbildung 18), ermöglicht die BIA-Analyse nicht nur die Aussage, ob überhaupt eine Bindung stattfindet, sondern auch eine gezielte Bestimmung von kinetischen Daten (Morton et al. 1995).

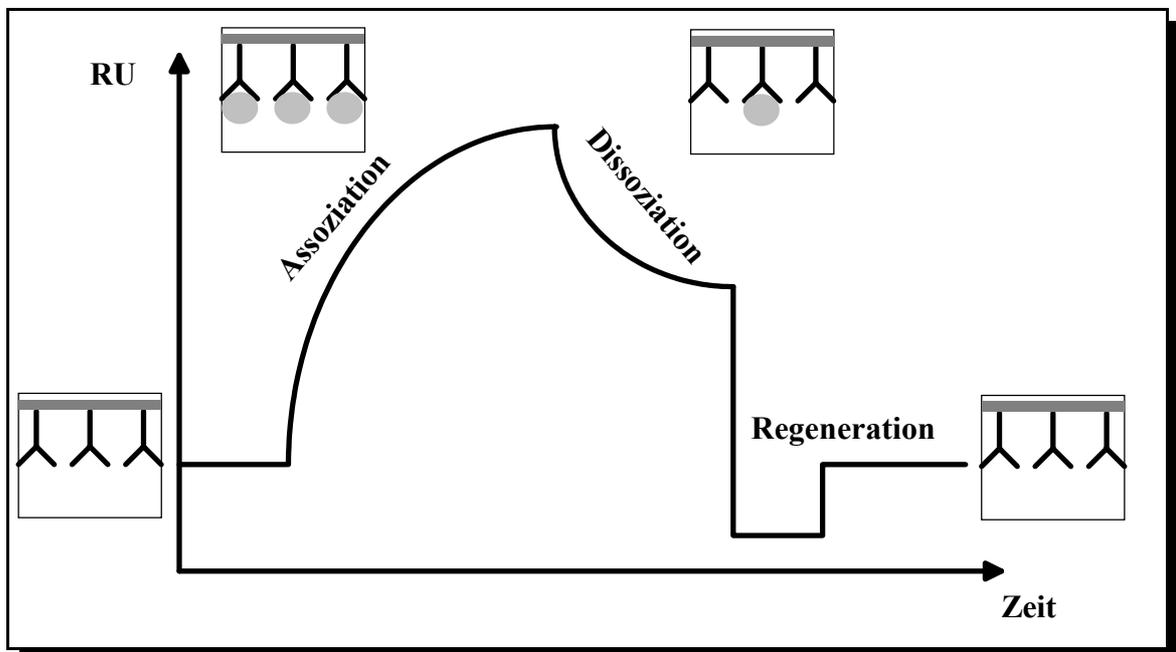


Abbildung 18: Sensorgramm. Der Kurvenverlauf zeigt den Signalanstieg während der Injektion des Analyten (Assoziation) und den Abfall aufgrund der Dissoziation des Komplexes. Die Kästchen zeigen den jeweiligen Zustand am Sensor-Chip (modifiziert nach Jäger 2001).

Kapitel 2 Zusammenfassung der Arbeit

Die Matrix Metalloproteinasen, eine Familie von Zink-abhängigen Enzymen, degradieren in Kombination alle Komponenten der extrazellulären Matrix. Daher sind sie in vielen physiologischen und pathologischen Prozessen, wie z.B. Wachstum, Wundheilung, rheumatoide Arthritis und Tumormetastasierung, von entscheidender Bedeutung.

In dieser Familie nehmen die Gelatinasen A und B (MMP-2 und MMP-9) eine Sonderstellung ein. Diese beruht hauptsächlich auf der zusätzlichen Fibronectin-ähnlichen Domäne und der Möglichkeit einer Interaktion von latenten Gelatinasen mit ihren natürlichen Inhibitoren, den TIMPs. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten für unterschiedliche Domänen Expressionssysteme etabliert und die rekombinanten Proteine weiter charakterisiert werden.

Für die Fibronectin-ähnliche Domäne der Gelatinase A stand ein etabliertes Expressionssystem in *E. coli* zur Verfügung (Stute 1998). Hierauf aufbauend wurde diese Domäne im Großmaßstab exprimiert und mittels RedOx-„shuffling“-System und Affinitätschromatographie an Gelatin-Sepharose aktiviert und gereinigt. Durch dieses effiziente Verfahren konnten mehrere Chargen mit unterschiedlichen Pufferzusammensetzungen produziert und dem Max-Planck-Institut in Martinsried zur Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse zur Verfügung gestellt werden.

Um den Einfluss einer Glykosylierung auf die Stabilität der katalytischen Domäne der Gelatinase B zu evaluieren, konnte ein Expressionssystem in *Pichia pastoris* erfolgreich etabliert werden. Hierfür wurde mittels PCR die codierende cDNA amplifiziert und nach Subklonierung in *E. coli* das Genfragment in den Hefe-Expressionsvektor pPICZ α A inkloniert. Nach erfolgreicher Transformation verschiedener *Pichia pastoris* Stämme konnte die Expression der gewünschten Domäne mittels Western-Blot nachgewiesen werden. Parallel zur Wildtyp-Form der katalytischen Domäne wurde ebenfalls eine potentiell inaktive Mutante (Glu³⁸³Gln, Leu³⁹⁹Ala) kloniert und exprimiert.

Die Expressionsanalyse zeigte bei beiden Varianten sowohl die Expression des gewünschten Monomers als auch die eines Dimers. Ein Aktivitätstest mittels Gelatin-Zymogramm wies eine Substratdegradierung für die Wildtyp-Form und die Mutante aus. Die autoproteolytische Degradierung während der Reinigung mittels Ionenaustauschchromatographie

und Gelfiltration verdeutlicht den nicht ausreichenden Schutz der Glykosylierung für die Stabilität der rekombinanten Domäne.

Für die Hämopexin-ähnliche Domäne der Gelatinase A stand ein etabliertes Expressionssystem in *E. coli* zur Verfügung (Stute 1998). Aufgrund der Isolierung des Proteins aus "inclusion bodies" und anschließender Reinigung unter denaturierenden Bedingungen sollte eine geeignete Methode zur Überführung in die native Konformation entwickelt werden. Unter Verwendung verschiedener Verfahren (stufenweise Dialyse gegen nicht-denaturierenden Puffer und RedOx-"shuffling"-System) konnte keine Komplexierung mit TIMP-2 und damit eine Bestätigung der nativen Konformation der Hämopexin-ähnlichen Domäne nachgewiesen werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde zusätzlich für die Hämopexin-ähnlichen Domänen der Gelatinasen A und B ein Expressionssystem in *Pichia pastoris* erfolgreich etabliert. Mittels PCR wurden die codierenden cDNAs amplifiziert und im Anschluss an eine Subklonierung in *E. coli* die Genfragmente in den Hefe-Expressionsvektor pPICZ α A inkloniert. Nach erfolgreicher Transformation verschiedener *Pichia pastoris* Stämme konnte die Expression der gewünschten Domänen mittels SDS-PAGE und N-terminaler Aminosäuresequenzierung nachgewiesen werden.

Zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen den Hämopexin-ähnlichen Domänen und den "tissue inhibitors of metalloproteinases" (TIMPs) wurde eine biomolekulare Interaktionsanalyse (BIA) durchgeführt. Die Analyse der hierbei bestimmten Assoziations- und Dissoziationskurven ergab für die Komplexe 72-Häm/b-TIMP-2 und 92-Häm/TIMP-1 jeweils einen zweistufigen Bindungsmechanismus. Dieses Ergebnis steht zwar im Gegensatz zu dem von Olson *et al.* veröffentlichten Einstufen-Mechanismus (Olson *et al.* 1997), stimmt aber mit der von Morgunova *et al.* bestimmten Kristallstruktur des Komplexes proMMP-2/TIMP-2 überein (Morgunova *et al.* 2002). Parallel zur Untersuchung des Bindungsmechanismus konnten die Dissoziationskonstanten (K_d) mit 170 nM für 72-Häm/b-TIMP-2 und 5,5 nM für 92-Häm/TIMP-1 bestimmt werden.

Hierzu ergänzend wurde ebenfalls eine biomolekulare Interaktionsanalyse für den Komplex proMMP-9/TIMP-1 durchgeführt. Dieses System unterscheidet sich grundlegend von den anderen. Zum einen wird dieser Komplex in einem dreistufigen Bindungsmechanismus gebildet und zum anderen zeigt der Komplex kaum eine Dissoziation.

Im Gegensatz zu den bekannten Komplexen 72-Häm/TIMP-4 und 72-Häm/ $\alpha_v\beta_3$ -Integrin konnten keine entsprechenden Komplexe mit der Hämopexin-ähnlichen Domäne der

Gelatinase B nachgewiesen werden. Weiterhin konnte keine Wechselwirkung zwischen 92-Häm und dem $\alpha_v\beta_6$ -Integrin identifiziert werden.

Ergänzend zur Komplexbildung auf einer Sensorchipoberfläche bei der Interaktionsanalyse wurde ein Verfahren zur Bereitstellung des 92-Häm/TIMP-1-Komplexes etabliert. Hierbei werden die Proteine zuerst komplexiert und anschließend wird der entstandene Komplex über eine Gelfiltrationssäule isoliert.

Mit diesen Ergebnissen leistet die vorliegende Arbeit einen wichtigen Beitrag zum Verständnis einzelner Gelatinase-Domänen in Bezug auf Struktur, Stabilität und Interaktion mit potentiellen Bindungspartnern.

Kapitel 3 Experimenteller Teil

3.1 Kultivierung von Zellen

Bei der Kultivierung von *E. coli* Bakterien muss mit sterilen Materialien gearbeitet werden, um eine Kontamination mit anderen Bakterien oder Pilzen zu vermeiden. Alle Medien, Reaktionsgefäße und Materialien werden vor Gebrauch autoklaviert und thermisch labile Substanzen sterilfiltriert. Die eingesetzten Bakterienstämme sind durchweg Sicherheitsstämme, die bestimmte Stoffwechseldefekte aufweisen und daher nur im Vollmedium überleben.

3.1.1 *Escherichia coli*

Über-Nacht-Kulturen dienen zur Herstellung frischer Zellkulturen eines Stammes oder der Plasmid-Anreicherung. Da alle verwendeten Plasmide eine Ampicillin-Resistenz aufweisen, werden nur die gewünschten *E. coli* Zellen vermehrt (Sambrook et al. 1989).

Zellkulturen können bei -20°C oder -80°C über einen längeren Zeitraum gelagert werden. Um eine Zerstörung der Zellen durch Kristallisation des Mediums zu verhindern, wird der Gefrierkultur Glycerin zugesetzt (Sambrook et al. 1989).

Mischkolonien lassen sich mit Hilfe eines Einzelkolonieausstrichs selektieren. Die Bakterienstämme werden hierfür mit einer sterilen Platinöse ausgestrichen.

3.1.2 *Pichia pastoris*

Die Kultivierung von *Pichia pastoris* Stämmen erfolgte nach Benutzerhandbuch (EasySelect™ *Pichia* Expression Kit, Invitrogen, NL). Die verwendeten Stämme wurden in Kulturkolben 16-20 Stunden bei 28°C unter Schütteln (150 rpm) kultiviert. Zur Langzeitlagerung werden die Kulturen mit 50% Glycerin bei -20°C oder -80°C tiefgefroren.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR können sehr geringe Mengen eines DNA-Fragmentes vervielfältigt werden (Saiki et al. 1988). Neben einer DNA-Polymerase werden hierfür zwei Oligonukleotide („primer“) benötigt, die sich antiparallel zueinander an die Einzelstränge der DNA-Matrix anlagern. Zu Beginn der Polymerasekettenreaktion wird der DNA-Doppelstrang zu Einzelsträngen denaturiert, an die bei nachfolgender Abkühlung die Oligonukleotide über homologe Basenpaarung hybridisieren („annealing“). Die „primer“ dienen der DNA-Polymerase als Startpunkt für die DNA-Neusynthese, die unter Verwendung zugegebener Nukleotide komplementär zum jeweiligen „template“-Strang erfolgt. Eine mehrmalige Wiederholung dieser Reaktionsschritte führt zu einer exponentiellen Anreicherung der durch die Oligonukleotide begrenzten DNA-Fragmente. Hierbei sind die Fragmentenden durch die 5'-Enden der „primer“ charakterisiert, so dass durch diese eine Einführung von Restriktionsschnittstellen sowie eines Start- und Stopp-„codons“ möglich ist (Mullis 1990).

Folgendes allgemeines Programm wurde für die PCR verwendet. Die entsprechende „annealing“-Temperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur der Oligonukleotide.

- 1 min 95°C Denaturierung
- 39 Zyklen: - 45 s 95°C Denaturierung
- - 30 s X°C + 0,2°C / Zyklus „annealing“
- - 30 s 72°C + 1 s / Zyklus Polymerisation
- 10 min 72°C Extension
- ∞ 4°C

X = individuelle „annealing“-Temperatur

3.2.2 DNA-Gelelektrophorese

Mittels Gelelektrophorese erfolgt eine Auftrennung von DNA-Fragmenten aufgrund ihres Molekulargewichtes. Dabei wandern im elektrischen Feld die negativ geladenen DNA-Fragmente in linearer Abhängigkeit ihrer Größe zur Anode (Sambrook et al. 1989). Die doppelsträngige DNA ist mittels planarer, aromatischer Kationen wie z.B. Ethidium (5-Ethyl-3,8-diamino-6-phenyl-phenanthridinium) leicht anzufärben. Dieser Farbstoff lagert sich in die DNA ein und kann dann mit UV-Licht geeigneter Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt werden.

Die DNA-Gelelektrophorese wird hauptsächlich zur Überprüfung der Größe sowie der Reinheit von DNA-Fragmenten durchgeführt. Weiterhin kann die Elektrophorese zur Restriktionsanalyse oder mit anschließender Elution der DNA-Fragmente zur Reinigung eingesetzt werden.

Die Größe von DNA-Fragmenten wird mit Hilfe eines DNA-Vergleichsstandards ermittelt. Die verwendete 1 kb-Leiter enthält DNA-Fragmente folgender definierter Größen:

12216 bp	7126 bp	2036 bp	394 bp
11198 bp	6108 bp	1635 bp	344 bp
10180 bp	5090 bp	1018 bp	298 bp
9162 bp	4072 bp	516 bp	220 bp
8144 bp	3054 bp	506 bp	200 bp

3.2.3 Reinigung amplifizierter DNA

Die Reinheit von Nukleinsäuren ist in der Gentechnik von besonderer Bedeutung. Nach einer PCR muss die amplifizierte DNA von unerwünschten Nebenprodukten sowie Primerresten, Paraffin, Polymerasen und dNTP-Resten gereinigt werden. Diese Verunreinigungen würden später eine Klonierung erschweren oder sogar zu falschen Ergebnissen führen.

Bei der Reinigung nach einer PCR wird die Bindung von DNA-Fragmenten in stark salzhaltigen Puffern an Silikat-Membranen ausgenutzt. Fragmente kleiner 100 bp, wie z.B. "PCR-primer", binden nicht an die Membran und können durch verschiedene Waschschritte entfernt werden. Die Elution der DNA erfolgt mit bidestilliertem Wasser.

3.2.4 Klonierung mittels "TA cloning"

Das "TA cloning" wurde speziell zur Klonierung von PCR-Produkten entwickelt. Mit Hilfe dieser Technik ist die direkte Insertion von PCR-Amplifikaten ohne vorhergehende enzymatische Modifikation in spezielle Vektorsysteme möglich. Das "TA cloning" arbeitet unter Ausnutzung der "template"-unabhängigen Polymerase-Aktivität, die in der PCR zur Addition eines Adenosins am 3'-Ende der Amplifikate führt. Wird bei der PCR eine Polymerase mit 3'→5'-Exonukleaseaktivität verwendet, die am Amplifikat kein überhängendes Adenosin addiert, ist vor der Ligation eine Polymerase-Nachbehandlung erforderlich. Der 3'-A-Überhang dient zur Einführung der PCR-Produkte in linearisierte Vektoren mit 3'-T-Überhang. Unter Verwendung der *T4*-Ligase werden die komplementären Enden miteinander verknüpft. Eine Transformation kompetenter *E. coli* Zellen mit dem konstruierten Plasmid kann sofort angeschlossen werden.

3.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Mit Hilfe des Enzyms Lysozym werden die Zellen unter geeigneten Bedingungen aufgebrochen, die Plasmide von weiteren *E. coli* Bestandteilen separiert und gereinigt (Sambrook et al. 1989, Winnacker 1990). Je nach gewünschter Qualität können zur DNA-Isolierung verschiedene Methoden angewendet werden.

Bei der alkalischen Mini-Lyse werden die *E. coli* Zellen zunächst lysiert und im alkalischen Milieu die genomische DNA denaturiert (Birnboim & Doly 1979). Durch Zentrifugation erfolgt eine Isolierung der Plasmid-DNA, die durch Phenolextraktion und Ethanol-fällung gereinigt wird.

Handelsübliche "plasmid isolation kits" wurden entwickelt, um sehr saubere, insbesondere zur Sequenzierung geeignete DNA zu erhalten. Das Verfahren stellt eine modifizierte alkalische Mini-Lyse dar. Das Reinigungsprinzip basiert auf der Fähigkeit von Plasmiden, in salzhaltigen Puffern an Silikat-Matrices zu binden. Somit kann nach der Zell-Lyse im basischen Milieu die Plasmid-haltige Lösung direkt über die Silikat-Säulen gereinigt werden. Die DNA-Fällung und vor allem die giftige Phenolisierung entfallen bei dieser Methode.

3.2.6 Klonierungsexperimente

Für das Einbringen eines Genabschnitts in einen Klonierungsvektor und dessen anschließende Vermehrung in *E. coli* sind neben den bereits angesprochenen weitere Klonierungsexperimente erforderlich (Winnacker 1990).

Durch geeignete Restriktions-Endonukleasen lassen sich Plasmide in eine spezifische Vektor- und "insert"-DNA spalten. Diese Restriktions-Endonukleasen erkennen auf DNA-Doppelsträngen bestimmte palindrome Sequenzen, die von ihnen hydrolysiert werden (Sambrook et al. 1989).

Die Gelextraktion stellt eine schnelle und effektive Methode zur Isolierung und Reinigung von DNA aus Agarosegelen dar. Handelsübliche "kits" machen sich wiederum die Bindungseigenschaften von DNA-Fragmenten an Silikat-Säulen zunutze.

Bei der Ligation wird eine Phosphodiester-Bindung zwischen benachbarten 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphatenden gebildet. Katalysiert wird dieses durch die DNA-Ligase aus dem Phagen *T4* (Ferretti & Sgaramella 1981). Man verwendet einen drei- bis fünffachen Überschuss an "insert" gegenüber dem Vektor. Das erhaltene Ligationsgemisch wird direkt zur anschließenden Transformation eingesetzt.

3.2.7 Transformation von *Escherichia coli*

Voraussetzung für die Einführung rekombinanter Plasmid-DNA in Wirtszellen ist die Überführung der *E. coli* Zellen in einen kompetenten Zustand, der zur Aufnahme von Fremd-DNA befähigt. Durch darauffolgende Transformation wird die Plasmid-DNA in die Zellen eingeführt.

Durch eine Behandlung der *E. coli* Zellen mit CaCl_2 -Lösung werden diese für eine leichte Aufnahme der Plasmid-DNA vorbereitet (Sambrook et al. 1989, Tang et al. 1994, Hanahan 1985).

Transformationskompetente *E. coli* Zellen können an ihrer Oberfläche Plasmide adsorbieren, die durch Hitzeimpulse die Zellmembran passieren (Mandel & Higa 1970). Dieser Effekt wird durch Zusatz von reduzierenden Agenzien verstärkt. Im Vollmedium werden die transformierten Bakterienzellen regeneriert und anschließend auf einem Antibiotikum-Selektionsmedium ausgestrichen. Durch die Aufnahme der Plasmid-DNA erlangen die

E. coli Zellen eine Antibiotika-Resistenz, die ein Wachstum auf diesem Medium ermöglicht.

Bei Vektoren, die über das *lacZ*-Gen verfügen, ist eine erste Selektion korrekt transformierter *E. coli* Zellen mit Hilfe des X-Gal-Tests möglich. Mit Hilfe dieses Tests können Transformanden, die ein Plasmid mit integrierter DNA aufgenommen haben, von negativen Transformanden mit religiertem Plasmid-Vektor differenziert werden (Sambrook et al. 1989, Winnacker 1990).

Zur Identifizierung positiver Transformanden müssen spezifische Nachweisreaktionen eingesetzt werden, die Aussagen über die transformierten Plasmide zulassen (Winnacker 1990). Ein möglicher Nachweis einer positiven Klonierung erfolgt durch eine Restriktionsanalyse, bei der Restriktionsenzyme die Plasmid-DNA hydrolysieren und durch anschließende Gelelektrophorese eine Größenbestimmung der DNA-Fragmente stattfindet (Gray et al. 1985).

3.2.8 Transformation von *Pichia pastoris*

Voraussetzung für das Einbringen einer rekombinanten Fremd-DNA in *Pichia pastoris* Zellen ist ebenfalls die Überführung der Zellen in einen kompetenten Zustand, der sie zur Aufnahme einer linearen DNA befähigt. Die durch Hitzeimpulse eingeführte lineare Fremd-DNA ist in der Lage, über homologe Sequenzen in das Genom von *Pichia pastoris* zu integrieren. Nach Regeneration der transformierten Zellen im Vollmedium erfolgt die Selektion positiver Transformanden auf einem Antibiotikum-Selektionsmedium. Hier sollten nur korrekt transformierte Zellen wachsen, die durch die integrierte Vektor-DNA eine entsprechende Antibiotikum-Resistenz erlangt haben.

Zur Integration der Fremd-cDNA in den *AOXI*-Locus des Hefegenoms wurde der verwendete pPICZ α A-Vektor mit der Restriktionsendonuklease *SacI* bzw. *PmeI* geschnitten (Clare et al. 1991). Die Transformation der Hefestämme erfolgte mittels Lithiumchlorid-Methode bzw. "EasyCompTM Transformation"-Methode nach Benutzerhandbuch. Nach der Transformation mit dem Zeocin-Resistenz vermittelnden Vektor erfolgte die Anzucht der Transformanden auf YPDS-Zeocin-Platten (EasySelectTM *Pichia* Expression Kit, Invitrogen, NL).

3.2.9 Expression rekombinanter Proteine

3.2.9.1 *Escherichia coli*

Mit Hilfe der Gentechnik lassen sich Proteine in Wirtsorganismen herstellen. Die Expression gewünschter Proteine in *E. coli* ermöglicht die Gewinnung in größeren Mengen. Ein Nachteil besteht jedoch in der Tatsache, dass die Proteine häufig in denaturierter Form isoliert werden und anschließend aktiviert werden müssen (Fischer et al. 1993).

Die Genexpression der Proteine im *E. coli* Wirtsorganismus erfolgt mittels Vektoren des pET-Systems. Dieses System ermöglicht eine Kontrolle der Expression durch *lac*-Repressoren und -Promotoren, die mit Induktoren wie dem Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) regulierbar sind. Vor der Induktion verhindert der *lac*-Repressor durch Bindung an die *UV5*-Promotorregion die Transkription des *T7*-Polymerasegens. Durch Zugabe von IPTG wird der *lac*-Repressor inaktiviert und gleichzeitig der *lac-UV5*-Promotor angeschaltet. Dies wiederum führt zur Synthese der *T7*-Polymerase, die durch Anlagerung an den *T7-lac*-Promotor die Expression des entsprechenden Gens induziert (Studier & Moffatt 1986).

Zu Testzwecken werden rekombinante Proteine im kleinen Maßstab exprimiert. Hierbei werden positiv identifizierte *E. coli* Transformanten auf ihre Fähigkeit zur Proteinexpression überprüft (Studier & Moffatt 1986, Sambrook et al. 1989).

Zur Herstellung größerer Mengen rekombinanter Proteine werden expressionsfähige *E. coli* Kulturen im Großmaßstab hergestellt. Die Zellen werden bis zu einer optischen Dichte von 0,6 - 0,8 kultiviert, bevor die Expression der Gene induziert wird. Zur Maximierung der Proteinproduktion werden die induzierten *E. coli* Zellen mehrere Stunden inkubiert.

Zur Kontrolle der Expression werden der Kultur in adäquaten Zeitabständen vor und nach der Induktion Proben entnommen. Die Bakterien-Suspension wird zentrifugiert, die Proteine denaturiert und die so erhaltenen Proben zur Polyacrylamid-Gelelektrophorese eingesetzt.

Die Synthese rekombinanter Proteine im *E. coli* Wirtsorganismus erfolgt mit anschließender intrazellulärer Sekretion. Häufig werden die Proteine in denaturierter Form als unlösliche Proteinaggregate ("inclusion bodies", IBs) abgelagert. Durch Zellaufschluss mit Hilfe von Lysozym und anschließenden Waschschritten lassen sich die "inclusion bodies"

isolieren. Diese werden dann durch denaturierende und reduzierende Reagenzien aufgeschlossen (Auerswald et al. 1988, Kleine et al. 1993).

3.2.9.2 *Pichia pastoris*

Pichia pastoris besitzt als methylo-trophe Hefe die Möglichkeit, Methanol als einzige Kohlenstoffquelle über die Alkoholoxidase zu verwerten. Dieses Enzym wird während der Verstoffwechslung von Glucose oder Glycerin als Kohlenstoff- und Energiequelle in der Zelle nicht exprimiert. Somit kann der Promotor der Alkoholoxidase als starker gentechnisch induzierbarer Promotor durch den Wechsel von Glycerin-haltigem auf Methanol-haltiges Kulturmedium eingesetzt werden (Ellis et al. 1985, Cregg & Madden 1988, Koutz et al. 1989, Sreekrishna & Kropp 1996).

Rekombinante Proteine können mit *P. pastoris* sowohl cytosolisch als auch in sezernierter Form hergestellt werden. Die cytosolische Expression findet eigentlich nur Anwendung, wenn das rekombinante Protein auch im ursprünglichen Wirt im Cytosol vorkommt. Größere Bedeutung hat dagegen die sekretorische Expression nativer Glykoproteine, da die endständige Mannosylierung und das damit verbundene Risiko der Hyperglykosylierung in *P. pastoris* weitaus weniger ausgeprägt ist als bei anderen Hefen (Tschopp et al., 1987).

Für die Sekretion von Proteinen ins Kulturmedium ist auf dem Vektor pPICZ α A die *S. cerevisiae* α -Faktor-Präprosignalsequenz verantwortlich. Diese wird nach der Erkennungssequenz ELR durch die Protease KEX2 im Golgiapparat abgespalten, insbesondere wenn nach dem R die Dipeptidwiederholung EAEA folgt. Diese wird wiederum durch die Dipeptidylpeptidase STE13 des Golgiapparates abgespalten (Cregg et al. 1993, Scorer et al. 1993).

Primärsequenzen, die von *P. pastoris* als zu glykosylierende Stellen erkannt werden, sind Asn-X-Ser/Thr. Hier findet im endoplasmatischen Retikulum die N-Glykosylierung des Mannose-Typs statt, bei der 8-14 Mannose-Reste pro Oligosaccharidkette posttranslational an das Protein angefügt werden (Grinna und Tschopp, 1989).

Die transformierten Hefezellen wurden in BMGY-Wachstumsmedium angezogen und die Expression durch Wechsel auf BMMY-Medium induziert (EasySelect™ *Pichia* Expression Kit, Invitrogen, NL). Zur Expressionskontrolle wurden in Tagesabständen Proben entnommen und diese mittels SDS-PAGE analysiert.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die Gelelektrophorese in Polyacrylamid-Gelen (PAA-Gelen) ist eine der effektivsten Methoden zur Trennung von Makromolekülen sowie zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen. Die Elektrophorese wird meist in Gegenwart eines Überschusses an Natriumdodecylsulfat (SDS) durchgeführt. Dieses lagert sich an hydrophobe Regionen der Proteine an, wodurch diese maximal negativ aufgeladen werden und im elektrischen Feld unabhängig von ihrer eigenen Ladung wandern (Laemmli 1970).

Die Gelmatrix wird in einer radikalischen Polymerisation aus Acrylamid mit N,N'-Methylenbisacrylamid als Quervernetzer hergestellt. Die Porengröße kann durch Variation der Acrylamidkonzentration gesteuert werden. Die Polymerisation wird durch Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat (APS) gestartet. Auspolymerisierte Gele werden als Gelmatrix verwendet. Die Trennung der Proteingemische wird bei konstanter Stromstärke von 40 mA durchgeführt.

Die Proteinproben werden mit 30% (v/v) Laemmli-Puffer versetzt. Durch das enthaltene β -Mercaptoethanol werden die Disulfidbrücken in den Proteinen reduziert und globuläre Proteine dissoziiert. Schwerlösliche Proteine werden zusätzlich durch Erhitzen auf 100°C für 10 min denaturiert. Bei Proteinen, die keine Disulfidbrücken enthalten, kann auf β -Mercaptoethanol verzichtet werden.

Die Wanderungsgeschwindigkeit SDS-markierter Proteine im PAA-Gel ist ihrer Größe direkt proportional. Bei der PAA-Gelelektrophorese wird als Eichsubstanz ein Proteingemisch mit genau definierten Molmassen verwendet (Weber & Osborne 1969). Der verwendete LMW-Marker enthält folgende Proteine:

Phosphorylase B (Kaninchenmuskel)	94.000 Da
Rinderserumalbumin (Rinderserum)	67.000 Da
Ovalbumin (Eiweiß)	43.000 Da
Carboanhydrase (Rinder-Erythrocyten)	30.000 Da
Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (Sojabohnen)	20.100 Da
α -Lactalbumin (Kuhmilch)	14.400 Da

Je nach Konzentration bzw. verwendeter Menge an Protein werden zwei Methoden zur Färbung von Proteinbanden in PAA-Gelen verwendet. Hochkonzentrierte Proteine werden

mit "Coomassie Blue" nachgewiesen; geringer konzentrierte Proteine werden mit Silber angefärbt. Die "Coomassie Blue"-Färbung beruht auf einer Reaktion des Farbreagenzes mit den NH_2 -Gruppen der Lysin-Seitenketten und den freien N-Termini der Proteine. In alkoholischer Lösung lagert sich der Farbstoff an die denaturierten Proteine an. Nach Auswaschen von überschüssigem "Coomassie Blue" lassen sich die Proteine nachweisen (Schägger et al. 1988). Die Silberfärbung basiert auf der Komplexbildung zwischen Ag(I) -Ionen und aciden Seitenketten der Proteine. Diese werden im PAA-Gel reduziert und unter sauren Bedingungen mit den Ag(I) -Ionen komplexiert. Im basischen Milieu werden die Kationen in Gegenwart von Formaldehyd zu elementarem Silber reduziert und die Proteine in der Gelmatrix angefärbt (Heukeshoven & Dernick 1988).

3.3.2 Automatisierte Protein-Sequenzierung

Durch ein "blotting" wird das Protein im elektrischen Feld auf eine Membran transferiert und mit "Coomassie Blue" detektiert (Xu & Shively 1988). Die anschließende Protein-Sequenzierung mittels Edman-Abbau dient der Bestimmung der N-terminalen Aminosäure-Sequenz von Proteinen (Edman & Begg 1967). Die automatisierte Bestimmung der AS-Sequenz wird in einem Flüssigphasen-Sequenzierer durchgeführt. Der eigentliche Edman-Abbau erfolgt hierbei in einem Eluatreaktor. Die zu analysierende Probe wird auf einer Membran in den Reaktor eingebracht und dort mit Phenylisothiocyanat (PITC) umgesetzt. Die N-terminale AS des Proteins zyklisiert mit dem gekuppelten PITC zum Phenylthiazolinon-Derivat (PTZ) unter gleichzeitiger Abspaltung vom Restpeptid. Im nachgeschalteten Konverter wird das PTZ zum stabileren Phenylthiohydantoin-Derivat (PTH) umgelagert. Die PTH-AS wird "online" im RP-HPLC-System mit einer C_{18} -Säule aufgetrennt und kann durch Vergleiche mit AS-Standards identifiziert werden (Reinke et al. 1991, Fischer 1992).

3.3.3 Western Blot

Beim Western-Blot werden elektrophoretisch fraktionierte Proteine aus der Gelmatrix auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Detektion der auf der Membran adsorbierten Proteine erfolgt in einer immunologischen Nachweisreaktion. Zunächst erkennt ein

spezifischer Antikörper das Zielprotein auf der Membran. Ein zweiter Antikörper, der mit Alkalischer Phosphatase konjugiert ist, reagiert mit dem Immunkomplex über den F_c-Teil des ersten Antikörpers. Die an den zweiten Antikörper gekoppelte Alkalische Phosphatase katalysiert die Umwandlung der löslichen Farbstoffe BCIP und NBT zu einem gefärbten Präzipitat aus Indigo und Diformazan, wodurch die Proteine an der Membran detektiert werden (Langone & Vunakis 1982, Blake et al. 1984).

3.3.4 Reinigung rekombinanter Proteine

Die Reinigung von Proteinen beruht auf Eigenschaften wie ihrer Größe, Ladung und Bindungsaffinität. Eine Trennung der Makromoleküle voneinander aufgrund ihrer Größe erfolgt durch Gelfiltration. Die Ionenaustauschchromatographie ermöglicht eine Reinigung der Proteine durch ihre unterschiedlichen Nettoladungen. Beide Verfahren können sowohl unter nativen als auch unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt werden. Viele native Proteine besitzen allerdings eine hohe Affinität zu bestimmten chemischen Gruppen. Dies wird in der Affinitätschromatographie ausgenutzt.

Anionische Proteine lassen sich an Chromatographie-Säulen mit positiv geladener Diethylaminoethyl-Cellulose (DEAE-Sepharose) oder Diethyl-(2-hydroxypropyl)aminoethyl-Cellulose (Q-Sepharose) binden. Je nach Stärke der Wechselwirkungen lassen sich die einzelnen Proteine mit ansteigendem Salzgradienten der Reihe nach eluieren. Hierbei konkurrieren die Chlorid-Ionen mit den Proteinen um die Bindungsstellen an der Säule. Moleküle mit geringer negativer Ladungsdichte verlassen die Säule zuerst, dann folgen die mit höherer Ladungsdichte (Pharmacia).

Bei der Gelfiltration wird eine Trennung der Proteine abhängig von ihrem Molekulargewicht erreicht. Die Chromatographie-Säule setzt sich aus einer stationären und einer mobilen Phase zusammen. Die stationäre Phase besteht aus Kügelchen eines gelartigen, quervernetzten Polymers wie Dextran, Agarose oder Polyacrylamid. Mittels Schwerkraft werden Moleküle der mobilen Phase an der stationären Phase vorbeigeführt. Kleine Proteine können hierbei in die Poren eindringen, wodurch sie die Säule langsamer passieren als größere Moleküle (Pharmacia).

Bei der Affinitätschromatographie wird die spezifische Bindungseigenschaft vieler Proteine zu anderen Biomolekülen ausgenutzt. Durch die kovalente Kopplung dieser Biomoleküle (Liganden) an das Säulenmaterial erhält man Chromatographie-Säulen großer

Aufnahmekapazität. Voraussetzung für die Bindung der Proteine an das Säulenmaterial sind jedoch native Bedingungen, da die Proteine nur in der richtigen dreidimensionalen Konformation mit dem Liganden interagieren (Pharmacia). Durch Zugabe von Komplexdissoziierenden Agenzien kann hoch reines Protein eluiert werden.

Verwendete Puffer:

denaturierende Q-Sepharose: 50 mM Tris/HCl pH 9,0

5 mM CaCl₂

4 M Harnstoff

40 mM β -Mercaptoethanol

Elution mit NaCl-Gradient 0-500 mM in Puffer

nicht-denaturierende

Q-Sepharose: 50 mM Tris/HCl pH 9,0

5 mM CaCl₂

Elution mit NaCl-Gradient 0-500 mM in Puffer

DEAE-Sepharose: 50 mM Tris/HCl pH 8,5

5 mM CaCl₂

5 mM ZnCl₂

Elution mit NaCl-Gradienten 0-1 M in Puffer

Gelatin-Sepharose: 50 mM Tris/HCl pH 7,5

5 mM CaCl₂

500 mM NaCl

0.001% (v/v) Brij 35

Elution mit 10% DMSO in Puffer

denaturierende Gelfiltration: 50 mM Tris/HCl pH 9,0
5 mM CaCl₂
4 M Harnstoff
100 mM NaCl
40 mM β-Mercaptoethanol

nicht-denaturierende

Gelfiltration: 50 mM Tris/HCl pH 7,5
5 mM CaCl₂
100 mM NaCl
0.01% (v/v) Brij 35

3.3.5 Aktivierung denaturierter Proteine

Sowohl nach einem Aufschluss von “inclusion bodies” als auch nach Proteinreinigungsschritten unter denaturierenden Bedingungen ist es notwendig, die Polypeptidketten durch Entzug der denaturierenden Agenzien in ihre native Konformation zu überführen und diese durch Disulfidbrücken zu stabilisieren.

Generell ist die *in vitro* Aktivierung ein spontaner Prozess, bei dem das Protein die Konformation des energetischen Minimums einnimmt. Die treibende Kraft ist der hydrophobe Effekt. Dieser führt jedoch häufig zu falschen Konformationen, die zwar energetisch begünstigt sind, aber von der nativen Struktur abweichen. Daher müssen bei der Aktivierung der rekombinanten Proteine optimale Faltungsbedingungen erreicht werden (Fischer et al. 1993). Das einfachste Verfahren stellt die stufenweise Dialyse dar, bei der den Proteinen langsam die denaturierenden Agenzien (Harnstoff und β-Mercaptoethanol) entzogen werden.

Bei Proteinen mit mehreren Disulfidbrücken führt die Dialyse allerdings nicht immer zur nativen Konformation. Das RedOx-”shuffling“-System unterstützt die Bildung der korrekten Disulfidbrücken. Dieses System katalysiert den Thiol-Disulfid-Austausch zwischen dem denaturierten Protein und einem Reagenz mit Disulfidbrücken (Dithiothreitol (DTT)). Um das DTT zum Disulfid zu regenerieren, wird dem System oxidiertes Glutathion (GSSG) zugesetzt. In reduzierter Form ist dieses gleichzeitig zur Spaltung nicht nativer Disulfide im Protein erforderlich. Zur Vermeidung intermolekularer Wechselwirkungen,

die zur Proteinaggregation führen, wird dem System zusätzlich Arginin zugesetzt (Creighton 1988 & 1990, Buchner 1992, Hodges et al. 1998). Da die Aktivierung thermodynamisch kontrolliert wird, ist eine Inkubation bei 4°C über mehrere Tage erforderlich. Die Proteinlösung kann entweder durch Ultrafiltration wieder konzentriert oder durch Kupplung an Säulenmaterial gereinigt werden.

3.3.6 Aktivitätsnachweis durch Zymographie

Die Zymographie ist eine der empfindlichsten Methoden zum Aktivitätsnachweis von Proteinasen gegenüber Substraten der extrazellulären Matrix. Hierbei wird ausgenutzt, dass Substrate wie Gelatin oder Casein sich in Polyacrylamid-Gele (PAA-Gele) einpolymerisieren lassen. Im sogenannten Substratgel werden die zu analysierenden Proteinproben elektrophoretisch fraktioniert und, in der Matrix fixiert, einer Substratumsetzung zugänglich gemacht. Durch "Coomassie Blue"-Färbung werden die Matrixproteine im Gel angefärbt. Die durch aktive Proteinasen fragmentierten Substrate erscheinen hierbei auf dem blauen Hintergrund als farblose Banden (Heussen & Dowdle 1980).

Da die zu analysierenden Proteingemische nach erfolgter gelelektrophoretischer Fraktionierung direkt dem Aktivitätsnachweis zugeführt werden, dürfen diese nicht denaturiert vorliegen. Die Proben werden daher vor der Elektrophorese mit einem Probenpuffer gemischt, der weder Harnstoff noch β -Mercaptoethanol enthält.

Die Entwicklung des Zymogramms erfolgt im nicht-denaturierenden Puffer bei physiologischen Temperaturen. Zur Entfernung von überschüssigem SDS wird die Gelmatrix mit Triton X-100 gewaschen. Die Inkubation bei 37°C im physiologischen Puffer ermöglicht daraufhin aktiven Proteinasen den Abbau des im Gel vernetzten Substrates.

3.3.7 Aktivitätstests mit synthetischen Substraten

Niedermolekulare, synthetische Verbindungen sind kommerziell erhältlich und können zum Nachweis der Protease-Aktivität eingesetzt werden. Diese Aktivitätstests basieren auf der Eigenschaft von Proteinasen, solche synthetischen Verbindungen zu hydrolysieren. Die dabei entstehenden Spaltprodukte sind mit Farbreagenzien markiert, so dass die proteolytische Aktivität spektroskopisch verfolgt werden kann.

Das synthetische Peptid nach Murphy, Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂, ist ein Substrat für Matrix Metalloproteinasen, das sich durch eine hohe Sensitivität auszeichnet (Knight et al. 1992). In dem Hexapeptid liegt in enger Nachbarschaft zu dem stark fluoreszierenden 7-Methoxycumarin-Substituenten (Mca) ein 3-[2,4-Dinitrophenyl]-L-2,3-diaminopropionyl-Rest (Dpa). Wird der Mca-Substituent mit elektromagnetischer Strahlung geeigneter Wellenlänge angeregt, so wird dieser Zustand durch Energietransfer zum Dpa-Rest ausgelöscht ("quenchen"). Erst durch die MMP-spezifische Hydrolyse zwischen Gly und Leu wird der Dpa-Rest im Substrat abgespalten und es entsteht ein fluoreszierendes Produkt. Der auftretende Fluoreszenzanstieg wird mit einem Spektrometer in Abhängigkeit von der Zeit registriert und dient als Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit der Protease.

Da die proteolytische Aktivität der MMPs bei diesem Test kontinuierlich verfolgt werden kann, findet dieses Substrat bei kinetischen Untersuchungen seinen Einsatz. Die Wirksamkeit von Inhibitoren gegenüber der Protease-Aktivität kann mit dem Mca-Peptid gleichermaßen gut untersucht werden.

3.3.8 Proteolytische Spaltung von Proteinen

Zur Untersuchung der Substratspezifität von Proteinen wurden die Substrate bei 37°C mit dem Enzym im Verhältnis 10:1 inkubiert. Eine Umsetzung des Substrates zeigte sich nach anschließender SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese anhand der sichtbaren Abbaubanden.

3.3.9 Darstellung von Protein-Komplexen

Zur Komplexbildung wurden die Proteine bei 4°C 14 Stunden oder bei 25°C 30-60 Minuten inkubiert und anschließend die Komplexbildung durch eine Gelelektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen analysiert oder nicht komplexierte Proteinreste durch eine Gelfiltration unter nicht-denaturierenden Bedingungen abgetrennt.

3.3.10 Gelelektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen

Die Elektrophorese in Polyacrylamid-Gelen (PAA-Gele) erlaubt auch die Untersuchung von Makromolekülen unter nicht-denaturierenden bzw. nicht-reduzierenden Bedingungen. Sie wird häufig zum Nachweis von Protein-Komplexen eingesetzt, die unter dem Zusatz von SDS dissoziieren (Westermeier 1990).

Die Trennung der Proteine in der Gelmatrix basiert auf der Eigenschaft geladener Moleküle, im elektrischen Feld zu wandern. Die Mobilität im PAA-Gel zeigt somit eine Abhängigkeit von Masse und Gestalt des Makromoleküls. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird aber vorrangig durch die Eigenladung der Proteine bestimmt (Schägger & Jagow 1991).

Bei der Gelelektrophorese unter nicht-denaturierenden bzw. nicht-reduzierenden Bedingungen wird ein Probenpuffer verwendet, der weder SDS noch Harnstoff und β -Mercaptoethanol enthält. Die Proben dürfen nicht erhitzt werden, da dies eine thermische Denaturierung der Proteine bzw. eine Dissoziation der Komplexe zur Folge hätte. Aus diesem Grund wird die Spannung niedrig gehalten (10 mA) und die Fraktionierung bei 4°C durchgeführt (Westermeier 1990).

3.3.11 Ultrafiltration

Die Ultrafiltration stellt ein schnelles und effektives Verfahren zur Konzentrierung von Proteinproben dar. Die sich in der Ultrafiltrationskammer befindende Membran besitzt eine Ausschlussgrenze, so dass sie nur von kleinen Molekülen, wie z.B. den Salzen des Puffers, passiert werden kann. Dadurch werden die Proteine zurückgehalten und konzentriert.

Zur Konzentrierung verdünnter Proteinlösungen wurden Ultrafiltrationskammern (Amicon, Beverly) unter einem Stickstoff-Überdruck von 3 bar bei 4°C verwendet. Die Membranen mit einer Ausschlussgrenze von 3 kDa wurden von Millipore, Bedford bezogen.

3.3.12 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration einer Proteinprobe kann durch Messung ihrer optischen Dichte (OD) ermittelt werden (Gill & von Hippel 1989). Da die OD-Bestimmung bei einer Wellenlänge von 280 nm erfolgt, steht der Extinktionskoeffizient des Moleküls vor allem in Abhängigkeit von den Tryptophanen und Tyrosinen. Daher kann aus den Extinktionskoeffizienten dieser Aminosäuren der Koeffizient des Gesamtproteins annähernd berechnet werden. Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes lässt sich die Konzentration des Proteins berechnen:

$$\Delta E = \varepsilon \times c \times d$$

$$\Delta E = OD_{280}$$

$$\begin{aligned} \varepsilon &= \text{Extinktionkoeffizient} \\ c &= \text{Konzentration [mol/l]} \\ d &= \text{Schichtdicke (1cm)} \end{aligned}$$

$$c = OD_{280} / \varepsilon$$

$$C = \text{Konzentration [mg/ml]}$$

$$C = OD_{280} / E$$

$$E = \varepsilon \times \text{Molekulargewicht}$$

$$\varepsilon_{\text{Protein}} = n_{\text{Tyr}} \times \varepsilon_{\text{Tyr}} + n_{\text{Trp}} \times \varepsilon_{\text{Trp}}$$

$$\begin{aligned} \varepsilon_{\text{Protein}} &= \text{Extinktionskoeffizient} \\ &\quad \text{des Proteins} \\ n_{\text{Tyr}} &= \text{Anzahl Tyrosine} \\ \varepsilon_{\text{Tyr}} &= \text{Extinktionskoeffizient} \\ &\quad \text{des Tyrosins} \\ &\quad 1280 [\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}] \\ n_{\text{Trp}} &= \text{Anzahl Tryptophane} \\ \varepsilon_{\text{Trp}} &= \text{Extinktionskoeffizient} \\ &\quad \text{des Tryptophans} \\ &\quad 5600 [\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}] \end{aligned}$$

3.4 Biomolekulare Interaktionsanalyse

Die biomolekulare Interaktionsanalyse wurde mit dem System "Biacore™ 3000" durchgeführt (Biacore AB, Freiburg).

Um bei den Messungen Artefakte aufgrund von Luftblasen und Staubpartikeln zu vermeiden, werden die verwendeten Proben und Puffer stets partikelfrei filtriert und entgast.

3.4.1 Immobilisierung der Liganden

Bei der Immobilisierung wird die Chipoberfläche kovalent mit einem Liganden beladen. Hierfür stehen grundsätzlich mehrere Bindungsmechanismen zur Verfügung. Neben der eigentlichen Messzelle dient eine weitere Flusszelle als Referenzoberfläche für unspezifische Wechselwirkungen.

Bei der Aminokopplung werden die Carboxygruppen der Dextran-Matrix durch eine Reaktion mit N-Hydroxysuccinimid und N-Ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)carbodiimid in aktive Ester übergeführt. Diese reagieren spontan mit den freien Aminogruppen des Liganden und dieser bindet so kovalent an die Chipoberfläche. Überschüssige freie Ester werden durch Umsetzung mit Ethanolamin deaktiviert. Abschließend wird der Sensorchip mit Phosphatpuffer (7,8 mM NaH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄, 0,1 mM CaCl₂, 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 0,01% Brij35, pH 7,2) äquilibriert.

Die Immobilisierung erfolgte anhand eines Biacore-Programms auf einem CM5 Sensorchip (Biacore 1999). Der Ligand wurde in einer Konzentration von 5 µg/ml in 10 mM Natriumacetat, pH 4,8 eingesetzt. Das Immobilisierungsziel lag bei 100 "response units" (RU).

3.4.2 Bindung der Analyten

Die Bindung der Analyten an die Liganden wurde bei 25°C in Phosphatpuffer mit verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Die Flussrate betrug 30 µL/min. Für die Messungen wurde das Biacore-Programm "binding analysis" verwendet, um reproduzierbare Versuchsabläufe zu gewährleisten (Biacore 1999).

3.4.3 Regeneration der Chipoberfläche

Bei der Regeneration der Chipoberfläche wird der Komplex spezifisch dissoziiert. Der Ligand sollte hierbei nicht beeinflusst werden, damit die Chipoberfläche mehrfach verwendet werden kann.

Die Komplexdissoziation von Ligand und Analyt erfolgte durch einen 30 s Puls mit 20 mM HCl gefolgt von einem 60 s Puls mit Phosphatpuffer. Die Flussrate während der Regeneration betrug 100 $\mu\text{L}/\text{min}$.

3.4.4 Analyse der Reaktionsstufen

Die Bindungskurven wurden mit dem Programm "Origin™ 5.0" von Microcal für nicht lineare Kurvenanpassung analysiert. Zur Bestimmung der Reaktionsschritte wurden die Bindungskurven mit Standardfunktionen für eine verschiedene Anzahl von Reaktionsschritten angepasst:

$y = y_0 + A_1 e^{-(t-t_0)/\tau_1}$ für eine Ein-Stufen-Reaktion, $y = y_0 + A_1 e^{-(t-t_0)/\tau_1} + A_2 e^{-(t-t_0)/\tau_2}$ für eine Zwei-Stufen-Reaktion und $y = y_0 + A_1 e^{-(t-t_0)/\tau_1} + A_2 e^{-(t-t_0)/\tau_2} + A_3 e^{-(t-t_0)/\tau_3}$ für eine Drei-Stufen-Reaktion (t_0 , Injektionsstartpunkt; y_0 , maximale RU-Wert; A_{1-3} , Amplitude der Relaxation; τ_{1-3} , Relaxationszeit).

Aufgrund der Übereinstimmung der Messkurve mit der angepassten Kurve können Aussagen über die Anzahl der Reaktionsschritte gemacht werden.

3.4.5 Bestimmung der Dissoziationskonstanten

Die Dissoziationskonstante K_d ist ein Maß für die Stabilität eines Komplexes. Die Komplexbildung eines immobilisierten Liganden (L) und eines Analyten (A) kann mathematisch beschrieben werden:

$$K_d = \frac{[A] \cdot [L]}{[AL]}$$

Die Dissoziationskonstante kann aus den Biacore-Messungen bestimmt werden (Farr et al. 1999). Hierzu wird die Sättigungskurve ($\Delta RU = f([A_{tot}])$) durch Auftragung der maximalen

Signalzunahme der Einzelmessungen gegen die totale Analytkonzentration aus freiem und gebundenem Analyten bestimmt. Durch eine gleichzeitige computergestützte Anpassung der drei Parameter ΔRU_{\max} (maximal mögliche Signalzunahme), $[L_{\text{tot}}]$ (Konzentration des immobilisierten Liganden) und der Dissoziationskonstanten K_d an die Sättigungskurve über die folgende Gleichung erhält man die Dissoziationskonstante.

$$\Delta RU = \frac{\Delta RU_{\max}}{[L_{\text{tot}}]} \cdot \left(\frac{[K_d] + [L_{\text{tot}}] + [A_{\text{tot}}]}{2} - \sqrt{-[L_{\text{tot}}] \cdot [A_{\text{tot}}] + \left(\frac{[K_d] + [L_{\text{tot}}] + [A_{\text{tot}}]}{2} \right)^2} \right)$$

Diese Gleichung resultiert aus einer schrittweisen Substitution ausgehend von dem Ausdruck für die Dissoziationskonstante (f = frei; b = gebunden):

$$K_d = \frac{[A] \cdot [L]}{[AL]}$$

$$K_d = \frac{([L_{\text{tot}}] - [A_b]) \cdot ([A_{\text{tot}}] - [A_b])}{[A_b]}$$

$$[A_b] = \frac{\Delta RU \cdot [L_{\text{tot}}]}{\Delta RU_{\max}}$$

Kapitel 4 Beschreibung der Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen den latenten Gelatinasen und ihren natürlichen Inhibitoren, den TIMPs. Das besondere Augenmerk lag dabei auf der Bedeutung der Hämopexin-ähnlichen Domänen. Daher sollten diese rekombinant dargestellt und anschließend ihre Interaktion mit den TIMPs näher analysiert werden. Auf Grund der Arbeiten von Brooks *et al.* ist auch eine Interaktion der Hämopexin-ähnlichen Domäne der Gelatinase A mit dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ von großem Interesse (Brooks *et al.* 1996 und 1998). In Ergänzung zu diesen Arbeiten sollten mögliche Wechselwirkungen der Hämopexin-ähnlichen Domäne der Gelatinase B mit Integrinen untersucht werden.

Als Grundlage für diese Arbeiten diente die während der Diplomarbeit in *E. coli* dargestellte und aufgereinigte Hämopexin-ähnliche Domäne der Gelatinase A (Stute 1998). Für die weiterhin durchgeführten Klonierungen stand dem Arbeitskreis eine full-length cDNA der Gelatinase A und eine cDNA codierend für den C-terminalen Teil (Typ V Kollagen-Domäne, Hinge-Region und Hämopexin-ähnliche Domäne) der Gelatinase B zur Verfügung (Kooperation mit Dr. Pourmotabbed, University of Tennessee, Memphis, USA).

Ergänzend zu diesen Arbeiten sollte die Fibronectin-ähnliche Domäne der Gelatinase A im Großmaßstab dargestellt und in Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut (MPI) in Martinsried die Kristallstruktur aufgeklärt werden. Weiterhin war der mögliche Einfluss einer Glykosylierung auf die Stabilität der katalytischen Domäne der Gelatinase B gegenüber einer Autolyse von Interesse. Hierfür sollte diese Domäne in dem Hefesystem *Pichia pastoris* exprimiert und anschließend charakterisiert werden.

4.1 Die Fibronectin-ähnliche Domäne der Gelatinase A

Für die Aufklärung der Kristallstruktur der Fibronectin-ähnlichen Domäne der Gelatinase A wurde unter Verwendung des etablierten Expressionssystems (Stute 1998) die gewünschte Domäne im Großmaßstab hergestellt (Abbildung 19).

Das rekombinante Protein wurde hierbei in Form von "inclusion bodies" (IBs) abgelagert. Diese konnten nur unter völliger Denaturierung der Proteine (8 M Harnstoff und 100 mM β -Mercaptoethanol) aufgeschlossen werden. Die Aktivierung der denaturierten Domäne erfolgte im RedOx-"shuffling"-System. In Gegenwart von Zink(II)- und Calcium(II)-Ionen katalysiert das System aus oxidiertem Glutathion und Dithiothreitol die Bildung von Disulfidbrücken.

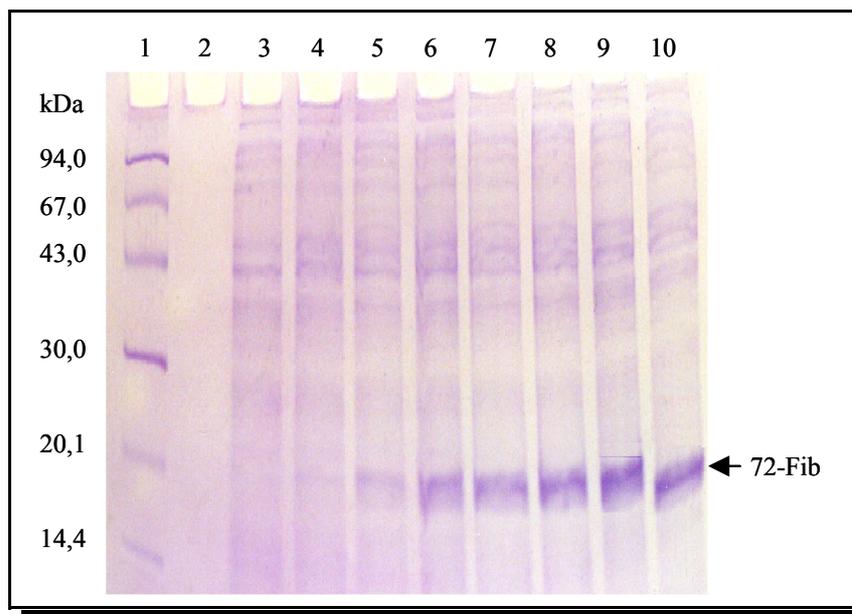


Abbildung 19: Expression der Fibronectin-ähnlichen Domäne der Gelatinase A. Analyse der Proteinmengen im PAA-Gel mit "Coomassie Blue" angefärbt.
Bahn 1: LMW-Marker
Bahn 3: Proteine der *E. coli* Bakterien vor der Induktion mit IPTG
Bahn 4-10: In adäquaten Abständen entnommene Kultur nach Induktion (Proteine nach 15 min, 30 min, 60 min, 90 min, 2 h, 3 h, 4 h)

Die Reinigung des Expressionsproduktes erfolgte mittels Affinitätschromatographie an Gelatin-Sepharose. Hierbei bindet die Fibronectin-ähnliche Domäne spezifisch an Gelatin, während *E. coli* Proteine nicht gebunden werden. Die Elution des reinen, aktiven Proteins erfolgte mit einem DMSO-haltigen Puffer (Abbildung 20).

Durch dieses effiziente Verfahren konnten mehrere Chargen der Fibronektin-ähnlichen Domäne der Gelatinase A mit verschiedenen Pufferzusammensetzungen für die Kristallisation und Strukturaufklärung bereitgestellt werden.

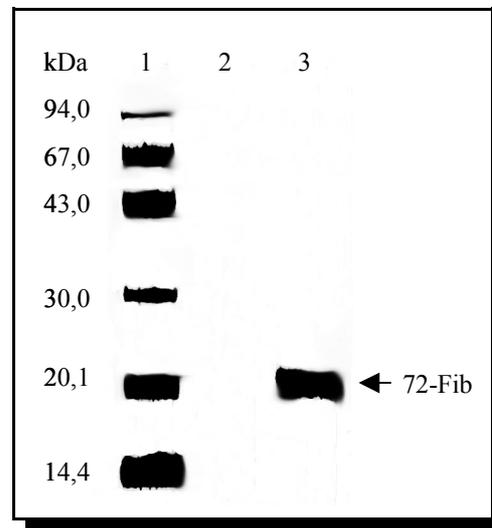


Abbildung 20: Reinigungskontrolle der Fibronektin-ähnlichen Domäne der Gelatinase A. Proteine im PAA-Gel mit Silber angefärbt.

Bahn 1: LMW-Marker

Bahn 3: Gereinigtes Protein nach Affinitätschromatographie an Gelatin-Sepharose

4.2 Die Hämopexin-ähnliche Domäne der Gelatinase A aus *E. coli*

4.2.1 Überführung der Hämopexin-ähnlichen Domäne in die native Konformation

Die während der Diplomarbeit dargestellte Variante der Hämopexin-ähnlichen Domäne der Gelatinase A (Ala⁴⁴⁷-Cys⁶⁶⁰) lag aufgrund der Isolierung des Proteins aus *E. coli* "inclusion bodies" und der daran anschließenden Aufreinigungsstrategie in denaturierter Form vor (Stute 1998). Für eine Untersuchung der Interaktion mit TIMPs musste das gereinigte Protein in seine native Konformation übergeführt werden.

Eine Möglichkeit der Faltung bestand in einer Dialyse gegen nicht-denaturierende Puffer. Bei diesem Verfahren werden Harnstoff und β -Mercaptoethanol dem Probenpuffer entzogen und das Protein kann so seine natürliche Struktur ausbilden.

Ein zweiter Ansatz beruhte auf dem sogenannten RedOx-"shuffling"-System. Dieses Verfahren wurde nach Creighton modifiziert und in der Arbeitsgruppe für die Faltung von Proteinen mit Disulfidbrücken eingeführt (Creighton 1990, Bucher 1992). Das System aus oxidiertem Glutathion (GSSG) und Dithiothreitol (DTT) katalysiert die Bildung der Disulfidbrücken. Durch eine große Verdünnung sowie die Zugabe von Arginin werden intermolekulare Wechselwirkungen der Enzyme minimiert.

4.2.2 Charakterisierung der Hämopexin-ähnlichen Domäne

Mit Hilfe einer Gelelektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen sollte eine Komplexbildung zwischen der Hämopexin-ähnlichen Domäne der Gelatinase A und TIMP-2 dokumentiert werden. Dieser bekannte Komplex diente zur Überprüfung der nativen Konformation der Hämopexin-ähnlichen Domäne. Da allerdings keine Komplexbildung nachgewiesen werden konnte, war davon auszugehen, dass die Hämopexin-ähnliche Domäne nicht in ihrer nativen Konformation vorlag. Dieses Ergebnis wurde durch spätere Untersuchungen bestätigt, da die aus *E. coli* stammende Domäne sowohl durch das Enzym Trypsin als auch durch die MMP-12 gespalten wurde, wo hingegen keine Spaltung bei der in *Pichia pastoris* exprimierten Domäne (siehe 4.3) stattfand, da die Spaltstellen bei der nativen Konformation nicht zugänglich waren (Abbildung 21).

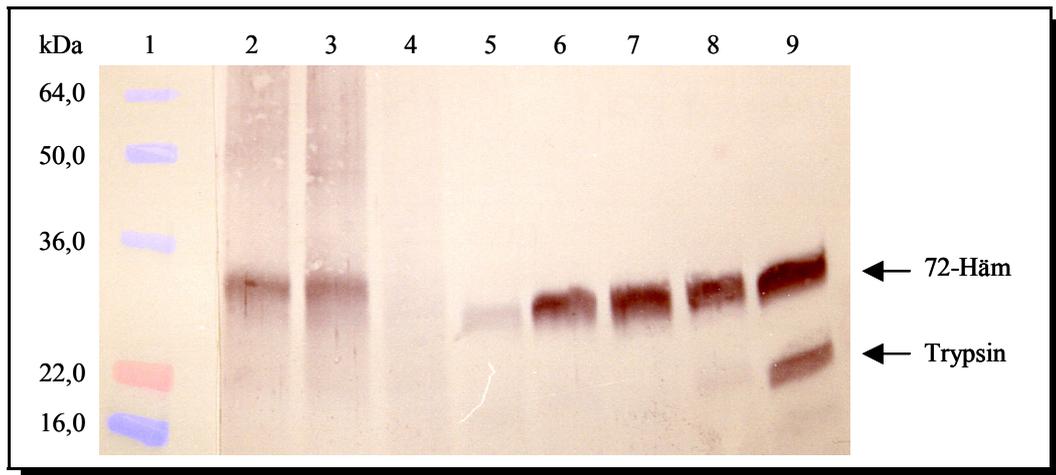


Abbildung 21: Überprüfung des proteolytischen Abbaus der in *E. coli* (Bahnen 2-5) und *Pichia pastoris* (Bahnen 6-9) exprimierten Hämopexin-ähnlichen Domäne der Gelatinase A durch verschiedene Enzyme. Proteine im PAA-Gel mit Silber angefärbt.

Bahn 1: SeeBlue®Plus2-Marker

Bahn 2: keine Spaltung durch MT1-MMP

Bahn 3: keine Spaltung durch MMP-8

Bahn 4: Spaltung durch MMP-12

Bahn 5: Spaltung durch Trypsin

Bahn 6: keine Spaltung durch MT1-MMP

Bahn 7: keine Spaltung durch MMP-8

Bahn 8: keine Spaltung durch MMP-12

Bahn 9: keine Spaltung durch Trypsin

4.3 Die Hämopexin-ähnliche Domäne der Gelatinase A aus *P. pastoris*

Aufgrund der denaturierten Konformation der Hämopexin-ähnlichen Domäne aus *E. coli* wurde eine Darstellung im Expressionssystem *Pichia pastoris* durchgeführt. Dieses eukaryotische System zeichnet sich durch die Möglichkeit einer sekretorischen Expression nativer Proteine aus.

4.3.1 Amplifizierung der cDNA

Zur rekombinanten Darstellung der Hämopexin-ähnlichen Domäne wurde zunächst die Protein-kodierende cDNA mittels PCR aus der vorhandenen Gesamtsequenz der Gelatinase A selektiv amplifiziert. Voraussetzung für die gezielte Amplifizierung war die Entwicklung spezifischer Oligonukleotide (siehe Anhang (Kapitel 7)), die die gewünschte Domäne flankierten und Restriktionsschnittstellen für die Enzyme *XhoI* und *NotI* enthielten. Außerdem verfügte der sogenannte “forward-primer” am 5’-Ende über Sequenzen des α -Faktors, die ansonsten bei einer Klonierung über die *XhoI* Schnittstelle des Expressionsvektors entfallen wären. Die Transkription des gewünschten Fragments erfolgte mit Hilfe eines optimierten PCR-Protokolls. Die amplifizierten Produkte wurden im Agarosegel analysiert (Abbildung 22).

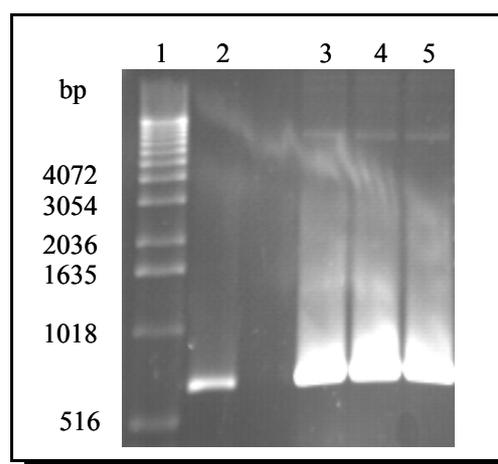


Abbildung 22: Größenbestimmung der PCR-Produkte im Agarosegel. EtBr gefärbtes DNA-Agarosegel, unter UV-Licht fotografiert.

Bahn 1: 1 kb-Leiter

Bahn 2: PCR-Produkt aus 72-Häm/pET12b “template”

Bahn 3-5: PCR-Produkte aus proMMP-2/pET15 “template”

4.3.2 Klonierung in den Expressionsvektor pPICZ α A

Aufgrund der "template"-unabhängigen Polymeraseaktivität waren die PCR-Produkte am 3'-Ende mit einem Adenosin versehen. Dieser 3'-A-Überhang diente der Einführung in einen linearisierten Vektor mit angefügtem 3'-Thymidin. So wurden die Amplifikate erwarteter Größe mit dem Vektor pGEM-T ligiert und der *E. coli* Stamm [JM 109] mit dem entstandenen Plasmid transformiert. Anhand des X-Gal-Tests wurden positive Transformanden selektiert und durch Restriktionsanalyse (Abbildung 23 A) analysiert.

Die cDNA eines positiven Transformanden konnte, über die mit den PCR-"primern" eingeführten Schnittstellen, mit dem Expressionsvektor pPICZ α A ligiert werden und *E. coli* Bakterien des Stammes [XL1blue MRF'] wurden mit dem rekombinanten Plasmid transformiert. Positive Klone konnten durch eine Restriktionsanalyse (Abbildung 23 B) und DNA-Sequenzierung identifiziert werden.

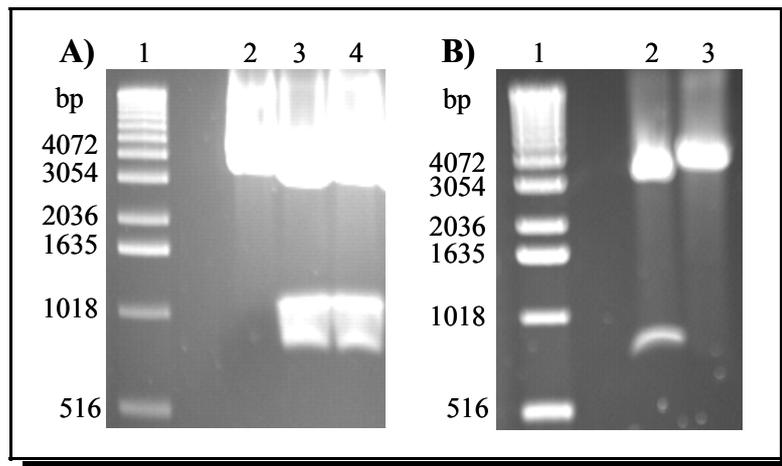


Abbildung 23: Restriktionsanalyse der Plasmide A) 72-Häm/pGEM-T und B) 72-Häm/pPICZ α A. EtBr gefärbtes DNA-Agarosegel, unter UV-Licht fotografiert.

A) Bahn 1: 1 kb-Leiter

Bahn 2-4: *XhoI/NotI* Hydrolyse unterschiedlicher 72-Häm/pGEM-T Plasmide

B) Bahn 1: 1 kb-Leiter

Bahn 2-3: *XhoI/NotI* Hydrolyse unterschiedlicher 72-Häm/pPICZ α A Plasmide

Durch anschließende DNA-Sequenzierung wurden die Klone in den Bahnen A) 3 und B) 2 als positiv identifiziert.

4.3.3 Etablierung eines Expressionssystems in *Pichia pastoris*

Nach der Klonierung des entsprechenden Expressionsplasmids wurde dieses durch Behandlung mit dem Restriktionsenzym *PmeI* linearisiert. Hierdurch wurde eine homologe Rekombination innerhalb des *AOX1*-Lokus des Hefe Genoms ermöglicht. Hefezellen der Stämme [KM 71], [GS 115] und [X 33] wurden unter Verwendung der Lithiumchlorid-Methode mit der linearisierten DNA transformiert und auf Zeocin[®]-haltigen Nährböden als Selektionsmedium kultiviert.

Die nach 72 Stunden gewachsenen Klone wurden für Testexpressionen im 25 mL Maßstab eingesetzt und der Expressionsverlauf zeitabhängig mittels SDS-PAGE verfolgt. Der am stärksten exprimierende Klon wurde für die Expression im Großmaßstab ausgewählt (Abbildung 24) und das Expressionsprodukt durch Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz identifiziert (NH₂-ASPDIDLG). Somit konnte für die Darstellung der Hämopexin-ähnlichen Domäne der Gelatinase A erfolgreich das Expressionssystem 72-Häm/pPICZ α A/[KM 71] etabliert werden.

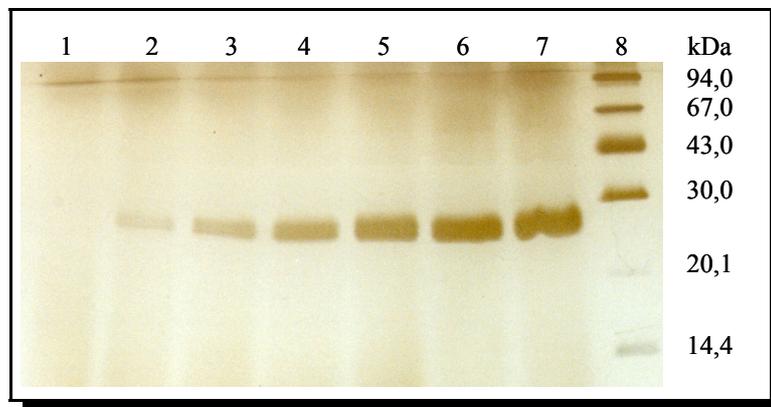


Abbildung 24: Zeitlicher Verlauf der Expression der Hämopexin-ähnlichen Domäne der Gelatinase A im *Pichia pastoris* Stamm [KM 71]. Analyse der Proteinmengen im PAA-Gel mit Silber angefärbt.

Bahn 1: Vor Induktion der Expression entnommene Kultur

Bahn 2-7: In Tagesabständen entnommene Kultur nach Induktion

Bahn 8: LMW-Marker

4.3.4 Reinigung des Expressionsproduktes

Nach der Expression der Hämopexin-ähnlichen Domäne der Gelatinase A wurde ein Reinigungsverfahren entwickelt. In dem gewählten Expressionssystem wurde das

rekombinante Protein in das Kulturmedium sezerniert. Dieses Medium wurde durch Zentrifugation von den Hefezellen abgetrennt und gegen einen nicht-denaturierenden Tris-Puffer dialysiert. Durch eine Kombination von Ionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose (NaCl-Gradient 0-500 mM) und Gelfiltration mit Sephacryl S 300 HR konnte das Protein bis zur Homogenität gereinigt werden. Die SDS-PAGE-Analyse der erhaltenen Fraktionen zeigt im Vergleich zum Kulturmedium keine Verunreinigungen mehr (Abbildung 26).

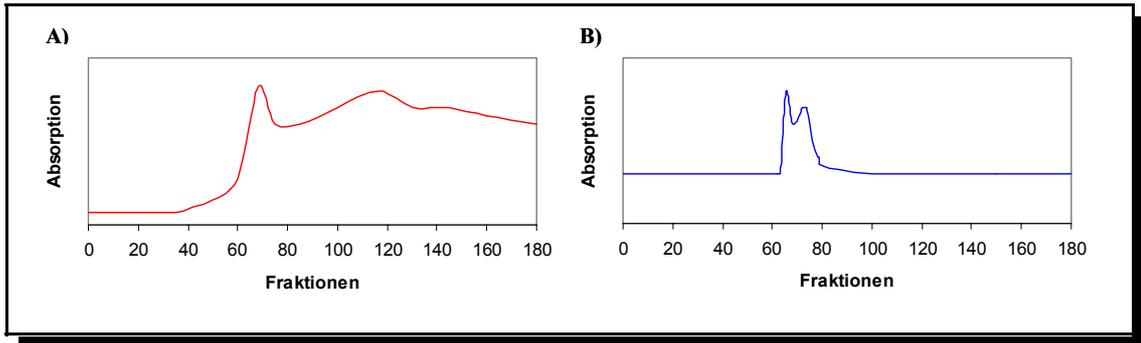


Abbildung 25: Repräsentative Elutionsprofile der Reinigung der Hämopexin-ähnlichen Domäne der Gelatinase A

A) Ionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose.

Das gewünschte Protein wurde in den Fraktionen 66-81 eluiert.

B) Gelfiltration an Sephacryl S 300 HR.

Das gewünschte Protein wurde in den Fraktionen 64-68 eluiert.

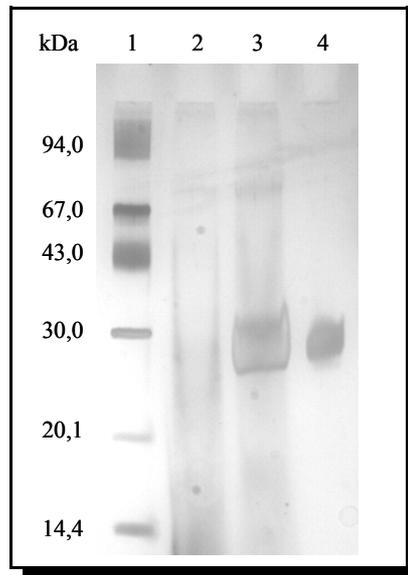


Abbildung 26: Reinigung der Hämopexin-ähnlichen Domäne der Gelatinase A. Proteine im PAA-Gel mit Silber angefärbt.

Bahn 1: LMW-Marker

Bahn 2: Kulturüberstand vor der Induktion

Bahn 3: Kulturüberstand nach der Expression

Bahn 4: Gereinigtes Protein nach Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration

4.4 Die Hämopexin-ähnliche Domäne der Gelatinase B aus *P. pastoris*

Analog der Gelatinase A Domäne sollte ebenfalls die Hämopexin-ähnliche Domäne der Gelatinase B (Thr⁴⁹⁸-Asp⁷⁰⁷) in *Pichia pastoris* exprimiert werden.

4.4.1 Amplifizierung der cDNA

Voraussetzung für die rekombinante Darstellung der Hämopexin-ähnlichen Domäne der Gelatinase B war die spezifische Anreicherung der Protein-kodierenden cDNA aus der dem Arbeitskreis zur Verfügung stehenden “template”-DNA mittels PCR-Technik. Für die korrekte Amplifizierung wurden spezifische Oligonukleotide (siehe Anhang (Kapitel 7)) eingesetzt, die sowohl Restriktionsschnittstellen als auch das zu ersetzende Fragment des α -Faktors enthielten. Mit dem im Vorfeld erarbeiteten PCR-Protokoll wurde die cDNA-Synthese durchgeführt. Die erfolgreiche Transkription des gewünschten Produktes wurde im Agarosegel analysiert (Abbildung 27).

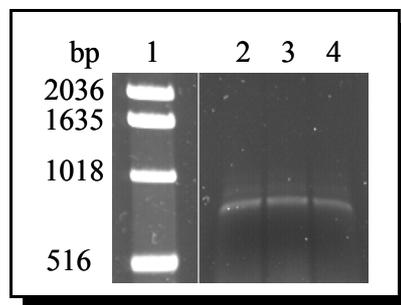


Abbildung 27: Größenbestimmung der PCR-Produkte im Agarosegel. EtBr gefärbtes DNA-Agarosegel, unter UV-Licht fotografiert.
Bahn 1: 1 kb-Leiter
Bahn 2-4: PCR-Produkte

4.4.2 Klonierung in den Expressionsvektor pPICZ α A

Aufgrund der verwendeten Polymerase musste das PCR-Produkt durch eine Nachbehandlung mit einer “template”-unabhängigen Polymerase mit einem A-Überhang versehen werden. So konnte das Amplifikat direkt mit dem Vektor pCR2.1-TOPO ligiert und der *E. coli* Stamm [JM 109] mit dem entstandenen Plasmid transformiert werden. Anhand des

X-Gal-Tests wurden positive Transformanden selektiert und durch Restriktionsanalyse (Abbildung 28 A) charakterisiert.

Die für die Hämopexin-ähnliche Domäne kodierende cDNA wurde für anschließende Expressionsversuche subkloniert. Über die bei der PCR eingeführten Restriktionsschnittstellen *XhoI* und *NotI* wurde zunächst die Ligation in den Expressionsvektor pPICZ α A vorgenommen und *E. coli* Bakterien vom Typ [XL1blue MRF'] mit dem entstandenen Plasmid transformiert. Positive Klone konnten durch Restriktionsanalyse (Abbildung 28 B) und DNA-Sequenzierung identifiziert werden.

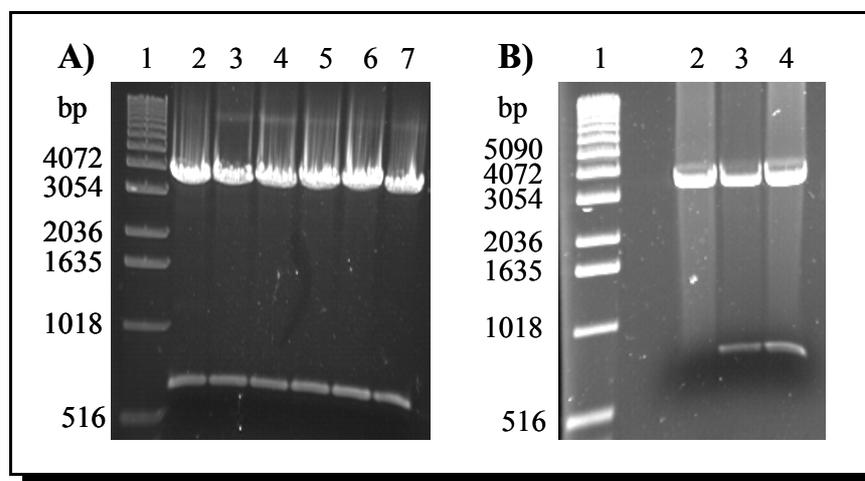


Abbildung 28: Restriktionsanalyse der Plasmide A) 92-Häm/pCR2.1-TOPO und B) 92-Häm/pPICZ α A. EtBr gefärbtes DNA-Agarosegel, unter UV-Licht fotografiert.

A) Bahn 1: 1 kb-Leiter

Bahn 2-7: *XhoI/NotI* Hydrolyse unterschiedlicher 92-Häm/pCR2.1-TOPO Plasmide

B) Bahn 1: 1 kb-Leiter

Bahn 2-7: *XhoI/NotI* Hydrolyse unterschiedlicher 92-Häm/pPICZ α A Plasmide

Durch anschließende DNA-Sequenzierung wurden die Klone in den Bahnen A) 2 und B) 3 als positiv identifiziert.

4.4.3 Etablierung eines Expressionssystems in *Pichia pastoris*

Das entsprechende Expressionsplasmid konnte durch eine Linearisierung mit dem Restriktionsenzym *SacI* homolog mit dem Hefegenom rekombiniert werden. Für die Transformation der Hefestämme [KM 71], [GS 115] und [X 33] wurde die Lithiumchlorid-Methode verwendet. Die Kultivierung der Transformanden erfolgte unter Selektionsdruck auf Zeocin[®]-haltigen Nährbodenplatten.

Die gewachsenen Klone wurden für Testexpressionen eingesetzt und der Expressionsverlauf zeitabhängig mittels SDS-PAGE verfolgt. Der am stärksten exprimierende Klon wurde für weitere Expressionen im Großmaßstab ausgewählt. Sowohl die elektrophoretische Auftrennung der Expressionsprodukte (Abbildung 29) als auch deren N-terminale Sequenzierungen zeigten zwei Varianten der Hämopexin-ähnlichen Domäne. Es konnte ein Protein mit dem erwarteten N-Terminus NH₂-TAGPSTATTVPL und eine um die ersten vier Aminosäuren verkürzte Variante identifiziert werden. Somit konnte für die Darstellung der Hämopexin-ähnlichen Domäne der Gelatinase B das Expressionssystem 92-Häm/pPICZαA/[GS 115] erfolgreich etabliert werden.

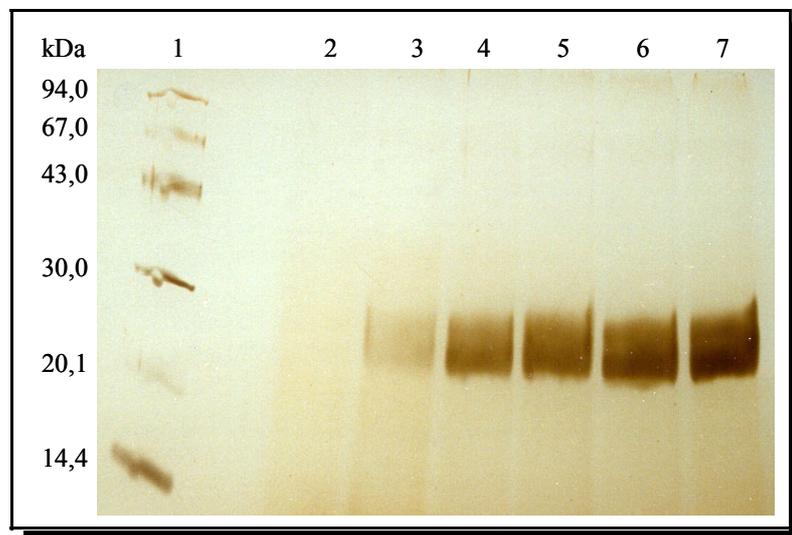


Abbildung 29: Zeitlicher Verlauf der Expression der Hämopexin-ähnlichen Domäne der Gelatinase B im *Pichia pastoris* Stamm [GS 115]. Analyse der Proteinmengen im PAA-Gel mit Silber angefärbt.

Bahn 1: LMW-Marker

Bahn 2: Vor Induktion der Expression entnommene Kultur

Bahn 3-7: In Tagesabständen entnommene Kultur nach Induktion

4.4.4 Reinigung des Expressionsproduktes

Die Reinigung des Expressionsproduktes erfolgte analog dem etablierten Verfahren zur Reinigung der Hämopexin-ähnlichen Domäne der Gelatinase A. Das Kulturmedium wurde durch Zentrifugation von den Hefezellen abgetrennt und gegen nicht-denaturierenden Tris-Puffer dialysiert. Durch die Kombination von Ionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose (NaCl-Gradient 0-500 mM) und Gelfiltration mit Sephacryl S 300 HR konnte

das Protein ebenfalls bis zur Homogenität gereinigt werden. Die Reinheit des Proteins wurde durch SDS-PAGE analysiert (Abbildung 31).

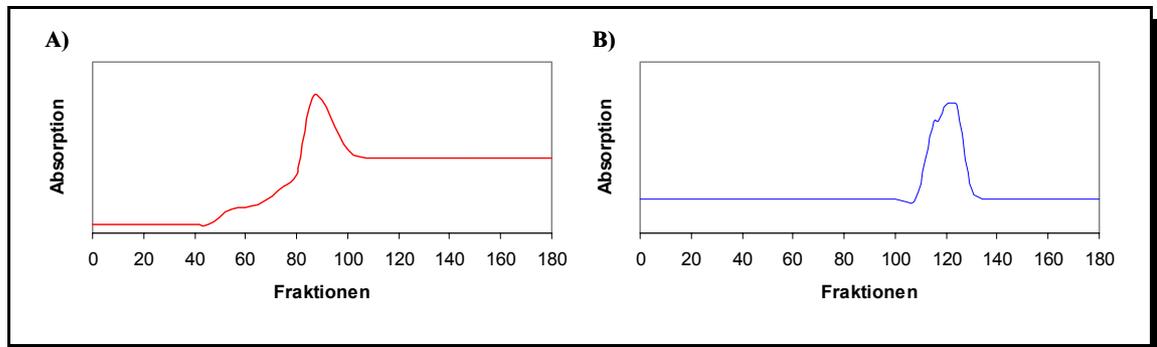


Abbildung 30: Repräsentative Elutionsprofile der Reinigung der Hämopexin-ähnlichen Domäne der Gelatinase B.

A) Ionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose.

Das gewünschte Protein wurde in den Fraktionen 85-100 eluiert.

B) Gelfiltration an Sephacryl S 300 HR.

Das gewünschte Protein wurde in den Fraktionen 118-128 eluiert.

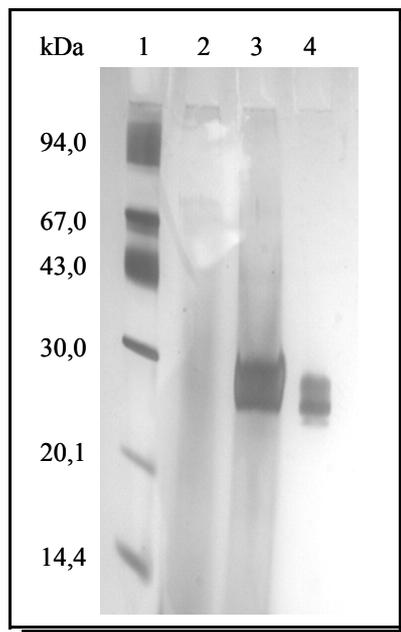


Abbildung 31: Reinigung der Hämopexin-ähnlichen Domäne der Gelatinase B. Proteine im PAA-Gel mit Silber angefärbt.

Bahn 1: LMW-Marker

Bahn 2: Kulturüberstand vor der Induktion

Bahn 3: Kulturüberstand nach der Expression

Bahn 4: Gereinigtes Protein nach Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration

4.5 Bereitstellung eines Komplexes aus der Hämopexin-ähnlichen Domäne der Gelatinase B und rekombinantem TIMP-1

Für die Untersuchung der Eigenschaften eines Komplexes aus Hämopexin-ähnlicher Domäne der Gelatinase B und TIMP-1 stand dem Arbeitskreis ein in *E. coli* exprimierter TIMP-1 zur Verfügung. Dieser war bereits zur Homogenität gereinigt, lag allerdings noch in denaturierter Form vor.

Die Faltung erfolgte auf der Basis des RedOx-„shuffling“-Systems nach einer Methode von Hodges (Hodges et al. 1998). Durch dieses Verfahren konnte der TIMP-1 in seine native Konformation übergeführt werden. Inhibierungsstudien mit der katalytischen Domäne der MMP-8 ergaben eine Ausbeute von 70% aktivem und damit korrekt gefaltetem TIMP-1.

Die Komplexbildung der Hämopexin-ähnlichen Domäne der MMP-9 und TIMP-1 erfolgte entweder für 30-60 Minuten bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Durch anschließende Gelfiltration unter nicht-denaturierenden Bedingungen konnte der Komplex von überschüssigen Edukten isoliert werden (Abbildungen 32 und 33).

Aufgrund der denaturierenden Bedingungen einer SDS-Gelelektrophorese ist nur ein indirekter Nachweis der Komplexbildung möglich. Allerdings kann durch die zeitversetzte Elution von reinem TIMP-1 und TIMP-1 in Verbindung mit 92-Häm auf einen Komplex zurückgeschlossen werden.

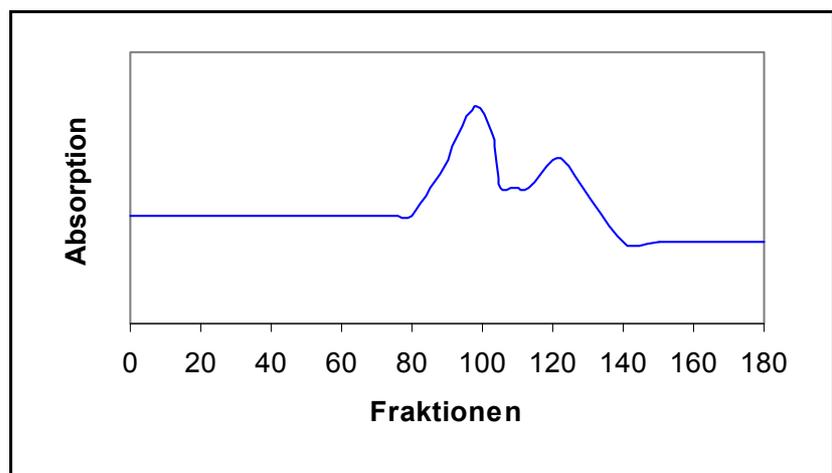


Abbildung 32: Repräsentatives Elutionsprofil der Reinigung des Komplexes aus Hämopexin-ähnlicher Domäne der Gelatinase B und rekombinantem TIMP-1 durch Gelfiltration an Sephacryl S 300 HR. In den Fraktionen 90-98 wurde der Komplex und in den Fraktionen 120-123 überschüssiger TIMP eluiert.

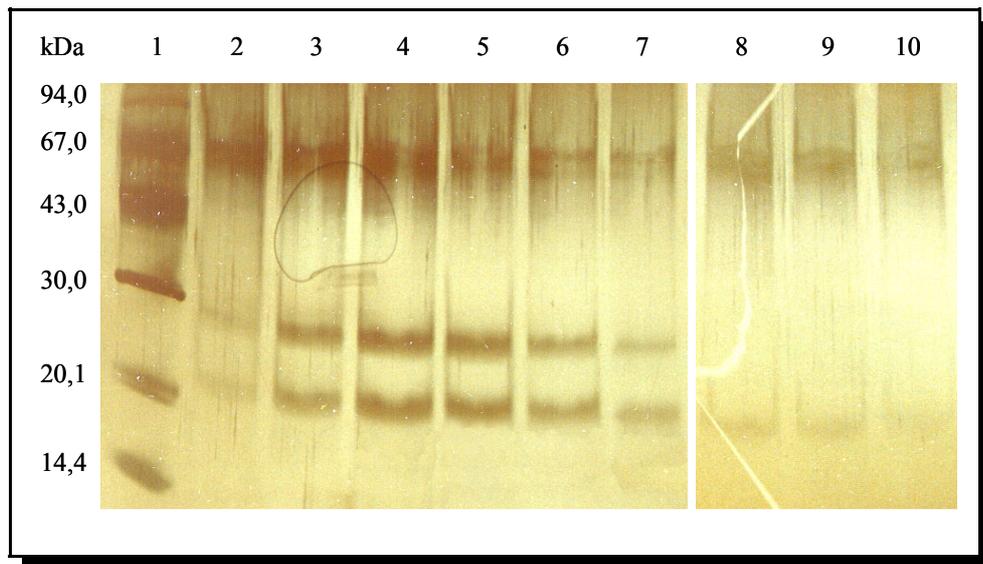


Abbildung 33: SDS-PAGE nach Isolierung des 92-Häm/TIMP-1-Komplexes von überschüssigem TIMP-1 mittels Gelfiltration. Proteine mit Silber angefärbt.

Bahn 1: LMW-Marker

Bahn 2-7: Elution des 92-Häm/TIMP-1-Komplexes (Fraktionen 90-98 der Gelfiltration)

Bahn 8-10: Elution von überschüssigem TIMP (Fraktionen 120-123 der Gelfiltration)

4.6 Biomolekulare Interaktionsanalyse

Die biomolekulare Interaktionsanalyse stellt eine effiziente Echtzeitmethode zur Untersuchung von Protein-Protein-, aber auch DNA-Protein-Wechselwirkungen dar. Mit diesem Verfahren sollte die Komplexbildung zwischen den Hämopexin-ähnlichen Domänen der Gelatinasen und den TIMPs, aber auch Integrinen, untersucht werden. Die erzielten Ergebnisse sollten neue Erkenntnisse über mögliche Bindungspartner und den zugrunde liegenden Bindungsmechanismus geben.

Für diese Untersuchungen wurde ein Biacore 3000[®]-Instrument mit CM5-Sensorchip verwendet. Die spätere Auswertung der Messdaten erfolgte mit dem Programm "Origin[®] 5.0" von Microcal.

4.6.1 Biacore-Messungen

Für die Messungen mit Biacore-Geräten wird ein Komplexpartner (Ligand) an die Chipoberfläche gekoppelt. Vorversuche ergaben, dass sowohl die Hämopexin-ähnlichen Domänen als auch die TIMPs für eine Kopplung an die Oberflächenmatrix geeignet sind. Aufgrund der beschränkten Verfügbarkeit und der Vergleichbarkeit mit schon bekannten Untersuchungen (Olson et al. 1997) wurden die TIMPs als Liganden ausgewählt.

Für die Kopplung (Immobilisierung) der Liganden an die Oberfläche wurde die Carboxydextranmatrix durch eine Mischung aus N-Ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) aktiviert. Der entstandene Succinimidester reagierte spontan mit dem Liganden bis zu einer Bindungsrate von ca. hundert "response units" (RU). Überschüssige aktive Ester wurden durch Ethanolamin deaktiviert. Anschließend wurde die Messzelle mit Phosphatpuffer äquilibriert.

Um Serien von Komplexassoziations- und Dissoziationszyklen auf einer einzelnen Sensorchipoberfläche durchführen zu können, musste eine vollständige Regeneration der Chipoberfläche ohne Zerstörung des Liganden gewährleistet werden. Hierzu wurden verschiedene Regenerationsmethoden getestet. Es stellte sich heraus, dass ein 30 s Puls mit 20 mM HCl (Flussrate 100 µL/min) eine vollständige Dissoziation des Komplexes bewirkt. Zur Äquilibrierung folgte ein 90 s Puls mit Phosphatpuffer (Flussrate 100 µL/min). Die eigentliche Komplexierung erfolgte bei einer Flussrate von 30 µL/min.

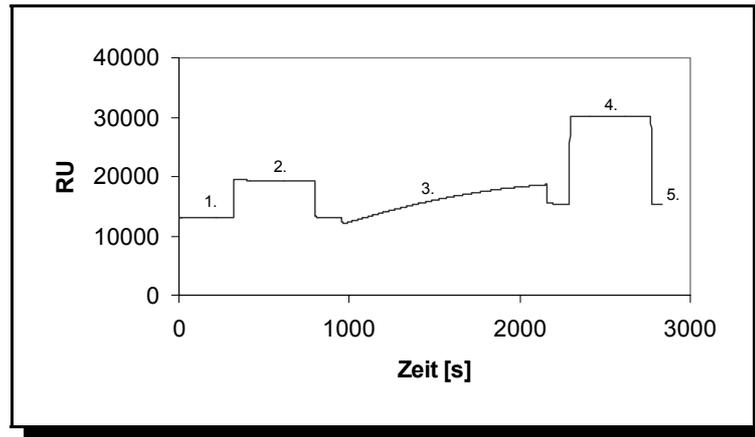


Abbildung 34: Repräsentatives Sensorgramm für die Immobilisierung eines Liganden. 1.) Grundlinie des unmodifizierten Sensorchips, 2.) Injektion von EDC/NHS zur Aktivierung der Oberfläche, 3.) Injektion des Liganden, 4.) Deaktivierung überschüssiger aktiver Ester mit 1 M Ethanolamin-HCl (pH 8,5), 5.) Grundlinie des immobilisierten Sensorchips.

4.6.1.1 Komplexe aus Hämopexin-ähnlichen Domänen und TIMPs

Für den Komplex aus Hämopexin-ähnlicher Domäne der Gelatinase A und bovinem TIMP-2 wurden Konzentrationen von 773,7 nM, 386,9 nM, 193,4 nM, 77,4 nM und 25,8 nM an 72-Häm eingesetzt (Abbildung 35).

Die Abnahme der “response units” am Ende der Assoziationsphase ist auf unspezifische Wechselwirkungen an der Chipoberfläche zurückzuführen. Derselbe Effekt wurde an einer nicht immobilisierten Kontrolloberfläche beobachtet. Für die spätere Auswertung wurde der Gleichgewichtswert bei 870 s verwendet.

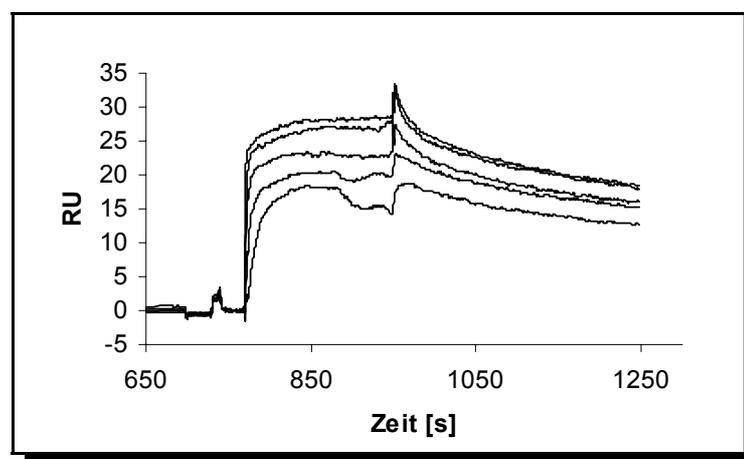


Abbildung 35: Sensorgramm der Komplexbildung zwischen der Hämopexin-ähnlichen Domäne der Gelatinase A und b-TIMP-2. Die Konzentrationen an 72-Häm betragen 773,7 nM, 386,9 nM, 193,4 nM, 77,4 nM und 25,8 nM.

Für den 92-Häm/TIMP-1-Komplex wurden zwei unterschiedliche TIMP-1-Varianten verwendet. Die erste Versuchsreihe wurde mit rekombinantem TIMP aus *E. coli* durchgeführt. Die Konzentrationen der Hämopexin-ähnlichen Domäne betragen dabei 3175 nM, 2116,7 nM, 1587,5 nM, 1058,3 nM, 793,8 nM, 317,5 nM, 105,8 nM, 52,9 nM und 31,8 nM (Abbildung 36 A).

Bei einer späteren Wiederholung der Messungen wurde rekombinanter TIMP-1 aus Säugetierzellen (CHO-Zellen) verwendet. Dieser TIMP ist im Gegensatz zum *E. coli* Produkt glykosyliert. Bei dieser Versuchsreihe wurden folgende Konzentrationen der 92-Häm eingesetzt: 150 nM, 60 nM, 30 nM, 15 nM, 10 nM und 5 nM (Abbildung 36 B).

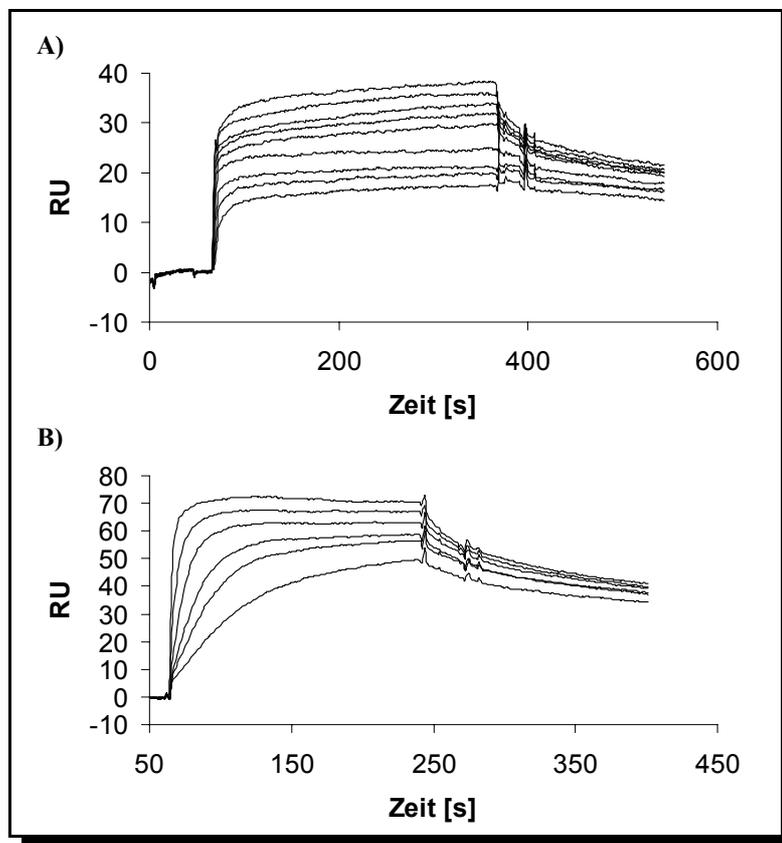


Abbildung 36: Sensorgramme für die Bindung von 92-Häm an rekombinanten TIMP-1 aus *E. coli* (A) und rekombinanten, glykosylierten TIMP-1 aus Säugetierzellen (B). Die Konzentrationen der Hämopexin-ähnlichen Domäne betragen bei (A) 3175 nM, 2116,7 nM, 1587,5 nM, 1058,3 nM, 793,8 nM, 317,5 nM, 105,8 nM, 52,9 nM und 31,8 nM und bei (B) 150 nM, 60 nM, 30 nM, 15 nM, 10 nM und 5 nM.

Um die Spezifität dieser Komplexe zu bestätigen, wurde ebenfalls die Interaktion von 72-Häm mit TIMP-1 und von 92-Häm mit TIMP-2 untersucht. Bei diesen Kontrollexperimenten konnte aber keine Komplexbildung nachgewiesen werden.

4.6.1.2 Komplex aus proGelatinase B und TIMP-1

Vergleichend zu der Interaktionsanalyse von Hämopexin-ähnlicher Domäne und TIMP sollte auch die Komplexbildung der proGelatinase B und TIMP-1 untersucht werden. Aufgrund der Latenz des Enzyms und der damit verbundenen Blockierung der “active site” war davon auszugehen, dass die Interaktion ausschließlich über die Hämopexin-ähnliche Domäne stattfinden würde.

Um eine Wechselwirkung über die katalytische Domäne aufgrund einer autoproteolytischen Aktivierung weitgehend auszuschließen, wurde eine Mischung aus proGelatinase B und Batimastat (1:10) für die Messungen eingesetzt. Voruntersuchungen hatten keine Interaktion von Batimastat und TIMP-1 ergeben, so dass keine Beeinflussung der Messergebnisse zu erwarten war. Ebenfalls ergaben Wiederholungen der Messreihen jeweils die gleichen Ergebnisse, so dass von einem stabilen Messsystem auszugehen ist. Eine autoproteolytische Aktivierung der proGelatinase oder eine Verdrängung des Batimastats aus einem Komplex mit aktiver MMP-9 durch das immobilisierte TIMP-1 kann somit ausgeschlossen werden. Für die einzelnen Messreihen wurde die proMMP-9 in den Konzentrationen 383 nM, 191,5 nM, 95,8 nM, 47,9 nM und 38,3 nM eingesetzt (Abbildung 37).

Das Sensorgramm weist einen sehr stabilen Komplex aus, der beinahe keiner Dissoziation unterliegt. Dieses wird auch durch die Tatsache belegt, dass sich bei kleinen Konzentrationen kein Gleichgewicht zwischen Komplexassoziation und -dissoziation einstellt, sondern vielmehr ein maximales Bindungssignal für alle Messreihen angestrebt wird.

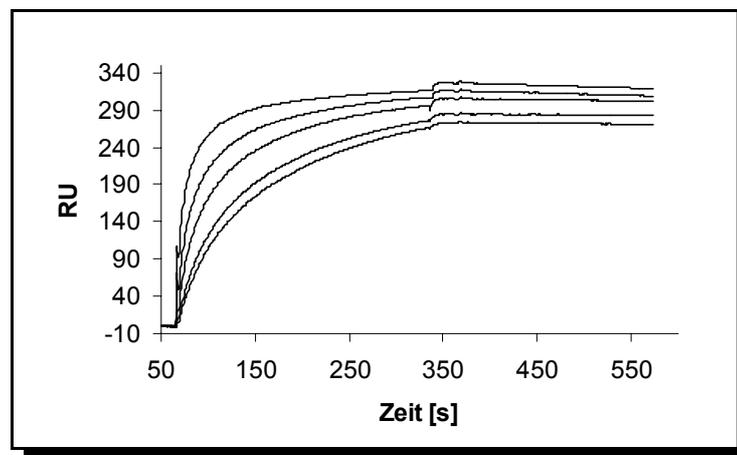


Abbildung 37: Sensorgramm der Bindung von latenter Gelatinase B (proMMP-9) an rekombinantes, glykosyliertes TIMP-1. Die proMMP-9 wurde in den Konzentrationen 383 nM, 191,5 nM, 95,8 nM, 47,9 nM und 38,3 nM eingesetzt.

4.6.1.3 Untersuchungen zu Komplexen mit TIMP-4 und Integrinen

Verschiedene Studien haben Komplexe zwischen der Hämopexin-ähnlichen Domäne der Gelatinase A und TIMP-4, sowie dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ nachgewiesen (Bigg et al. 1997, Brooks et al. 1996). Mit Hilfe der biomolekularen Interaktionsanalyse sollte überprüft werden, ob auch entsprechende Komplexe mit der Hämopexin-ähnlichen Domäne der Gelatinase B möglich sind. Damit durch die kovalente Immobilisierung des Liganden auf der Sensorchipoberfläche nicht entscheidende Bindungsstellen blockiert werden, wurden bei diesen Untersuchungen beide Komplexpartner sowohl als Ligand als auch als Analyt eingesetzt. Allerdings konnte bei keinem der Messsysteme eine Bindung nachgewiesen werden. Ein vergleichbares Resultat ergab sich bei dem System 92-Häm/Integrin $\alpha_v\beta_6$, das ebenfalls getestet wurde.

4.6.2 Bestimmung von Bindungsmechanismen und Dissoziationskonstanten

Für die Bestimmung der Bindungsmechanismen wurden die Assoziations- und Dissoziationskurven der Sensorgramme mit Standardfunktionen computergestützt angepasst. Diese Funktionen symbolisieren Reaktionsmechanismen mit einer unterschiedlichen Anzahl von Reaktionsschritten. Aufgrund der Übereinstimmung von Messkurve und angepasster Kurve konnte auf die Anzahl der Reaktionsschritte geschlossen werden.

Die Dissoziationskonstanten wurden über die Sättigung des immobilisierten Sensorchips im Gleichgewicht bestimmt. Die Sättigungskurven ließen sich aus den "response units" im Gleichgewicht und den dazugehörigen Analytkonzentrationen A_{tot} bestimmen. Eine iterative Näherung des mathematischen Ausdruckes für die Änderung des Bindungssignals $\Delta\text{RU} = f(A_{\text{tot}})$ an die experimentellen Sättigungskurven führte zur Bestimmung der Komplexdissoziationskonstanten K_d .

Die Analyse der Assoziations- und Dissoziationskurven (Abbildung 38) verdeutlichen, dass es sich bei der Komplexbildung von Hämopexin-ähnlicher Domäne der Gelatinase A und TIMP-2 nicht um einen Ein-Stufen-Mechanismus handelt, wie es von Olson *et al.* beschrieben wurde (Olson et al. 1997), sondern vielmehr um einen Zwei-Stufen-Mechanismus.

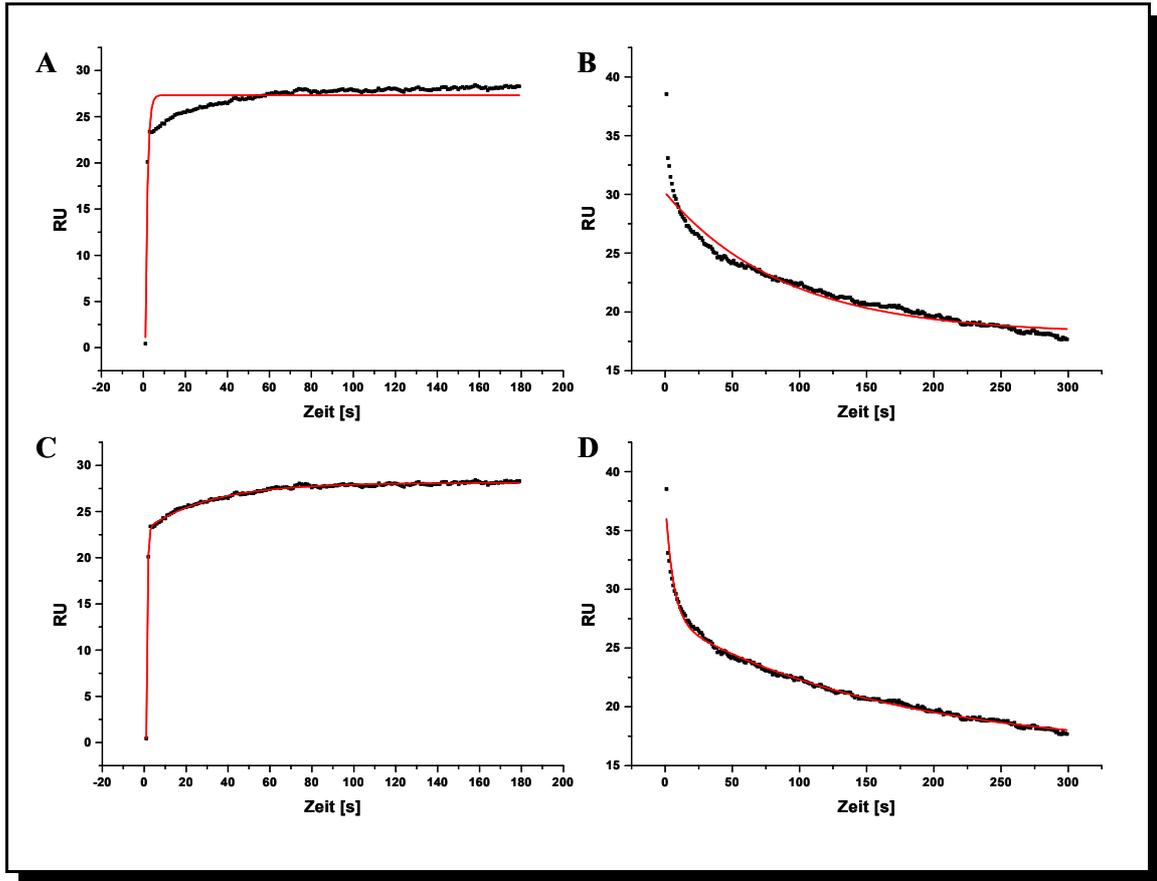


Abbildung 38: Durch eine nicht lineare Kurvenanpassung wurden die Assoziations- und Dissoziationskurven der Komplexbildung von 72-Häm und bovinem TIMP-2 analysiert. A) + B) Anpassung mit Kurvengleichung für eine Ein-Schritt-Reaktion und C) + D) Anpassung für eine Zwei-Schritt-Reaktion (■ Messkurve; — Kurvenanpassung).

	y_0 [RU]	A_1 [RU]	τ_1 [s]	A_2 [RU]	τ_2 [s]	χ^2
Ein-Schritt-Assoziation	27,33	-69,83	1,02			1,20
Zwei-Schritt-Assoziation	28,12	-166,85	0,50	-5,15	30,95	0,02
Ein-Schritt-Dissoziation	18,14	12,02	88,39			0,54
Zwei-Schritt-Dissoziation	16,21	10,18	5,96	11,23	164,31	0,07

Tabelle 6: Zusammenstellung der Parameter der computergestützten Kurvenanpassung für die Komplexbildung 72-Häm/b-TIMP-2. Der χ^2 -Wert ist ein Maß für die Güte der Anpassung.

(y_0 , maximaler RU-Wert; A_{1-2} , Amplitude der Relaxation; τ_{1-2} , Relaxationszeit)

Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten für den Komplex aus Hämopexin-ähnlicher Domäne der Gelatinase A und bovinem TIMP-2 ergab einen Wert von $0,17 \pm 0,08 \mu\text{M}$ (Abbildung 39).

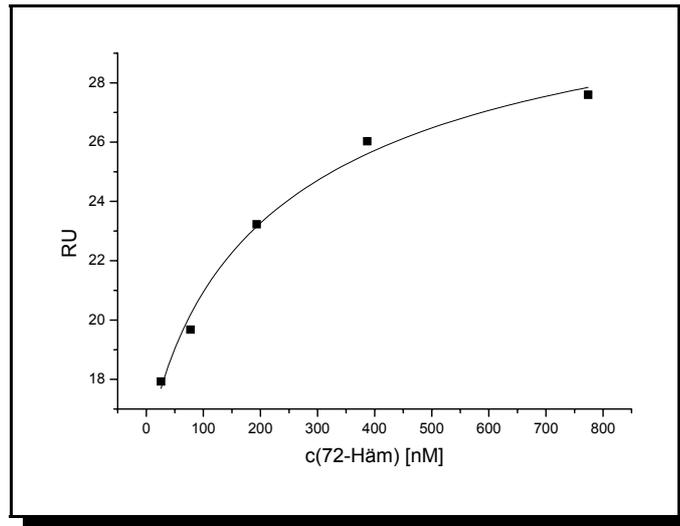


Abbildung 39: Sättigungskurve des mit bovinem TIMP-2 immobilisierten Sensorchips in Abhängigkeit von der 72-Häm Konzentration.

Für den Komplex aus Hämopexin-ähnlicher Domäne der Gelatinase B und TIMP-1 ergab sich mit einer Zwei-Schritt-Reaktion der gleiche Bindungsmechanismus wie für das 72-Häm/TIMP-2 System (Abbildung 40). Es konnte kein Unterschied zwischen glykosyliertem und nicht glykosyliertem TIMP nachgewiesen werden.

	y_0 [RU]	A_1 [RU]	τ_1 [s]	A_2 [RU]	τ_2 [s]	χ^2
Ein-Schritt-Assoziation	67,02	-65,13	6,37			0,38
Zwei-Schritt-Assoziation	67,21	-45,61	3,61	-26,59	10,81	0,06
Ein-Schritt-Dissoziation	39,26	25,46	57,27			0,75
Zwei-Schritt-Dissoziation	33,72	10,16	11,06	24,63	116,86	0,31

Tabelle 7: Zusammenstellung der Parameter der computergestützten Kurvenanpassung für die Komplexbildung 92-Häm/TIMP-1. Der χ^2 -Wert ist ein Maß für die Güte der Anpassung.
(y_0 , maximaler RU-Wert; A_{1-2} , Amplitude der Relaxation; τ_{1-2} , Relaxationszeit)

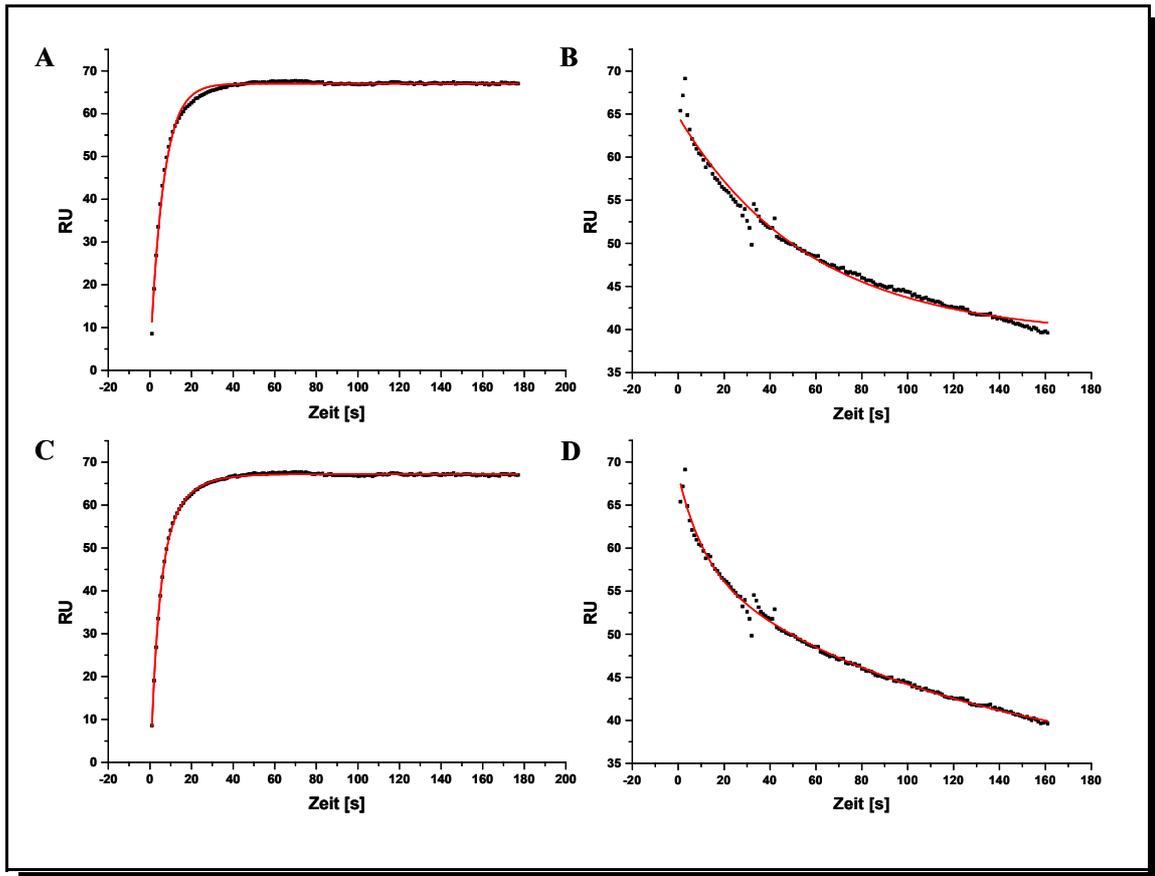


Abbildung 40: Durch eine nicht lineare Kurvenanpassung wurden die Assoziations- und Dissoziationskurven der Komplexbildung von 92-Häm und rekombinatem TIMP-1 analysiert (dargestellt ist exemplarisch die Komplexbildung mit glykosyliertem TIMP). A) + B) Anpassung mit Kurvengleichung für eine Ein-Schritt-Reaktion und C) + D) Anpassung für eine Zwei-Schritt-Reaktion (■ Messkurve; — Kurvenanpassung).

Anders als beim Bindungsmechanismus hat die Glykosylierung einen erheblichen Einfluss auf die Stabilität des Komplexes. Während die Dissoziationskonstante für den nicht glykosylierten Komplex $1,08 \pm 0,24 \mu\text{M}$ beträgt, ist der glykosylierte Komplex mit einem K_d -Wert von $5,5 \pm 0,7 \text{ nM}$ etwa um den Faktor 200 stabiler (Abbildung 41).

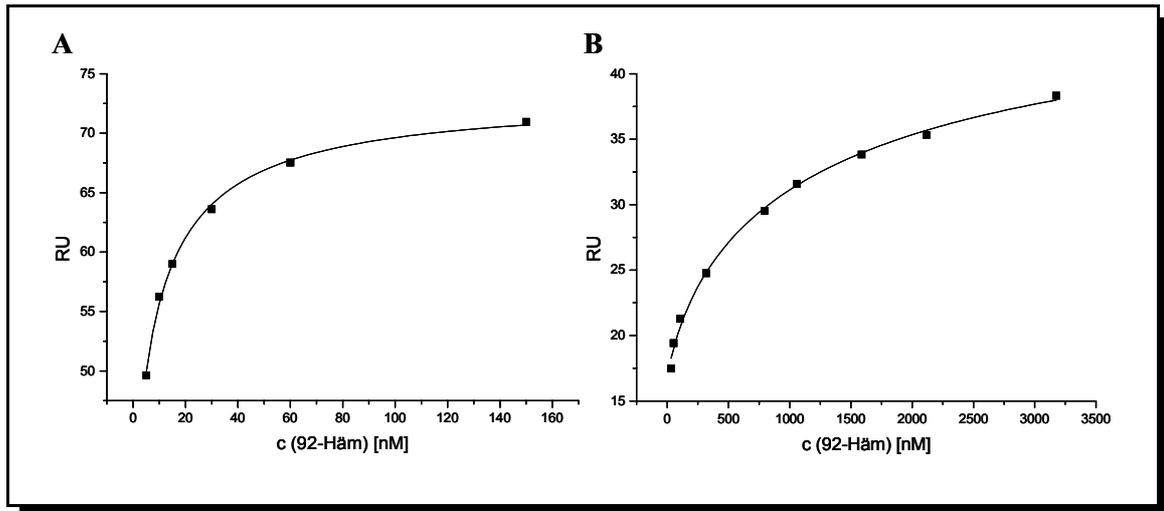


Abbildung 41: Sättigungskurven der mit rekombinantem TIMP-1 immobilisierten Sensorchips in Abhängigkeit der 92-Häm Konzentration. A) Für glykosylierten TIMP-1 und B) für nicht glykosylierten TIMP-1.

Die Immobilisierung eines Liganden auf der Sensorchipoberfläche kann einen erheblichen Einfluss auf den Bindungsmechanismus ausüben. So kann z.B. bei der Bindung des Liganden an die Oberfläche eine Bindungsstelle für den Analyten blockiert werden. Ebenso ist bei Proteinen mit einer unterschiedlichen Anzahl von Bindungsstellen die Wahl von Ligand und Analyt entscheidend für den Bindungsmechanismus. So haben z.B. Antigene nur eine Bindungsstelle (monovalent), während Antikörper zwei Bindungsstellen haben (bivalent). Um diese Einflüsse ausschließen zu können, wurde bei den Systemen 72-Häm/TIMP-2 und 92-Häm/TIMP-1 Analyt und Ligand ausgetauscht. Dieser Austausch hatte zwar keinen Einfluss auf den Bindungsmechanismus, allerdings zeigte die Hämopexin-ähnliche Domäne keine Stabilität gegenüber den Regenerationsbedingungen.

Der Komplex aus proMMP-9 und TIMP-1 weist im Gegensatz zu den oben beschriebenen Systemen ein anderes Bindungsverhalten auf. Obwohl das aktive Zentrum durch die Pro-Domäne blockiert sein sollte und somit für eine Bindung des TIMPs nicht zur Verfügung steht, wird der proMMP-9/TIMP-1 Komplex in einer Drei-Stufen-Reaktion gebildet (Abbildung 42).

Eine Bestimmung der Dissoziationskonstanten ist bei diesem System nicht möglich. Aufgrund der Stabilität des Komplexes und der damit fehlenden Dissoziation (siehe 4.6.1.2) befindet sich das Messsystem nicht im Gleichgewicht. Ein Gleichgewicht ist aber eine notwendige Voraussetzung für die Bestimmung des K_d -Wertes.

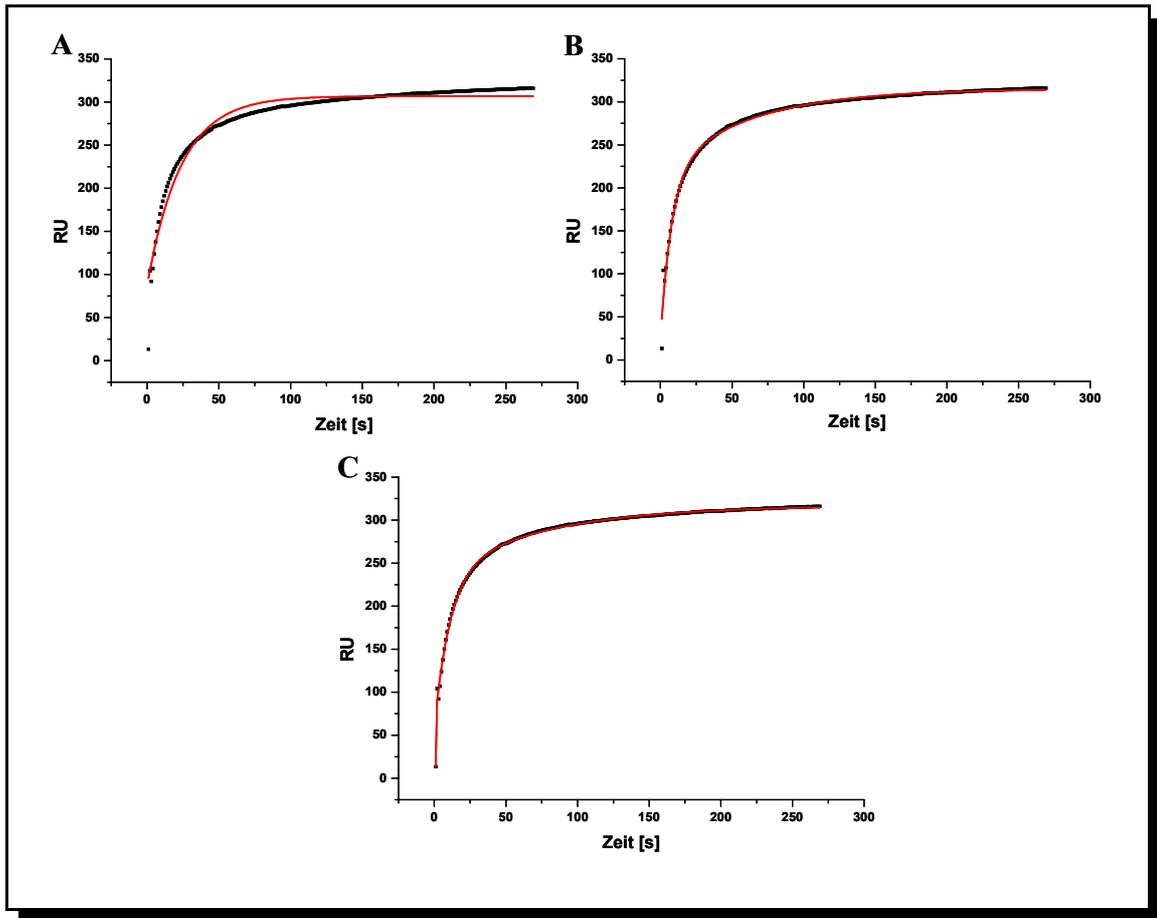


Abbildung 42: Durch eine nicht lineare Kurvenanpassung wurde die Assoziationskurve der Komplexbildung von proMMP-9 und rekombinatem TIMP-1 analysiert. A) Anpassung mit Kurvengleichung für eine Ein-Schritt-Reaktion, B) Anpassung für eine Zwei-Schritt-Reaktion und C) Anpassung für eine Drei-Schritt-Reaktion (■ Messkurve; — Kurvenanpassung).

	y_0 [RU]	A_1 [RU]	τ_1 [s]	A_2 [RU]	τ_2 [s]	A_3 [RU]	τ_3 [s]	χ^2
Ein-Schritt-Assoziation	306,89	-219,95	23,68					77,06
Zwei-Schritt-Assoziation	314,87	-191,77	7,79	-100,12	59,68			11,08
Drei-Schritt-Assoziation	317,10	n.d.	0,08	-176,64	10,99	-81,91	75,19	2,70

Tabelle 8: Zusammenstellung der Parameter der computergestützten Kurvenanpassung für die Komplexbildung proMMP-9/TIMP-1. Der χ^2 -Wert ist ein Maß für die Güte der Anpassung.

(y_0 , maximaler RU-Wert; A_{1-2} , Amplitude der Relaxation; τ_{1-2} , Relaxationszeit; n.d.; nicht definierbar)

4.7 Die katalytische Domäne der Gelatinase B

Vorausgegangene Arbeiten zeigten, dass die katalytische Domäne der Gelatinase B, exprimiert in *E. coli*, sehr instabil ist und es bei 4 °C bereits nach wenigen Stunden zu einer signifikanten autoproteolytischen Zersetzung kommt (Kröger 1998). Als Ursache hierfür wurde eine fehlende Glykosylierung angenommen. Um die damals angestellten Überlegungen zu verifizieren, sollte die katalytische Domäne im Hefesystem *Pichia pastoris* exprimiert und Untersuchungen zur Stabilität durchgeführt werden. Parallel sollte eine inaktive Mutante exprimiert werden.

Dem Arbeitskreis standen für diese Untersuchungen die entsprechenden *E. coli* Systeme 92-KaDo/pET-12b/[BL21(DE3)] und 92-KaDoGln³⁸³Ala³⁹⁹/pET-12b/[BL21(DE3)] zur Verfügung. Beide Varianten der katalytischen Domäne wurden parallel in analoger Weise kloniert und exprimiert.

4.7.1 Amplifizierung der cDNA

Zur selektiven Amplifizierung der cDNA wurden die entsprechenden Plasmide aus den vorhandenen *E. coli* Systemen isoliert und gereinigt. Mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide (siehe Anhang (Kapitel 7)), die die gewünschte DNA flankieren und selektive *XhoI* und *NotI* Restriktionsschnittstellen enthalten, wurde die kodierende DNA mittels PCR amplifiziert. Durch Gelelektrophorese konnte die erfolgreiche Anreicherung der Fragmente erwarteter Größe (1014 bp) nachgewiesen werden (Abbildung 43).

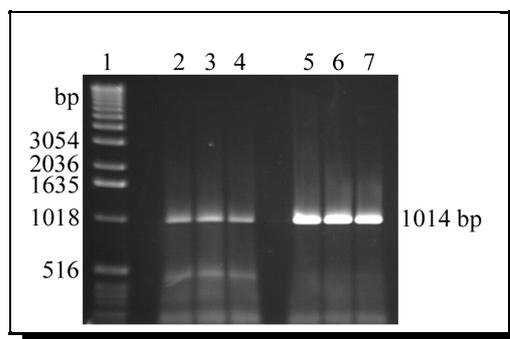


Abbildung 43: Größenbestimmung der PCR-Produkte im Agarosegel. EtBr gefärbtes DNA-Agarosegel, unter UV-Licht fotografiert.

Bahn 1: 1 kb-Leiter

Bahn 2-4: PCR-Amplifikat 92-KaDo

Bahn 5-7: PCR-Amplifikat 92-KaDoGln³⁸³Ala³⁹⁹

4.7.2 Klonierung in den Expressionsvektor pPICZ α A

Die PCR-Produkte wurden zunächst durch eine Nachbehandlung mit einer "template"-unabhängigen Polymerase am 3'-Ende mit einem Adenosin-Überhang versehen. Hierdurch war eine Insertion in den linearisierten pGEM-T-Vektor mit 3'-T-Überhang möglich. Die Ligation der komplementären Enden von Vektor-DNA und PCR-Amplifikat erfolgte mit Hilfe der *T4*-Ligase. Die erhaltenen Plasmide wurden anschließend zur Transformation des *E. coli* Stammes [JM 109] eingesetzt.

Eine erste Selektion potentiell positiver Transformanden ermöglichte der X-Gal-Test. Die Plasmide der positiven Klone wurden isoliert und zur weiteren Charakterisierung einer Restriktionskontrolle unterzogen. Die Hydrolyse der Plasmide lieferte DNA-Fragmente von charakteristischer Größe (Abbildung 44 A).

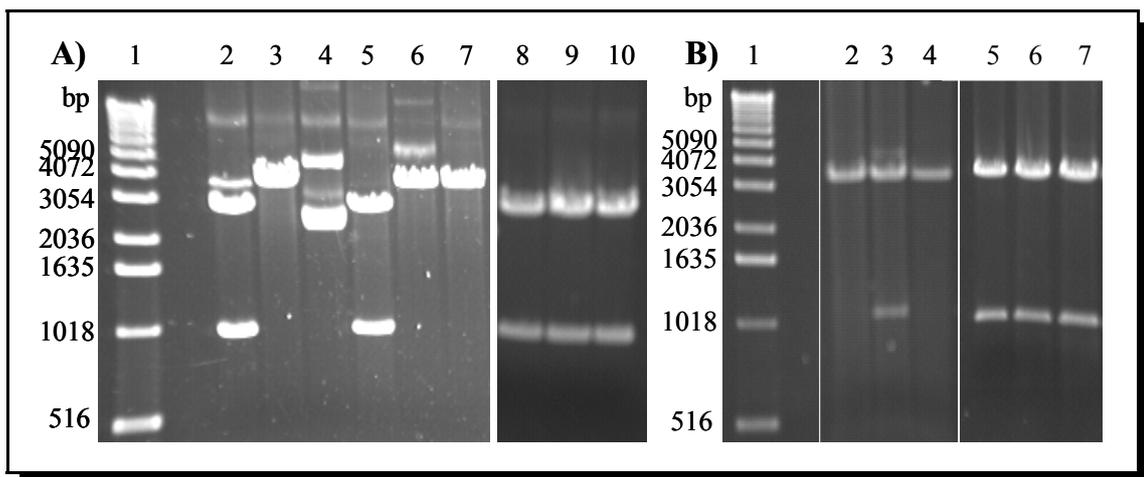


Abbildung 44: Restriktionsanalysen A) der Plasmide 92-KaDo/pGEM-T und 92-KaDo-Gln³⁸³Ala³⁹⁹/pGEM-T und B) der Plasmide 92-KaDo/pPICZ α A und 92-KaDoGln³⁸³Ala³⁹⁹/pPICZ α A. EtBr gefärbte DNA-Agarosegele, unter UV-Licht fotografiert.

A) Bahn 1: 1 kb-Leiter

Bahn 2-7: *XhoI/NotI* Hydrolyse von unterschiedlichen 92-KaDo/pGEM-T Plasmiden

Bahn 8-10: *XhoI/NotI* Hydrolyse von unterschiedlichen 92-KaDoGln³⁸³Ala³⁹⁹/pGEM-T Plasmiden

Durch anschließende DNA-Sequenzierung wurden die Klone in den Bahnen 5 und 8 als positiv identifiziert.

B) Bahn 1: 1 kb-Leiter

Bahn 2-4: *XhoI/NotI* Hydrolyse von unterschiedlichen 92-KaDo/pPICZ α A Plasmiden

Bahn 5-7: *XhoI/NotI* Hydrolyse von unterschiedlichen 92-KaDoGln³⁸³Ala³⁹⁹/pPICZ α A Plasmiden

Durch anschließende DNA-Sequenzierung wurden die Klone in den Bahnen 3 und 6 als positiv identifiziert.

Die “insert”-DNA positiver Plasmide konnte nun über die bei der PCR eingeführten Restriktionsschnittstellen mit dem Expressionsvektor pPICZ α A ligiert werden. Die erhaltenen Plasmide wurden zur Transformation des *E. coli* Stammes [XL 1 blue MRF'] eingesetzt. Positive Transformanden wurden durch Restriktionsanalyse (Abbildung 44 B) und DNA-Sequenzierung identifiziert.

4.7.3 Etablierung eines Expressionssystems in *Pichia pastoris*

Als positiv identifizierte Plasmide wurden mit Hilfe des Restriktionsenzym *SacI* linearisiert und zur Transformation der *Pichia pastoris* Stämme [X 33], [GS 115] und [KM 71] nach der “EasyComp[®]Transformation”-Methode eingesetzt. Die Kultivierung der Hefezellen erfolgte unter Selektionsdruck auf Zeocin[®]-haltigen Nährböden.

Die nach 72 Stunden erhaltenen Kulturen wurden für Testexpressionen eingesetzt und einer Expressionsanalyse mittels Western Blot unterzogen. Diese spezifische Expressionskontrolle mit Antikörpern gegen die katalytische Domäne zeigt neben dem erwarteten Produkt von ca. 38 kDa auch ein dimeres Expressionsprodukt der doppelten Größe (Abbildung 45).

Auf diese Weise konnten die beiden Expressionssysteme 92-KaDo/pPICZ α A/[KM 71] und 92-KaDoGln³⁸³Ala³⁹⁹/pPICZ α A/[KM 71] erfolgreich etabliert werden.

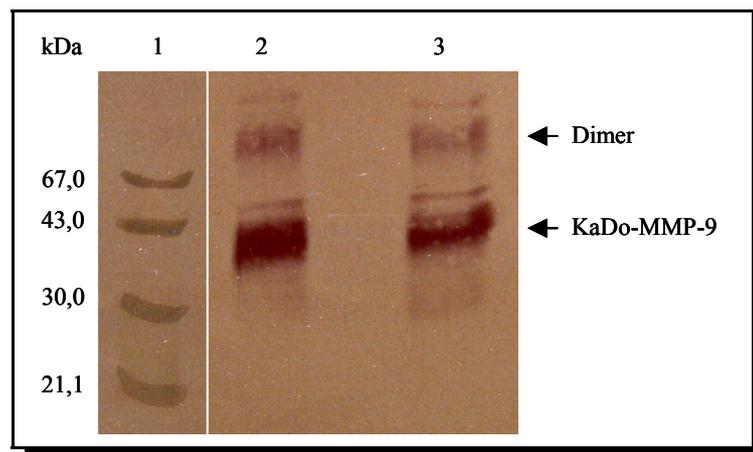


Abbildung 45: Western Blot zur Expressionskontrolle der katalytischen Domäne der Gelatinase B und der Gln³⁸³Ala³⁹⁹-Mutante. Proteine aufgetrennt im PAA-Gel, transferiert auf PVDF-Membran und Detektion durch anti-MMP-9 Antikörper.

Bahn 1: LMW-Marker

Bahn 2: katalytische Domäne der MMP-9

Bahn 3: Gln³⁸³Ala³⁹⁹-Mutante der katalytischen Domäne der MMP-9

4.7.4 Aufreinigung und Charakterisierung

Zur Überprüfung der Aktivität wurde sowohl mit dem Expressionsmedium der katalytischen Domäne als auch mit dem der Mutante ein Gelatin-Zymogramm durchgeführt. Wie Abbildung 46 verdeutlicht, zeigt die katalytische Domäne der MMP-9 eine starke Gelatinaseaktivität (Monomer und Dimer). Allerdings ist auch bei der inaktiven Mutante noch eine gewisse Restaktivität nachweisbar.

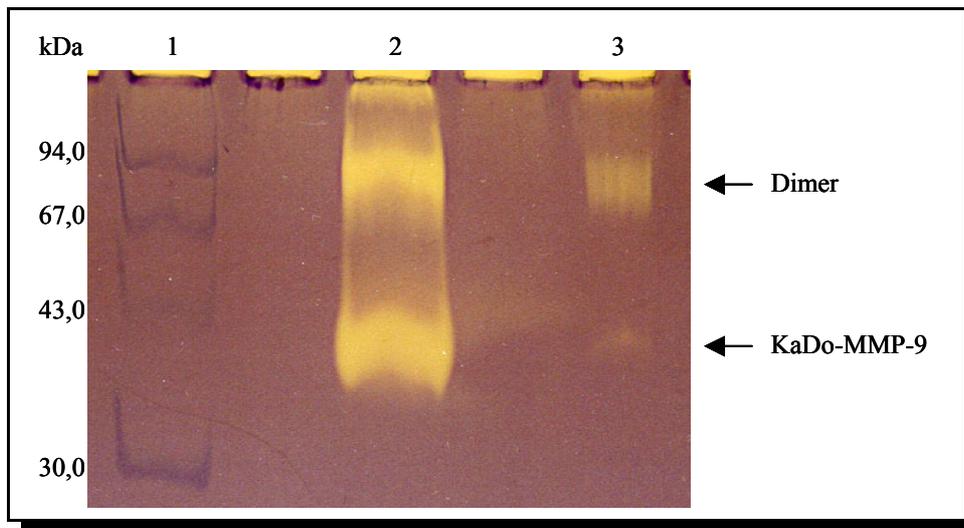


Abbildung 46: Aktivitätsnachweis der katalytischen Domäne der Gelatinase B und der Gln³⁸³Ala³⁹⁹-Mutante durch Zymographie. Gelatin-Substratgel über Nacht inkubiert und mit "Coomassie Blue" gefärbt.

Bahn 1: LMW-Marker

Bahn 2: Aktivität der katalytischen Domäne der MMP-9

Bahn 3: Aktivität der Gln³⁸³Ala³⁹⁹-Mutante der katalytischen Domäne der MMP-9

Die Aufreinigung der Expressionsprodukte sollte analog dem etablierten Verfahren beim *E. coli* Protein über Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration unter nicht-denaturierenden Bedingungen erfolgen. Allerdings konnte nach einer Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose keine Fraktion mit dem gewünschten Protein mehr nachgewiesen werden. Wie auch schon an der Expressionskontrolle zu erkennen (schwache Abbaubanden), unterliegt die katalytische Domäne einer autoproteolytischen Degradierung, so dass auch bei 4 °C keine längere Stabilität gewährleistet ist. Die gleiche Beobachtung trifft auch auf die "inaktive" Mutante zu, bei der zusätzlich eine bekannte autoproteolytische Spaltstelle mutiert ist (Leu³⁹⁹→Ala).

Kapitel 5 Diskussion und Ausblick

Die Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9) nehmen in der Familie der Matrix Metalloproteinasen eine Sonderstellung ein. Diese beruht zum einen auf der zusätzlichen Fibronectin-ähnlichen Domäne, durch die eine besondere Substratspezifität und Aktivität gewährleistet wird, und zum anderen auf der Hämapexin-ähnlichen Domäne, die einen wichtigen Beitrag zur Substratspezifität, aber auch der Enzymregulation leistet. Besonders die Komplexbildung von latenten Gelatinasen und ihren Inhibitoren (TIMPs) über eine Wechselwirkung mit der Hämapexin-ähnlichen Domäne hat in den letzten Jahren für große Aufmerksamkeit gesorgt.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte die Interaktion zwischen den Hämapexin-ähnlichen Domänen beider Gelatinasen und den TIMPs näher beleuchtet werden, um somit einen Beitrag zur Aufklärung des Bindungsmechanismus zu leisten. Ebenso sollten ergänzende Arbeiten mit der Fibronectin-ähnlichen Domäne der Gelatinase A und der katalytischen Domäne der Gelatinase B Hinweise auf Strukturen und die Bedeutung einer Glykosylierung liefern.

5.1 Die Fibronectin-ähnliche Domäne der Gelatinase A

Aufgrund von Vorarbeiten stand ein etabliertes Expressionssystem für die Fibronectin-ähnliche Domäne der Gelatinase A zur Verfügung (Stute 1998). Somit konnte diese im Großmaßstab exprimiert werden. Die Expression in *E. coli* und die damit verbundene Ablagerung des Proteins in "inclusion bodies" erforderte eine Faltung im RedOx-"shuffling"-System. Die Reinigung erfolgte mittels Affinitätschromatographie an Gelatin-Sepharose. Durch dieses Verfahren gelang es, dem Max-Planck-Institut in Martinsried ausreichend Material für eine Kristallisation und Strukturaufklärung zur Verfügung zu stellen. Aufgrund der schlechten Kristallisationseigenschaften des Proteins wurden verschiedene Chargen mit unterschiedlichen Pufferzusammensetzungen bereitgestellt.

Aufgrund der Kristallisationseigenschaften und der von Morgunova *et al.* veröffentlichten Struktur der proGelatinase A (Morgunova *et al.* 1999, siehe Abbildung 10) wurde von einer Strukturaufklärung Abstand genommen.

5.2 Die katalytische Domäne der Gelatinase B

Die Arbeiten von Kröger zeigten, dass die in *E. coli* exprimierte katalytische Domäne der Gelatinase B bereits bei 4 °C einer raschen autoproteolytischen Degradierung unterliegt (Kröger 1998). Als Ursache hierfür wurde die fehlende Glykosylierung angenommen. Um diese Überlegungen zu verifizieren, sollte eine Expression in *Pichia pastoris* Hefezellen Aufschlüsse über die Bedeutung der Kohlenhydratreste für die Stabilität der katalytischen Domäne geben.

Neben der Wildtyp-Form (Glu³⁸³Leu³⁹⁹) der katalytischen Domäne sollte parallel eine Gln³⁸³Ala³⁹⁹-Mutante exprimiert werden. Bei dieser Variante ist sowohl der für die Aktivität wichtige Glutamat-Rest als auch eine autoproteolytische Spaltstelle mutiert. Diese Mutationen sollten eine Inaktivierung des Enzyms und eine Unterdrückung der autoproteolytischen Degradierung bewirken.

Die cDNAs beider Varianten konnten mittels PCR aus einem "template" amplifiziert und über spezifische Restriktionsstellen mit dem Expressionsvektor pPICZ α A ligiert werden. Positiv identifizierte Plasmide wurden linearisiert und zur Transformation verschiedener *Pichia pastoris* Stämme eingesetzt. Die unter Selektionsdruck erhaltenen Klone wurden für Testexpressionen verwendet und die Expression mittels Western Blot verfolgt. Durch diese Verfahren konnte sowohl für die Wildtyp-Form als auch für die Mutante erfolgreich ein Expressionssystem etabliert werden.

Die Analyse der Expressionsprodukte ergab neben dem erwarteten Produkt von ca. 38 kDa auch ein Dimer der doppelten Größe. Dieses ist in Analogie zum full-length Enzym zu sehen, das als Monomer, Dimer oder Heterodimer mit Lipokalin aus Neutrophilen isoliert wurde (Triebel et al. 1992, Tschesche et al. 1992).

Eine Aktivitätskontrolle mittels Gelatin-Zymogramm zeigte für beide Varianten einen deutlichen Abbau durch Monomer und Dimer. Die Aktivität der potentiell inaktiven Mutante ist zwar wesentlich geringer, aber die Restaktivität veranschaulicht, dass die Mutation des Glutamat-Restes nicht ausreichend für eine Inaktivierung des Enzymes ist.

Die Aufreinigung der Expressionsprodukte sollte über Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration erfolgen. Obwohl die Reinigung bei 4 °C erfolgte, kam es zu einer Degradierung der Proteine, so dass bereits nach der Ionenaustauschchromatographie, auch mittels Antikörper, kein Protein mehr detektiert werden konnte. Zusammen mit der Expressionskontrolle, bei der auch schon Abbaubanden detektiert wurden, verdeutlicht

dieser Befund, dass die bei der Expression in *Pichia pastoris* angefügten Kohlenhydrate nicht zu einer ausreichenden Stabilisierung der katalytischen Domäne der Gelatinase B führen. Die Arbeiten von Van den Steen *et al.* mit einer rekombinanten murinen Gelatinase B zeigten in *Pichia pastoris* Zuckerstrukturen aus Oligomannose-Resten (Van den Steen *et al.* 1998). Im Gegensatz dazu weisen die Untersuchungen von Rudd *et al.* bei humaner MMP-9 aus Neutrophilen wesentlich komplexere Kohlenhydratstrukturen auf (Rudd *et al.* 1999). Sollte eine Glykosylierung wirklich zu einer ausreichenden Stabilisierung der katalytischen Domäne führen, könnten diese Expressionssystem-abhängigen Zuckerstrukturen ein Grund für die autoproteolytische Degradierung sein.

5.3 Die Hämopexin-ähnliche Domäne der Gelatinase A

Die bereits zur Verfügung stehende Hämopexin-ähnliche Domäne der Gelatinase A lag aufgrund der Expression in *E. coli* und der damit verbundenen Aufreinigungsstrategie in denaturierter Form vor (Stute 1998). Die für die Charakterisierung notwendige native Konformation sollte zum einen durch eine Dialyse gegen nicht-denaturierenden Puffer und zum anderen mittels RedOx-„shuffling“-System erlangt werden.

Bei anschließenden Komplexierungen mit bovinem TIMP-2 konnte mittels Gelelektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen allerdings kein Komplex detektiert werden. Spätere Untersuchungen bekräftigten die Annahme einer nicht nativen Konformation der Hämopexin-ähnlichen Domäne, da das *E. coli* Produkt durch die Proteinasen Trypsin und Makrophagen Elastase (MMP-12) gespalten wurde, während keine Spaltung bei dem nativen Expressionsprodukt aus *Pichia pastoris* stattfand.

Aufgrund der nicht nativen Konformation wurde eine Expression in *Pichia pastoris* angestrebt. Diese Hefezellen ermöglichen eine korrekte Faltung von Proteinen mit Disulfidbrücken und, verbunden mit der Ausnutzung des α -Präpropeptids aus *S. cerevisiae*, eine Sekretion der nativen Proteine.

Die Protein-kodierende cDNA wurde mittels PCR aus der full-length DNA amplifiziert und über selektive Restriktionsschnittstellen mit dem Vektor pPICZ α A ligiert. Verschiedene Hefezellen wurden mit den linearisierten Plasmiden transformiert und unter Selektionsdruck kultiviert. Der über SDS-PAGE verfolgte zeitabhängige Verlauf anschließender Expressionsversuche und eine N-terminale Aminosäuresequenzierung des Produktes belegten die Etablierung eines Expressionssystems. Die Reinigung des

Expressionsproduktes erfolgte durch Kombination von Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration bis zur Homogenität.

Durch dieses Verfahren konnte die Hämopexin-ähnliche Domäne der Gelatinase A in nativer Konformation erfolgreich dargestellt werden. Allerdings ist im Gegensatz zu *E. coli* die Expression in *Pichia pastoris* recht zeitintensiv (Expressionsdauer: 4 Stunden bei *E. coli* und 4-6 Tage bei *P. pastoris*). Im Gegensatz dazu müssen die Proteine nicht zeit- und kostenintensiv renaturiert werden. Anstelle der gewählten Reinigungsstrategie würde eine Aufarbeitung mittels Affinitätschromatographie an einer TIMP-2-Säule mehrere Vorteile haben: Zum einen würde es nur noch einen Chromatographieschritt geben und damit eine erhebliche Zeiteinsparung und zum anderen würde eine spezifische Aufreinigung Verunreinigungen besser eliminieren. Andererseits wäre für die Elution ein passender Puffer erforderlich, der den Komplex dissoziiert, aber keines der beiden Proteine denaturiert.

Für die Evaluierung der Wechselwirkungen zwischen der Hämopexin-ähnlichen Domäne der Gelatinase A und TIMP-2 wurde die biomolekulare Interaktionsanalyse herangezogen. Die Messreihen wurden mit einem Biacore 3000®-Gerät durchgeführt. Boviner TIMP-2 wurde als Ligand mittels Aminokopplung auf der Oberfläche eines CM5-Sensorchips kovalent immobilisiert und die Komplexbildung bei verschiedenen Konzentrationen der Hämopexin-ähnlichen Domäne beobachtet. Für diese Serien von Komplexassoziation und -dissoziation musste eine vollständige Regeneration der Chipoberfläche ohne Zerstörung des Liganden gewährleistet werden. Der Komplex zeigte eine unerwartete Stabilität gegenüber milden, aber auch ionenentziehenden Reagenzien wie z.B. 100 mM Glycin, 1 M NaCl oder 200 mM EDTA, daher mussten verschiedene Regenerationsmethoden getestet werden. Als Regenerationsmittel der Wahl stellte sich 20 mM HCl bei einer hohen Flussrate von 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ heraus.

Die Auswertung der Sensorgramme ergab, dass die Komplexbildung nicht nach einer Reaktion erster Ordnung ablief. Dieser Befund steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Olson *et al.*, die die Bindung der C-terminalen Domäne an TIMP-2 mit einem Einphasen-Model beschreiben konnten (Olson et al. 1997). Um den Bindungsmechanismus zu verifizieren wurden die Assoziations- und Dissoziationskurven der Biacoremessungen mit Gleichungen für Ein-Stufen-, Zwei-Stufen- und Drei-Stufen-Reaktionen computergestützt angepasst. Dieses führte zu der Erkenntnis, dass es sich bei der Bindung von Hämopexin-ähnlicher Domäne und TIMP um einen Zwei-Schritt-Mechanismus handelt. Diese

unterschiedlichen Ergebnisse beruhen möglicherweise auf unterschiedlichen Messsystemen. Obwohl beide Untersuchungen auf dem Prinzip der Oberflächenplasmon-Resonanz beruhen, verwendet das Biacoregerät ein Flusssystem, während die Untersuchungen von Olson *et al.* mit einem stationären Küvettenassay durchgeführt wurden. Dieses würde auch das Ergebnis einer Simulation der Ergebnisse von Olson *et al.* erklären. Die anhand der veröffentlichten Daten mit dem Programm "BIAsimulation software[®]" simulierte Bindungskurve weicht dabei deutlich von dem publizierten Sensorgramm ab.

Im Gegensatz dazu stimmt eine Zwei-Stufen-Reaktion mit der von Morgunova *et al.* veröffentlichten Kristallstruktur des proMMP-2/TIMP-2-Komplexes überein (Morgunova *et al.* 2002). Die Struktur weist zwei unabhängige Regionen für die Bindung auf. Der C-terminale Teil des TIMP-2 bindet dabei zwischen den Modulen III und IV der Hämapexin-ähnlichen Domäne. Diese Region ist vergleichbar mit der von Overall *et al.* beschriebenen "docking site" (Overall *et al.* 1999 und 2000). Die andere Bindung erfolgt zwischen dem GH-"loop" des TIMPs und einer Tasche im Modul IV des β -Propellers (siehe Abbildung 12). Aus diesen Erkenntnissen lässt sich für den Bindungsmechanismus postulieren, dass der TIMP-2 mit seinem anionischen C-Terminus eine schnelle ionische Interaktion mit der kationischen "docking site" eingeht (Schritt 1), während zur weiteren Stabilisierung eine hydrophobe Wechselwirkung zwischen dem GH-"loop" des TIMPs und dem Modul IV ausgebildet wird (Schritt 2).

Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten des Komplexes erfolgte über die Sättigung des Ligand-beschichteten Sensorchips. Unter der Voraussetzung, dass es sich um einen 1:1-Komplex handelt, ist der mathematische Ausdruck für die Änderung der "response units" eine Funktion in Abhängigkeit der gesamten Analytkonzentration. Durch eine iterative Näherung dieser Gleichung an die Sättigungskurve des Sensorchips ließ sich die Dissoziationskonstante mit $0,17 \pm 0,08 \mu\text{M}$ berechnen. Diese Konstante ist um den Faktor 3-6 größer als die bisher veröffentlichten Werte (Olson *et al.* 1997, Overall *et al.* 1999). Allerdings entspricht sie der von Bigg *et al.* bestimmten Konstanten für den 72-Häm/TIMP-4-Komplex (Bigg *et al.* 1997).

5.4 Die Hämopexin-ähnliche Domäne der Gelatinase B

Die Etablierung eines Expressionssystems für die Hämopexin-ähnliche Domäne der Gelatinase B erfolgte in analoger Weise zum System für die entsprechende Domäne der Gelatinase A. Als "template" für die PCR stand eine cDNA aus der Zusammenarbeit mit Dr. Pourmotabbed (University of Tennessee) zur Verfügung. Sowohl die Expressionskontrolle durch SDS-PAGE als auch eine N-terminale Aminosäuresequenzierung zeigten zwei Expressionsprodukte. Neben dem erwarteten N-Terminus T⁴⁹⁸AGPSTATTVPL konnte eine um vier Aminosäuren verkürzte Variante identifiziert werden. Diese verkürzte Variante entstand durch eine unspezifische Proteolyse während der sekretorischen Ausschleusung des Proteins in das Kulturmedium. Die Reinigung des Expressionsproduktes erfolgte ebenfalls durch Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration.

Die beobachtete N-terminale Deletion betrifft nicht die eigentliche Propellerstruktur der Hämopexin-ähnlichen Domäne, sondern ist vielmehr ein Teil der "hinge"-Region. Da aber keine Wechselwirkungen dieser Region mit den TIMPs bekannt sind, wurde von keiner Beeinflussung der Messergebnisse ausgegangen.

Trotz der erfolgreichen Etablierung eines Verfahrens zur Darstellung des Komplexes aus Hämopexin-ähnlicher Domäne und TIMP-1 konnte, aufgrund von zu geringem Ausgangsmaterial, kein Komplex für eine Strukturaufklärung bereitgestellt werden.

Im Gegensatz zum 72-Häm/TIMP-2-Komplex gab es bisher kaum Untersuchungen zum Komplex 92-Häm/TIMP-1. In der vorliegenden Arbeit sollte somit der Bindungsmechanismus dieses Komplexes durch die biomolekulare Interaktionsanalyse untersucht werden. Durch konzentrationsabhängige Messreihen und Analyse der Bindungskurven durch nicht lineare Kurvenanpassung ergab sich in Analogie zum 72-Häm/TIMP-2-Komplex eine Zweiphasen-Interaktion. Ein Aminosäurevergleich zwischen den beiden Hämopexin-ähnlichen Domänen der Gelatinasen zeigte gewisse Gemeinsamkeiten auf. Zwar konnte in der 92-Häm-Domäne kein Lysincluster in den Modulen III und IV der Propellerstruktur identifiziert werden, jedoch könnte eine Akkumulation von Argininen bei der passenden dreidimensionalen Konformation eine Bindungsstelle ähnlich der "docking site" bilden (Abbildung 47). Im Gegensatz zu TIMP-2 weist TIMP-1 keinen anionischen C-terminalen Teil für die Interaktion mit der kationischen "docking site" auf. Dass eine Komplexbildung trotzdem möglich ist, zeigt die Interaktion von TIMP-3, der ebenfalls keinen anionischen Teil besitzt, mit der Hämopexin-ähnlichen Domäne der Gelatinase A (Butler et al. 1999).

Diese Komplexbindung ist aber um den Faktor 15 schwächer als bei 72-Häm/TIMP-2, wofür der fehlende anionische C-terminale Teil verantwortlich gemacht wird. Trotzdem konnte gezeigt werden, dass die Module III und IV für die Bildung dieses Komplexes von entscheidender Bedeutung sind.

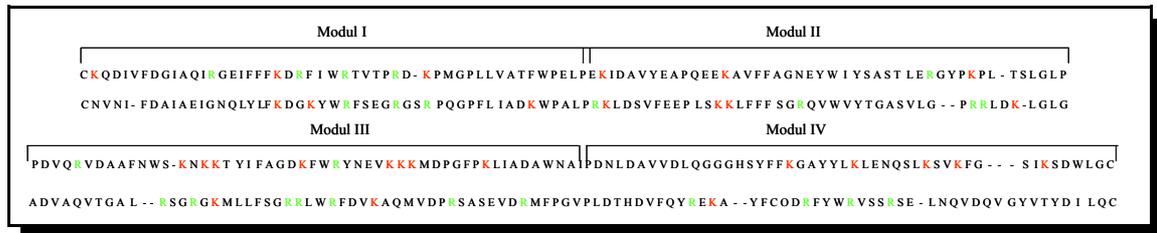


Abbildung 47: Aminosäurevergleich der Hämopexin-ähnlichen Domänen der Gelatinasen. Die obere Zeile gibt die Sequenz der Gelatinase A wieder, die untere die der Gelatinase B. Dargestellt sind die Aminosäuren der Propellerstruktur der MMP-2; hervorgehoben in rot die Lysinreste und in grün die Argininreste (modifiziert nach Overall et al. 1999).

Im Gegensatz zu diesen Überlegungen zeigten Morgunova *et al.* die Spezifität der Interaktionen im proMMP-2/TIMP-2-Komplex auf (Morgunova et al. 2002). So sind einige an der Bindung beteiligte Aminosäuren einzigartig für MMP-2 und TIMP-2 und kommen in der MMP-9 und TIMP-1 nicht vor. Dieses deutet darauf hin, dass sich beide Komplexe zwar in einer Zweiphasen-Interaktion bilden, die Bindungen in den Komplexen aber signifikant unterschiedlich sind. Dieses ist eine Erklärung für die Spezifität der Komplexe und damit dafür, dass die Komplexe 72-Häm/TIMP-1 und 92-Häm/TIMP-2 nicht nachgewiesen werden konnten.

Ein überraschendes Ergebnis bei der Komplexbildung lieferte der Vergleich zwischen glykosyliertem TIMP-1 aus Säugetierzellen (CHO-Zellen) und unglykosyliertem TIMP-1 aus *E. coli*. Die Glykosylierung hatte zwar keinen Einfluss auf den Bindungsmechanismus, aber der Komplex mit glykosyliertem TIMP war deutlich stabiler. Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten lieferte für das glykosylierte System einen K_d -Wert von $5,5 \pm 0,7$ nM, wohingegen der Wert für den unglykosylierten Komplex $1,08 \pm 0,24$ μ M betrug. Für diese große Differenz gibt es zwei mögliche Erklärungen. Zum einen könnte der TIMP-1 aus *E. coli* nur unzureichend nativ gefaltet sein. Diese Erklärung wird durch die durchgeführten Inhibierungsstudien gestützt, bei denen nur ca. 70% des eingesetzten TIMPs die katalytische Domäne der MMP-8 inhibierten. Ergänzend ist hier anzumerken, dass sich bei der Überführung in die native Konformation oft große Mengen von Glutathion an das Protein anlagern (Tschesche 2001), diese Glutathionreste könnten dann

die Stabilität des Komplexes beeinflussen. Zum anderen könnte die Glykosylierung einen wichtigen Beitrag zur Stabilität eines Komplexes leisten. Dieses würde erklären, warum der 92-Häm/TIMP-1-Komplex ohne anionischen C-terminalen TIMP-1-Teil stabiler ist als der 72-Häm/TIMP-2-Komplex, bei dem keine Glykosylierung vorliegt.

Ganz andere Erkenntnisse brachte die biomolekulare Interaktionsanalyse für den Komplex von proGelatinase B und TIMP-1. Das Sensorgramm wies einen sehr stabilen Komplex aus, bei dem annähernd keine Dissoziation zu erkennen war. Außerdem erreichte das Messsystem bei geringen proMMP-9-Konzentrationen keinen Gleichgewichtszustand, sondern näherte sich einem maximalen Bindungssignal für alle Konzentrationen an, wodurch eine Bestimmung der Dissoziationskonstanten nicht möglich war.

Obwohl aufgrund der Latenz der proMMP-9 nur eine Bindung an die Hämopexin-ähnliche Domäne möglich erschien, ergab die Analyse des Bindungsmechanismus eindeutig eine Drei-Stufen-Reaktion. Somit muss es für den Inhibitor außer den beiden Bindungsstellen an der Hämopexin-ähnlichen Domäne noch eine weitere mögliche Bindungsstelle geben, die nicht der "active site" entspricht. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit den Beobachtungen von Olson *et al.*, die sowohl für die Bindung von TIMP-1 und TIMP-2 an die aktiven Formen der Gelatinasen als auch für die Bindung an die entsprechenden proEnzyme eine Zwei-Phasen-Kinetik bestimmten (Olson *et al.* 1997).

Während Komplexe der Hämopexin-ähnlichen Domäne der Gelatinase A mit TIMP-4 und dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ schon seit längerer Zeit bekannt sind (Bigg *et al.* 1997, Brooks *et al.* 1996), sind keine Angaben über entsprechende Komplexe mit der Hämopexin-ähnlichen Domäne der Gelatinase B bekannt. Ein möglicher 92-Häm/TIMP-4-Komplex wurde allerdings durch die Arbeiten von Stratmann postuliert (Stratmann 2000). Hierbei konnte eine schwache Interaktion zwischen der proGelatinase B und N-terminal blockiertem TIMP-4 festgestellt werden. Aufgrund der Latenz der Gelatinase und der N-terminalen Blockierung des TIMPs musste diese Wechselwirkung über die C-Termini erfolgen. Die in dieser Arbeit hierzu durchgeführten Biacore-Messungen ergaben keine Bestätigung für diesen Komplex. Auch eine Bindung von 92-Häm an die Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_6$ konnte nicht nachgewiesen werden. Um einer möglichen Blockierung von Bindungsstellen aufgrund der kovalenten Immobilisierung an der Chipoberfläche entgegenzuwirken, wurden bei diesen Messungen zusätzlich Ligand und Analyt wechselseitig ausgetauscht.

5.5 Ausblick

Die vorliegende Arbeit konnte wichtige Erkenntnisse über die Komplexbildung zwischen den Hämopexin-ähnlichen Domänen der Gelatinasen und den TIMPs liefern. Zur Verifizierung dieser Ergebnisse und der weiteren detaillierten Aufklärung der Bindungsmechanismen sind noch weitere Untersuchungen erforderlich. So könnte die Aufklärung der Komplexstrukturen von 92-Häm/TIMP-1 und pro-MMP-9/TIMP-1 wichtige Hinweise auf die verschiedenen Bindungsstellen und damit den Bindungsmechanismus liefern. Auch schon die einzelne Struktur der Hämopexin-ähnlichen Domäne der Gelatinase B würde zum Verständnis der Interaktionen beitragen, in dem sie Einblicke in die mögliche Akkumulation der Argininreste liefert. Ebenso könnten Mutationsstudien Aufschlüsse über die Bedeutung einzelner Argininreste bei der Komplexbildung liefern.

Unter Verwendung der biomolekularen Interaktionsanalyse könnten neue Erkenntnisse über die zusätzliche Bindungsstelle bei latenten Gelatinasen erlangt werden. So würden vergleichbare Messungen mit einer potentiell aktiven, aber gleichzeitig inhibierten Gelatinase Aufschlüsse über die Beteiligung der Pro-Domäne geben. Die Inhibierung würde dabei die "active site" für eine Bindung blockieren und außerdem die autoproteolytische Degradierung des Enzyms unterdrücken.

Eine durch die vorliegende Arbeit aufgekommene Frage ist die Bedeutung der Glykosylierung für die Stabilität dieser Komplexe aus Hämopexin-ähnlicher Domäne und TIMP im Allgemeinen und für unterschiedliche Systeme wie z.B. 72-Häm/TIMP-3 oder 92-Häm/TIMP-1 im Speziellen.

Während über die *in vivo* Bedeutung des Komplexes aus proGelatinase A und TIMP-2 bzw. TIMP-4 durch zahlreiche Veröffentlichungen schon sehr viel bekannt ist, gibt es kaum Erkenntnisse über die Komplexe aus proGelatinase B und TIMP-1 oder TIMP-3. Hier besteht in Zukunft noch ein großer Klärungsbedarf, um die Bedeutung dieser Komplexe besser einschätzen zu können. Hierfür bieten sich als mögliche Ansatzpunkte Untersuchungen an Zellkulturen oder *knockout* Mäusen an.

Kapitel 6 Literaturangaben

- Agrez, M., Gu, X., Turton, J., Meldrum, C., Niu, J., Antalis, T. and Howard, E.W. (1999) The $\alpha_v\beta_3$ integrin induces gelatinase B secretion in colon cancer cells. *Int. J. Cancer* 81, 90-97.
- Atkinson, S.J., Crabbe, T., Cowell, S., Ward, R.V., Butler, M.J., Sato, H., Seiki, M., Reynolds, J.J. and Murphy, G. (1995) Intermolecular autolytic cleavage can contribute to the activation of progelatinase A by cell membranes. *J. Biol. Chem.* 270, 30479-30485.
- Auerswald, E.A., Horlein, D., Reinhardt, G., Schroder, W. and Schnabel, E. (1988) Expression, isolation and characterization of recombinant [Arg15, Glu52]aprotinin. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 369 Suppl: 27-35.
- Bar-Or, A., Oliveira, E.M., Anderson, D.E. and Hafler, D.A. (1999) Molecular pathogenesis of multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 100, 252-259.
- Becker, J.W., Marcy, A.I., Rokosz, L.L., Axel, M.G., Burbaum, J.J., Fitzgerald, P.M., Cameron, P.M., Esser, C.K., Hagmann, W.K., Hermes, J.D. et al. (1995) Stromelysin-1: three-dimensional structure of the inhibited catalytic domain and the C-truncated proenzyme. *Protein Sci.* 4, 1966-1976.
- Biacore AB (1999). Biacore 3000[®] Instrument Handbook, Uppsala, Sweden.
- Bigg, H.F., Shi, Y.E., Liu, Y.E., Steffenson, B. and Overall, C.M. (1997) Specific, high affinity binding of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) to the COOH-terminal hemopexin-like domain of human gelatinase A. *J. Biol. Chem.* 272, 15496-15500.
- Billinghamst, R.C., Dahlberg, L., Ionescu, M., Reiner, A., Bourne, R., Rorabeck, C., Mitchell, P., Hambor, J., Diekmann, O., Tschesche, H., et al. (1997) Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J. Clin. Invest.* 99, 1534-1545.
- Birkedal-Hansen, H., Moore, W.G.I., Bodden, M.K., Windsor, L.J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A. and Engler, J.A. (1993) Matrix metalloproteinases: a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 4, 197-250.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic. Acids. Res.* 7, 1513-1523.

- Blake, M.S., Johnston, K.H., Russel-Johnes, G.J. and Gotschlich, E.C. (1984) A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal. Biochem.* 136, 175-179.
- Bode, W., Reinemer, P., Huber, R., Kleine, T., Schnierer, S. and Tschesche, H. (1994) The X-ray crystal structure of the catalytic domain of human neutrophil collagenase inhibited by a substrate analogue reveals the essentials for catalysis and specificity. *EMBO J.* 13, 1263-1269.
- Bornstein, P., Devarayalu, S., Li, P., Disteche, C.M. and Framson, P.A. (1991) A second thrombospondin gene in the mouse is similar in organization to thrombospondin 1 but does not respond to serum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8636-8640.
- Brooks, P.C., Strömblad, S., Sanders, L.C., von Schalscha, T.L., Aimes, R.T., Stetlet, Stevenson, W.G., Quigley, J.P. and Cheresch, D.A. (1996) Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin $\alpha_v\beta_3$. *Cell* 85, 683-693.
- Brooks, P.C., Silletti, S., von Schalscha, T.L., Friedlander, M. and Cheresch, D.A. (1998) Disruption of angiogenesis by PEX a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. *Cell* 92, 391-400.
- Brown, J.C. and Timpl, R. (1995) The collagen superfamily. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 107, 484-490.
- Buchner, J., Pastan, I. and Brinkmann, U. (1992) A method for increasing the yield of properly folded recombinant fusion proteins: single-chain immunotoxins from renaturation of bacterial inclusion bodies. *Anal. Biochem.* 205, 263-270.
- Butler, G.S., Will, H., Atkinson, S.J. and Murphy, G. (1997) Membrane-type 2 matrix metalloproteinase can initiate the processing of progelatinase A and is regulated by the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Eur. J. Biochem.* 244, 653-657.
- Butler, G.S., Apte, S.S., Willenbrock, F. and Murphy, G. (1999) Human tissue inhibitor of metalloproteinases 3 interacts with both the N- and C-terminal domains of gelatinases A and B. *J. Biol. Chem.* 274, 10846-10851.
- Cao, J.C., Drews, M., Lee, H.M., Conner, C., Bahou, W.-F. and Zucker, S. (1998) The propeptide domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase is required for binding of tissue inhibitor of metalloproteinases and activation of pro-gelatinase A. *J. Biol. Chem.* 273, 34745-34752.

- Cawston, T., Plumpton, T., Curry, V., Ellis, A. and Powell, L. (1994) Role of TIMP and MMP inhibition in preventing connective tissue breakdown. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 732, 75-83.
- Cawston, T.E. (1996) Metalloproteinase inhibitors and the prevention of connective tissue breakdown. *Pharmacol. Ther.* 70, 163-182.
- Clare, J.J., Rayment, F.B., Ballantine, S.P., Sreekrishna, K. and Romanos, M.A. (1991) Highlevel expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Bio/Technology* 9, 455-460.
- Collier, I.E., Wilhelm, S.M., Eisen, A.Z., Marmer, B.L., Grant, G.A., Seltzer, J.L., Kronberger, A., He, C.S., Bauer, E.A. and Goldberg, G.I. (1988) H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen. *J. Biol. Chem.* 263, 6579-6587.
- Cregg, J.M. and Madden, K.R. (1988) Development of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris* as a host for the production of foreign proteins. *Dev. Ind. Microbiol.* 29, 33-41.
- Cregg, J.M., Madden, K.R., Barringer, K.J., Thill, G. and Stillman, C.A. (1989) Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast, *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* 9, 1316-1323.
- Cregg, J.M., Vedvick, T.S. and Raschke, W.C. (1993) Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology (NY)*11, 905-910.
- Creighton, T.E. (1988) Toward a better understanding of protein folding pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 5082-5086.
- Creighton, T.E. (1990) Protein folding. *Biochem. J.* 270, 1-16.
- Deryugina, E.I., Bourdon, M.A., Jungwirth, K., Smith, J.W. and Strongin, A.Y. (2000) Functional activation of integrin $\alpha_v\beta_3$ in tumor cells expressing membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Int. J. Cancer* 86, 15-23.
- Deryugina, E.I., Ratnikov, B., Monsov, E., Postnova, T.I., DiScipio, R., Smith, J.W. and Strongin, A.Y. (2001) MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin $\alpha_v\beta_3$ promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. *Exp. Cell. Res.* 263, 209-223.

- Docherty, A.J., O'Connell, J., Crabbe, T., Angal, S. and Murphy, G. (1992) The matrix metalloproteinases and their natural inhibitors: prospects for treating degenerative tissue diseases. *Trends. Biotechnol.* 10, 200-207.
- EasySelect™ *Pichia* Expression Kit, Invitrogen, NL.
- Edman, P. and Begg, G.A. (1976) A protein sequenator. *Eur. J. Biochem.* 1, 80-91.
- Ehring, K., Leivo, I., Argraves, W.S., Ruoslahti, E. and Engvall, E. (1990) Merosin, a tissue-specific basement membrane protein, is a laminin-like protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3264-3268.
- Ellis, S.B., Brust, P.F., Koutz, P.J., Waters, A.F., Harpold, M.M. and Gingeras, T.R. (1985) Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* 5, 1111-1121.
- English, W.R., Holtz, B., Vogt, G., Knäuper, V. and Murphy, G. (2001) Characterization of the role of the "MT-loop". *J. Biol. Chem.* 276, 42018-42026.
- Farr, M., Pieper, M., Calvete, J. and Tschesche, H. (1999) The N-terminus of collagenase MMP-8 determines superactivity and inhibition: a relation of structure and function analyzed by biomolecular interaction analysis. *Biochemistry* 38, 7332-7338.
- Fernandez-Catalan, C., Bode, W., Huber, R., Turk, D., Calvete, J.J., Lichte, A., Tschesche, H. and Maskos, K. (1998) Crystal structure of the complex formed by the membrane type 1-matrix metalloproteinase with the tissue inhibitor of metalloproteinases-2, the soluble progelatinase A receptor. *EMBO J.* 17, 5238-5248.
- Ferretti, K.K. and Sgaramelle, V. (1981) Temperature dependence of the joining by *T4* DNA ligase of termini produced by type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids. Res.* 9, 85-93.
- Fischer, P. (1992) 25 Jahre automatisierte Proteinsequenzierung. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 40, 963-971.
- Fischer, B., Sumner, I. and Goodenough, P. (1993) Isolation, Renaturation and Formation of Disulfide Bonds of Eukaryotic Proteins Expressed in *Escherichia coli* as Inclusion Bodies. *Biotechnology and Bioengineering* 41, 183-187.
- Fischer, B., Sumner, I. and Goodenough, P. (1993) Renaturation of lysozyme-temperature dependence of renaturation rate, renaturation yield and aggregation: identification of hydrophobic folding intermediates. *Arch. Biochem. Biophys.* 306, 183-187.

- Fosang, A.J., Last, K., Knäuper, V., Neame, P.J., Murphy, G., Hardingham, T.E., Tschesche, H. and Hamilton, J.A. (1993) Fibroblast and neutrophil collagenases cleave at two sites in the cartilage aggrecan interglobular domain. *Biochem J.* 295, 273-276.
- Fosang, A.J., Last, K., Neame, P.J., Murphy, G., Knäuper, V., Tschesche, H., Hughes, C.E., Caterson, B. and Hardingham, T.E. (1994) Neutrophil collagenase (MMP-8) cleaves at the aggrecanase site E373-A374 in the interglobular domain of cartilage aggrecan. *Biochem J.* 304, 347-351.
- Fridman, R., Fuerst, T.R., Bird, R.E., Hoyhtya, M., Oelkuct, M., Kraus, S., Komarek, D., Liotta, L.A., Berman, M.L. and Stetler-Stevenson, W.G. (1992) Domain structure of human 72-kDa gelatinase/type IV collagenase. Characterization of proteolytic activity and identification of the tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) binding region. *J. Biol. Chem* 267,15398-15405.
- Gack, S., Vallon, R., Schmidt, J., Grigoriadis, A., Tuckermann, J., Schenkel, J., Weiher, H., Wagner, E.F. and Angel, P. (1995) Expression of interstitial collagenase during skeletal development of the mouse is restricted to osteoblast-like cells and hypertrophic chondrocytes. *Cell Growth Differ.* 6, 759-767.
- Gill, S.C. and von Hippel, P.H. (1989) Calculation of Protein Extinction Coefficients from Amino Acid Sequence Data. *Anal. Biochem.* 182, 319-326.
- Gohlke, U., Gomis-Rüth, F.-X., Crabbe, T., Murphy, G., Docherty, A.J.P. and Bode, W. (1996) The C-terminal (haemopexin-like) domain structure of human gelatinase A (MMP-2): structural implications for its function. *FEBS Letters* 378, 126-130.
- Gomis-Rüth, F.X., Gohlke, U., Betz, M., Knäuper, V., Murphy, G., Lopez-Otin, C. and Bode, W. (1996) The helping hand of collagenase-3 (MMP-13): 2.7 Å crystal structure of its C-terminal haemopexin-like domain. *J. Mol. Biol.* 264, 556-566.
- Gomis-Rüth, F.X., Maskos, K., Betz, M., Bergner, A., Huber, R., Suzuki, K., Yoshida, N., Nagase, H., Brew, K., Bourenkov, G.P., Bartunik, H. and Bode, W. (1997) Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature* 389, 77-81.
- Gray, G.C., Baldrige, J.S., McKeown, K.S., Heyneker, H.C. and Chang, C.N. (1985) Periplasmic production of correctly processed human growth hormone in *E. coli*. *Gene* 39, 247-254.

- Grinna, L. and Tschopp, J.F. (1989) Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Yeast* 5, 107-115.
- Gross, J. and Lapiere, C.M. (1962) Collagenolytic activity in amphibian tissues: A tissue culture assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54, 1014.
- Hall, D. (2001) Use of optical biosensors for the study of mechanistically concerted surface adsorption processes. *Analyt. Biochem.* 288, 109-125.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 570-580.
- Harris, E.D. and Krane, S.M. (1972) An endopeptidase from rheumatoid synovial tissue culture. *Biochim. Biophys. Acta* 258, 566-576.
- Hernandez-Barrantes, S., Shimura, Y., Soloway, P.D., Sang, QX.A. and Fridman, R. (2001) Differential roles of TIMP-4 and TIMP-2 in pro-MMP-2 activation by MT1-MMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 126-130.
- Heukeshoven, J. and Dernick, R. (1988) Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 9, 28-32.
- Heussen, C. and Dowdle, E.B. (1980) Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Annal. Biochem.* 102, 196-2002.
- Hodges, D.J., Reid, D.G., Rowan, A.D., Clark, I.M. and Cawston, T.E. (1998) Preparation of recombinant tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in high yield and identification of a hydrophobic surface feature. *Eur. J. Biochem.* 257, 562-569.
- Howard, E.W. and Banda, M.J. (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, 17972-17977.
- Howard, E.W., Bullen, E.C. and Banda, M.J. (1991) Regulation of autoactivation of human 72-kDa progelatinase by tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *J. Biol. Chem.* 266, 13064-13069.
- Itoh, Y., Kajita, M., Kinoh, H., Mori, H., Okada, A. and Seiki, M. (1999) Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP, MMP-17) is a glycosylphosphatidylinositol-anchored proteinase. *J. Biol. Chem.* 274, 34260-34266.

- Itoh, Y., Takamura, A., Ito, N., Maru, Y., Sato, H., Suenaga, N., Aoki, T. and Seiki, M. (2001) Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion. *EMBO J.* 20, 4782-4793.
- Jäger, W. (2000) Detektion von Protein-Interaktionen in den Proteomics. *Transkript Laborwelt* 4, 21-23.
- Jo, Y., Yeon, J., Kim, H.-J. and Lee, S.-T. (2000) Analysis of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 effect on pro-matrix metalloproteinase-2 activation by membrane-type 1 matrix metalloproteinase using baculovirus/insect-cell expression system. *Biochem. J.* 345, 511-519.
- Kang, T., Yi, J., Yang, W., Wang, X., Jiang, A. and Pei, D. (2000) Functional characterization of MT3-MMP in transfected MDCK cells: progelatinase A activation and tubulogenesis in 3-D collagen lattice. *FASEB* 14, 2559-2568.
- Kleine, T., Bartsch, S., Bläser, J., Schnierer, S., Triebel, S., Valentin, M., Gote, T. and Tschesche, H. (1993) Preparation of active recombinant TIMP-1 from *Escherichia coli* inclusion bodies and complex formation with the recombinant catalytic domain of PMNL-collagenase. *Biochemistry* 32, 14125-14131.
- Knight, G., Willenbrock, F. and Murphy, G. (1992) A novel coumarin-labelled peptide for sensitive continuous assays of matrix metalloproteinases. *FEBS Letters* 296, 263-266.
- Kocourek, A. (2002) Darstellung und Charakterisierung der katalytischen Domäne der humanen Makrophagenelastase. Dissertation, Universität Bielefeld.
- Kojima, S., Itoh, Y., Matsumoto, S., Masuho, Y. and Seiki, M. (2000) Membrane-type 6 matrix metalloproteinase (MT6-MMP, MMP-25) is the second glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored MMP. *FEBS Letters* 480, 142-146.
- Kolkenbrock, H., Hecker-Kia, A., Orgel, D., Ulbrich, N. and Will, H. (1997) Activation of progelatinase A and progelatinase A/TIMP-2 complex by membrane type-2 matrix metalloproteinase. *Biol. Chem.* 378, 71-76.
- Koutz, P.J., Davis, G.R., Stillmann, C., Barringer, K., Cregg, J.M. and Thill, G. (1989) Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes. *Yeast* 5, 167-177.
- Kreis, T. and Vale, R. (1994) Guidebook to the extracellular matrix and adhesion proteins. A Sambook & Tooze Publication at Oxford University Press 2nd Edition.

- Kröger, M. (1998) Rekombinante Darstellung, Charakterisierung und Stabilisierung einzelner Gelatinase-Varianten. Dissertation, Universität Bielefeld.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage *T4*. *Nature* 227, 680-685.
- Langone, J.J. and Vunakis, H. (1982) Immunochemical Techniques. In: Methods in Enzymologie. Bd. 92. London / NY.
- Lehti, K., Lohi, J., Valtanen, H. and Keski-Oja, J. (1998) Proteolytic processing of membrane-type-1 matrix metalloproteinase is associated with gelatinase A activation at the cell surface. *Biochem. J.* 334, 345-353.
- Lehti, K., Lohi, J., Juntunen, M.M., Pei, D. and Keski-Oja, J. (2002) Oligomerization through hemopexin and cytoplasmic domains regulates the activity and turnover of membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *J. Biol. Chem.* 277, 8440-8448.
- Libson, A.M., Gittis, A.G., Collier, I.E., Marmer, B.L., Goldberg, G.I. and Lattman, E.E. (1995) Crystal structure of the haemopexin-like C-terminal domain of gelatinase A. *Nature Structural Biol.* 2, 938-942.
- Liotta, L.A., Abe, S., Robey, P.G. and Martin, G.R. (1979) Preferential digestion of basement membrane collagen by an enzyme derived from a metastatic murine tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 2268-2272.
- Llano, E., Pendas, A.M., Freije, J.P., Nakano, A., Knäuper, V., Murphy, G. and Lopez-Otin, C. (1999) Identification and characterization of human MT5-MMP, a new membrane-bound activator of progelatinase A overexpressed in brain tumors. *Cancer Res.* 59, 2570-2576.
- Mainardi, C.L., Seyer, J.M. and Kang, A.H. (1980) Type-specific collagenolysis: a type V collagen-degrading enzyme from macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97, 1108-1115.
- Mandel, M. and Higa, A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53, 159-162.
- Matrisian, L.M. (1990) Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends. Genet.* 6, 121-125.
- Morgunova, E., Tuuttila, A., Bergmann, U., Isupov, M., Lindqvist, Y., Schneider, G. and Tryggvason, K. (1999) Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: activation mechanism revealed. *Science* 284, 1667-1670.

- Morgunova, E., Tuuttila, A., Bergmann, U. and Tryggvason, K. (2002) Structural insight into the complex formation of latent matrix metalloproteinase 2 with tissue inhibitor of metalloproteinase 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 7414-7419.
- Morrison, C.J., Butler, G.S., Bigg, H.F., Roberts, C.R., Soloway, P.D. and Overall, C.M. (2001) Cellular activation of MMP-2 (gelatinase A) by MT2-MMP occurs via a TIMP-2-independent pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 47402-47410.
- Morton, T.A., Myszka, D.G. and Chaiken, I.M. (1995) Interpreting complex binding kinetics from optical biosensors: A comparison of analysis by linearization, the integrated rate equation, and numerical integration. *Analyt. Biochem.* 227, 176-185.
- Mullis, K.B. (1990) The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.* 262, 56-61.
- Murphy, G., Willenbrock, F., Ward, R.V., Crockett, M.I., Eaton, D. and Docherty, A.J. (1994) Assessment of the role of the fibronectin-like domain of gelatinase A by analysis of a deletion mutant. *J. Biol. Chem.* 269, 6632-6636.
- Murphy, G., Nguyen, Q., Cockett, M.I., Atkinson, S.J., Allan, J.A., et al. (1994) Assessment of the role of the fibronectin-like domain of gelatinase A by analysis of a deletion mutant. *J. Biol. Chem.* 269, 6632-6636.
- Nagase, H. (1997) Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol. Chem.* 378, 151-160.
- Nguyen, Q., Murphy, G., Hughes, C.E., Mort, J.S. and Roughley, P.J. (1993) Matrix metalloproteinases cleave at two distinct sites on human cartilage link protein. *Biochem J.* 295, 595-598.
- O'Connell, J.P., Willenbrock, F., Docherty, A.J.P., Eaton, D. and Murphy, G. (1994) Analysis of the role of the COOH-terminal domain in the activation, proteolytic activity, and tissue inhibitor of metalloproteinase interaction of gelatinase B. *J. Biol. Chem.* 269, 14967-14973.
- O'Farrell, T. and Pourmotabbed, T. (1998) The fibronectin-like domain is required for the type V and XI collagenolytic activity of gelatinase B. *Arch. Biochem. Biophys.* 354, 24-30.
- O'Farrell, T. and Pourmotabbed, T. (2000) Identification of structural elements important for matrix metalloproteinase type V collagenolytic activity as revealed by chimeric enzymes. *J. Biol. Chem.* 275, 27964-27972.

- Ogata, Y., Itoh, Y. and Nagase, H. (1995) Steps involved in activation of the pro-matrix metalloproteinase 9 (progelatinase B)-tissue inhibitor of metalloproteinase-1 complex by 4-aminophenylmercuric acetat and proteinases. *J. Biol. Chem.* 270, 18506-18511.
- Okada, Y., Gonodji, Y., Nakanishi, I., Nagase, H. and Hayakawa, T. (1990) Immunohistochemical demonstration of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) in synovial lining cells of rheumatoid synovium. *Virchows Arch. B. Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 59, 305-312.
- Olson, M.W., Gervasi, D.C., Mobashery, S. and Fridman, R. (1997) Kinetic analysis of the binding of human matrix metalloproteinase-2 and -9 to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2. *J. Biol. Chem.* 272, 29975-29983.
- Ota, K., Stetler-Stevenson, W.G., Yang, Q., Kumar, A., Wada, J., Kashihara, N., Wallner, E.I. and Kanwar, Y.S. (1995) Cloning of murine membrane-type-1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and its metanephric development regulation with respect to MMP-2 and its inhibitor. *Kidney Int.* 54, 131-142.
- Overall, C.M., King, A.E., Sam, D.K., Ong, A.D., Lau, T.T.Y., Wallon, U.M., DeClerck, Y.A. and Atherstone, J. (1999) Identification of the tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) binding site on the hemopexin carboxyl domain of human gelatinase A by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 274, 4421-4429.
- Overall, C.M., Tam, E., McQuibban, G.A., Morrison, C., Wallon, U.M., Bigg, H.F., King, A.E. and Roberts, C.R. (2000) Domain interactions in the gelatinase A-TIMP-2-MT1-MMP activation complex. *J. Biol. Chem.* 275, 39497-39506.
- Patterson, M.L, Atkinson, S.J., Knäuper, V. and Murphy, G. (2001) Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. *FEBS Letters* 503, 158-162.
- Pei, D. and Weiss, S.J. (1995) Furin-dependent intracellular activation of human stromelysin-3 zymogen. *Nature* 375, 244-247.
- Pei, D. (1999) Identification and characterization of the fifth membrane-type matrix metalloproteinase MT5-MMP. *J. Biol. Chem.* 274, 8925-8932.
- Pharmacia (1992) Guidebooks for Protein Purification.

- Rantala-Ryhänen, S., Ryhänen, L., Nowal, F.V. and Uitto, J. (1983) Proteinases in human polymorphonuclear leukocytes. Purification and characterization of an enzyme which cleaves denatured collagen and a synthetic peptide with a Gly-Ile sequence. *Eur. J. Biochem.* 134, 129-137.
- Reinke, H., Fischer, S., Reimann, F. and Tschesche, H. (1991) *Methods in Protein Analysis.* (Jörnvall, Höög, Gustavsson) Birkenhäuser Verlag, Basel.
- Ries, C. and Petrides, P.E. (1995) Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. *Biol. Chem. Hoppe Syler* 376, 345-355.
- Rodgers, W.H., Osteen, K.G., Matrisian, L.M., Navre, N., Giudice, L.C. and Gorstein, F. (1993) Expression and localization of matrilysin, a matrix metalloproteinase, in human endometrium during the reproductive cycle. *F. Am. J. Obstet. Gynecol.* 168, 253-260.
- Rodgers, W.H., Matrisian, L.M., Giudice, L.C., Dsupin, B. Cannon, P., Svitek, C., Gorstein, F. and Osteen, K.G. (1994) Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones. *J. Clin. Invest.* 94, 946-953.
- Rowell, S., Hawtin, P., Minshull, C.A., Jepson, H., Brockbank, S.M.V., Barratt, D.G., Slater, A.M., McPheat, W.L., Waterson, D., Henney, A.M. and Pauptit, R.A. (2002) Crystal structure of human MMP-9 in complex with a reverse hydroxamate inhibitor. *J. Mol. Biol.* 319, 173-181.
- Rudd, P.M., Mattu, T.S., Masure, S., Bratt, T., Van den Steen, P.E., Wormald, M.R., Küster, B., Harvey, D.J., Borregaard, N., Van Damme, J., Dwek, R.A. and Opdenakker, G. (1999) Glycosylation of natural human neutrophil gelatinase B and neutrophil gelatinase B-associated lipocalin. *Biochemistry* 38, 13937-13950.
- Ruoslahti, E. (1989) Proteoglycans in cell regulation. *J. Biol. Chem.* 264, 13369-13372.
- Saarialho-Kere, U.K., Pentland, A.P., Birkedal-Hansen, H., Parks, W.C. and Welgus, H.G. (1994) Distinct populations of basal keratinocytes express stromelysin-1 and stromelysin-2 in chronic wounds. *J. Clin. Invest.* 94, 79-88.
- Saiki, K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

- Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, A. and Seiki, M. (1994) A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature* 370, 61-65.
- Sato, H., Kinoshita, T., Takino, T., Nakayama, K. and Seiki, M. (1996) Activation of recombinant membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-2). *FEBS Letters* 393, 101-104.
- Sato, H., Takino, T., Kinoshita, T., Imai, K., Okada, Y., Stetler-Stevenson, W.G. and Seiki, M. (1996) Cell surface binding and activation of gelatinase A induced by expression of membrane-type-1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *FEBS Letters* 385, 238-240.
- Schägger, H., Aquila, H. and von Jagow, G. (1988) Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis. *Anal. Biochem.* 173, 201-205.
- Schägger, H. and von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* 199, 223-231.
- Scorer, C.A., Buckholz, R.G., Clare, J.J. and Romanos, M.A. (1993) The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 136, 111-119.
- Sellers, A., Reynolds, J.J. and Meikle, M.C. (1978) Neutral metallo-proteinases of rabbit bone. Separation in latent forms of distinct enzymes that when activated degrade collagen, gelatin and proteoglycans. *Biochem J.* 171,493-496.
- Silletti, S., Kessler, T., Goldberg, J., Boger, D.L. and Cheresh, D.A. (2001) Disruption of matrix metalloproteinase 2 binding to integrin $\alpha_v\beta_3$ by an organic molecule inhibits angiogenesis and tumor growth *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 119-124.
- Sopata, I. and Dancewicz, A.M. (1974) Presence of a gelatin-specific proteinase and its latent form in human leucocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 370, 510-523.
- Springman, E.B., Angleton, E.L., Birkedal-Hansen, H. and Van Wart, H.E. (1990) Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 364-368.

- Spurlino, J.C., Smalwood, A.M., Carlton, D.D., Banks, T.M., Vavra K.J., Johnson, J.S., Cook, E.R., Falvo, J., Wahl, R.C., Pulvino, T.A. et al. (1994) 1,56 Å structure of mature truncated human fibroblast collagenase. *Proteins* 19, 98-109.
- Sreekrishna, K. and Kropp, K.E. (1996) *Pichia pastoris*, In: Wolf, K. (Hrsg.) Nonconventional yeasts in biotechnology, Springer Berlin, Heidelberg, New York, 203-253.
- Steffensen, B., Wallon, U.M. and Overall, C.M. (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, 11555-11566.
- Sternlicht, M.D. and Bergers, G. (2000) Matrix metalloproteinases as emerging targets in anti-cancer therapy: status and prospects. *Emerging Ther. Targets* 4, 609-633.
- Sternlicht, M.D. and Werb, Z. (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 463-516.
- Stetler-Stevenson, W.G., Kruttsch, H.C. and Liotta, L.A. (1989) Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J. Biol. Chem.* 264, 17374-17378.
- Stöcker, W., Grams, F., Baumann, U., Reinemeier, P., Gomis-Rüth, F.X., McKay, D.B. and Bode, W. (1995) The metzinkins - Topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins and matrixins (collagenase) define a superfamily of zincpeptidases. *Pro. Sci.* 4, 823-840.
- Stratmann, B. (2000) Klonierung, Expression und Charakterisierung des "human tissue inhibitor of metalloproteinases-4". Dissertation, Universität Bielefeld.
- Strongin, A.Y., Collier, I.E., Krasnov, P.A., Genrich, L.T., Marmer, B.L. and Goldberg, G.I. (1993) Human 92 kDa type IV collagenase: functional analysis of fibronectin and carboxyl-end domains. *Kidney Int.* 43, 158-162.
- Strongin, A.Y., Collier, I., Bannikov, G., Marmer, B.L., Grant, G.A. and Goldberg, G.I. (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, 5331-5338.
- Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113-130.
- Stute, J. (1998) Klonierung und Expression einzelner Gelatinase-Domänen. Diplomarbeit, Universität Bielefeld.

- Tang, X., Nakata, Y., Li, H.O., Zhang, M., Gao, H., Fujita, A., Sakatsume, O., Otha, T. and Yokoyama, K. (1994) The optimization of preparation of competent cells for transformations of *E. coli*. *Nucleic. Acids. Res.* 22, 2857-2858.
- Toth, M., Bernardo, M., Gervasi, D.C., Soloway, P.D., Wang, Z., Bigg, H.F., Overall, C.M., DeClerck, Y.A., Tschesche, H., Cher, M.L., Brown, S., Mobasherry, S. and Fridman, R. (2000) Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 acts synergistically with synthetic matrix metalloproteinase (MMP) inhibitors but not with TIMP-4 to enhance the (membrane type 1)-MMP-dependent activation of pro-MMP-2. *J. Biol. Chem.* 275, 41415-41423.
- Triebel, S., Bläser, J., Reinke, H. And Tschesche, H. (1992) A 25 kDa α_2 -microglobulin-related protein is a component of the 125 kDa form of human gelatinase. *FEBS* 314, 386-388.
- Tschesche, H., Knäuper, V., Krämer, S., Michaelis, J., Oberhoff, R. and Reinke, H. (1992) Latent collagenase and gelatinase from human neutrophils and their activation. *Matrix Supplement 1*, 245-255.
- Tschesche, H. (1995) Human Neutrophil Collagenase. In: *Methods of Enzymology, proteolytic Enzymes: Aspartatic and Metallo Peptidases*. 248, 431-449.
- Tschesche, H. (2001) Persönliche Mitteilungen.
- Tschopp, J.F., Sverlow, G., Kosson, R., Craig, W. and Grinna, L. (1987) High level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* 5, 1305-1308.
- Valesco, G., Pendas, A.M., Fueyo, A., Knäuper, V., Murphy, G. and Lopez-Otin, C. (1999) Cloning and characterization of human MMP-23, a new matrix metalloproteinase predominantly expressed in reproductive tissues and lacking conserved domains in other family members. *J. Biol. Chem.* 274, 4570-4576.
- Van den Steen, P., Rudd, P.M., Proost, P., Martens, E., Paemen, L., Küster, B., van Dammen, J., Dwek, R.A. And Opendakker, G. (1998) Oligosaccharides of recombinant mouse gelatinase B variants. *Biochim. Biophys. Acta* 1425, 587-598.
- Van Wart, H.E. and Birkedal-Hansen, H. (1990) The cystein-switch: A principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 5578-5582.

- Velasco, G., Cal, S., Merlos-Suarez, A., Ferrando, A.A., Alvarez, S., Nakano, A., Arribas, J. and Lopez-Otin, C. (2000) Human MT6-matrix metalloproteinase: identification, progelatinase A activation, and expression in brain tumors. *Cancer Res.* 60, 877-882.
- Wang, Y., Johnson, A.R., Ye, Q.Z. and Dyer, R.D. (1999) Catalytic activities and substrate specificity of the human membrane type 4 matrix metalloproteinase catalytic domain. *J. Biol. Chem.* 274, 33043-33049.
- Weber, K. and Osborne, M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamid gelelectrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4412.
- Westermeier, R. (1990) *Electrophorese-Praktikum*. VCH, Weinheim.
- Wilhelm, S.M., Collier, I.E., Marmer, B.L., Eisen, A.Z., Grant, G.A. and Goldberg, G.I. (1989) SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J. Biol. Chem.* 264, 17213-17221.
- Will, H., Atkinson, S.J., Butler, G.S., Smith, B. and Murphy, G. (1996) The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autoproteolytic activation. Regulation by TIMP-2 and TIMP-3. *J. Biol. Chem.* 271, 17119-17123.
- Winnacker, E.L. (1990) *Gene und Klone*. VCH, Weinheim.
- Xu, Q. and Shively, J. (1988) Microsequence analysis of peptides and proteins. *Anal. Biochem.* 170, 19-30.
- Yu, M., Sato, H., Seiki, M., Spiegel, S. and Thompson, E.W. (1997) Calcium influx inhibits MT1-MMP processing and blocks MMP-2 activation. *FEBS Letters* 412, 568-572.

Kapitel 7 Anhang

7.1 Stämme und Vektoren

7.1.1. *Escherichia coli* Stämme

Alle verwendeten Stämme sind rekombinationsdefiziente *E. coli* Stämme, die im Phänotyp ampicillinsensitiv sind. Sie wurden von den Firmen Novagen, Invitrogen und Stratagene bezogen.

7.1.1.1 *E. coli* [JM 109]

Genotyp: *endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17 (r_Km_K) relA1 supE44 Δ(lac-proAB)*
[f'*traD36 proAB AB lacI^q ΔM15*]

Der *E. coli* Stamm [JM 109] (Promega, Mannheim) wurde im Rahmen der TA-Klonierung zur Transformation von Ligationsansätzen eingesetzt.

7.1.1.2 *E. coli* [XL1 blue MRF[']]

Genotyp: *Δ(mcrA) 183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 endA1 supE44 thi-1 recA1*
gyrA96 relA1 lac[F['] proAB lacI^q ZΔM15 Tn 10 (Tet^r)]

Bei dem *E. coli* Stamm [XL1 blue MRF[']] (Stratagene, La Jolla) handelt es sich um einen reinen Klonierungsstamm, der zur Klonierung der Ziel-DNA in verschiedene Vektoren und zur Vervielfältigung und Erhaltung der Plasmide eingesetzt wurde, da er rekombinationsdefizient (*recA*-) ist und hohe Transformationsraten erzielt. Verwendung findet dieser Stamm insbesondere auch bei der Klonierung eukaryotischer cDNA, da diese oftmals an Cytosinen und/oder Adeninen methyliert ist und vom Bakterium als fremde DNA erkannt wird, was zum Abbau der DNA führen kann. Mutationen in verschiedenen Genen des Stammes verhindern dies.

7.1.2 *Escherichia coli* Vektoren

7.1.2.1 pCRTM-2.1-TOPO

Für TA-Klonierungen wurde der Vektor pCRTM-2.1-TOPO (Invitrogen, Groningen) eingesetzt, der auf Plasmiden der pUC-Serie basiert.

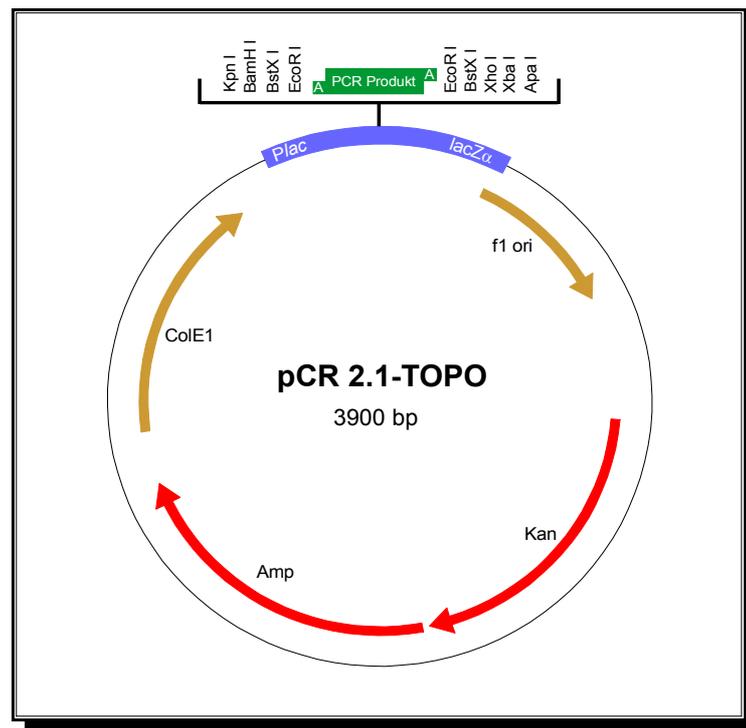


Abbildung 48: Vektorkarte pCRTM-2.1-TOPO. (*Plac*: *lac* Promotor; *lacZα*: *lacZα* Fragment; *f1 ori*: *f1* Replikationsursprung; *Kan*: Kanamycinresistenzgen; *Amp*: Ampicillinresistenzgen; *ColE1*: Replikationsursprung ; PCR Produkt: TA-Klonierungsstelle)

7.1.2.2 pGEM™-T

Der pGEM™-T-Vektor (Promega, Mannheim) wurde ebenfalls für die TA-Klonierungen verwendet.

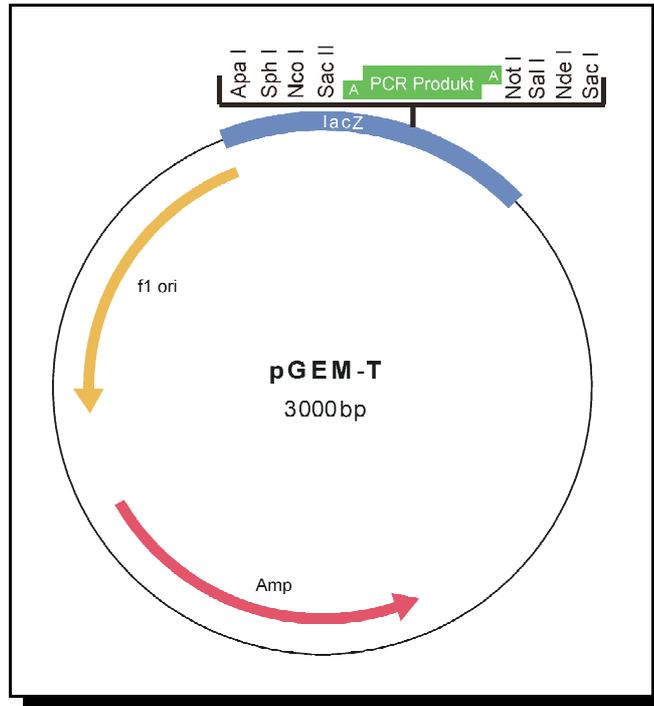


Abbildung 49: Vektorkarte pGEM™-T. (lacZ: lacZ Fragment; f1 ori: f1 Replikationsursprung; Amp: Ampicillinresistenzgen; PCR Produkt: TA-Klonierungsstelle)

7.1.3 *Pichia pastoris* Stämme

P. pastoris besitzt zwei Gene, die für Alkohol-Oxidase kodieren: AOX1 und AOX2. Für den weitaus größten Teil der Alkohol-Oxidase-Aktivität in der Zelle ist das AOX1-Gen verantwortlich. Die Expression ist genau reguliert und kann durch Induktion mit Methanol auf ein Vielfaches ansteigen. *P. pastoris* Stämme wie [X 33] und [GS 115] nutzen das AOX1-Gen, um Methanol als einzige Kohlenstoffquelle zu metabolisieren. Sie gehören zum Phänotyp Mut⁺ (Methanol utilization plus).

Das AOX2-Gen ist 97% homolog zum AOX1-Gen. Der Verlust des AOX1-Gens führt zum Verlust des größten Teils der Alkohol-Oxidase-Aktivität der Zellen und resultiert im verlangsamten Methanol-Metabolismus unter Nutzung des AOX2-Gens und damit in

vermindertem Wachstum (Cregg et al. 1989). Zu diesem Phänotyp Mut^s (Methanol utilization slow) gehört der *P. pastoris* Stamm [KM 71].

Die Stämme wurden von der Firma Invitrogen, Groningen bezogen.

Genotypen: [X 33]: wildtyp
 [GS 115]: his4
 [KM 71]: arg4 his4 aox1:ARG4

7.1.4 *Pichia pastoris* Vektor pPICZ α A

Für die heterologe Expression in *P. pastoris* wurde der Vektor pPICZ α A (Invitrogen, Groningen) verwendet, der nach Linearisierung durch Restriktion innerhalb des AOX1-Gens in das *Pichia*-Genom integriert wurde.

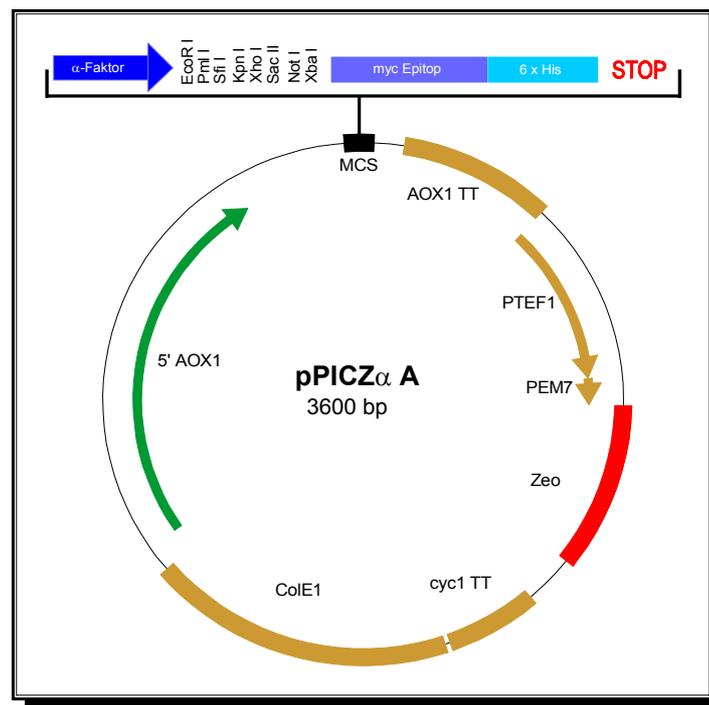


Abbildung 50: Vektorkarte pPICZ α A. (5' AOX1: Promotor der Alkoholoxidase; α -Faktor: α -Faktor Sekretionssignal; MCS: Multiple Cloning Site; *myc*: C-terminales *myc*-Epitop; 6x His: C-terminaler Polyhistidin-Tag; AOX1 TT: Transkriptionsterminationsregion des AOX1 Gens; PTEF1: Promotor des Transkriptionselongationsfaktors 1; PEM 7: Synthetischer prokaryontischer Promotor für Zeocinresistenzgen; Zeo: Zeocinresistenzgen; *Cyc1* TT: Transkriptionsterminationsregion des *cyc1* Gens; ColE1: Replikationsursprung für *E. coli*)

7.2 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein bezogen.

Fettdruck: Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *NotI*

Kursivdruck: Start- bzw. Stopp-Codons

Farbdruck: Sequenz-Elemente aus α -Präpropeptid

72-Häm-F: 5'-CTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGCCTCTCCT-3'

72-Häm-R: 5'-GCGGCCGCCTAGCAGCCTAG-3'

92-Häm-F: 5'-CTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTACTGCTGGCCCTTCT-3'

92-Häm-R: 5'-GCGGCCGCCTAGTCCTCAGGGCA-3'

92-KaDo-F: 5'-CTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTTTCCAAACCTTT-3'

92-KaDo-R: 5'-GCGGCCGCCTAACCATAGAGGTGCC-3'

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Stute
Vorname: Jörg
Adresse: Stellmacherweg 11, 33659 Bielefeld
Geburtsdatum: 15.04.1972
Geburtsort: Bielefeld
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet

Schulische Ausbildung

1978 - 1982 Grundschule in Bielefeld-Brackwede
1982 - 1991 Gymnasium Brackwede
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Wissenschaftliche Ausbildung

WS 1991 - SS 1998 Universität Bielefeld
Studiengang: Diplom Chemie (Gesamtnote: gut)
Thema der Diplomarbeit:
„Klonierung und Expression einzelner Gelatinase-Domänen“
SS 1998 - WS 2002 Universität Bielefeld
Promotion an der Fakultät für Chemie, Fachrichtung Biochemie
Thema der Doktorarbeit:
„Klonierung, Expression und Charakterisierung einzelner Domänen
der Gelatinasen“

Zivildienst

1998 - 1999 Familienentlastender/-unterstützender Dienst Lebenshilfe Bielefeld

Seminare / Fortbildungen

September 2000 Gentechnikrecht:
Gefährdungspotentiale, Sicherheitsmaßnahmen und
Rechtsvorschriften