

Klonierung, Expression und Charakterisierung der Ektodomäne der MT1-MMP

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Universität Bielefeld

vorgelegt von
Martin Roderfeld
aus Rüthen

Arbeitsgruppe Prof. Dr. H. Tschesche
Biochemie I, Fakultät für Chemie
Universität Bielefeld
September 2001

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 1998 bis September 2001 in der Arbeitsgruppe Biochemie I an der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld unter Leitung von Professor Dr. Harald Tschesche durchgeführt. Herrn Tschesche danke ich herzlich für die Aufgabenstellung. Mit stetem Interesse am Fortgang dieser Arbeit sowie durch viele Anregungen hat Herr Tschesche wesentlich zum selbstständigen Erstellen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Knut Kleesiek danke ich für seine Bereitschaft, sich als Zweitgutachter zur Verfügung zu stellen.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Biochemie I danke ich für die Hilfe bei wissenschaftlichen Fragestellungen. Ich wünsche allen Kollegen, immer wieder ein solch freundschaftliches und aufgeschlossenes Betriebsklima vorzufinden, wie es in der Biochemie I herrschte. Frau Margot Müller, Herrn Dr. Herbert Wenzel und Herrn Dipl. Ing. Rainer Beckmann danke ich in dieser Hinsicht ganz besonders.

Frau Dr. Andrea Lichte danke ich insbesondere für die korrigierte MT1-MMP-cDNA und die Einarbeitung in die MT1-MMP Thematik.

Herrn Dipl. Chem. Oliver Hiller und Herrn Dr. Martin Farr danke ich für die Zusammenarbeit bei der Aufklärung der Substratspezifität.

Herrn Dr. Bernd Stratmann und Herrn Dr. Jörg Schröder danke ich für die gemeinsamen Untersuchungen zur Inhibition der MT1-MMP.

Ich danke besonders Herrn Marc-Oliver Luther für die fachliche Hilfe bei der praktischen Durchführung. Herrn Luther, Frau Katharina Köster und Frau Kerstin Böker danke ich für die Protein-Sequenzierungen.

Frau Prof. Dr. Cornelia Mauch und Frau Dr. Paola Zigrino danke ich für die kooperative Zusammenarbeit und die freundliche Überlassung der HEK-293 Zelllinien.

Herrn Prof. Dr. Erwin Flaschel, dem Leiter des Lehrstuhls für Fermentationstechnik der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld, danke ich für die Bereitstellung der Fermentationsanlage. Herrn Chem. Ing. Thomas Schäffer möchte ich für seine Hilfe und seine Mitarbeit bei der Durchführung der Fermentationen danken.

Frau Dr. Monika Burg, Herrn Dipl. Chem. Oliver Hiller und Herrn Martin Püttschneider danke ich für die Durchsicht der Arbeit.

Den Praktikanten Stefano, Jean, Michael, und Sylvia, die im Laufe ihrer sechswöchigen Praktika zum Fortgang meiner Arbeit beigetragen haben, möchte ich hiermit danken.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern, meinen Brüdern und Monika danken, mit deren Unterstützung ich diese Arbeit schreiben konnte.

1	EINLEITUNG	4
1.1	DIE EXTRAZELLULÄRE MATRIX	4
1.2	MATRIX METALLOPROTEINASEN	6
1.2.1	Domänenstruktur	6
1.2.1.1	Das Signalpeptid	7
1.2.1.2	Das Propeptid	7
1.2.1.3	Die Furin-Spaltstelle	7
1.2.1.4	Die katalytische Domäne	7
1.2.1.5	Die Fibronectin Typ II-Domänen	10
1.2.1.6	Hinge Region	10
1.2.1.7	Die Hämopexin-ähnliche Domäne	11
1.2.1.8	Die Transmembran- und die cytoplasmatische Domäne	12
1.2.2	Regulation der MMP Aktivität	13
1.2.2.1	Transkription	13
1.2.2.2	Aktivierung	14
1.2.2.3	Inhibierung durch TIMPs	18
1.2.3	Substrate der Matrixine	20
1.2.3.1	Natürliche Substrate	20
1.2.3.2	Fibrinogen als natürliches Substrat der MT1-MMP	21
1.2.3.3	Synthetische Substrate	21
1.2.4	Biologische Rolle der Matrix Metalloproteinasen	23
1.2.4.1	Physiologische Prozesse	23
1.2.4.2	Pathologische Prozesse	23
1.2.4.3	Die Rolle von MT1-MMP bei Krankheiten des zentralen Nervensystems	24
1.2.5	Calciumabhängigkeit der Matrix Metalloproteinase-Aktivität	26
2	ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT	28
3	MATERIAL UND METHODEN	30
3.1	KULTIVIERUNG VON ZELLEN	30
3.1.1	<i>E. coli</i>	30
3.1.2	<i>Pichia pastoris</i>	30
3.1.3	HEK293-EBNA	31
3.2	KLONIERUNG	31
3.2.1	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	31
3.2.2	Gelelektrophorese	33
3.2.3	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	33
3.2.4	DNA-Reinigung	33
3.2.5	Vektoren	34
3.2.6	Klonierung und Transformation mit dem pGEM [®] T-Easy Kit	34
3.2.7	Klonierung in den Expressionsvektor	35
3.2.8	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	35
3.2.9	Restriktion	35
3.2.10	DNA-Sequenzierung	35

3.2.11	Transformation von <i>Pichia Pastoris</i>	36
3.2.12	Selektion exprimierender Klone	36
3.3	EXPRESSION UND REINIGUNG	36
3.3.1	Kultivierung im Schüttelkolben	36
3.3.2	Kultivierungen im Bioreaktor (20 Liter Kulturvolumen)	37
3.3.3	Reinigung der rekombinanten Ektodomäne der MT1-MMP	38
3.3.4	Konzentrationsbestimmungen	39
3.4	CHARAKTERISIERUNG	39
3.4.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
3.4.2	Färbung von PAA-Gelen	40
3.4.3	Elektroblotting	40
3.4.4	Mikrosequenzierung nach Edman	40
3.4.5	Western Blot-Analyse	40
3.4.6	MALDI-TOF-MS-Untersuchungen	41
3.4.7	<i>Reversed Phase</i> HPLC (RP-HPLC)	41
3.4.8	Kinetische-Untersuchungen	42
3.4.9	Autolyse und Identifizierung der Spaltprodukte	43
3.4.10	Spaltung von Substraten und Identifizierung der Degradationsprodukte	43
3.4.11	Zymogramme	44
3.4.12	Calcium-Abhängigkeit	44
3.4.13	Reversible Aktivierung/Hemmung	44
3.4.14	Hemmung durch natürliche und synthetische Inhibitoren	45
4	ERGEBNISSE	46
4.1	KLONIERUNG	46
4.1.1	Subklonierung der cDNA (proMT1-MMP [Ala ²¹ -Glu ⁵²³]) in <i>E. coli</i>	46
4.1.1.1	PCR zur Gewinnung der cDNA	46
4.1.1.2	TA-Klonierung in den pGEM [®] T-Vektor	47
4.1.2	Klonierung des 1500 bp Fragments in den Expressionsvektor pPICZαA	48
4.1.3	Klonierung der proMT1-MMP (Ala ²¹ -Glu ⁵²³) in <i>P. pastoris</i>	49
4.2	EXPRESSION UND REINIGUNG	49
4.2.1	Expression der Ektodomäne der MT1-MMP (Ala ²¹ -Glu ⁵²³)	49
4.2.2	Affinitätschromatographische Reinigung	51
4.2.3	Kultivierungen im Bioreaktor (20 Liter Kulturvolumen)	53
4.3	CHARAKTERISIERUNG	54
4.3.1	Identifizierung des 47,5 kDa Expressionsproduktes durch N-terminale Sequenzierung	54
4.3.2	Identifizierung des C-Terminus durch die MALDI-TOF Analyse	55
4.3.3	Untersuchung der autolytischen Fragmentierung	56
4.3.4	Vergleich der Substratspezifität katalytische Domäne – Ektodomäne	57
4.3.4.1	Proteolytischer Abbau von Fibrinogen	57
4.3.4.2	Proteolytischer Abbau des <i>myelin basic protein</i>	60
4.3.4.3	Spaltung von Substanz P	61
4.3.4.4	Abbau von Gelatin, β-Casein und den Kollagenen I, III, VI und VII im Zymogramm	63
4.3.5	Vergleich der kinetischen Parameter katalytische Domäne-Ektodomäne	64

4.3.5.1	Fluoreszenzkinetische Messung mit dem MCA-Peptid.....	64
4.3.5.2	Fluoreszenzkinetische Messungen mit Gelatin als Substrat.....	65
4.3.6	Inhibierung der MT1-MMP-Varianten durch natürliche und synthetische Inhibitoren.....	66
4.3.6.1	Hemmung durch TIMPs.....	67
4.3.6.2	Hemmung durch synthetische Inhibitoren.....	68
4.3.7	Regulation der Aktivität über die Calcium-Konzentration.....	69
4.3.7.1	Abhängigkeit der proteolytischen Aktivität von der Calcium-Konzentration.....	70
4.3.7.2	Reversible Aktivierung und Deaktivierung der MT1-MMP.....	71
5	ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION DER ERGEBNISSE	74
5.1	KLONIERUNG.....	74
5.2	EXPRESSION UND REINIGUNG.....	75
5.2.1	Expression.....	75
5.2.2	Fermentation.....	76
5.2.3	Reinigung.....	76
5.3	CHARAKTERISIERUNG.....	77
5.3.1	Immunologischer Nachweis.....	77
5.3.2	N-terminale Sequenzierung und MALDI-TOF.....	77
5.3.3	Autolytische Fragmentierung.....	77
5.3.4	Fibrinogen-Proteolyse.....	78
5.3.5	MBP-Proteolyse.....	79
5.3.6	Spaltung des Neurotransmitters Substanz-P.....	79
5.3.7	Kinetische Messungen.....	79
5.3.8	Hemmung.....	81
5.3.9	Calciumabhängigkeit der Aktivität.....	81
5.4	AUSBLICK.....	83
6	LITERATUR.....	84
	LEBENS LAUF	104

1 Einleitung

1.1 Die extrazelluläre Matrix

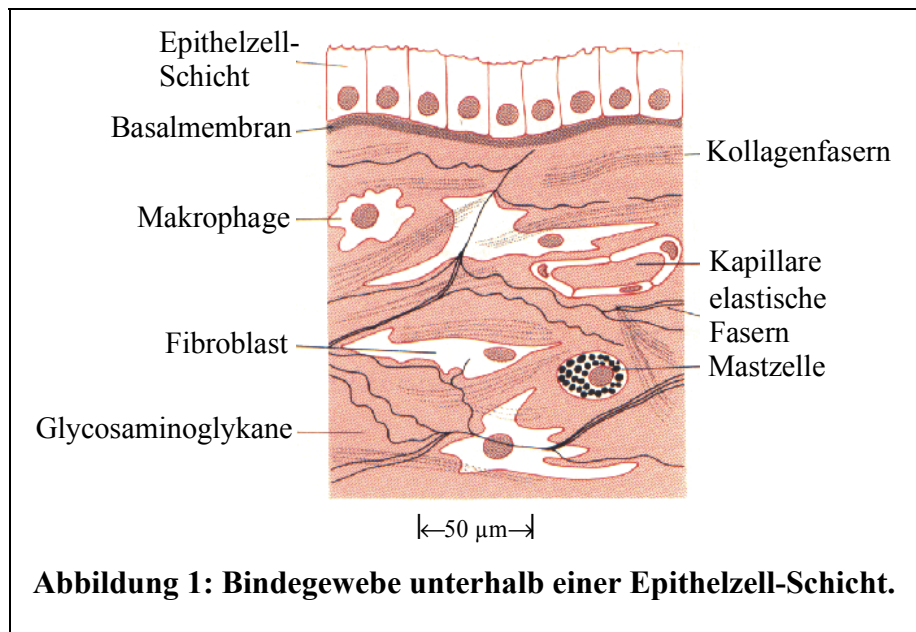
Gewebe bestehen aus Zellen und der sie umgebenden extrazellulären Matrix (engl.: Extra Cellular Matrix - ECM). Der Aufbau und die Zusammensetzung der Matrix bestimmt im wesentlichen die physikalischen Eigenschaften und die Morphologie der entsprechenden Gewebe (Alberts et al., 1990). Zum Beispiel führt die Calcifizierung der Matrix in Knochen und Zähnen zu hartem Gewebe, während die kollagenreichen Sehnen enorme Zugfestigkeit und Elastizität aufweisen. Aufgrund von Funktion und morphologischer Zusammensetzung kann zwischen Epithel-, Binde-, Muskel- und Nervengewebe unterschieden werden. In Bindegeweben nimmt die extrazelluläre Matrix im allgemeinen mehr Raum ein als die Zellen. Die verschiedenen Organe weisen eine sehr unterschiedliche Verteilung der einzelnen Gewebe auf: Haut oder Knochen bestehen weitgehend aus Bindegeweben, während Bindegewebe im Gehirn oder Rückenmark nur einen geringen Anteil an der Gesamtmasse stellen.

Die Makromoleküle der ECM werden hauptsächlich von den in ihr eingebetteten Zellen sezerniert und entsprechend den Gewebeeigenschaften angeordnet und vernetzt. In den meisten Bindegeweben wird diese Aufgabe durch Fibroblasten oder höher spezialisierte Zellen der Fibroblasten-Familie erfüllt. Zwei Haupttypen von Makromolekülen der ECM werden unterschieden:

Proteoglycane (z.B.: Aggrecan, Perlecan oder Decorin) sind hochmolekulare Aggregate, bestehend aus Polysaccharidketten (Chondroitin-, Dermatan-, Keratan- oder Heparansulfat), die an ein Proteingerüst gebunden sind. Sie sind sehr hydrophil und bilden unter Einlagerung von interstitieller Flüssigkeit hydratisierte Gele. Unterstützt wird diese Eigenschaft durch die hohe negative Ladungsdichte, die zur Bindung osmotisch aktiver Kationen führt. Die auf diese Weise gebundene Wassermenge verleiht der extrazellulären Matrix einen bestimmten Quelldruck (Tugor), der für die Druckfestigkeit des entsprechenden Gewebes verantwortlich ist. Der gelartige Aufbau der Matrix ermöglicht einerseits einen raschen Transport wasserlöslicher Moleküle (Versorgung) und andererseits die Wanderung von Zellen.

Neben den Proteoglycanen bilden die Faserproteine die zweite große Hauptklasse von Makromolekülen der ECM. Man unterscheidet je nach Funktion die Strukturproteine (z.B. Kollagen, Elastin oder Fibrillin), die der Matrix mechanische Stabilität verleihen, und Anheftungsproteine (z.B. Fibronectin und Laminin), die für die Anheftung von Zellen an die

Strukturen der ECM verantwortlich sind. Die große Vielfalt der Kollagentypen (Fibrilläre Kollagene z.B. Typ I, II, III; nichtfibrilläres Kollagen Typ IV und niedermolekulare Kollagene) und die Anordnung und Vernetzung der Kollagenfibrillen bildet eine wesentlich Grundlage für die Eigenschaften und die Morphologie des jeweiligen Gewebes.



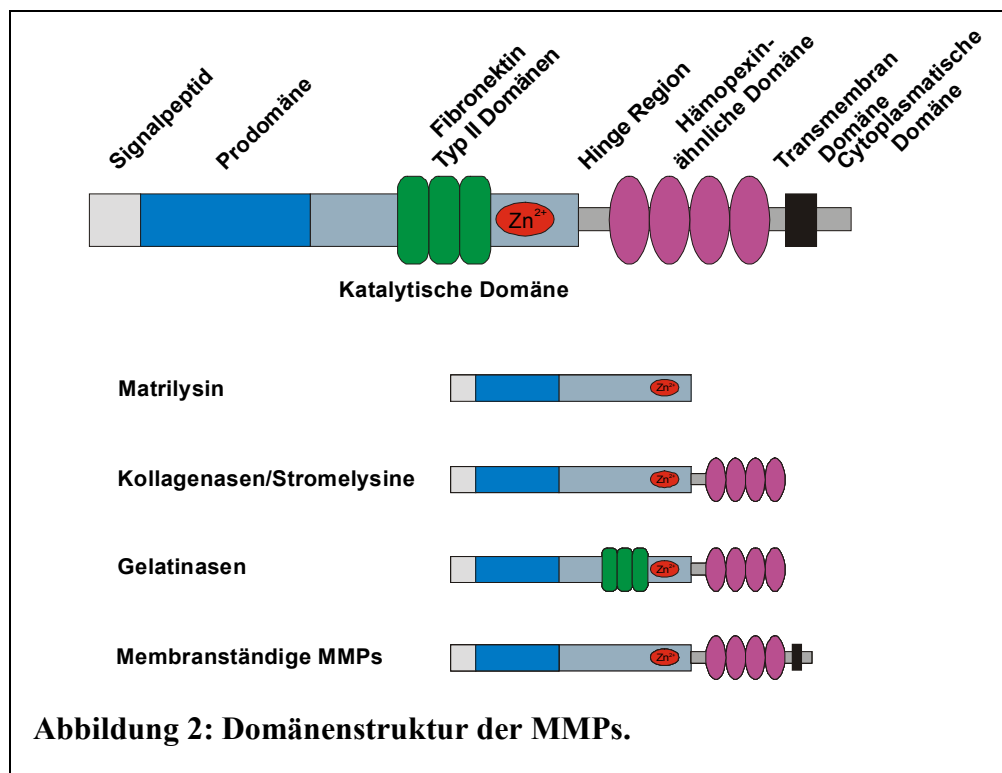
Entgegen der bis vor kurzem gültigen Lehrmeinung, nach der die ECM nur eine „statische Stützfunktion“ des Gewebes erfüllt, ist heute klar, daß die Matrix eine aktive und komplexe Rolle für Entwicklung, Bewegung, Vermehrung, Form, Funktion und Stoffwechselfunktion von Zellen, mit denen sie in Kontakt steht, spielt. Hinsichtlich Synthese und Degradation ihrer Komponenten stellt die Matrix ein fein reguliertes, dynamisches System dar. Dies äußert sich in physiologischen Prozessen, wie z.B. Wundheilung, Wachstum, Embryogenese oder Angiogenese. Pathologische Ereignisse, wie z.B. Fibrosen, rheumatoide Arthritis, Parodontose, chronische Entzündungen, Tumorwachstum und Metastasierung, gehen mit der verstärkten Bildung oder dem exzessivem Abbau von Matrixkomponenten einher. Neben Threonin- und Aspartatproteasen spielen vor allem Serin-, Cystein- und die Metalloproteasen eine wichtige Rolle bei der Degradation von Bestandteilen der ECM (Alexander & Werb, 1998; Basbaum & Werb, 1996). Die Metzinkine bilden die wichtigste Klasse der Metalloproteinasen und werden in die Familien der Adamalysine, Astazine, Serralysine und Matrixine (Matrix Metalloproteinasen/MMPs) eingeteilt (Stöcker et al., 1995).

1.2 Matrix Metalloproteinasen

Viele physiologische und pathologische Prozesse zeichnen sich durch die Umstrukturierung von Bindegewebe aus. 1962 zeigten Gross und Lapière, daß verschiedene auf Kollagen-Gelen kultivierte Gewebe den Abbau des tripelhelikalen Kollagens verursachten. Nach dieser ersten Veröffentlichung im Zusammenhang mit Matrixinen folgten Berichte über die Entdeckung von Kollagenasen in humanen Geweben (MMP-1) und in Neutrophilen Granulozyten (MMP-8) (Gross & Nagai, 1965; Lazarus et al., 1968). Im Laufe der Jahre wuchs die Familie der MMPs durch die Charakterisierung weiterer Mitglieder mit unterschiedlichen Eigenschaften, so daß bis heute 19 humane Matrix Metalloproteinasen identifiziert und charakterisiert werden konnten (Woessner, J.F. & Nagase, H., 2000).

1.2.1 Domänenstruktur

Neben der Sequenzhomologie weisen alle charakterisierten MMPs eine hohe Strukturhomologie auf. Aufbau und Funktion der MMPs sind auf das Zusammenspiel der einzelnen Domänen zurückzuführen (Bode et al., 1999). Im Folgenden werden Aufbau und Funktionen der einzelnen Domänen erklärt:



1.2.1.1 Das Signalpeptid

Alle MMPs werden intrazellulär synthetisiert und in den extrazellulären Raum sezerniert. Das dafür verantwortliche hydrophobe Signalpeptid besitzt typischerweise 18 bis 30 Aminosäurereste und wird während der Sekretion abgespalten.

1.2.1.2 Das Propeptid

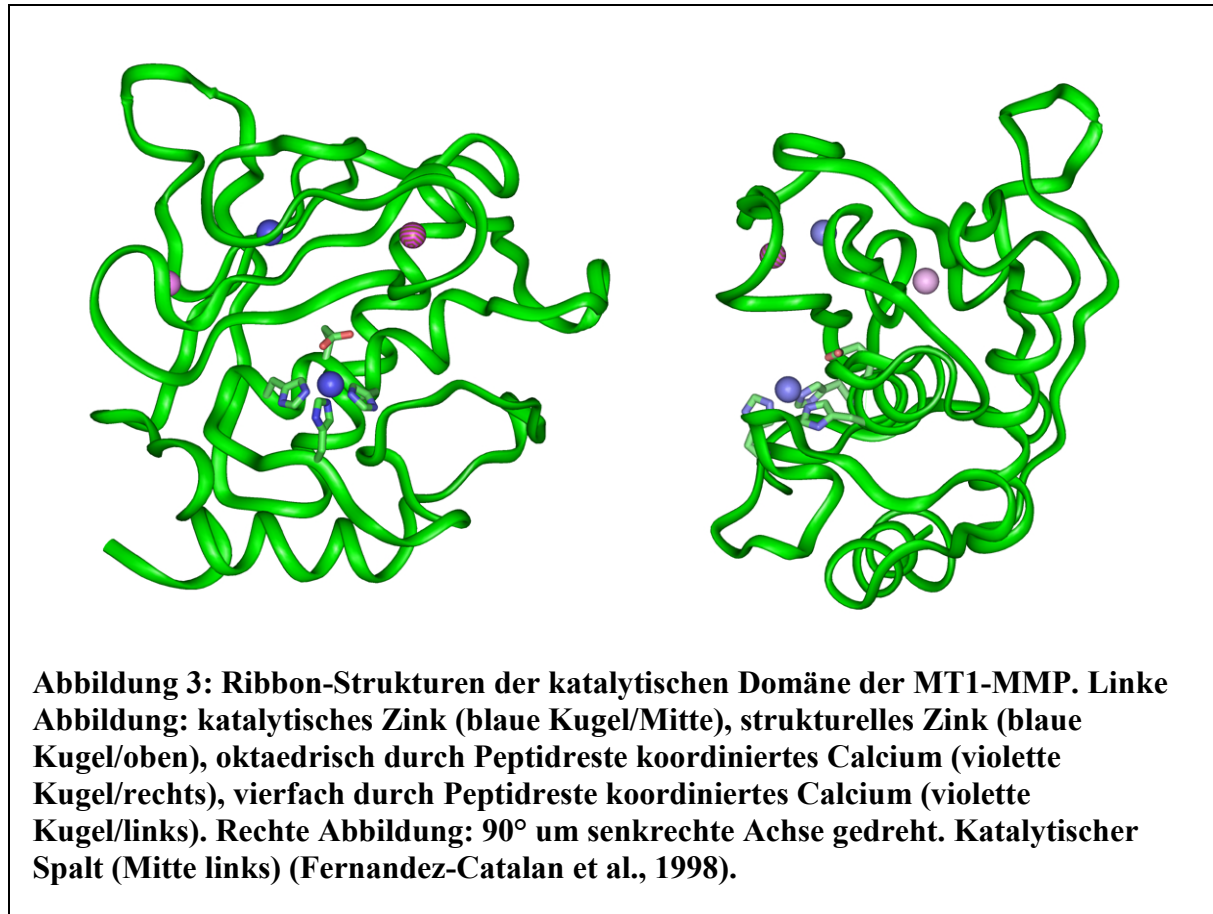
Das durchschnittlich 80 Aminosäuren umfassende Propeptid der Matrixine enthält die hochkonservierte Region PRCGVDP, welche im latenten Enzym direkt gegenüber dem Zink-Ion des aktiven Zentrums positioniert ist. Die Thiol-Gruppe des Cysteins besetzt hier die vierte Koordinationsstelle des Zink-Ions und ist somit direkt für die Latenz des Proenzym verantwortlich (Springman et al., 1990). Der Beweis für diese Art der Latenzerhaltung wurde zunächst durch sukzessive Mutation einzelner Reste der PRCGVDP-Region (Park et al., 1991) und später durch Röntgenstrukturanalyse (Becker et al., 1995) bewiesen. Die Entfernung des blockierenden Cysteins kann auf vielfältige Weise erfolgen (Oxidation, Proteolyse, Behandlung mit Quecksilber- oder Gold-Verbindungen). Ein Konzept für den Aktivierungsmechanismus, der sogenannte *cystein-switch* (**Abbildung 9**), wurde 1990 von van Wart und Birkedal-Hansen vorgeschlagen.

1.2.1.3 Die Furin-Spaltstelle

Am C-terminalen Ende des Propeptids befindet sich eine Erkennungssequenz (R¹⁰⁸RKR) für Furin-ähnliche Proteasen der Kex-2 Familie. Bei der Reifung des Enzyms im Golgi-Apparat kann Furin die proteolytische Abspaltung des Propeptids und somit die Aktivierung der MMP bewirken. Pei und Weiss (1995) bewiesen die Möglichkeit dieses Aktivierungsweges mit *in vitro* Untersuchungen an der proMMP-11 und Furin als Aktivator.

1.2.1.4 Die katalytische Domäne

Matrilysin trägt als kürzeste bisher bekannte MMP C-terminal die katalytische Domäne, an die sich bei allen anderen MMPs die Hämpexin-ähnliche Domäne anschließt. Die bekannten Kristallstrukturen der katalytischen Domänen von MMPs weisen große Homologien auf.



Das Hauptkennzeichen der Raumstrukturen ist das stark verdrillte fünfsträngige β -Faltblatt, welches von drei α -Helices flankiert wird. Als Beispiel ist in **Abbildung 3** die Struktur der katalytischen Domäne der MT1-MMP dargestellt. Die typischerweise 160-170 Aminosäuren lange katalytische Domäne enthält im C-terminalen Drittel das aktive Zentrum mit dem hochkonservierten HELGHXXGXXH Zink-Bindungsmotiv. Neben dem im aktiven Zentrum gebundenen Zink Ion enthält die cdMT1-MMP ein weiteres, strukturstabilisierendes Zink-Ion (**Abbildung 4**). Der katalytische Spalt (**Abbildung 3**, von links nach rechts verlaufend) wird durch einen β -Strang (sIV), eine α -Helix (hB) und den für die Aktivität essentiellen „Met-turn“ gebildet.

Die katalytische Domäne der MT1-MMP wird außerdem durch zwei sehr unterschiedlich koordinierte Calcium-Ionen in ihrer Struktur stabilisiert, während andere MMPs hier ein, zwei oder auch drei Calcium-Ionen binden können.

Sowohl das strukturelle Zink-Ion (Wetmore et al., 1996), als auch die beiden Calcium-Ionen (Housley et al., 1993) sind essentiell für die Aufrechterhaltung des proteolytischen Potentials.

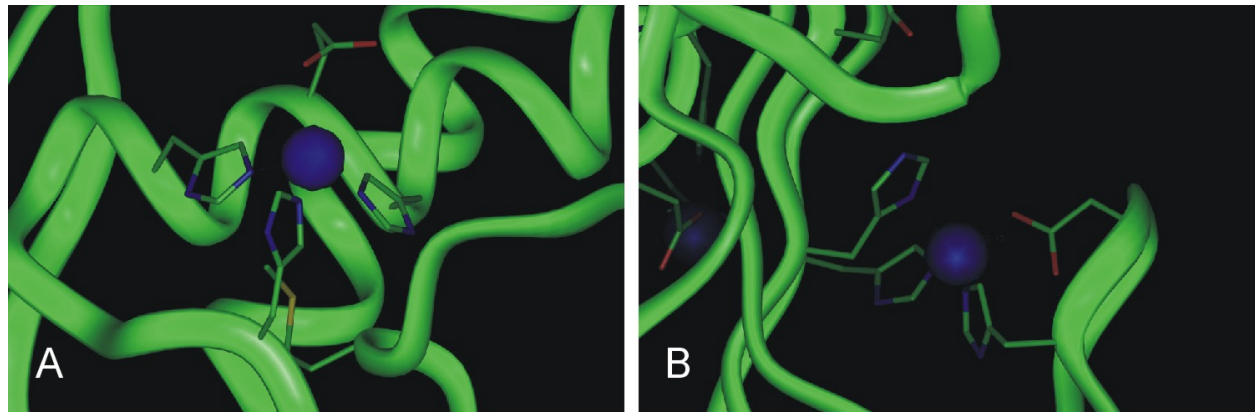
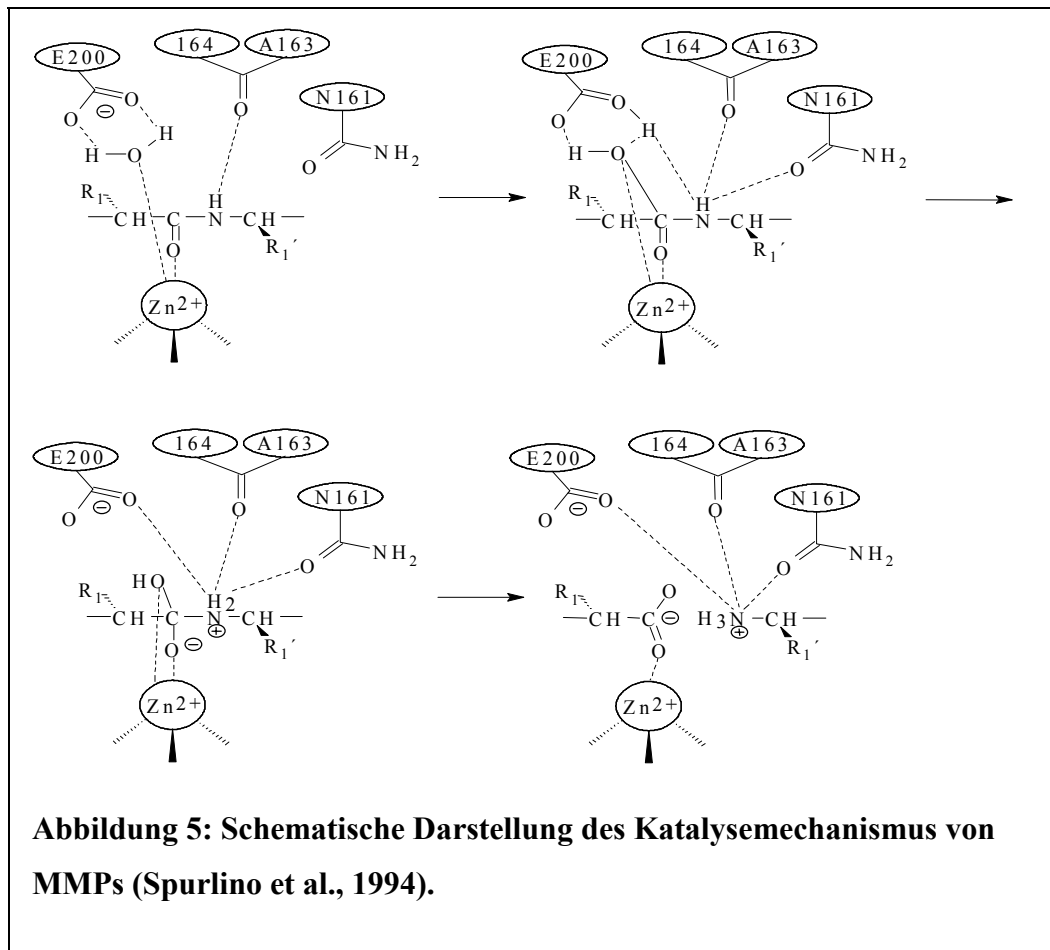


Abbildung 4: Detailansichten des katalytischen Zentrums (A): katalytisches Zink-Ion dreifach von Histidin-Resten koordiniert; die vierte Koordinationsstelle wird durch ein H₂O-Molekül zwischen dem Glu²⁴⁰ und dem Zink besetzt (hier nicht dargestellt). (B): Detailansicht des strukturell gebundenen Zink-Ions: tetraedrische Koordination durch einen Glu und drei His-Reste.

Die untersuchten katalytischen Domänen von MMPs zeigten trotz der großen Ähnlichkeit der Raumstrukturen Unterschiede bezüglich der katalytischen Spezifitäten, der kinetischen Parameter und der Hemmeigenschaften von TIMPs (Windsor et al., 1997; Zucker et al., 1998; Lichte et al., 1996).

Erste Vermutungen zum katalytischen Mechanismus der MMPs wurden anhand der mittels Röntgenstrukturanalyse gewonnenen 3-D-Modelle aufgestellt (Spurlino et al., 1994) und durch Mutationsanalysen bestätigt (Windsor et al., 1994). Basierend auf dem für Thermolysin ermittelten Mechanismus der Hydrolyse einer Peptidbindung (Matthews, 1988) wurde folgender Proteolysemechanismus für MMPs vorgeschlagen:

Das Substratmolekül lagert sich entsprechend den Spezifitätskriterien in der katalytischen Tasche so ein, daß der Sauerstoff der Carbonylgruppe der zu spaltenden Bindung eine Koordination mit dem katalytischen Zink eingeht, wodurch die Carbonylgruppe für einen nucleophilen Angriff aktiviert ist. Ein dem katalytischen Zink gegenüber angeordneter Glutamatrest verstärkt den nucleophilen Angriff des Wassermoleküls auf die Carbonylgruppe der zu spaltenden Bindung. Die Anordnung des katalytischen Zentrums begünstigt die Bildung des Übergangszustandes, eines Hemiketals, und katalysiert dadurch die Spaltung einer Peptidbindung. Abbildung 5 zeigt schematisch den Katalysemechanismus von MMPs:



1.2.1.5 Die Fibronectin Typ II-Domänen

Die Gelatinasen A und B tragen im Gegensatz zu anderen MMPs innerhalb ihrer katalytischen Domäne die dreifache Wiederholung einer 58 Aminosäure großen Fibronectin Typ II – ähnlichen Sequenz, die maßgeblich an der Substraterkennung beteiligt ist. Dieser direkt vor dem Zinkbindungsmotiv positionierte Sequenzabschnitt ist somit auch für die Substratspezifität der Gelatinasen verantwortlich (Bányai et al., 1996).

1.2.1.6 Hinge Region

Zwischen der katalytischen und der sich C-terminal anschließenden Hämopexin-ähnlichen Domäne wird in allen bekannten MMPs eine prolinreiche Verbindungsregion von 2 bis 72 Aminosäureresten gefunden. Die Aufklärung der Gesamtstruktur der MMP-1 aus Schwein ergab keine definierte Position des 17 Aminosäuren langen *Loops*, was diese Region als hochflexible Verbindungssequenz ausweist (Li et al., 1995). Die Vermutung, diese Region könnte bei Kollagenasen zum Katalysemechanismus beitragen, indem sie „reißverschlusartig“

mit der Tripelhelix interagiert (*proline-zipper*), hat sich bis heute nicht bestätigt (de Souza et al., 1996). Als Ausnahme gegenüber allen anderen Mitgliedern der MMP-Familie trägt die MMP-9 an dieser Stelle einen 54 Aminosäure langen, der $\alpha 2$ Kette des Typ V Kollagens ähnlichen, Einschub (Pourmotabbed, 1994).

1.2.1.7 Die Hämapexin-ähnliche Domäne

Die Hämapexin-ähnliche Domäne umfasst ca. 200 Aminosäuren und ist bei allen bekannten MMPs außer bei Matrilysin zu finden. Die Struktur entspricht einem vierblättrigen Propeller, wobei jedes „Blatt“ ca. 48 Aminosäuren umfasst (Li et al., 1995). Die Struktur-Funktions-Beziehungen wurden in der letzten Zeit eingehend diskutiert (Murphy & Knäuper, 1997; Bode, W., 1995).

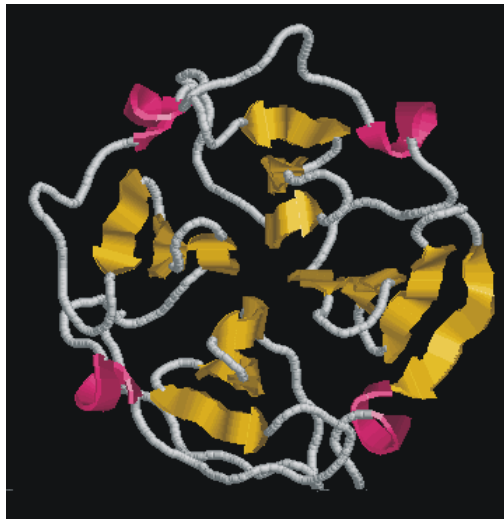


Abbildung 6: Aufsicht auf den „vierblättrigen Propeller“ der Hämapexin-ähnlichen Domäne von MMP-2 (Libson et al., 1995).

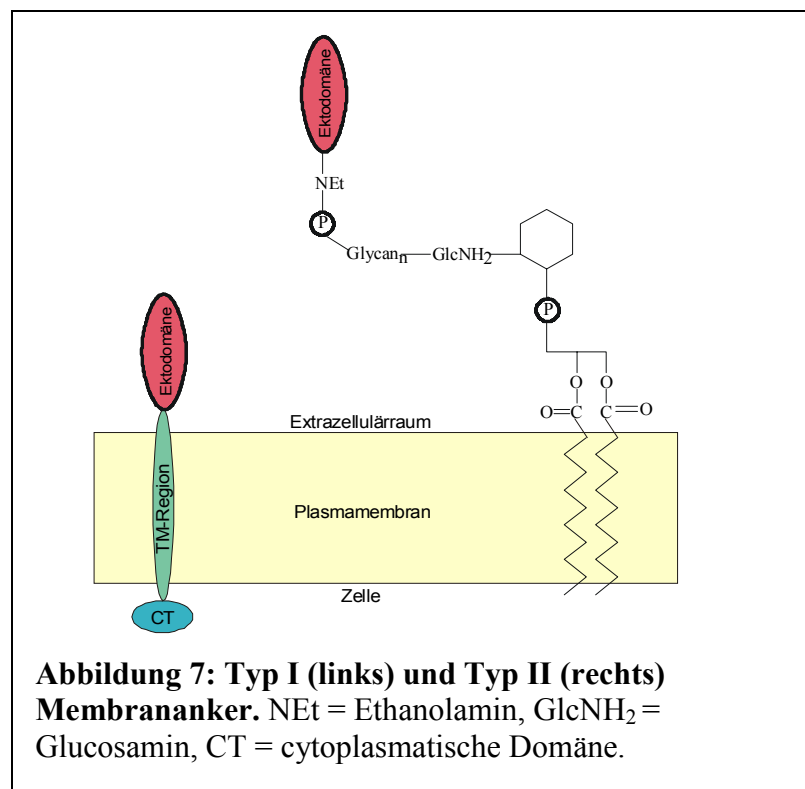
Die Hämapexin-ähnliche Domäne ist essentiell für die Bindung der Kollagenasen an Kollagen und bestimmt damit das Substratspezifitätsspektrum (Murphy et al., 1992). 1996 wurde ein Mechanismus der Kollagenbindung vorgeschlagen, bei dem die Hämapexin-ähnliche Domäne über die frei bewegliche Hinge Region in der Lage ist, mit der katalytischen Domäne und einem Kollagenstrang einen sandwichartigen Komplex zu formen (Gomis-Rüth et al., 1996). Dieser Mechanismus soll anhand von Röntgenstrukturanalysen an kollagengebundenen MMPs untersucht werden (Gomis-Rüth et al., 1996).

Weiterhin sind Bindungsaffinitäten zu verschiedenen Komponenten der ECM untersucht worden: Heparin (Crabbe et al., 1993), Integrin $\alpha_v\beta_3$ (Brooks et al., 1996), TIMPs (Lichte et al., 1996). Bindungsstudien von TIMP-1 an MMP-2, MMP-3 und MMP-13 haben gezeigt, daß die Hämopexin-ähnliche Domäne Einfluß auf die Bindungsstärke des Komplexes hat (5.3.8), wohingegen dieser Effekt bei der Bindung von TIMP-2 an MMP-13 keine Rolle spielt (Nguyen et al., 1994; Baragi et al., 1994; Knäuper et al., 1997).

Nicht zuletzt wird über die Bindung der Hämopexin-ähnlichen Domäne von proMMP-2 an den MT1-MMP/TIMP-2 Komplex (**Abbildung 10**) die Aktivierung der Progelatinase A an bestimmten Orten (zum Beispiel den Enden von Invadopodien) der Zelloberfläche vermittelt (Lichte et al., 1996).

1.2.1.8 Die Transmembran- und die cytoplasmatische Domäne

Die erste membranständige Matrix Metalloproteinase MMP-14 (MT1-MMP) wurde 1994 zum ersten Mal beschrieben und 1995 erstmals kloniert und sequenziert (Sato et al., 1994; Takino et al., 1995). Die 24 hydrophoben Aminosäurereste der Region 539-562 bilden die Transmembran-Region, womit die MT1-MMP in der Zellmembran verankert ist. Deletions- und Hybridisierungsversuche bestätigten die anfangs aus der Sequenz geschlossenen Vermutungen zur Funktion dieser Region (Cao et al., 1995).



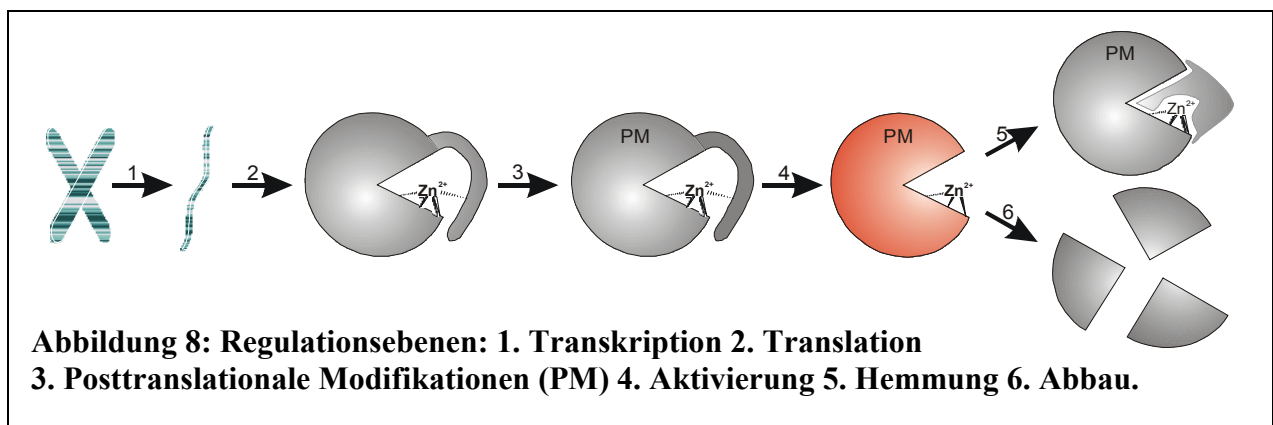
Bis heute sind sechs weitere Mitglieder, MT2-MMP bis MT6-MMP, der Unterfamilie der membranständigen Matrix Metalloproteinasen kloniert und charakterisiert (Will & Hinzmann, 1995; Takino et al., 1995; Puente et al., 1996; Llano et al., 1999; English, W.R. et al., 2001).

MT4- und MT6-MMP unterscheiden sich von den anderen membranständigen MMPs, da sie statt der Transmembrandomäne und der cytoplasmatischen Domäne durch einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) mit der Plasmamembran verbunden sind. Aufgrund der unterschiedlichen Verankerung in der Zellmembran werden die MT1-, MT2-, MT3- und MT5-MMP als Typ I membranständige MMPs und MT4- und MT6-MMP als Typ II membranständige MMPs bezeichnet (**Abbildung 7**).

Die cytoplasmatische Domäne wurde lange Zeit nicht beachtet, so daß erst vor kurzem Theorien hinsichtlich zielgerichteter Expression und möglicher Phosphorylierung der 20 Aminosäuren langen Region und damit einhergehender Signaltransduktion durch die Membran aufgestellt wurden (Lethi et al., 2000).

1.2.2 Regulation der MMP Aktivität

Viele biologische Prozesse gehen mit der Umstrukturierung der extrazellulären Matrix einher (1.2.4) und erfordern das sinnvolle und kontrollierte Zusammenspiel aller daran beteiligten Faktoren. Die am Abbau von Komponenten der ECM beteiligten Matrix Metalloproteinasen können auf fünf Ebenen reguliert werden:



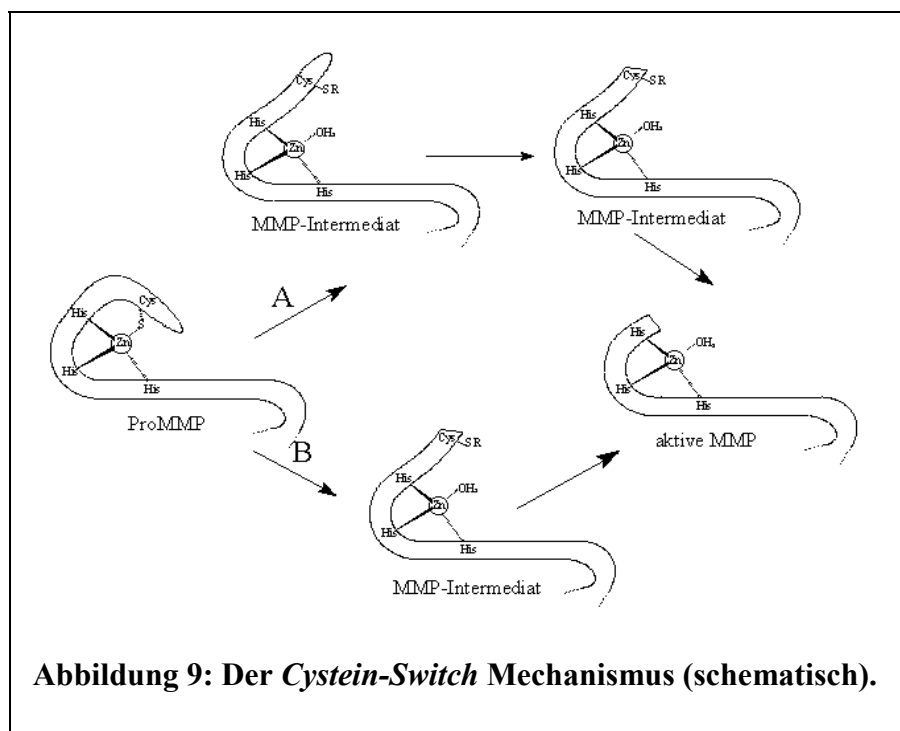
1.2.2.1 Transkription

Außer der MMP-2, die als *housekeeping-gene* über eine GC-reiche Box konstitutiv exprimiert wird, verfügen alle MMPs neben der „TATA-Box“ über induzierbare Promotor-Sequenzen, die im Zusammenspiel mit einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren, Cytokinen und

Onkogenen die Transkription regulieren. Fast alle MMP-Promotoren enthalten das TRE-Element (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat-responsive-element), welches durch Bindung des Transkriptionsfaktors AP-1, einem Dimer aus den Oncogenen Fos und Jun, die MMP-Transkription induziert. Die Antwort des TRE-Elements ist als Reaktion auf eine Vielzahl von Faktoren untersucht worden: TNF- α (Sato & Seiki, 1993), INF- β (Sciavolino et al., 1994), IL-1 (Fini et al., 1994). Ein anderes Element, die PEA3-Sequenz („Polynoma enhancer activator“), ist für die durch Onkogene und TPA induzierte Transkription der Gene von MMP-1 und MMP-3 von Bedeutung (Gutman & Wasylyk, 1990; Wasylyk et al., 1991).

1.2.2.2 Aktivierung

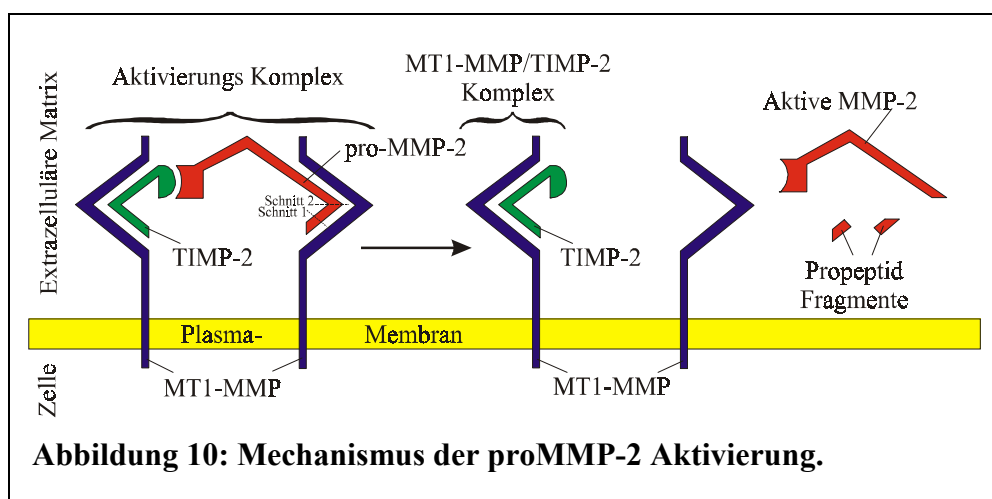
Alle Matrixine werden als Proenzym gebildet und anschließend aktiviert. Für MMP-11 und MMP-14 (Pei & Weiss, 1995; Sato et al., 1996) konnte eine intrazelluläre Aktivierung nachgewiesen werden. Wahrscheinlich trifft dies auch für die anderen membranständigen MMPs zu, da sie am Ende der Prodomäne die gleiche RR(K/R)R-Sequenz tragen, die von mindestens vier Mitgliedern der Proprotein-Convertase Familie (Furin, PACE4, PC6 und PC7) als Erkennungssequenz dient (Nakayama, 1997; Zhou et al., 1999; Yana & Weiss, 2000). Der von Van Wart formulierte *Cystein-Switch* Mechanismus (**Abbildung 9**) beschreibt die Reifung von MMPs (Van Wart & Birkedal-Hansen, 1990).



Weg **A** in **Abbildung 9** zeigt schematisch den *Cystein-Switch* Mechanismus bei der *in vitro* Behandlung von proMMPs mit thiolmodifizierenden Reagenzien, wie zum Beispiel Organoquecksilberverbindungen, Iodacetamid oder oxidiertes Glutathion. Bei diesem Modell erfolgt die Aktivierung schrittweise: Thiolmodifizierende Reagenzien interagieren mit dem konservierten Cystein im Propeptid, welches im Zymogen die vierte Koordinationsstelle des Zinkions im aktiven Zentrum besetzt. Ist die koordinative Bindung an das Schwefelatom des Cysteins unterbrochen, nimmt das für die katalytische Wirkung der MMP wichtige Wassermolekül die vierte Koordinationsstelle ein. Im folgenden Schritt kann das MMP-Intermediat autoproteolytisch die auf die PRCGVDP-Region folgende Peptidsequenz entfernen, worauf sich die Abspaltung der konservierten Sequenz anschließt (Weg **A**).

In vivo wird zur Aktivierung einer proMMP vermutlich Weg **B** beschritten. Bei Aktivierung durch Serinproteasen (z.B. Plasmin oder Cathepsin G) oder aktive MMPs wird ein N-terminales Peptid vor der konservierten PRCGVDP-Region proteolytisch entfernt, wodurch eine Konformationsänderung erfolgt, die die Koordination des Cystein-Schwefels an das Zinkion aufhebt. Wie im Falle der Aktivierung des Cysteins durch chemische Modifikation, tritt ein Wassermolekül an die freigewordene Koordinationsstelle. Dadurch wird das MMP-Intermediat befähigt, sich autoproteolytisch zur aktiven MMP zu prozessieren (Weg **B**).

Innerhalb der Familie der löslichen MMPs ist die proMMP-2 das einzige Zymogen, das nicht durch Serinproteasen in die aktive Form übergeführt werden kann. Lange Zeit war bekannt, daß die Aktivierung der Progelatinase A auf der Zelloberfläche verschiedener mit Concanavalin A, Phorbol ester oder TGF- β stimulierter Zellen beobachtet werden kann



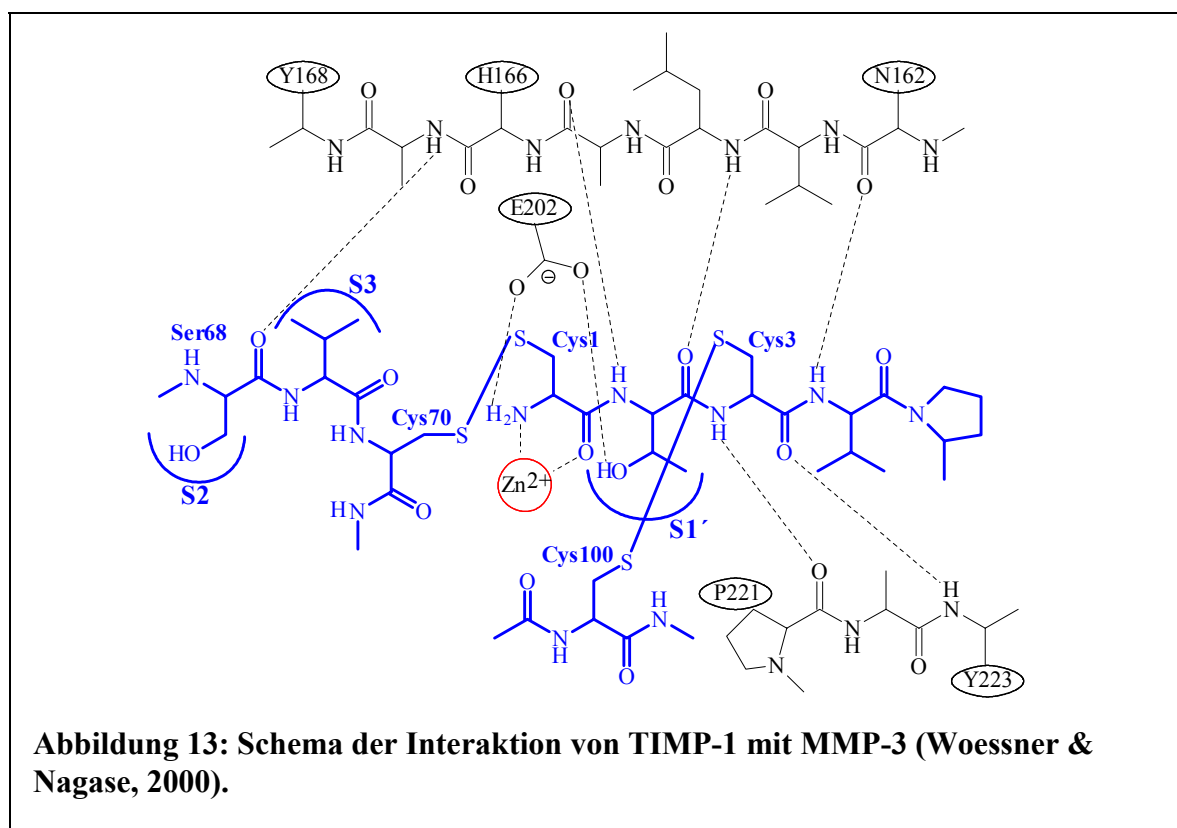
(Matrisian, 1994).

Die proMMP-2 bindet an den MT1-MMP/TIMP-2-Komplex auf der Zelloberfläche (TIMP = *tissue inhibitor of matrix metalloproteinases*). Nach Assoziation einer zweiten MT1-MMP,

1.2.2.3 Inhibierung durch TIMPs

Zum ersten Mal wurde 1975 über ein Kollagenase-inhibierendes Protein in Kulturüberständen von humanen Fibroblasten berichtet (Bauer et al., 1975). Seitdem wurden drei weitere Mitglieder der TIMP-Familie charakterisiert. Die TIMPs 1-4 sind in 35-40 % ihrer Aminosäuresequenz identisch und besitzen deutliche strukturelle Homologien (Gomez et al., 1997).

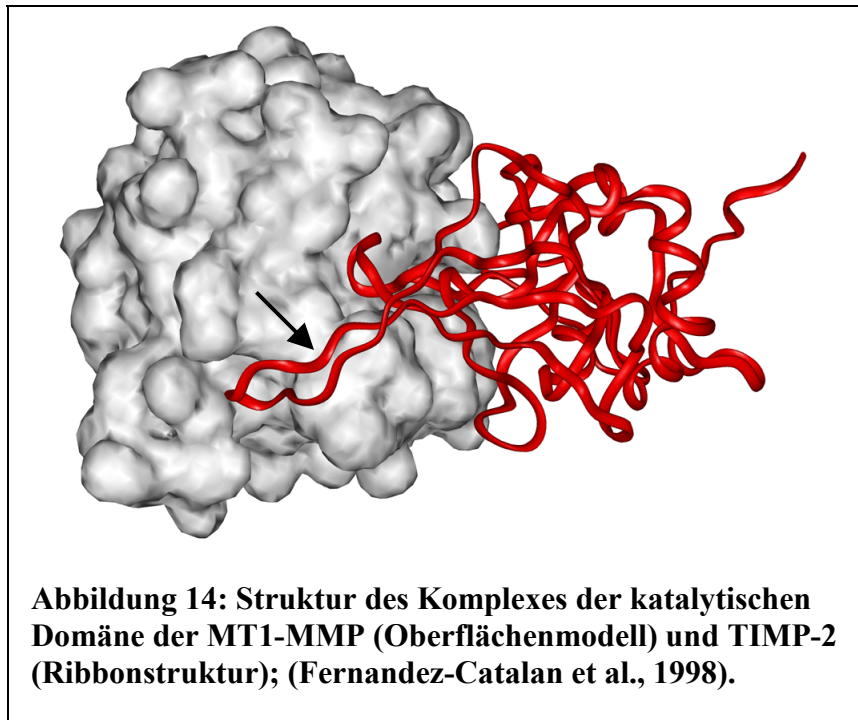
Abbildung 13 verdeutlicht die Interaktion von TIMP-1 mit Stromelysin-1 (MMP-3) im Bereich des aktiven Zentrums:



Die α -Amino- und die Carbonylgruppe des Cys1-Restes koordinieren „zweizählig“ an das katalytische Zink-Ion. Die Reste von Ser68 und Val69 passen sich in die S2 und S3 Tasche des katalytischen Spaltes ein, während der Thr2-Rest in die große hydrophobe S1'-Spezifitätstasche ragt. Zwei der sechs Disulfidbrücken verbinden die im aktiven Zentrum liegende inhibitorische Domäne mit dem globulären Körper des TIMP-1. Durch die Ausbildung zahlreicher Wasserstoffbrückenbindungen können die beiden Moleküle auf einer Fläche von 1300 \AA^2 miteinander interagieren (Gomis-Rüth et al., 1997).

Die zwölf konservierten Cysteinreste der TIMPs bilden 6 Disulfidbrücken aus, was zu der charakteristischen „sechs Peptidschleifen“-Struktur führt. Die drei N-terminalen Schleifen sind für die Bindung und Inhibierung der MMPs essentiell (DeClerck et al., 1993).

Abbildung 13 soll die intensive Interaktion des TIMP-2 im Komplex mit der katalytischen Domäne der MT1-MMP verdeutlichen. Der katalytische Spalt ist hier komplett vom Inhibitor ausgefüllt. Bemerkenswert ist der *AB- β -hairpin-loop* von TIMP-2 (Pfeil) mit dem der Inhibitor das Enzym umgreift (Williamson et al., 2001).



Aktive MMPs werden im Verhältnis 1:1 von TIMPs gehemmt. Neben der inhibitorischen Eigenschaft besitzen TIMP-1 und TIMP-2 die Fähigkeit, mit proGelatinase B bzw. proGelatinase A Proenzym/Inhibitor-Komplexe zu bilden. Die Bildung des proMMP-2/TIMP-2-Komplexes ist für die Aktivierung der proMMP-2 essentiell (**Abbildung 10**), während für den proMMP-9/TIMP-1-Komplex noch kein vergleichbarer Mechanismus gefunden wurde.

Neben den natürlichen Inhibitoren wurde eine Vielzahl synthetischer Inhibitoren entwickelt (Beeley et al., 1994). Die inhibierende Wirkung dieser Substanzen beruht im allgemeinen auf der Chelatisierung des katalytischen Zink-Ions durch Thiol-, Carboxyl-, Phosphat-, Sulfodiimin- oder Hydroxamatgruppen. Schon sehr bald wurde deutlich, daß pharmazeutisch einsetzbare Substanzen sehr selektiv sein müssen, um spezifisch die Überregulation bestimmter MMPs zu hemmen (Morphy et al., 1994). Die Verknüpfung von strukturbasiertem Ligandendesign und kombinatorischer Chemie ermöglicht die effektive Herstellung neuer

Inhibitoren (Rockwell et al., 1996), die z.T. auch schon in klinischen Tests der Phase I und II geprüft wurden (Brown, 1997).

1.2.3 Substrate der Matrixine

1.2.3.1 Natürliche Substrate

Über die proteolytische Aktivität von MMPs gegenüber natürlichen Substraten unter *in vivo*-Bedingungen ist wenig bekannt (Woessner, 1998). Dagegen ist die Liste der *in vitro* getesteten potentiellen Substrate nahezu unüberschaubar (Chandler et al., 1997). Der Vergleich der unter natürlichen Bedingungen gebildeten Fragmente potentieller Substrate mit den bekannten *in vitro*-Ergebnissen könnte hier weitere Erkenntnisse liefern. Die Untersuchung der Funktion von Proteasen *in vivo* durch *knockout*-Experimente bietet eine Möglichkeit zum besseren Verständnis ihrer Wirkung. In folgenden drei Fällen konnten die *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse durch die Analyse der Spaltprodukte aus natürlichem Gewebe untermauert werden:

1. Die Spaltung des interstitiellen Kollagens Typ II durch MMP-13 (Billinghorst et al., 1997).
2. Der Abbau von Aggrecan durch MMP-8 (Fosang et al., 1994).
3. Spaltung des *link proteins*, das den N-Terminus von Aggrecan an Hyaluronsäure bindet, durch MMP-2, -7, -9 und -10 (Nguyen et al., 1993).

Aber auch diese Ergebnisse sind nur bedingt aussagekräftig, da zum Beispiel nur eine mit den MMP-8-Versuchen übereinstimmende Spaltstelle gefunden wurde, und diese auch nicht der bevorzugten *in vitro* Spaltstelle der MMP-8 gegenüber Aggrecan entspricht (Fosang et al., 1993). Die schon lange vermutete „Aggrecanase“ konnte also auch durch diese Ergebnisse nicht in Form eines bekannten Enzyms gefunden werden. Einen Überblick über die jüngste Entwicklung bieten die in immer kürzeren Abständen erscheinenden und an Umfang zunehmenden Reviews und Bücher zu dieser Thematik (Parks & Mechem, 1998; Barrett et al., 1998; Woessner & Nagase, 2000).

1.2.3.2 Fibrinogen als natürliches Substrat der MT1-MMP

Das 340 kDa große fibrilläre Fibrinogen spielt eine wichtige Rolle bei der Hämostase und der Wundheilung. Eine offene Wunde ist meist der Auslöser des Reaktionsweges der Blutgerinnungskaskade, der durch eine gestaffelte Aktivierung von Serinproteasen (den sog. Gerinnungsfaktoren) schließlich die Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin verursacht. Die Serinprotease Thrombin ist in der Lage, die Fibrinopeptide A ($A\alpha$ 1-6) und B ($B\beta$ 1-14) proteolytisch zu entfernen und so die Aggregation der Fibrinmonomere einzuleiten. Unter Einlagerung von Thrombozyten und Erythrozyten und kovalenter Quervernetzung der Fibrinmonomere durch den Faktor XIII_a der Blutgerinnungskaskade entsteht ein „harter“ Thrombus, der das beschädigte Blutgefäß verschließt und die Blutung somit stoppt.

Der Einfluß von MMPs auf die Blutgerinnungskaskade wurde in vorangegangenen Arbeiten untersucht (Tschesche et al., 2000; Hiller et al., 2000). Dabei wurde gezeigt, daß Blutplasmae Proteine, wie zum Beispiel Fibrinogen, Plasmin, Plasminogen, Prothrombin und der Faktor XII der Blutgerinnungskaskade potentielle Substrate von MMPs darstellen. Außerdem konnte durch Gerinnungstests gezeigt werden, daß die Gerinnbarkeit des Fibrinogens durch die Einwirkung der katalytischen Domäne der MT1-MMP in starkem Maße beeinträchtigt wird.

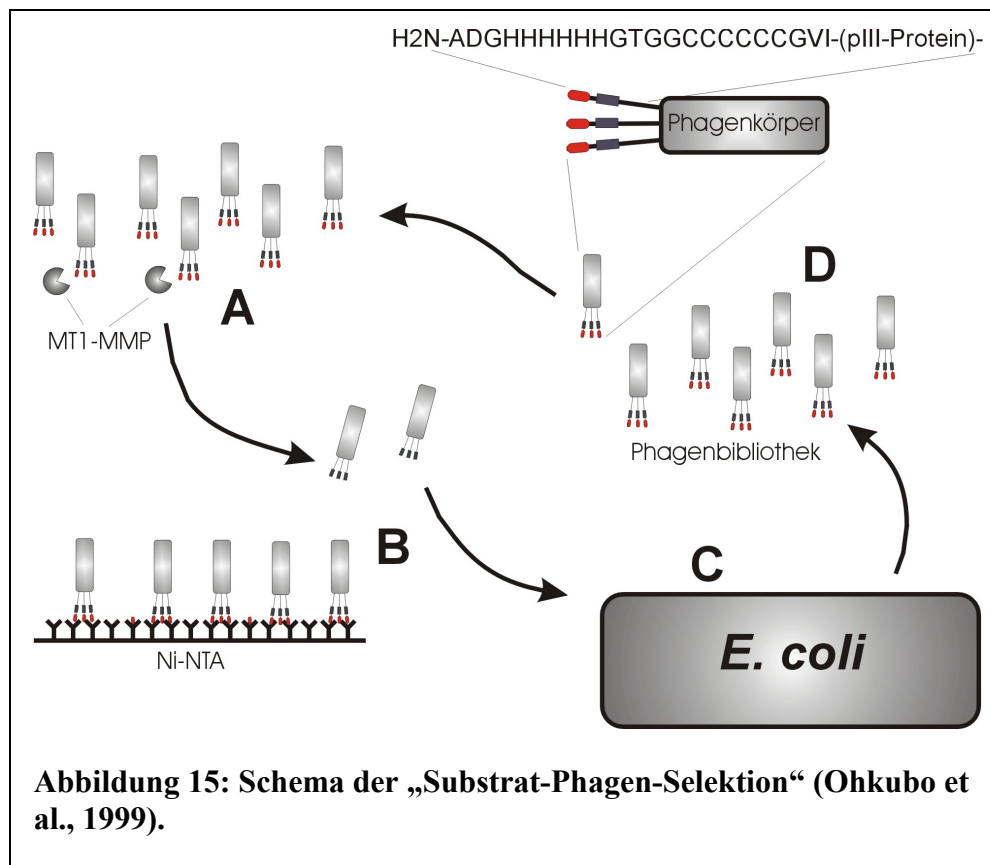
Bisher wurde nur die katalytische Domäne der MT1-MMP hinsichtlich der *in vitro* Proteolyse von Fibrinogen untersucht. Mit dieser Arbeit sollte ein möglicher Unterschied zum proteolytischen Verhalten des Gesamtzyms hinsichtlich der Proteolyse von Fibrinogen analysiert werden.

1.2.3.3 Synthetische Substrate

Im Falle der Spaltung natürlicher Substrate ist es oft schwierig, kinetische Parameter zu gewinnen, die den Vergleich der Substrate untereinander zulassen. Aus diesem Grunde wurden synthetische Substrate entwickelt, die jeweils nur eine einzige enzymespezifische Spaltstelle enthalten und somit aussagekräftige Kinetik-Assays ermöglichen. Im allgemeinen werden fluorogene Substrate verwendet. Diese wasserlöslichen, synthetisch hergestellten Substrate bestehen aus einer MMP-spezifischen Aminosäuresequenz variabler Länge, die N-terminal von einer fluoreszierenden Gruppe und C-terminal von einer „Quenchergruppe“ flankiert ist. Die proportional zur Spaltung des Substrates zunehmende Fluoreszenzaktivität

kann gemessen und zur Bestimmung kinetischer Daten verwendet werden (Knight et al., 1992).

Ein interessanter Ansatz zur Identifizierung von Peptidsequenzen, die spezifisch mit Proteinen oder DNA-Fragmenten interagieren, bietet die 1990 entwickelte Methode der „bacteriophage peptide display library“ (Devlin et al., 1990). Ohkubo et al. nutzen diese Methode zur Identifizierung bevorzugter Spaltstellen der MT1-MMP (Ohkubo et al., 1999).



Phagen, deren pIII-Protein mit einem zufälligen Hexapeptid und einem endständigen „His-Tag“ (rot) gekoppelt ist, werden mit MT1-MMP inkubiert (A). Die bezüglich der Hexapeptide unprozessierten Phagen werden durch Affinitätsbindung des „His-Tag“-Anteils an eine Ni-NTA-Matrix entfernt (B). Die zurückbleibenden Phagen werden zur Vermehrung in *E. coli* eingebracht (C). Man erhält eine Phagen-Bibliothek, die hinsichtlich potentieller Substratbindungsstellen sequenziert und zur weiteren Selektion verwendet werden kann (D). Durch dieses Verfahren wurden die zwei Konsensussequenzen P-X-G-L/I und P-X-P-L an P3-P1' Position für die MT1-MMP gefunden (Ohkubo et al., 1999). Die Konsensussequenz P-X-G-L/I kommt zum Beispiel in Typ I, II und III Kollagen und in α_2 Makroglobulin vor und wurde bereits als Schnittstelle für Kollagenasen in diesen ECM-Bestandteilen beschrieben (Nagase & Fields, 1996).

1.2.4 Biologische Rolle der Matrix Metalloproteinasen

1.2.4.1 Physiologische Prozesse

Viele physiologische Prozesse gehen mit der Umstrukturierung extrazellulärer Matrix einher. Werden Korrelationen zwischen dem jeweiligen Stadium eines physiologischen Vorgangs und dem vorherrschenden MMP-Level (meist nur auf mRNA-Ebene) gefunden, wird die Beteiligung des Enzyms postuliert. Leider sind häufig keine genaueren Untersuchungen möglich, da sich die Spezifität natürlicher und synthetischer Inhibitoren im allgemeinen nicht auf einzelne Matrixine bezieht. MMPs sind an physiologischen Funktionen der Reproduktion (Hulboy et al., 1997), z.B. der Ovulation (Tsafriri, 1995), der Menstruation (Salomonsen & Woolley, 1996) oder der Cervixerweiterung während der Schwangerschaft (Osmers et al., 1996) beteiligt. MMPs werden außerdem bei Vorgängen der Entwicklung, wie z.B. dem Aufbau von Zahnschmelz (Smith, 1998), der Morphogenese der Nieren (Stuart et al., 1995) oder der Embryogenese (Shi et al., 1996) benötigt. Nichtzuletzt sind MMPs für die Aufrechterhaltung der Integrität von Gewebe z.B. die normale Haut (Kähäri & Saarialho-Kere, 1997), die alternde Haut (West, 1994) oder die Wundheilung (Parks et al., 1998) essentiell.

1.2.4.2 Pathologische Prozesse

Die pathologischen Prozesse, die unter Beteiligung von MMPs ablaufen, lassen sich im wesentlichen in drei Gruppen einteilen, die von folgenden Erscheinungsbildern gekennzeichnet sind: 1. Gewebeerstörung 2. Fibrosenbildung 3. Matrixschwächung.

Das Wachstum und die Metastasierung von Krebs gehen mit deutlicher Zerstörung teilweise lebenswichtiger Gewebe einher (Tschesche et al., 1994; Basset et al., 1997; Chambers & Matrisian, 1997; Cockett et al., 1998; Powell & Matrisian, 1996; Stetler-Stevenson et al., 1996). Auch bei Arthritis (Bottomley et al., 1998; Cunnane et al., 1998), oralen Erkrankungen im allgemeinen (Reynolds & Meikle, 1997) und Parodontitis (Havemose-Poulsen & Holmstrup, 1997) wird exzessiver Gewebeabbau beobachtet.

Atherosklerose (Libby et al., 1998; Ye et al., 1998), Herzinfarkt (Cleutjens, 1996; Tyagi, 1997) und Leberfibrose (Arthur, 1997) sind in diesem Zusammenhang Beispiele für fibrotische, pathologische Vorgänge.

Bei Aneurysmen der Aorta (Thompson & Parks, 1996) oder Herzversagen (Janicki et al., 1995) wird häufig eine pathologische Schwächung der Matrix diagnostiziert.

Außerhalb dieser Einordnung stehen Erkrankungen des zentralen Nervensystems (Gottschll & Deb, 1996), Multiple Sklerose (Chandler et al., 1997) und hämatologische Störungen (Guedez et al., 1996).

1.2.4.3 Die Rolle von MT1-MMP bei Krankheiten des zentralen Nervensystems

Das Zentrale Nervensystem besteht aus dem Rückenmark und dem Gehirn, das sich in die Teile Großhirn, Kleinhirn und Hirnstamm gliedert. Optisch zeigt sich das Gewebe des ZNS in zwei Farben.



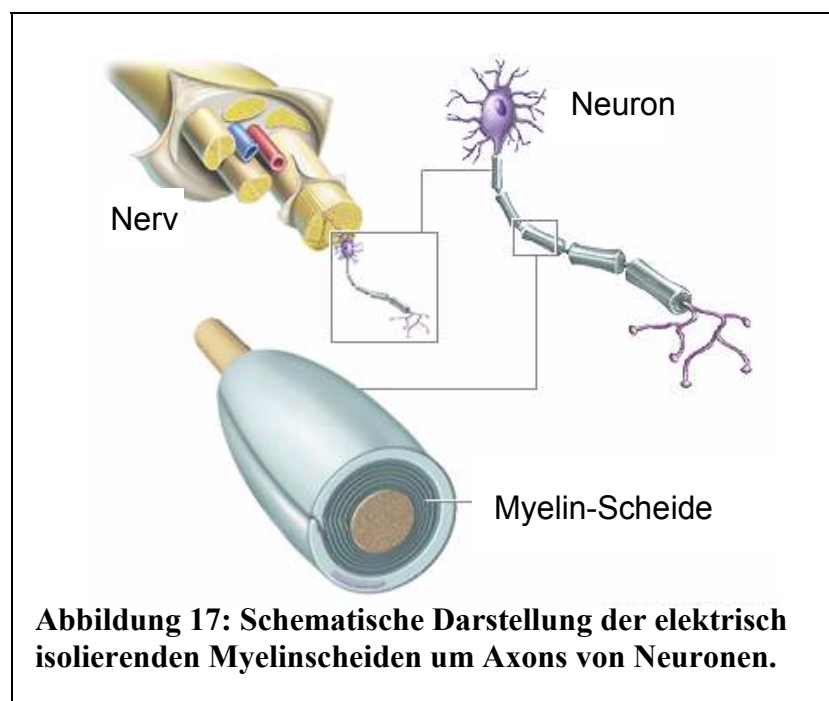
Abbildung 16: Schnitt durch das menschliche Hirn.

Größere Mengen von nahe beieinander liegenden Nervenzellkörpern und Gliazellen, wie sie in der Hirnrinde zu finden sind, erscheinen grau und werden deshalb auch graue Substanz (Substantia grisea) genannt. Als weiße Substanz (Substantia alba) bezeichnet man die weiß erscheinenden Bereiche des Zentralen Nervensystems die zum Großteil aus myelinreichen Nervenfasern bestehen. Myelin ist Hauptbestandteil der Isolationsschicht von Nervenfasern und sorgt für eine hohe Geschwindigkeit bei der Nervenleitung.

Bei der Multiplen Sklerose kommt es zu Entzündungen an den Myelinscheiden. Als Folge des geschädigten Myelins ist die Informationsübertragung über das Axon gestört. Sie kann verlangsamt oder auch ganz unterbrochen sein. Die Entzündungsherde, die das Myelin angreifen, bezeichnet man als Plaques, die Schädigung der Markscheiden wird Demyelinisierung oder auch Entmarkung genannt.

Bei der Multiplen Sklerose nimmt im Verlauf der Erkrankung die Zahl und der Umfang der Plaques zu. In der Regenerationsphase kann eine unterschwellige Entzündung zurückbleiben.

So wie bei anderen Wunden auch bildet das zerstörte Nervengewebe eine Narbe (Sklerose). Das Narbengewebe aber stört die Informationsübertragung der Nervenfasern. Die Folgen sind je nach Lokalisation unterschiedlich: Leitet die geschädigte Nervenfasern Informationen zu einem bestimmten Muskel, so sind die Bewegungen des Muskels beeinträchtigt. Bewegungen sind z. B. nicht mehr so kräftig und geschickt. Die Regeneration kann auch vollständig sein, häufig jedoch bleiben aber im weiteren Verlauf der Erkrankung Narben zurück. Multiple Sklerose tritt in Schüben auf, die sich innerhalb von Stunden oder auch Tagen entwickeln und dann nach einiger Zeit wieder nachlassen. In der Regenerationsphase kann sich die geschädigte Myelinscheide erholen. Es wird neues Myelin gebildet, die demyelinisierten Nervenfasern können sich remyelinisieren.



Als Marker für pathologische Vorgänge, die mit Demyelinisierung einhergehen, dient der Gehalt des *myelin basic protein* (MBP) in der Cerebrospinal-Flüssigkeit. Während bei Gesunden Werte weit unterhalb von 4 ng/ml MBP gemessen werden, liegt der Spiegel bei vielen entzündlichen Krankheiten des ZNS über 4 ng/ml.

Matrix Metalloproteinasen beeinflussen die Pathogenese von entzündlichen Vorgängen des zentralen Nervensystems (Pagenstecher et al., 1998). Erstmals wurde 1995 über das Vorkommen von MT1-MMP im Gehirn berichtet (Yamada et al., 1995). Die immunohistochemischen Untersuchungen zeigten in Gehirnen von Alzheimer-Patienten die Überproduktion von MT1-MMP in Mikroglia-Zellen der weissen Substanz, während MT1-MMP in der grauen Substanz nicht nachgewiesen werden konnte. Mit *in vitro* Versuchen zur Ausbreitung und Wanderung von Glioma-Zellen auf Bestandteilen der Weissen Substanz

wurde die Beteiligung von MT1-MMP als MMP-2 Aktivator nachgewiesen (Belien et al., 1999). Diese Versuche deuteten darauf hin, daß die MT1-MMP auf das invasive Verhalten maligner Glioma-Zellen maßgeblichen Einfluß hat, was später erschienene Arbeiten zur Untersuchung der MT1-MMP-Expression auf mRNA-Ebene bestätigten (Forsyth et al., 1999; Hur et al., 2000). Die in neu gebildeten Blutgefäßen nachgewiesenen mRNA-Level von MT1-MMP legen auch eine Beteiligung bei der Angiogenese nahe.

Bei malignen Tumoren zeigt sich ein anderes Bild. Hier konnte eine vermehrte Ausschüttung von MT1-MMP nur in neoplastischen Astrocyten von malignen Astrocytomen, nicht aber in Zellen der Weissen Substanz, nachgewiesen werden (Yamamoto et al., 1996).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der proteolytische Abbau des *myelin basic protein* durch zwei lösliche Varianten der MT1-MMP in *in vitro* Experimenten untersucht.

1.2.5 Calciumabhängigkeit der Matrix Metalloproteinase-Aktivität

Housley et al. beobachteten 1993 den Zusammenhang zwischen der Thermostabilität der katalytischen Domäne der MMP-3 und der Calcium-Konzentration, wobei sie ein Stabilitätsoptimum bei einer Konzentration von 5 mM Ca^{2+} feststellten. In der gleichen Veröffentlichung wird auch der Einfluß der Calcium-Konzentration auf die Aktivierung der proMMP-3 beschrieben. Während die Aktivierung von rekombinanter proMMP-3 mit p-Aminophenyl-Quecksilberacetat bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 0,1 mM ausschließlich zu Autolyseprodukten führte, ergab die Aktivierung bei einer Konzentration von 2 mM Ca^{2+} die korrekt aktivierte katalytische Domäne.

Wetmore und Hardman wiesen 1996 nach, daß MMP-3 neben dem für die Katalyse essentiellen Zink-Ion Calcium als strukturstabilisierende Komponente benötigt. Diese Aussage wurde 1998 durch NMR- und Röntgenstruktur-Analysen an der MMP-1 dahingehend erweitert, daß Calcium sogar als strukturbildende Komponente agieren kann (Moy et al., 1998). Nach Einsatz von Calcium während der Aufarbeitung des Enzyms erhielt eine vorher in der Struktur nicht definierte, also flexible Region die Form eines definierten *loops*.

Die Beeinflussung der MT1-MMP-Expression und die proMMP-2 Aktivierung durch die Erhöhung des intrazellulären Calcium-Spiegels wurde 1997 von Yu et al. beschrieben. Die Verwendung des Calcium-Ionophors Ionomycin verursachte einen dosisabhängigen Rückgang der proMMP-2 Aktivierung, wobei jedoch kein Effekt auf die mRNA-Konzentration der MT1-MMP beobachtet wurde. Durch Western Blot-Analyse wurde die

Akkumulation von latenter proMT1-MMP (63kDa) nachgewiesen, was zur Annahme führte, daß erhöhte intrazelluläre Calcium-Level die Reifung der MT1-MMP unterdrücken. Spätere Arbeiten bestätigten diese Beobachtungen, auch für Fibroblasten und Fibrosarcom-Zellen konnte ein entsprechender Nachweis erbracht werden (Lethi et al., 1998; Atkinson et al., 2001).

Das Aktivitätsoptimum der katalytischen Domänen von MMP-8, MMP-12, MMP-13 und MMP-14 liegt bei *in vitro*-Versuchen zwischen 1 mM und 2 mM Ca^{2+} , was der physiologischen Serum-Konzentration entspricht (unveröffentlichte Ergebnisse eigener Untersuchungen). In dieser Hinsicht scheint Enamelysin (MMP-20) eine Ausnahme unter den MMPs zu sein. Die optimale Aktivität wird hier bei einer Konzentration von 10 mM Calcium erreicht (Fukae et al., 1998).

2 Zusammenfassung der Arbeit

Aufgrund der Bedeutung der MMPs bei physiologischen und pathologischen Prozessen ist die *in vitro*-Untersuchung der Eigenschaften unverzichtbar. Da die Präparation von MMPs aus humanem Gewebe nur in sehr begrenztem Umfang möglich ist, werden solche *in vitro* Experimente im Allgemeinen mit rekombinant hergestellten Proteinen durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die gesamte Ektodomäne der MT1-MMP rekombinant hergestellt, gereinigt und charakterisiert werden.

Die gesamte, aus humanem Knorpel durch reverse Transkription gewonnene (Büttner et al., 1997) cDNA der humanen MT1-MMP wurde von Frau Dr. A. Lichte zur Verfügung gestellt (Lichte, 1997). In einer PCR konnte die für die Ektodomäne der MT1-MMP (Ala²¹-Glu⁵²³) codierende cDNA erfolgreich amplifiziert werden. Nach Subklonierungen in *E. coli* wurde das Genfragment in den Hefe-Expressionsvektor pPICZ α A inkloniert.

Als Wirtssystem zur rekombinanten Produktion der MT1-MMP wurde der *Pichia pastoris* Stamm KM71 gewählt und mit dem Konstrukt pPICZ α A/ Δ MT1-MMP transformiert. Die Auswahl positiv transformierter Klone erfolgte über *PCR-Screening*. Aus dem *Pool* positiv transformierter Klone wurden zunächst durch *colony blot* und daran anschließend durch Expressionsanalysen stark exprimierende Klone zur weiteren Produktion bestimmt. Die Expression zur Herstellung der Ektodomäne zwecks nachfolgender Charakterisierung wurde im 1 L-Maßstab im Schüttelkolben durchgeführt. Nach Modifikation der Reinigungsmethode nach Moore & Spilberg konnten pro Aufarbeitung 0.2 – 0.5 mg des aktiven Enzyms Δ MT1-MMP (Tyr¹¹²-Glu⁵²³) hochrein hergestellt werden.

Die Darstellung größerer Mengen der Ektodomäne zur anschließenden Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse gelang durch eine Kultivierung im 30 L Fermenter. Es konnten 6,5 mg der Δ MT1-MMP produziert werden.

Die Identifizierung des Expressionsproduktes als MT1-MMP erfolgte über Western Blot unter Verwendung eines in Kaninchen produzierten Antikörpers gegen die katalytische Domäne. N-terminale Sequenzierung und Identifizierung des C-Terminus mittels MALDI-TOF erbrachten den Beweis für die Herstellung der vollständigen aktiven Ektodomäne der MT1-MMP (Tyr¹¹²-Glu⁵²³).

Die Untersuchung des autoproteolytischen Verhaltens führte zur Bestimmung von zwei Spaltstellen. Die erste Schnittstelle Gln²⁸¹-Leu²⁸² liegt am Ende der katalytischen Domäne in der letzten Windung einer α -Helix, während sich die zweite Stelle Pro²⁹⁴-Pro²⁹⁵ sehr

exponiert in der Hinge-Region, dem *Verbindungsloop* zwischen katalytischer- und Hämopexin-ähnlicher Domäne, befindet.

Zum Vergleich der Substratspezifität der katalytischen und der Ektodomäne der MT1-MMP wurden Fibrinogen und das *myelin basic protein* im *in vitro*-Experiment proteolytisch abgebaut. Bei der Proteolyse des Fibrinogens durch die Ektodomäne konnten vier Spaltstellen ermittelt werden. Dabei konnte nur eine Spaltstelle beiden Enzymvarianten zugeordnet werden. Die aus dem Fibrinogenabbau resultierenden Fragmentierungsmuster wiesen keinerlei Übereinstimmung auf. Dagegen waren die Fragmentierungsmuster aus dem proteolytischen Abbau des *myelin basic protein* mit den beiden MT1-MMP-Varianten völlig identisch. Für die Spaltung durch die Ektodomäne konnten bisher allerdings nur zwei Schnittstellen bestimmt werden.

Der Abbau des Neuropeptids Substanz P durch die beiden löslichen MT1-MMP-Formen zeigte ebenfalls ein übereinstimmendes Bild der Fragmentierung.

Für den proteolytischen Abbau eines synthetischen fluorogenen Peptids durch die katalytische Domäne, die Ektodomäne und das Gesamtzym (auf Zellen) konnten kinetische Parameter bestimmt und verglichen werden. Weiterhin wurden für die Zerlegung von denaturiertem Kollagen durch die beiden löslichen Enzyme relative kinetische Konstanten ermittelt. Die katalytische Domäne besitzt demnach, verglichen mit der Ektodomäne, einen um den Faktor zwei größeren k_{cat}/K_M -Wert gegenüber kleinen Peptiden, wohingegen die relativen Aktivitäten gegenüber dem hochmolekularen Substrat nicht voneinander abwichen.

Durch die Untersuchung der Hemmung von beiden löslichen Enzymen mit den natürlichen Inhibitoren TIMP-2 und TIMP-4 konnten Hemmkonstanten bestimmt und verglichen werden. Die Inhibierung durch den TIMP-2 bestätigte die in der Literatur für andere MMP/TIMP-Paare beschriebene effektivere Hemmung der Ektodomäne, während die Hemmung durch die inhibitorische Domäne des TIMP-4 für die katalytische Domäne stärker war.

Weiterhin wurden ca. 40 Vertreter einer neuen Klasse von synthetischen Inhibitoren der Thiadiazin-Familie hinsichtlich ihrer Hemmwirkung gegenüber den beiden MT1-MMP-Varianten getestet. Viele der getesteten Stoffe wiesen Hemmkonstanten im nanomolaren Bereich auf.

Versuche zur Calcium-Abhängigkeit der proteolytischen Aktivität ergaben bei zunehmender Größe der Varianten eine sinkende Abhängigkeit. Für die löslichen Varianten konnte die reversible Aktivierung und Deaktivierung durch abwechselnde Gabe und Entzug von Calcium gezeigt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Kultivierung von Zellen

3.1.1 *E. coli*

Die für die Subklonierungen verwendeten *E. coli* Stämme JM109 (Promega, Mannheim) und XL1-blue MRF' (Stratagene, La Jolla) wurden in LB-Medium (10 g/L NaCl (5 g/L NaCl nach Transformation mit pPICZ α A), 10 g/L Pepton und 5 g/L Hefeextrakt) über Nacht unter Schütteln bei 37°C kultiviert. Nach Transformation mit den Antibiotikaresistenzvermittelnden Vektoren wurde das entsprechende Antibiotikum zum Nährmedium gegeben (200 mg/L Ampicillin, 50 mg/L Zeocin). Die Herstellung von Nährbodenplatten erfolgte unter Zusatz von 2% Agar zum LB-Medium. Neben der Selektion durch Antibiotika konnten die mit dem pGEM[®]T Vektor erfolgreich transformierten Klone mit einem Test auf α -Komplementation (Ullmann et al., 1967) erkannt werden. Dazu wurden die Nährbodenplatten vor Ausstreichen der Transformationsansätze mit Isopropyl- β -D-galactopyranosid (IPTG) und 5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal) versetzt (Sambrock et al., 1989). Die Lagerung der *E. coli* Stämme bei -80°C erfolgte unter Zugabe von 50% Glycerin zu Kulturansätzen mit einer optischen Dichte (578 nm) von 15.

3.1.2 *Pichia pastoris*

Die *Pichia pastoris* Stämme GS115, KM71 und X-33 (Invitrogen, Groningen) wurden in YPD-Medium (10 g/L Hefeextrakt, 20 g/L Pepton und 20 g/L Glucose) 20 Stunden bei 28°C unter Schütteln kultiviert. Nach Transformation mit dem Konstrukt pPICZ α A- Δ TM-MT1-MMP und Selektion erfolgreich transformierter Klone erfolgte die Kultivierung in BMGY-Medium (0,1 M Kaliumphosphat pH 6,0, 1,34% YNB, 4 \cdot 10⁻⁴% Biotin, 1% (v/v) Glycerin; YNB – *Yeast Nitrogen Base*: 1,76 g/L KH₂PO₄, 0,25 g/L K₂HPO₄, 1 g/L MgSO₄ x 7 H₂O, 0,2 g/L NaCl, 0,2 g/L CaCl₂ x 2 H₂O, 9,97 g/l (NH₄)₂SO₄, 11,8 mg Vitamin-Mix) bis zu einer optischen Dichte (578 nm) von ~20. *P. pastoris* ist als methylotrophe Hefe in der Lage, Methanol mit Hilfe der Alkoholoxidase als einzige Kohlenstoffquelle zu nutzen. Die Alkoholoxidase wird bei der Nutzung von Glucose oder Glycerin als Kohlenstoff- und Energiequelle nicht exprimiert. Aus diesem Grunde kann der Alkoholoxidase-Promotor durch den Wechsel von Glycerin-haltigem auf Methanol-haltiges Medium induziert und somit als

starker gentechnischer Promotor verwendet werden (Ellis et al., 1985; Sreekrishna & Kropp, 1996). Die Induktion der 48 stündigen Expression wurde durch einen Wechsel des Mediums von BMGY- auf BMMY-Medium erzielt (BMMY enthält statt des Glycerins 0,5% v/v Methanol), wobei das Medium zur Aufrechterhaltung der Methanolkonzentration nach dem ersten Tag mit 0,32% v/v Methanol ergänzt wurde. Nährbodenplatten enthielten 2% Agar im Nährmedium. Die Lagerung bei -80°C erfolgte nach Zugabe von 50% v/v Glycerin zum Zellpellet.

3.1.3 HEK293-EBNA

Von Prof. Dr. C. Mauch (Universität Köln) wurden sowohl der untransformierte Stamm K21 der HEK293 EBNA Zellen und der stabil transfizierte Klon HEK293/K21-pCMV-MT1-MMP zur Verfügung gestellt.

Die HEK293 Zellen wurden in 10 ml DMEM/10% FCS (Gibco BRL LifeTechnologies, Eggenstein) bei 37°C , 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2 bis zur Konfluenz und anschließend über Nacht in serumfreiem Medium kultiviert, um für die Messungen Serum-freie Bedingungen zu schaffen. Im Falle des stabil transfizierten Klones HEK293/K21-pCMV-MT1-MMP erfolgte die Kultivierung zusätzlich unter Zugabe des Antibiotikums Puromycin (0.5 mg/L).

3.2 Klonierung

3.2.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Mittels PCR wurde das für die Pro-Ektodomäne der MT1-MMP (Ala²¹-Glu⁵²³) codierende cDNA-Fragment amplifiziert. Hierbei wurden durch entsprechende Wahl der Primer die gewünschten Restriktionsschnittstellen und das Stoppcodon in das Amplifikat eingefügt (Saiki et al., 1988). Für die PCR wurde die *Deep Vent*[®] Polymerase mit *proof reading* Funktion gewählt, um die Zahl der Mutationen zu minimieren.

Die PCR-Ansätze setzten sich wie folgt zusammen:

- 1-10 ng Templat
- 0,5 µl *forward* Primer, 50 µM (MWG, Ebersberg)
- 0,5 µl *reverse* Primer, 50µM (MWG, Ebersberg)
- 2 µl dNTP, 10 mM (Genecraft, Münster)
- 5 µl 10x Polymerasepuffer
- 0,5 U Polymerase
- mit Wasser auf 50 µl auffüllen
- mit 40 µl Paraffin überschichten

Die Reaktionsmischungen wurden in einem *Thermocycler* gemäß folgendem Programm cyclischen Temperaturschwankungen unterworfen:

Tabelle 1: PCR-Programm.

Schritt	Dauer	Temperatur
1. Denaturierung	30 s	95 °C
2. Denaturierung	30 s	95 °C
3. <i>Annealing</i>	10 s	55 °C
4. Polymerisation	120 s	72 °C
5. Zahl d. Cyclen	39 x zu Schritt 2	
6. Extension	120 s	72 °C
7. Lagerung		4 °C

Für Arbeiten mit dem *pGEM[®]T-Easy Kit*, mußten an den 3'-Enden der PCR-Produkte jeweils ein Adenosin angefügt werden. Dazu wurde nach der PCR für 10 min bei 72 °C eine Nachbehandlung mit der Tth[®]-Polymerase (1U) durchgeführt.

Folgende Oligonucleotide (MWG-Biotech) wurden zur Klonierung der Ektodomäne der MT1-MMP (Δ MT1-MMP) eingesetzt:



3.2.2 Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten hinsichtlich ihres Molekulargewichtes erfolgte in 1%igen Agarosegelen durch horizontale Gelelektrophorese nach Standardvorschrift (Sambrook et al., 1989). Dazu wurden 5 bis 500 ng DNA und der Längenstandard (1 kb Standard, Gibco BRL LifeTechnologies, Eggenstein) aufgetragen, mittels Elektrophorese im Gel aufgetrennt und anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt (Sharp et al., 1973).

3.2.3 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

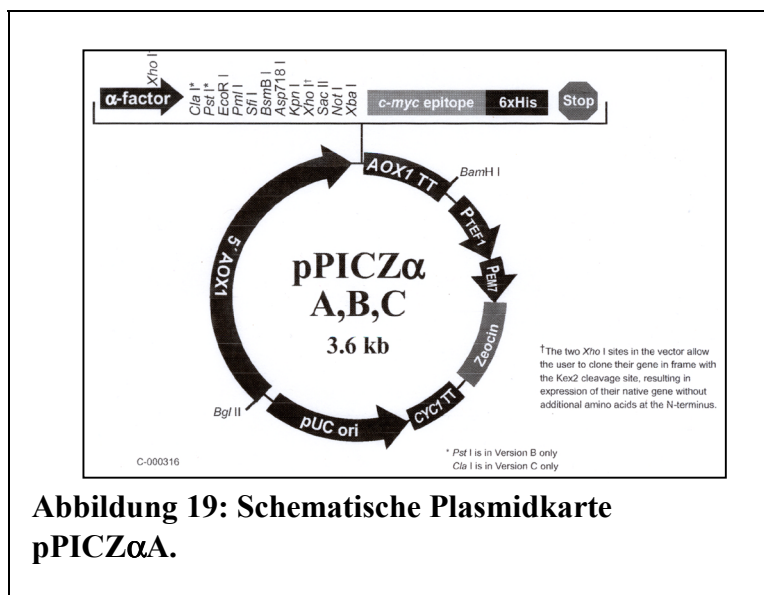
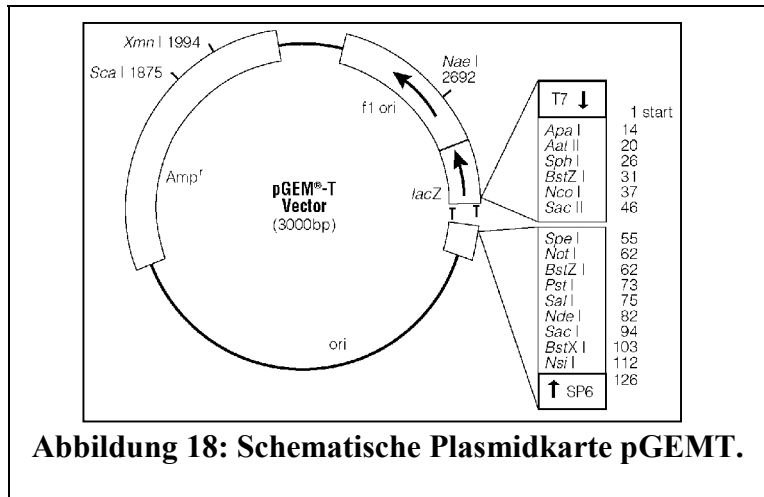
Mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) wurde nach Vorschrift des Herstellers DNA aus Agarosegelen extrahiert und anschließend in einer weiteren Agarosegelelektrophorese auf Reinheit und Konzentration geprüft.

3.2.4 DNA-Reinigung

Zur Reinigung von DNA wurden unterschiedliche Methoden eingesetzt. Für die Klonierungen wurde die DNA mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) aufgearbeitet. Bei einer größeren Zahl von Proben, wie z.B. für *Screenings*, wurden die DNA-Proben durch Phenolisierung und anschließende Ethanol-fällung (Sambrook et al., 1989) gereinigt.

3.2.5 Vektoren

Die Subklonierung in *E. coli* erfolgte über den pGEM[®]T-Vektor (Promega) in den Expressionsvektor pPICZ α A. Im Folgenden sind die Plasmidkarten schematisch dargestellt:



3.2.6 Klonierung und Transformation mit dem pGEM[®]T-Easy Kit

Mit Hilfe des *pGEM[®]T-Easy Kits* (Promega, Mannheim) können PCR Produkte unter Verwendung eines Topoisomerase/Ligase-Gemisches mit dem pGEM[®]T-Vektor ligiert werden, worauf sich die Transformation von JM109 kompetenten *E. coli*-Zellen mit dem entstandenen Konstrukt anschließt.

3.2.7 Klonierung in den Expressionsvektor

Die für die Ektodomäne der MT1-MMP^{Ala21-Glu523} codierende Gensequenz wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und NotI (New England Biolabs, Beverly, USA) aus dem pGEM[®]T-Vektor geschnitten und in den ebenso linearisierten pPICZ α A-Expressionsvektor durch Ligation mit der Bakteriophage T4-DNA-Ligase (Promega, Mannheim) eingefügt (Weiss et al., 1968).

3.2.8 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Kompetente Zellen wurden nach der Vorschrift von Hanahan (1985) hergestellt und verwendet oder, wie im Falle des *pGEM[®]T-Kits* (Promega, Mannheim), direkt vom Hersteller bezogen und entsprechend der mitgelieferten Vorschriften eingesetzt.

Bei Antibiotikaresistenz-vermittelnden Transformationen erfolgte die anschließende Kultivierung auf Antibiotikum-enthaltenden Nährbodenplatten unter Selektionsdruck

Für die Selektion der pGEM[®]T- Δ TM-MT1-MMP-positiven Zellen stand außerdem der Test auf α -Kontemplation zur Verfügung (Ullmann et al., 1967).

3.2.9 Restriktion

Die Restriktionsanalyse beinhaltet die alkalische Lyse der Zellen (Sambrook et al., 1989), die Reinigung der Plasmid DNA über das *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen), die Spaltung des Plasmids mit bestimmten Endonukleasen (Cohen et al., 1973) und die Analyse der entstehenden Fragmente durch Elektrophorese (Sambrook et al., 1989). Die Plasmid-DNA eines positiven Klons wurde zur Bestätigung der korrekten Gensequenz der DNA-Sequenzierung unterzogen.

3.2.10 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen (Sanger et al., 1977) erfolgten mit einem *LI-COR Sequencer* (MWG Biotech, Ebersberg) durch fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide und mit dem *ABI-DNA-Sequencer* (Perkin-Elmer) durch fluoreszenzmarkierte Didesoxynucleotide (Dr. W. Engelhardt & Dipl. Biol. F. Hecht, IIT, Universität Bielefeld).

3.2.11 Transformation von *Pichia Pastoris*

Zur Transformation von *Pichia pastoris* wurde das Konstrukt pPICZ α A- Δ MT1-MMP mit der Endonuclease *Pme I* (New England Biolabs, Beverly, USA) linearisiert, damit über die so erzeugten DNA-Bereiche eine homologe Rekombination in den *AOX1*-Locus (Clare et al., 1991) des Hefe Genoms stattfinden kann.

Die *Pichia pastoris* Stämme GS115, KM71 und X-33 (Invitrogen, Groningen) wurden durch die Behandlung mit LiCl unter Zusatz von Lachs-Sperma DNA als Carrier transformiert (Invitrogen, Groningen). Nach der Transformation erfolgte die Kultivierung unter Selektionsdruck auf Zeocin[®] enthaltenden Nährbodenplatten (100 mg/L) bei 28°C ca. 72 Stunden unter Lichtausschluß. Zur Sicherung wurden die Klone anschließend auf Rasterplatten übertragen.

3.2.12 Selektion exprimierender Klone

Zur Kontrolle der Transformation wurden die *Pichia pastoris* Klone einem PCR-*Screening* unterzogen. Dazu wurde ein geringer Teil der Zellmasse aufgekocht und als Templat eingesetzt.

Die in dem *Screening* als positiv identifizierten Klone wurden in *colony blots* untersucht, um die Stärke der Expression abzuschätzen. Aufgrund dieser Abschätzung wurden Klone ausgewählt, und mit diesen Probeexpressionen im 50 ml-Maßstab durchgeführt. Die Expression wurde zeitabhängig mittels SDS-PAGE verfolgt. Letztendlich wurde ein gut exprimierender Klon ausgewählt.

3.3 Expression und Reinigung

3.3.1 Kultivierung im Schüttelkolben

Die Expression im 1 L-Maßstab wurde mit dem Klon KM71/36 durchgeführt (2 x 0,5 L im Schüttelkolben; Kolben mit Schikanen, Braun Biotech International, Melsungen). Die Probeexpressionen zeigten das Expressionsmaximum eines ~47 kDa großen Peptids am zweiten Tag der Expression, so daß für alle folgenden Großexpressionen mit diesem Klon eine Induktionsdauer von zwei Tagen nach Induktionsstart gewählt wurde.

3.3.2 Kultivierungen im Bioreaktor (20 Liter Kulturvolumen)

Die Herstellung größerer Mengen des Enzyms war in kleinen Kulturansätzen aufgrund der autoproteolytischen Instabilität und der Degradation der Ektodomäne durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen nicht möglich. Daher wurde der Klon im 20 L Maßstab kultiviert.

Die Kultivierung im 20 L Maßstab wurde von Herrn Dipl.-Ing. T. Schäffer am Lehrstuhl von Herrn Prof. Dr. E. Flaschel (Universität Bielefeld, Technische Fakultät, Lehrstuhl für Fermentationstechnik) in Anlehnung an ein Vorlageprotokoll von Dr. S. Bartsch durchgeführt.

Für die Fermentation wurden 4 L Mediumkonzentrat BMGY (siehe 3.1.2) benötigt. Das Konzentrat wurde im Fermenter auf 20 Liter aufgefüllt und für 25 min bei 121°C hitzesterilisiert. Nach dem Abkühlen wurden über Septen im Bioreaktordeckel 8 mg sterilfiltriertes Biotin in 40 ml Wasser und 200 ml 70%iges hitzesterilisiertes Glycerin zugegeben. Die Kultivierung wurde durch Animpfen des Reaktors mit einer 500 ml Kolbenkultur in der stationären Phase über ein Septum gestartet. Durch Zugabe von Säure (10% H_3PO_4) oder Lauge (25% $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$) über Zulaufpumpen wurde der pH-Wert während der Kultivierung konstant bei 5,4 gehalten. Um eine Sauerstofflimitierung zu verhindern, wurde die Rührerdrehzahl bei einem O_2 -Gehalt des Mediums von unter 40 % des Sättigungswertes automatisch erhöht. Der Luftzustrom betrug dabei 10 L/min.

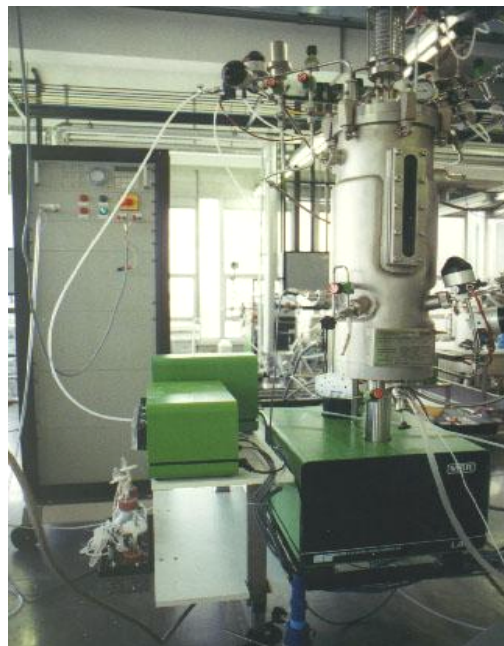


Abbildung 20: MBR 30 Liter Rührkesselbioreaktor mit Begasungsregeleinheit.

Die Zellen wurden zunächst 24 Stunden bei 30°C in BMGY-Medium vermehrt. Die Induktion wurde durch Zugabe von 200 ml Methanol zu einer Endkonzentrationen von 1 % Methanol gestartet. Nach einer Induktionsdauer von 10 h wurden durch kontinuierliches Zupumpen über die nächsten 14 h nochmals 1000 ml Methanol zugegeben. Anschließend wurde der Reaktorinhalt durch Querstromfiltration (Pall-Filtron) mit 1 MDa Ausschlußgrenze sterilfiltriert. In einer zweiten Filtration mit einer Ausschlußgrenze von 5 kDa wurde der Kulturüberstand auf 1.6 L eingengt und durch Nachspülen mit nativem Tris-Puffer (2,4 g/L TRIS/HCl pH 7,2, 5,8 g/L NaCl, 0,6 g/L CaCl₂) dialysiert. Das eingengte Ultrafiltrat wurde erneut sterilfiltriert, um präzipitiertes Material abzutrennen. Um die autoproteolytische Degradation des Expressionsproduktes zu verhindern, wurden die Puffer während dieser Prozeduren auf Eis gekühlt. Trotz der Kühlung aller verwendeten Puffer und Kühlung des Kulturüberstandes auf Eis wurden innerhalb der Querstromfiltrationsanlage teilweise Temperaturen bis 37°C gemessen.

3.3.3 Reinigung der rekombinanten Ektodomäne der MT1-MMP

Die *S. cerevisiae* α -Faktor-Präprosequenz des pPICZ α A-Vektors sorgt für die Ausschleusung des Enzyms in den Kulturüberstand. Nach Abzentrifugieren der Zellen bei 1500 g folgten zwei Dialysen (Spectra/Por 1, Spectrum Medical Industries, Houston) bei 4°C gegen die zehnfache Menge an nativem-TRIS-Puffer. Nach Sterilfiltration (0,2 μ m Ausschlußgrenze) wurde der Überstand bei 4°C über eine Affinitätssäule (Moore & Spilberg, 1986) geleitet und der Durchlauf verworfen. Nach Spülen der Affinitätssäule mit 300 ml nativem-TRIS-Puffer erfolgte die Elution unter partiell denaturierenden Bedingungen (Elutionspuffer: 2,4 g/L TRIS/HCl pH 9,0, 120 g/L NaCl, 5% Dioxan). Dabei wurde das Eluat fraktioniert gesammelt und mittels SDS-PAGE analysiert. Die Δ MT1-MMP enthaltenden Proben wurden vereinigt, in einer Ultrafiltrationskammer (Amicon D2, Amicon, Witten) mit 3 bar Stickstoffatmosphäre durch YM3-Membranen (Millipore, Bedford) auf 3-5 ml eingengt und über Nacht bei 4°C gegen 5 L nativen TRIS-Puffer dialysiert (Roderfeld et al., 2000).

3.3.4 Konzentrationsbestimmungen

Photometrische Bestimmung

Mit folgender Formel (Pace et al., 1995) wurde der Extinktionskoeffizient der Ektodomäne Tyr¹¹²-Glu⁵²³ bei 280 nm berechnet:

$$\epsilon_{\Delta\text{MT1-MMP}} [\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}] = 12 (\text{Tryptophan}) \cdot 5500 + 21 (\text{Tyrosin}) \cdot 1490 = 97290 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

Durch die optische Dichte der Proteinlösung bei 280 nm läßt sich daraus mit dem Lambert-Beerschen Gesetz die Proteinkonzentration der Lösung bestimmen.

BCA-Test

Cu^{II} wird von Proteinen zu Cu^I reduziert, was durch die Komplexbildung mit Bicininchonsäure verfolgt werden kann (Pierce, Out-Beijerland, Niederlande). Die Bildung des Cu^I-Bicininchonsäure-Komplex konnte bei 560 nm im *ELISA-Reader* (Tecan, Crailsheim) erfaßt und durch Vergleich mit einem Standard (2 g/L BSA) quantifiziert werden.

Active site-Titration

Nachdem für die Ektodomäne der MT1-MMP eine 1:1 Hemmung durch synthetische Inhibitoren nachgewiesen worden war, konnten Konzentrationsbestimmungen durch *active site*-Titrationsen mit Batimastat (BB94, British Biotech) durchgeführt werden.

3.4 Charakterisierung

3.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE stellt eine sehr effektive Methode zur Trennung von Makromolekülen und Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen dar. Durch die Anlagerung von SDS-Molekülen erhalten alle Proteine die gleiche negative Ladungsdichte und werden im elektrischen Feld unter Einfluß der Polyacrylamidmatrix nur aufgrund ihrer unterschiedlichen Massen aufgetrennt (Laemmli, 1970; Westermeier, 1990). Durch den Vergleich mit einem

Proteinstandardgemisch (LMW-Marker, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) ist eine Größenabschätzung der zu untersuchenden Proteine möglich (Weber & Osborne, 1969). Die Elektrophoresen wurden mit 7 bis 15%igen Gelen bei einer Stromstärke von 40 mA durchgeführt.

3.4.2 Färbung von PAA-Gelen

Die Färbung mit Silberionen ist sehr effektiv und läßt noch einen Nachweis von 10 ng Protein pro Bande zu. Die Silberionen lagern sich an die Thiol- und Carboxylatgruppen der im Gel fixierten, denaturierten Proteine an und können durch Reduktion im basischen Milieu zu elementarem Silber reduziert werden, wodurch die Proteinbanden sichtbar werden (Sammons et al., 1981; Heukeshoven & Dernick, 1988).

3.4.3 Elektroblothing

In einem elektrischen Feld können die im PAA-Gel aufgetrennten Proteingemische mit 150 mA für 50 min auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF-Membran, Millipore, Bedford) übertragen werden (Towbin et al., 1979; Xu & Shively, 1988).

3.4.4 Mikrosequenzierung nach Edman

Für N-terminale-Sequenzanalysen wurden die auf die PVDF-Membran transferierten Proteine durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht, die Banden ausgeschnitten und dem automatisierten Edman-Abbau zugeführt (Schlägger et al., 1988). Der automatisierte Edman-Abbau (Edman und Begg, 1967; Reinke et al., 1991; Fischer, 1992) mit dem *Protein Sequencer 810/910* (Knauer, Berlin) wurde in der Universität Bielefeld durchgeführt (S. Grabolle, M.O. Luther, K. Köster und K. Böker, Biochemie I).

3.4.5 Western Blot-Analyse

Der immunologische Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen erfolgte mittels Western Blot-Analyse. Nach Absättigung der Membran wurde mit einem Primärantikörper gegen die MT1-MMP (katalytische Domäne, aus Kaninchen) inkubiert. Die Färbung erfolgte

nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper, der als Konjugat mit der alkalischen Phosphatase eingesetzt wurde (Langone & Vunakis, 1982; Blake et al., 1984).

3.4.6 MALDI-TOF-MS-Untersuchungen

Zur Identifizierung des C-Terminus der rekombinant exprimierten Δ TM-MT1-MMP wurden MALDI-TOF-MS-Untersuchungen durchgeführt (*matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight mass spectrometry*).

Dazu wurde eine Probe der gereinigten Ektodomäne mit einer modifizierten Trypsin-Variante (Promega, Mannheim) über Nacht bei 37°C hydrolysiert und die Probe anschließend zur Analyse eingesetzt (Karas & Hillenkamp, 1988).

3.4.7 Reversed Phase HPLC (RP-HPLC)

Bei der HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) wird die mobile Phase unter hohem Druck durch eine Säule, die die stationäre Phase enthält, gepumpt. Im Gegensatz zur konventionellen HPLC ist bei der RP-HPLC die stationäre Phase unpolarer als die mobile. Durch die Einstellung eines geeigneten Puffergradienten kann ein an die stationäre Phase gebundenes Peptidgemisch, je nach Polarität der Komponenten, getrennt eluiert und fraktioniert gesammelt werden (Aguilar et al., 1996). Als Säule kam eine WP-RP-C₁₈-Säule (Macherey-Nagel) an der *Hitachi LaChrome*-HPLC-Anlage (Merck) zum Einsatz.

Folgendes Programm wurde zur Elution der Substanz-P-Fragmente eingesetzt:

Tabelle 2: HPLC-Programm.

Zeit/min	Parameter
0-5	0% Puffer B
5-35	0-100% Puffer B
35-40	100% Puffer B
40-42	100-0% Puffer B

Puffer A: 1 ml/L TFA (v/v) in Tridest

Puffer B: 1 ml/L TFA (v/v)
80% CH₃CN (v/v)

3.4.8 Kinetische-Untersuchungen

(7-Methoxycoumarin-4-yl)acetyl-Pro-Leu-Gly-Leu-(3-[2,4-dinitrophenyl]-L-2,3-diaminopropionyl)-Ala-Arg-NH₂

Das synthetische, fluorogene MMP-Substrat (7-Methoxycoumarin-4-yl)acetyl-Pro-Leu-Gly-Leu-(3-[2,4-dinitrophenyl]-L-2,3-diaminopropionyl)-Ala-Arg-NH₂ (MCA-Peptid; Knight et al., 1992) weist eine geringe Grundfluoreszenz auf. Nach Spaltung der Gly-Leu Bindung ist der *Quenching*-Effekt der Dinitrophenylgruppe nicht mehr wirksam und die Fluoreszenz der Methoxycoumarinringgruppe kann bei einer Anregung von 330 nm im Maximum der Emission, bei 390 nm, gemessen werden. Aus gerätespezifischen Gründen wurden die Messungen etwas außerhalb des Emissionsmaximums, bei 405 nm, mit dem *Spectra-Fluor Plus* (Tecan, Crailsheim) mindestens in Dreifachbestimmungen durchgeführt. Dabei wurden Enzymkonzentrationen im nanomolaren und Substratkonzentrationen in mikromolaren Bereich verwendet.

Mit (7-Methoxycoumarin-4-yl)acetyl-Pro-Leu konnte unter Aufnahme einer Eichgeraden ein Faktor zur Umrechnung der gemessenen relativen Fluoreszenzwerte in absolute Substratkonzentrationen erhalten werden. Alle Messungen, mit Ausnahme der Messungen zur Calciumabhängigkeit der Enzymaktivität, bei denen die Calciumkonzentration variiert wurde, erfolgten in nativem TRIS-Puffer mit Substratkonzentrationen von 0,1 bis 2 µM.

Die enzymatische Spaltung des MCA-Peptids wurde zusätzlich am Gesamtzym auf lebenden Zellen untersucht. Dazu wurde eine von C. Mauch zur Verfügung gestellte, mit der MT1-MMP stabil transfizierte HEK 293 Zelllinie verwendet. Die konfluent angewachsenen Zellen wurden über Nacht in serum-freiem Medium (DMEM, Gibco BRL LifeTechnologies, Eggenstein) kultiviert und nach Bestimmung der Zahl an aktiven Zentren pro eingesetzter Zelle (*active site titration*) mit einer Lösung des Substrates überschichtet, von der in zeitlicher Reihenfolge Proben fluoreszenzspektrometrisch vermessen wurden. Die Messungen wurden in nativem-Tris-Puffer mit Substratkonzentrationen von 2-20 µM durchgeführt. Die Vermessung der Proben erfolgte mit dem *Spectra-Fluor Plus* (Tecan, Crailsheim) mindestens in Dreifachbestimmungen. Alle gemessenen Aktivitäten wurden auf die Aktivität untransformierter Zellen (als Referenz) bezogen.

Gelatin als Substrat

Die kinetischen Daten der katalytischen und der Ektodomäne der MT1-MMP wurden am Beispiel des Gelatins untersucht und verglichen. Dazu wurden Proben „definierter Substratkonzentration“ („1-50 μM “) mit 2,5 nmol Enzym bei 37°C inkubiert und die zeitliche Zunahme der Anzahl der gebildeten N-Termini erfasst. Fluorescamin (Sigma-Aldrich, Steinheim) reagiert mit primären Aminosäuren unter Bildung eines fluoreszierenden Produktes. Die zeitliche Zunahme der Fluoreszenz ist direkt proportional zur Bildung neuer N-Termini und kann unter Verwendung einer Eichgeraden (Eichsubstanz: Ala-Glu) quantitativ erfasst werden. Die Versuche wurden in BisTris-Puffer durchgeführt (8 g/L BisTris/ HCl pH 7,3, 5,8 g/L NaCl, 0,74 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Unter Verwendung dieser Daten konnten durch Auswertung nach Lineweaver-Burk „relative“ k_{cat}/K_M -Werte ($k_{\text{cat}}/K_M^{\text{rel}}$) für die beiden löslichen MT1-MMP-Varianten ermittelt werden, da keine absoluten Angaben über die Substratkonzentration gemacht werden konnten.

3.4.9 Autolyse und Identifizierung der Spaltprodukte

Versuche zur Autolyse der Ektodomäne der MT1-MMP wurden in nativem Tris-Puffer und Enzymkonzentrationen von 100 mg/L durchgeführt (Roderfeld et al., 2000). Die Inkubation der Enzymprobe erfolgte bei 37°C, wobei in zeitlicher Reihenfolge Proben entnommen und mittels SDS-PAGE und Sequenzblot mit anschließendem automatisierten Edman-Abbau untersucht wurden.

3.4.10 Spaltung von Substraten und Identifizierung der Degradationsprodukte

Potentielle Substrate wurden in nativem Tris-Puffer in einer Konzentration von 100 mg/L mit Enzym der Konzentration 10 mg/L bei 37°C unter Probennahme inkubiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Sequenzierblot mit anschließendem automatisierten Edman-Abbau analysiert. Untersucht wurden Fibrinogen (Sigma, München), *myelin basic protein* (MBP; Fluka, Steinheim) und Substanz-P (Bachem, Bubendorf (Schweiz)). Das MBP wurde aus Gewebe aufgearbeitet und lag in einer Reinheit von 50% vor. Die Spaltungen wurden unter Zusatz eines Inhibitorcocktails durchgeführt (*CompleteTM Mini, EDTA free*, Roche). Im Falle der „Substanz-P“ wurden die entstandenen Fragmente durch RP-HPLC getrennt und nach Lyophilisation zur N-terminalen Sequenzierung gegeben. Hier wurden für die Spaltung

die gleichen Bedingungen vorgegeben, die für die Degradation durch die katalytische Domäne der MT1-MMP eingesetzt wurden: 40 µg (29,68 nmol) des Neuropeptids wurden mit 8,7 pmol des Enzyms für 15 min bei 37°C inkubiert und der Abbau durch Zugabe von EDTA gestoppt (Lichte, 1997).

3.4.11 Zymogramme

Potentielle Substrate (Gelatin, Typ I-, III-, VI- und VII – Kollagen, β-Casein) wurden in einer Konzentration von 1 g/L in PAA-Gele einpolymerisiert. Diese Gele wurden in einer SDS-PAGE eingesetzt, bei der als Probe die ΔMT1-MMP aufgetragen wurde. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel über Nacht bei 37°C in nativem-Tris-Puffer inkubiert und anschließend einer Coomassie-Färbung unterzogen (Heussen & Dowdle, 1980).

3.4.12 Calcium-Abhängigkeit

Die Calciumabhängigkeiten der cdMT1-MMP, der Ektodomäne und des Gesamtzyms (auf HEK 293-Zellen) wurden anhand der proteolytischen Zerlegung des MCA-Peptids in nativem Tris-Puffer bei Calciumkonzentrationen von 0 bis 100 mM untersucht. Dazu wurden Proben von 100µl (mit einer Konzentration von 500µg/ml) der Enzyme über Nacht bei 4°C gegen 5 L nativen Tris-Puffer ohne Calcium dialysiert und diese Lösungen für die Aktivitätsmessungen mit dem Murphy-Substrat eingesetzt. Die Anheftung der Hek-293-Zellen auf der Oberfläche der Kulturschale wurde durch den Entzug von Calcium sehr schnell unterbunden, so daß Messungen nur bis 1µM Ca²⁺ vorgenommen wurden.

3.4.13 Reversible Aktivierung/Hemmung

Die reversible Aktivierung und Hemmung der proteolytischen Aktivität der MT1-MMP wurde durch abwechselnde Dialysen der enzymhaltigen Proben gegen calciumhaltigen- und calciumfreien nativen Tris-Puffer erreicht. Die enzymatische Aktivität der Probe wurde nach Einstellen des Dialysegleichgewichtes (unter Rühren 5 Stunden) durch Fluoreszenzmessungen mit dem fluorogenen MCA-Peptid analysiert.

Außerdem wurde der Effekt der Aktivierung und Hemmung durch abwechselnde Zugabe von Calcium und einem „spezifischen“ Calciumchelator untersucht. Zur Maskierung des gelösten Calciums wurden Oxalat, Citrat und Doxycyclin getestet.

3.4.14 Hemmung durch natürliche und synthetische Inhibitoren

Die 1:1 Hemmung der Ektodomäne durch TIMP-2 und TIMP-4 wurde durch *active-site*-Titration ermittelt.

In Zusammenarbeit mit Dr. B. Stratmann wurden die IC_{50} -Werte von cdMT1-MMP/idTIMP-4 und Δ MT1-MMP/idTIMP-4 bestimmt (Stratmann, 2000).

Der Vergleich der Hemmung von cdMT1-MMP und von Δ MT1-MMP durch synthetische Inhibitoren erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. J. Schröder (Schröder, 2001).

4 Ergebnisse

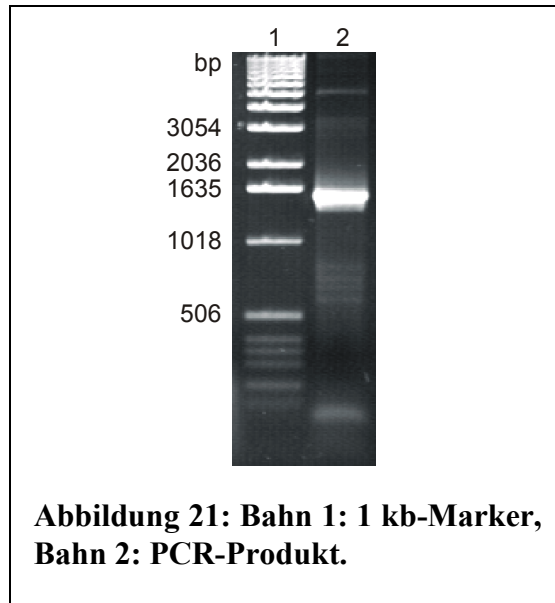
Das vollständige Gen der MT1-MMP wurde von Dr. E. Bartnik und Dr. F. H. Büttner (Hoechst Marion Roussel) durch reverse Transkription (RT-PCR) aus Chondrosarcom-Zellen erhalten und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Tschesche (Biochemie I/Universität Bielefeld) für weitere Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Eine durch die RT-PCR entstandene Punktmutation führte zu einem Terminationssignal (Büttner et al., 1997). Mittels gezielter *in vitro*-Mutagenese erzielte Frau Dr. A. Lichte die Wiederherstellung der *wild-type* cDNA der MT1-MMP aus humanem Knorpel (Lichte, 1997).

4.1 Klonierung

4.1.1 Subklonierung der cDNA (proMT1-MMP [Ala²¹-Glu⁵²³]) in *E. coli*

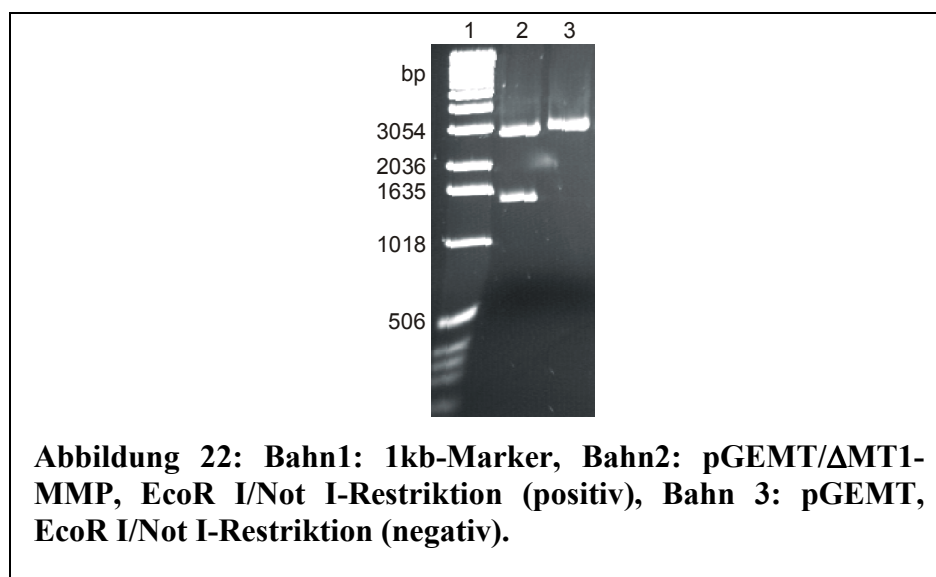
4.1.1.1 PCR zur Gewinnung der cDNA

Zu Beginn der Arbeit lag die vollständige cDNA der MT1-MMP im pCRTMII-Vektor vor (Lichte, 1997) und wurde für die Bereitstellung der für die Ektodomäne der MT1-MMP (Ala²¹-Glu⁵²³) codierenden cDNA in einer PCR als Template eingesetzt. Die Amplifikation der gewünschten cDNA erfolgte unter Verwendung zweier Oligonucleotidprimer, die die zu exprimierende Domäne eingrenzen und eine *EcoR I*, sowie eine *Not I* Restriktionsschnittstelle einfügen. Der komplette PCR-Ansatz wurde einer zehnmütigen Nachbehandlung bei 72°C mit der Tth[®]-Polymerase unterzogen, um an den 3'-Enden der PCR-Produkte Adenosine für die Klonierung in den pGEM[®]T-Vektor anzufügen. Nach Auftrennung des PCR-Ansatzes durch Agarosegelelektrophorese wurde das erhaltene 1500 bp große DNA-Fragment mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kit* gewonnen, gereinigt und anschließend in einer weiteren Agarosegelelektrophorese auf Reinheit und Konzentration hin untersucht (Abbildung 21).



4.1.1.2 TA-Klonierung in den pGEM[®]T-Vektor

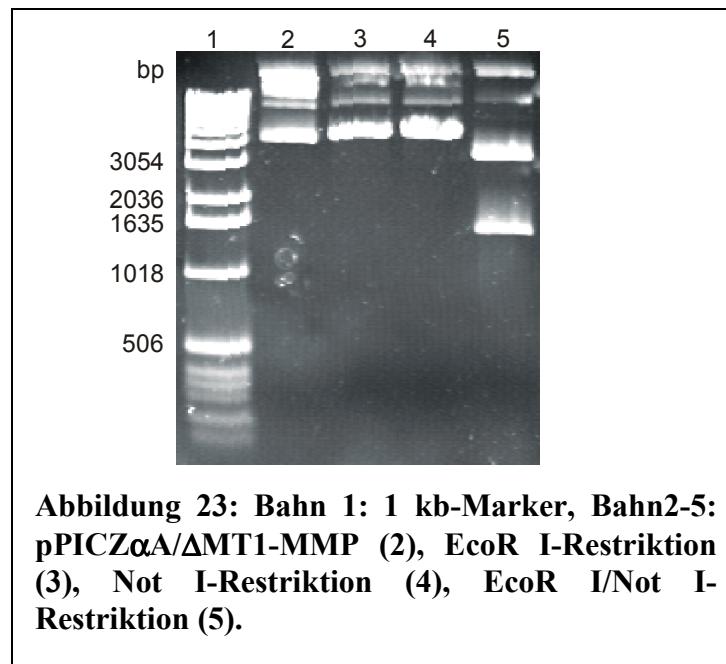
Das gereinigte PCR-Produkt wurde mit dem linearisierten pGEM[®]T-Vektor ligiert und das erhaltene Plasmid in kompetente Zellen des *E. coli* Stammes JM109 eingebracht. Neben der Selektion durch Antibiotika, konnten die mit dem pGEM[®]T Vektor erfolgreich transformierten Klone über die “Blau-Weiss”-Selektion identifiziert werden. Die X-Gal produzierenden Klone erscheinen weiss, nicht transformierte Klone blau. Zwanzig der positiven Klone wurden in Übernachtskulturen kultiviert, anschließend die Plasmid-DNA aufgearbeitet und mit den Endonucleasen *EcoR I* und *Not I* geschnitten. Die Restriktionsansätze werden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.



Positive Klone weisen in der Agarosegelelektrophorese des Restriktionsansatzes neben dem linearisierten 3000 bp großen pGEM[®]T Vektor das 1500 bp große cDNA Fragment der MT1-MMP auf. Für die Expression in *Pichia pastoris* wurde das 1500 bp große Fragment gereinigt und in den induzierbaren Hefe-Vektor pPICZ α A kloniert.

4.1.2 Klonierung des 1500 bp Fragments in den Expressionsvektor pPICZ α A

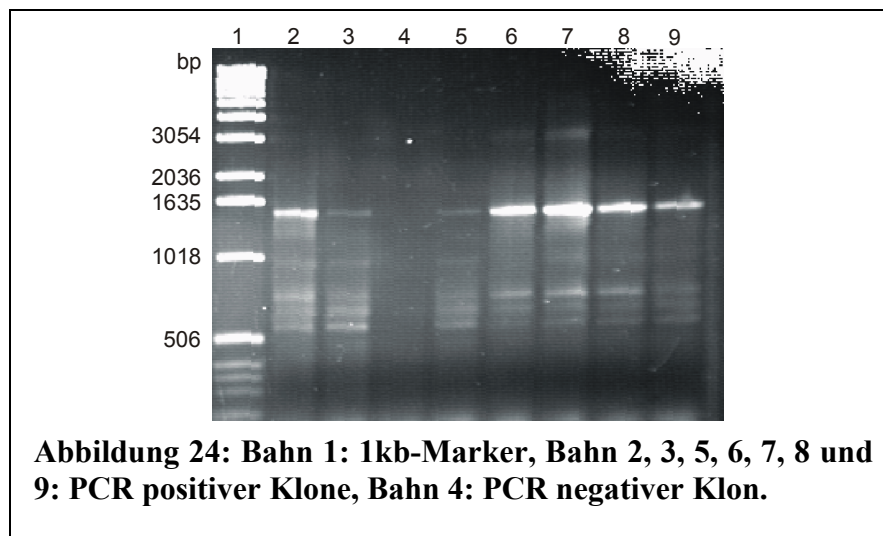
Das durch die Restriktionsschnittstellen *EcoR I*/*Not I* flankierte, für die Ektodomäne codierende cDNA-Fragment wurde mit dem entsprechend geschnittenen und mit alkalischer Phosphatase behandelten Vektor pPICZ α A ligiert. Der Ligationsansatz wurde in verschiedenen Konzentrationen für die Transformation kompetenter Zellen des *E. coli* Stammes X11-blue verwendet. Aus zwanzig der auf Antibiotikaresistenz hin vorselektierten Klone wurde nach Kultivierung in Übernachtskulturen die Plasmid-DNA gewonnen. Wiederum erfolgte die Analyse auf positive Rekombination durch Restriktion mit *EcoR I* und *Not I* und anschließende Agarosegelelektrophorese



Die Basensequenz der in den pPICZ α A klonierten cDNA der Ektodomäne der MT1-MMP wurde zur Kontrolle einer DNA-Sequenzierung unterworfen. Die Analyse ergab die vollständige Übereinstimmung der klonierten Sequenz mit der für die humane MT1-MMP veröffentlichten Sequenz (Luo et al., 1995).

4.1.3 Klonierung der proMT1-MMP (Ala²¹-Glu⁵²³) in *P. pastoris*

Die *Pichia pastoris* Stämme GS115, KM71 und X-33 wurden mit dem linearisierten Konstrukt pPICZ α A- Δ MT1-MMP transformiert und unter Selektionsdruck auf Zeocin[®]-haltigen Nährbodenplatten (100 mg/L) bei 28°C ca. 72 Stunden unter Lichtabschluß kultiviert. Zur Kontrolle der Transformation wurden die *Pichia pastoris*-Klone einem PCR-Screening unterzogen. Auf diese Weise war es möglich, hunderte von Klonen hinsichtlich der Transformationseffizienz in sehr kurzer Zeit zu untersuchen.

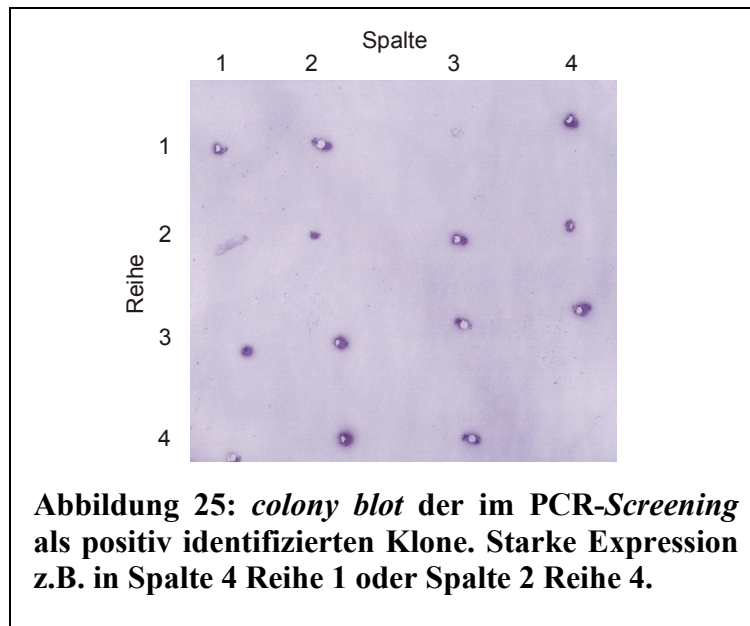


Mit Hilfe des *PCR-Screenings* wurden transformierte Klone aller drei getesteten Stämme gefunden.

4.2 Expression und Reinigung

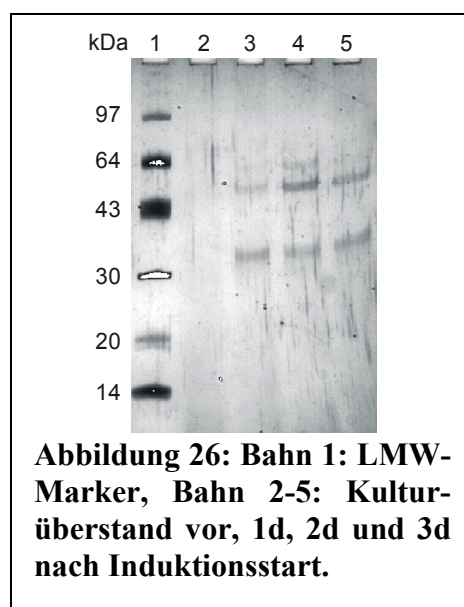
4.2.1 Expression der Ektodomäne der MT1-MMP (Ala²¹-Glu⁵²³)

Die in dem *PCR-Screening* als positiv identifizierten Klone wurden zur Abschätzung der Expressionslevel an rekombinantem Protein durch *colony blots* untersucht.



Mit zehn der am stärksten exprimierenden Klone wurden Probeexpressionen im 50 mL-Maßstab durchgeführt und der Kulturverlauf zeitabhängig über SDS-PAGE verfolgt (Abbildung 26).

Neben dem LMW-Marker in Bahn 1 (Abbildung 26), sind in Bahn 2 eine Probe des Kulturüberstandes vor Induktion und in Bahn 3-5 Proben des Kulturüberstandes am ersten, zweiten und dritten Tag nach Induktion der Expression aufgetragen. Die Banden des überexprimierten Proteins mit 47 kDa weisen in Bahn 4 die größte Intensität auf, womit das Maximum der Expression für Tag zwei nach Induktionsbeginn bestimmt wurde. Im Kulturüberstand wurden am zweiten Tag Expressionslevel bis 25 mg/L MT1-MMP durch fluoreszenzkinetische Messungen mit dem "Murphy-Substrat" festgestellt. Nach dem zweiten Tag sinkt die Konzentration der Expressionsprodukte im Kulturüberstand, was wahrscheinlich auf Autoproteolyse zurückzuführen ist.

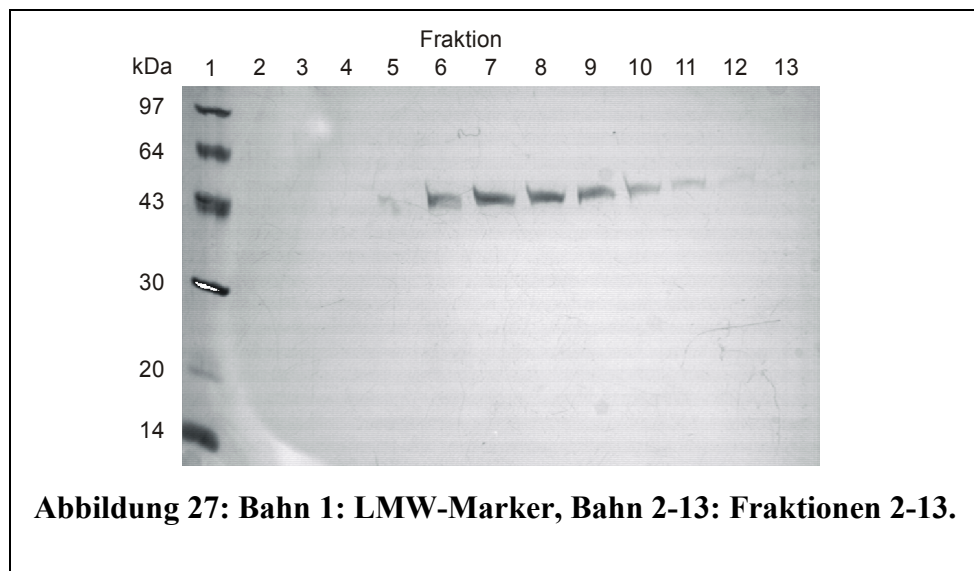


Die Pro-Form der Ektodomäne (Ala²¹-Glu⁵²³ - 57,4 kDa) lag im Kulturmedium nur in sehr geringen Mengen vor, während die aktivierte Form (Tyr¹¹²-Glu⁵²³ - 47,5 kDa) als Hauptprodukt der Expression erscheint.

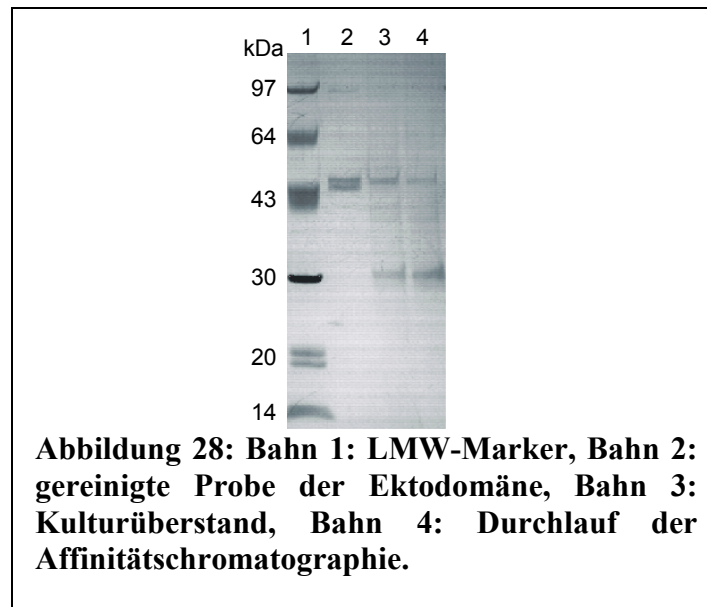
Letztendlich wurde ein stark exprimierender Klon des Stammes KM71 für die Expression im 1 L-Maßstab ausgewählt. Die Expressionskontrolle im 1 L-Maßstab zeigte einen mit Abbildung 26 identischen Kulturverlauf.

4.2.2 Affinitätschromatographische Reinigung

Die Reinigung der aktiven Ektodomäne der MT1-MMP (Tyr¹¹²-Glu⁵²³) erfolgte über eine Affinitätssäulenchromatographie nach Moore and Spilberg (Moore & Spilberg, 1986). Das Hydroxamat-Inhibitor gekoppelte Säulenmaterial ermöglichte die rasche Reinigung des Enzyms. Die SDS-PAGE-Analyse der Eluatfraktionen (Abbildung 27) zeigt das Elutionsmuster eines typischen Chromatographielaufes. In diesem Falle wurden die Fraktionen 5 bis 11 vereinigt, durch Ultrafiltration konzentriert und gegen nativen Tris-Puffer dialysiert.



Die Qualität der Reinigung der Ektodomäne wurde mittels SDS-PAGE (Abbildung 28) und Western Blot (Abbildung 29) untersucht. In Bahn 2 (Abbildung 28) erscheint die gereinigte aktive MT1-MMP als Doppelbande. Beide Fragmente beginnen mit dem *wild-type* N-Terminus, was durch N-terminale Sequenzierung bewiesen wurde (4.3.1).



In Bahn 3 und 4 (Abbildung 28) sind Proben des Kulturüberstandes und des Durchlaufs der Affinitätschromatographie aufgetragen. Auch der Durchlauf enthielt noch erhebliche Mengen der Ektodomäne.

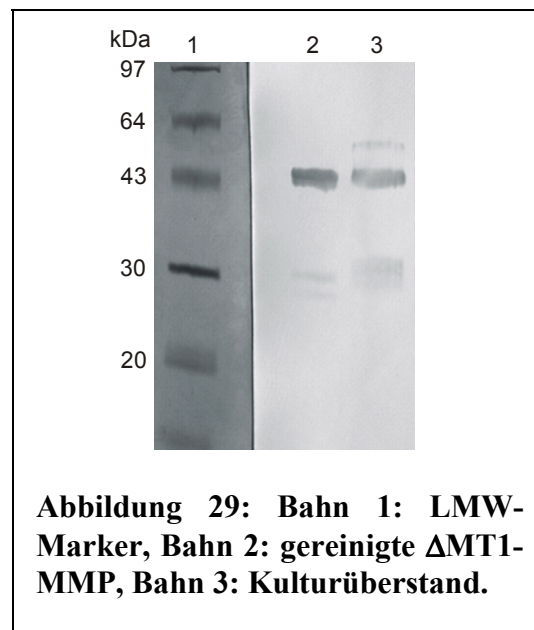
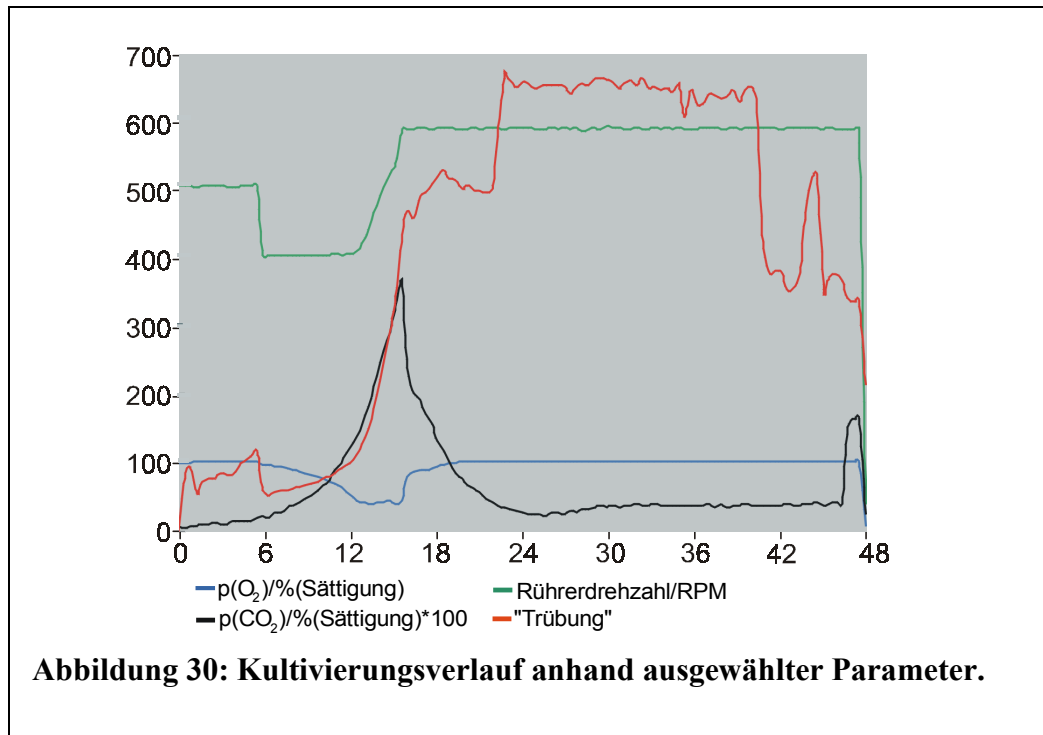


Abbildung 29 zeigt einen, die Aufreinigung dokumentierenden Western Blot, wobei in Bahn 2 eine Probe des gereinigten Enzyms und in Bahn 3 eine Probe des Kulturüberstandes am zweiten Tag der Induktionsphase aufgetragen ist. Der verwendete polyklonale Antikörper wurde in Kaninchen gegen die proMT1-MMP (Ala²¹-Ile³¹⁸) hergestellt (Lichte, 1997) und zeigte keinerlei Kreuzreaktivität gegen hefeeigene Enzyme (Ergebnisse hier nicht gezeigt). In der Probe des Kulturüberstandes ist auch die Bande des nicht aktivierten Enzyms (57,4 kDa) zu erkennen.

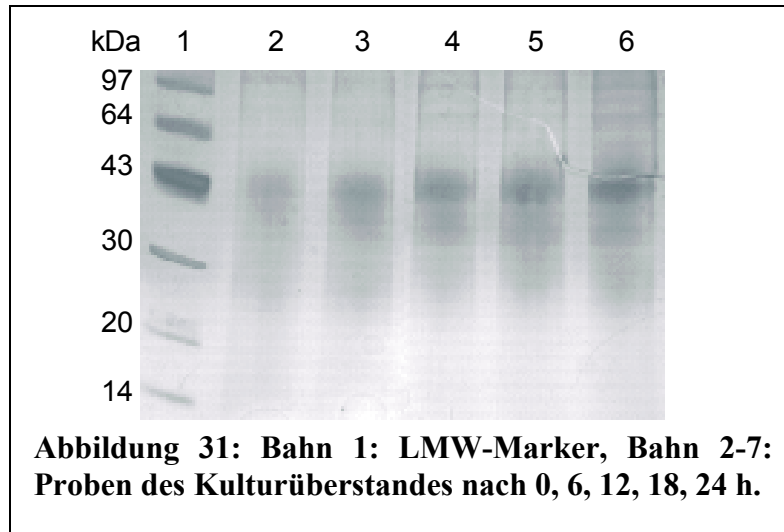
4.2.3 Kultivierungen im Bioreaktor (20 Liter Kulturvolumen)

Über den gesamten Verlauf der Fermentation wurden verschiedene Parameter des Kulturverlaufes *online* bestimmt. Abbildung 30 zeigt die wichtigsten variablen Größen im Verlauf der Kultivierung:



Über die Rührerdrehzahl (grün) wurde die Sauerstoffkonzentration (blau) geregelt. Sank die Sauerstoffkonzentration unter 40 % (100 % = Sättigung), erhöhte sich automatisch die Rührerdrehzahl. Die „Wachstumsphase“ war 16 Stunden nach dem Animpfen abgeschlossen (CO₂-Produktion sinkt). Bis zur 24sten Stunde verblieb die Kultur in einer *steady state*-Phase, worauf die Induktion der Expression durch Methanolzugabe gestartet wurde. Die „Trübung“ (rot) der Kultur ist ein Maß für die relative Zelldichte. Anhand dieser Parameter wurde der Kulturverlauf überwacht. Die Auswertung der Daten ermöglicht eine bessere Vorhersage für Wachstumszeit und Induktionszeit für spätere Fermentationen.

Im Abstand von 6 Stunden wurden nach Beginn der Induktionsphase automatisch Proben entnommen. Nach Abtrennung des Zellmaterials wurden die Proben mittels SDS-PAGE untersucht (Abbildung 31).



Der Gehalt an aktiver Δ MT1-MMP im Kulturmedium nimmt während der Expression kontinuierlich zu (Abbildung 31, 47.5 kDa-Bande). Während hier kaum Abbauprodukte sichtbar wurden, zeigte die SDS-PAGE-Expressionskontrolle der Schüttelkolbenkultur (Abbildung 26) neben der zeitlichen Zunahme der Δ MT1-MMP auch die Akkumulation an Proteolysefragmenten der Δ MT1-MMP.

Die *active site*-Titrationsanalyse der MT1-MMP-Konzentration im Kulturüberstand nach 24 h Expression ergab eine Konzentration von $3\mu\text{g/ml}$ und somit bei 20 L Kulturvolumen eine Gesamtausbeute von ~ 60 mg an aktivem Enzym.

Nach der Ultrafiltration und der damit verbundenen Dialyse war in den verbleibenden 1,6 L lediglich eine Konzentration von $4\mu\text{g/ml}$ und somit eine Ausbeute von 6,5 mg festzustellen.

4.3 Charakterisierung

4.3.1 Identifizierung des 47,5 kDa Expressionsproduktes durch N-terminale Sequenzierung

Eine Probe des gereinigten Enzyms wurde elektrophoretisch aufgetrennt und durch Elektroblothing auf eine PVDF-Membran übertragen. Die mit Coomassie angefärbten Banden wurden ausgeschnitten und die ersten 8 Aminosäuren durch automatisierten Edman-Abbau bestimmt.

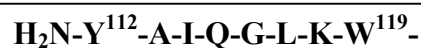
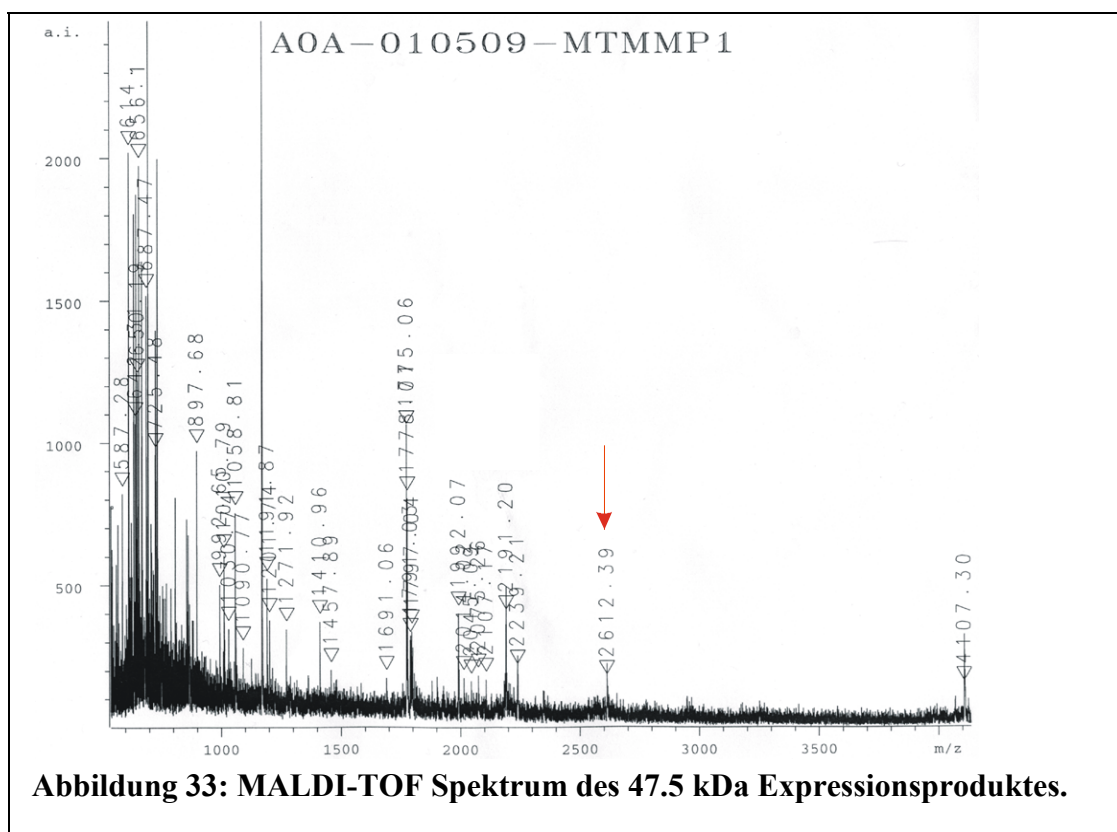


Abbildung 32: N-terminale Aminosäuresequenz des 47.5 kDa Expressionsproduktes.

Der Vergleich der gefundenen Sequenz mit der Sequenz der humanen MT1-MMP ergab 100% Übereinstimmung. Damit wurde das gereinigte Expressionsprodukt eindeutig als Ektodomäne der MT1-MMP mit „wild-type“ N-Terminus identifiziert.

4.3.2 Identifizierung des C-Terminus durch die MALDI-TOF Analyse

Zur Identifizierung des C-Terminus der rekombinant exprimierten Δ TM-MT1-MMP wurde eine Probe der gereinigten Ektodomäne mit einer modifizierten Trypsin-Variante (Promega, Mannheim) über Nacht bei 37°C hydrolysiert und die Probe anschließend zur Analyse eingesetzt.

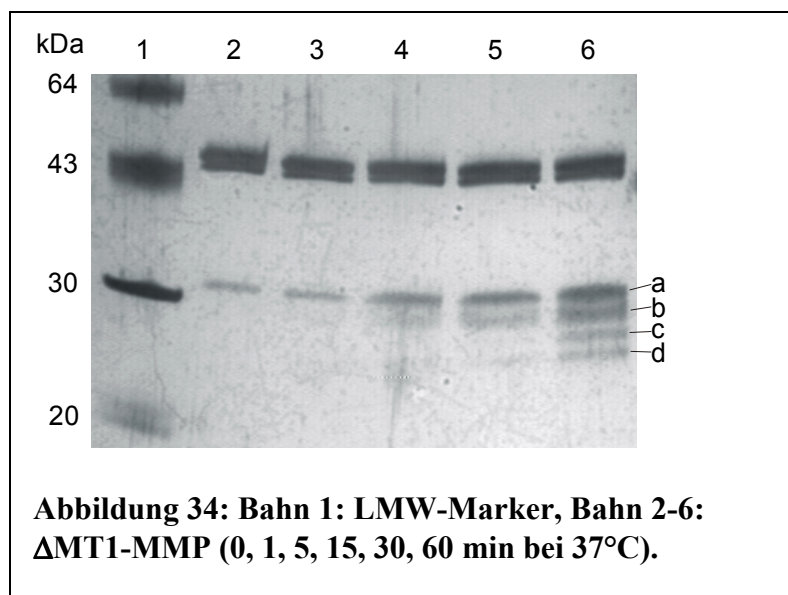


Das Spektrum enthielt eine Bande bei 2612,39 Da, die, unter Berücksichtigung einer Verschiebung des Spektrums um +0,065%, aufgrund der Masse eindeutig dem Fragment Ser⁵⁰⁰-Glu⁵²³ (Masse 2610,7 Da) zugeordnet werden konnte. Die Eichung des Massenspektrometers erfolgte vor der Messung mit Peptiden bekannter Masse. Da sich die „Flugdauer“ im elektrischen Feld proportional zur Masse der Teilchen verhält, läßt sich eine Eichgerade erstellen. Treten bei der Messung unbekannter Peptide dann geringe Abweichungen in der Beschleunigungsspannung oder der Desorptionsfähigkeit der Probe, bedingt durch deren Zusammensetzung auf, wird wie in diesem Falle eine leichte

Verschiebung des gesamten Spektrums beobachtet. Da die relative Abweichung für alle potentiell zu erwartenden Peptide gleich ist, kann die Eichgerade auf die aktuelle Messung hin korrigiert werden. Damit wurde bewiesen, daß die vollständige Ektodomäne Tyr¹¹²-Glu⁵²³ das primäre Produkt der vorangegangenen Expression war.

4.3.3 Untersuchung der autolytischen Fragmentierung

Nach der affinitätschromatographischen Reinigung lag das Enzym neben geringen Mengen an Autolysenprodukten in reiner Form vor. Um das autodegradative Verhalten näher zu charakterisieren, wurden Proben in "nativem Tris-Puffer" bei 37°C inkubiert und durch SDS-PAGE analysiert (Abbildung 34). Die neu entstandenen Fragmente konnten unter Verwendung des automatisierten Edman-Abbaus N-terminal sequenziert und somit das Fragmentierungsmuster identifiziert werden.

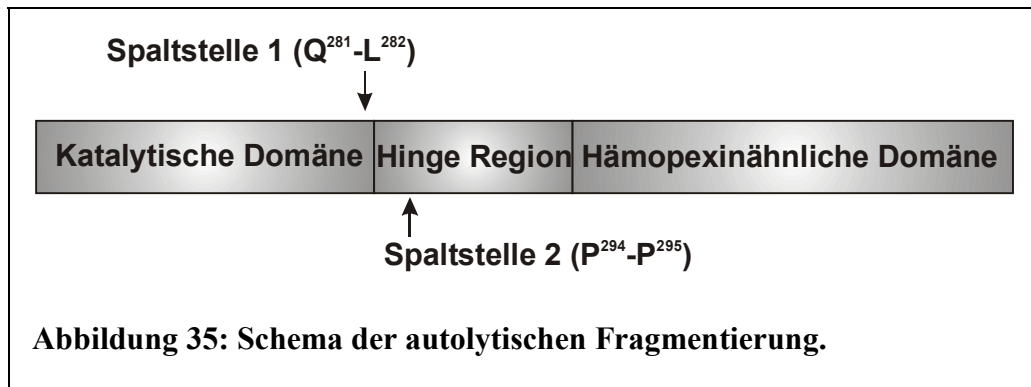


Folgende Tabelle faßt die Ergebnisse der N-terminalen Sequenzierungen zusammen:

Tabelle 3: Übersicht der identifizierten MT1-MMP Fragmente.

Bande	Molekulargewicht der analysierten Bande	N-terminale Aminosäuresequenz
a	~32 kDa	L ²⁸² -Y-G-L-Q-V-T-...
b	~29 kDa	P ²⁹⁵ -P-P-R-T-T-...
c	~27 kDa	Y ¹¹² -A-I-Q-G-L-...
d	~25 kDa	Y ¹¹² -A-I-Q-G-L-K-W-Q-...

Aus den Sequenzierungsdaten ergibt sich schematisch folgendes Fragmentierungsmuster:



Die autolytische Aktivität scheint also sehr spezifisch gegen exponierte Bereiche des Übergangs zwischen katalytischer Domäne und Hinge-Region gerichtet zu sein. Sehr auffällig ist die Prozessierung zwischen Pro²⁹⁴ und Pro²⁹⁵.

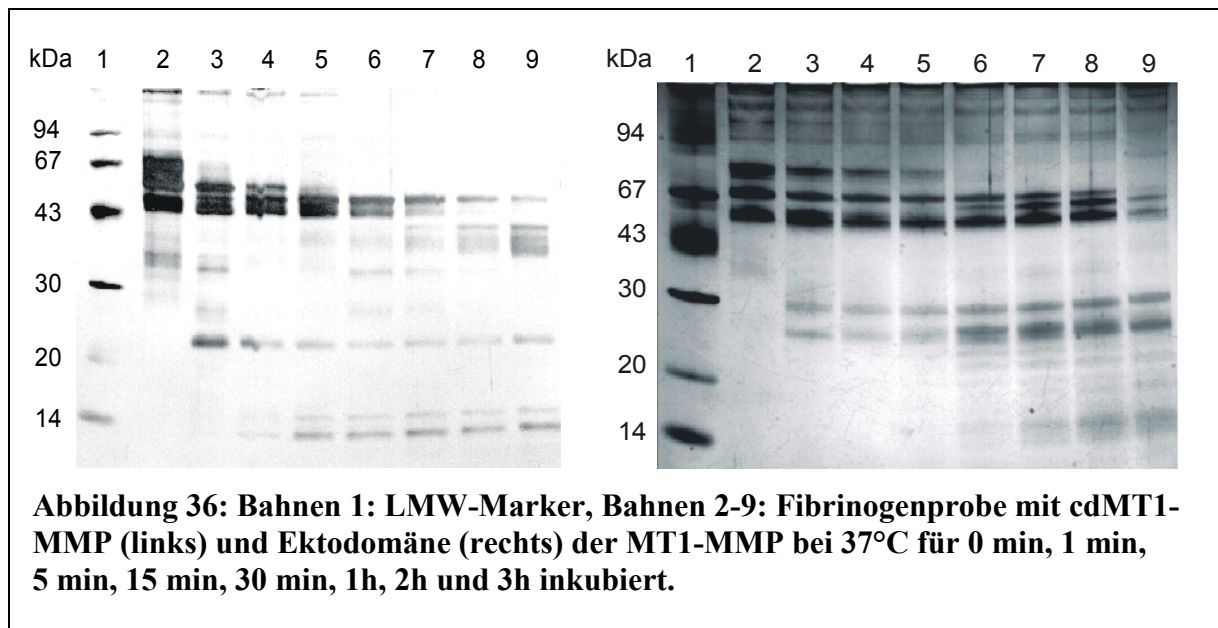
4.3.4 Vergleich der Substratspezifität katalytische Domäne – Ektodomäne

Um die Substratspezifität der katalytischen Domäne mit der der Ektodomäne zu vergleichen, wurden verschiedene Substrate abgebaut und die Fragmentierungsmuster durch Auftrennung mit SDS-PAGE verglichen. Die entstehenden Fragmente wurden zum Teil durch N-terminale Sequenzierung charakterisiert und somit Schnittstellen identifiziert.

4.3.4.1 Proteolytischer Abbau von Fibrinogen

Der Einfluß von MMPs (und speziell der MT1-MMP) auf die Blutgerinnungskaskade ist Gegenstand aktueller Forschung (Tschesche et al., 2000; Hiller et al., 2000). Da bisher nur die katalytische Domäne der MT1-MMP für die *in vitro*-Proteolyse von Fibrinogen untersucht wurde, sollte mit dieser Arbeit ein möglicher Unterschied zum proteolytischen Verhalten des Gesamtzyms analysiert werden.

Die folgende Abbildung zeigt das Fragmentierungsmuster von Fibrinogen durch proteolytischen Abbau mit der katalytischen Domäne (links; Hiller et al., 2000) und mit der Ektodomäne der MT1-MMP (rechts) in einer SDS-PAGE Analyse.



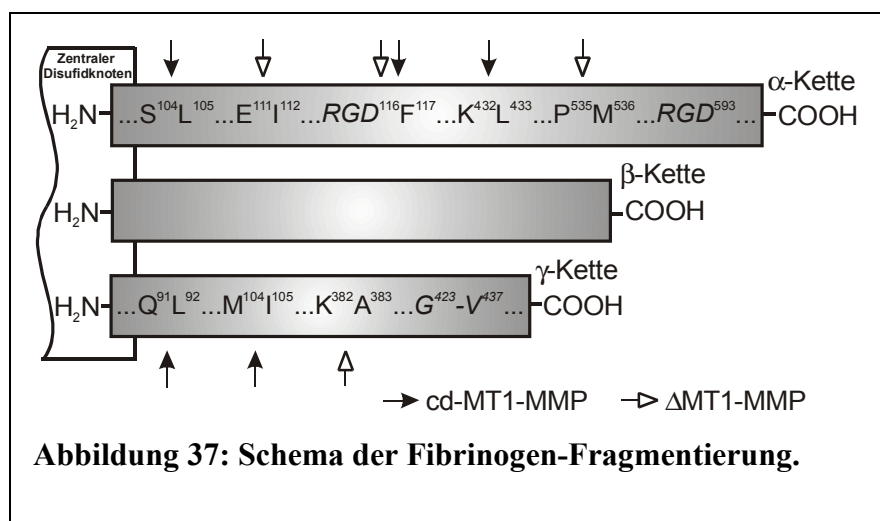
Unter den reduzierenden Bedingungen, bedingt durch die Probenvorbereitung, ist die Zusammensetzung des Fibrinogens aus drei verschiedenen Untereinheiten mit Molekulargewichten von 67 kDa (α -Kette), 56 kDa (β -Kette) und 47 kDa (γ -Kette) deutlich erkennbar (Bahnen 2).

Die entstandenen Fragmente wurden mittels Elektroblothing auf eine PVDF-Membran transferiert und N-terminal durch Edman-Abbau sequenziert. Folgende Tabelle gibt die durch N-terminale Sequenzierung identifizierten Fragmente der Spaltung von Fibrinogen durch die Ektodomäne der MT1-MMP wieder:

Tabelle 4: Übersicht der identifizierten Fibrinogen-Fragmente.

Molekulargewicht der analysierten Bande	N-terminale Aminosäuresequenz	Untereinheit
~36 kDa	A ²⁰ -D-S-G-E-G-D-F-...	α -Kette
~30 kDa	A ²⁰ -D-S-G-E-G-D-F-...	α -Kette
~28 kDa	A ²⁰ -D-S-G-E-G-D-F-...	α -Kette
~21 kDa	I ¹¹² -L-R-G-D-F-...	α -Kette
~18 kDa	F ¹¹⁷ -S-T-A-N-N-R-D-...	α -Kette
~16 kDa	A ³⁸³ -S-T-P-N-G-Y-D-...	γ -Kette
~15 kDa	A ²⁰ -D-S-G-E-G-D-F-...	α -Kette
~13 kDa	M ⁵³⁶ -L-G-E-F-V-S-E-...	α -Kette

Durch den proteolytischen Abbau von Fibrinogen durch die Ektodomäne der MT1-MMP und anschließende Analyse der Fragmente konnten drei Spaltstellen in der α -Kette und eine in der γ -Kette von Fibrinogen ermittelt werden. Die Spaltstelle D¹¹⁶-F¹¹⁷ in der α -Kette findet sich auch bei Prozessierung des Fibrinogens durch die katalytische Domäne der MT1-MMP, wobei das dabei entstandene Fragment nur eine Größe von 6 kDa aufweist (Hiller et al., 2000). Die anderen drei in der α - und in der γ -Kette bestimmten Schnittstellen wurden bei der homolog durchgeführten Spaltung nicht ermittelt. Die analysierten Fragmente der Größen 36, 30, 28 und 15 kDa zeigten 100%ige Übereinstimmung mit dem N-Terminus des unprozessierten Fibrinogens.

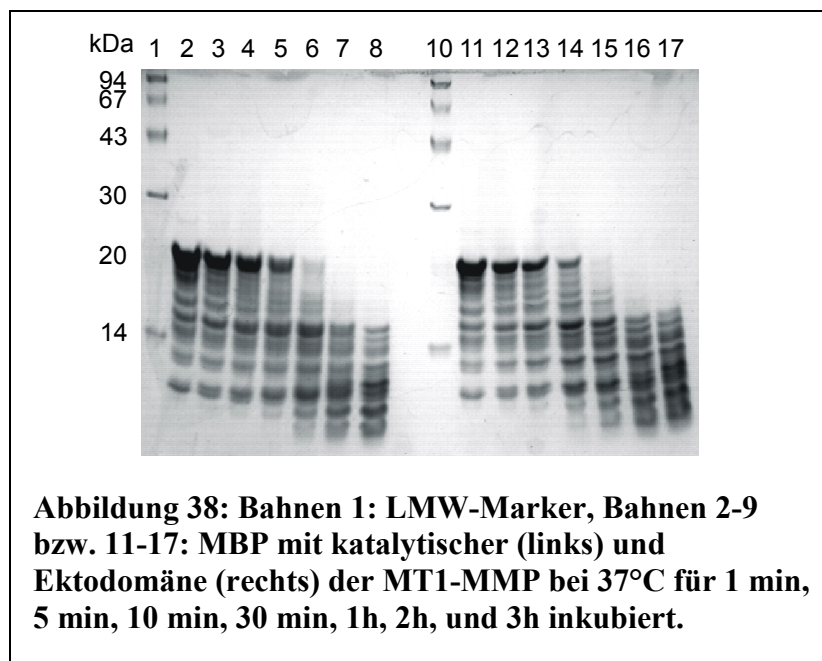


Hiermit konnte gezeigt werden, daß die Ektodomäne der MT1-MMP (Tyr¹¹²-Glu⁵²³) hinsichtlich der proteolytischen Degradation von Fibrinogen *in vitro* teilweise eine andere Spezifität als die katalytische Domäne (Tyr¹¹²-Ile³¹⁸) aufweist.

4.3.4.2 Proteolytischer Abbau des *myelin basic protein*

In bisher nicht veröffentlichten Vorarbeiten konnte Dr. M. Farr die proteolytische Aktivität der katalytischen Domäne der MT1-MMP gegenüber dem *myelin basic protein* zeigen, wobei keine Identifizierung der Fragmente vorgenommen wurde. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die proteolytischen Spezifitäten von katalytischer Domäne und Ektodomäne der MT1-MMP gegenüber dem *myelin basic protein* verglichen werden.

Zu diesem Zweck wurden die Fragmentierungsmuster mittels SDS-PAGE analysiert und in Abbildung 38 gegenübergestellt:



Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Fibrinogenspaltung sind hier die Fragmentierungsmuster des proteolytischen Abbaus durch beide MT1-MMP Formen gleich. Direkt nach Zugabe des Enzyms zur Substratlösung tritt eine Vielzahl von Fragmenten auf (Bahnen 2 und 11), während in der Kontrollinkubation des MBP bei 37°C keine Spaltprodukte zu ermitteln sind (hier nicht gezeigt). Die N-terminalen Sequenzen der entstandenen Fragmente konnten bisher nur zum Teil aufgeklärt werden, so daß der endgültige Beweis für die Übereinstimmung aller Spaltstellen noch aussteht.

Von folgenden zwei Fragmenten der Hydrolyse durch die Ektodomäne konnten die N-Termini durch automatisierten Edman-Abbau bestimmt und somit die entsprechenden Spaltestellen ermittelt werden:

Tabelle 5: Übersicht über die identifizierten MBP-Fragmente.

Molekulargewicht der analysierten Bande	N-terminale Aminosäuresequenz
6 kDa	L ¹¹⁰ -S-L-S-X-F-...
4 kDa	X ²⁶ -H-G-F-L-X-X-H-...

Der Abbau des *myelin basic protein* konnte eindeutig belegt werden, wobei das identische Fragmentierungsmuster homologe Spezifitäten der katalytischen Domäne und der Ektodomäne der MT1-MMP gegenüber dem *in vitro*-Abbau des MBP nahelegt.

Der Beweis hierfür muß durch die eindeutige Identifizierung der N-Termini aller entstandenen Fragmente noch erbracht werden.

4.3.4.3 Spaltung von Substanz P

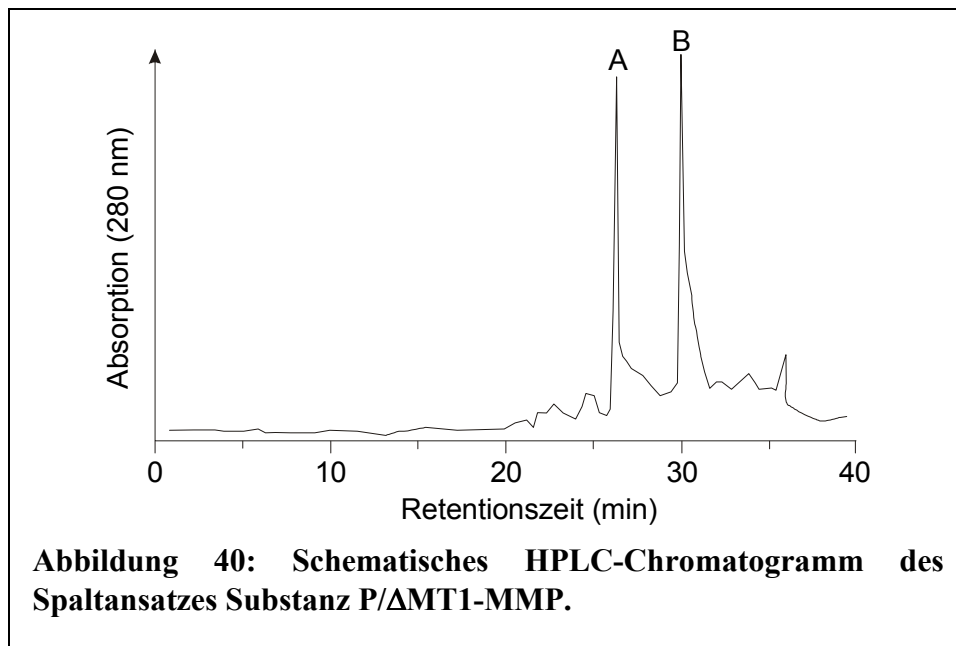
Zum Vergleich der Substratspezifitäten der katalytischen Domäne und der Ektodomäne der MT1-MMP gegenüber relativ kurzen Peptiden wurde die proteolytische Prozessierung der Substanz P herangezogen.

Substanz P ist ein aus 11 Aminosäuren bestehendes Peptid, welches in den Zellkörpern der Ganglienzellen der Hinterwurzel des Rückenmarks synthetisiert wird und als körpereigener Überträgerstoff (Neurotransmitter) wirkt. Die Substanz P vermittelt unter anderem die Weiterleitung eines Schmerzsignals von peripheren Nerven auf Nervenzellen des Rückenmarks und besitzt außerdem eine Vielzahl von Funktionen einschließlich der Erregung glatter Muskelzellen, der Reduktion des Blutdrucks und der Stimulation sekretorischer Gewebe (Ferrante & VadeBoncouer, 1993).

Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met

Abbildung 39: Aminosäuresequenz der Substanz P.

Für die Katabolisierung der Substanz P durch die Ektodomäne der MT1-MMP wurden entsprechend gleiche Bedingungen zu der bereits beschriebenen Spaltung durch die katalytische Domäne eingehalten (Lichte, 1997). Der Reaktionsansatz wurde unter Verwendung einer C₁₈-RP-HPLC-Säule in die Bestandteile aufgetrennt, wobei folgendes Chromatogramm erhalten wurde:



Das Eluat wurde fraktioniert gesammelt und die Fraktionen der beiden Peaks mit den Retentionszeiten 26,8 min (A) und 30,0 min (B) lyophilisiert und durch automatisierten Edman-Abbau analysiert. Tabelle 6 zeigt die N-Termini der gefundenen Fragmente:

Tabelle 6: Übersicht über die identifizierten Fragmente der Substanz P.

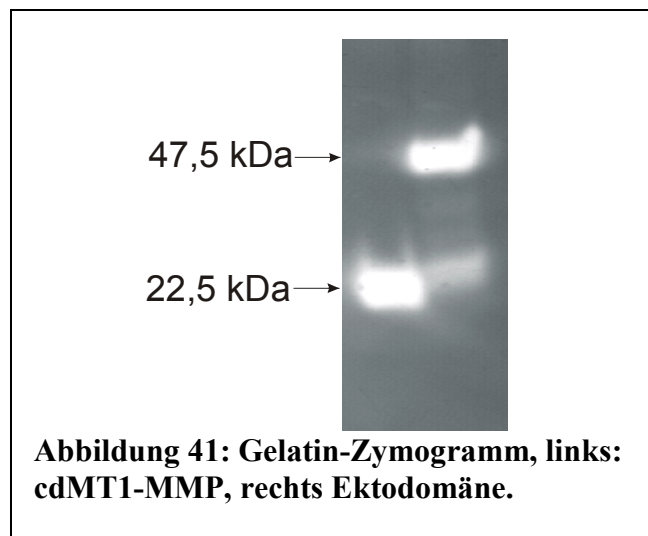
Fraktion	N-Terminus
A	Q ⁵ -Q-F-F-G-L-M
B	R ¹ -X-X-X-X-X...

Während in Fraktion B nur die erste Aminosäure des Peptids sicher identifiziert werden konnte, wurde das Peptid der Fraktion A als C-terminales Heptapeptid der Substanz P bestimmt. Bei dem Peptid der Fraktion B muß es sich um das Edukt handeln, da Arg¹ das einzige Arginin der Sequenz darstellt, während mit dem in Fraktion A identifizierten Fragment eindeutig ein Spaltprodukt der Substanz P gefunden wurde. Die Spaltstelle Pro⁴-Gln⁵ stimmt mit der von der katalytischen Domäne erkannten Spaltstelle überein, womit eindeutig die gleiche Spezifität der beiden MT1-MMP Varianten bei dem *in vitro*-Abbau von Substanz P nachgewiesen wurde.

4.3.4.4 Abbau von Gelatin, β -Casein und den Kollagenen I, III, VI und VII im Zymogramm

Der Abbau von Gelatin, β -Casein und den Kollagenen I, III, VI und VII durch die beiden Varianten der MT1-MMP wurde in Substratgelen untersucht. Dazu wurden die entsprechenden Substrate in einer Konzentration von 1 mg/ml in das Acrylamidgel einpolymerisiert und äquivalente Mengen der beiden Enzymformen per SDS-PAGE im Gel aufgetrennt. Die Enzyme konnten die in das Gel einpolymerisierten Substratmoleküle während einer 24-stündigen Inkubation in nativem TRIS-Puffer bei 37°C proteolytisch abbauen. Die Enzym-haltigen Bereiche des Gels zeichnen sich nach einer anschließenden Coomassie-Färbung durch helle Bereiche aus. Das Maß der Entfärbung gibt Aufschluß über die enzymatische Aktivität in diesem Bereich.

Im folgenden Gelatin-Substratgel werden die Aktivitäten der Katalytischen Domäne und der Ektodomäne der MT1-MMP gegenübergestellt:



Es wurden je 5 pmol der katalytischen Domäne (links) und der Ektodomäne (rechts) auf das Gel aufgetragen. Die „Intensität“ der Haupt-Banden ist nahezu gleich, was auf eine nahezu gleiche Aktivität der verwendeten Enzymformen hindeutet. Der quantitative Vergleich der beiden Formen hinsichtlich der Degradation von Gelatin wurde in einem anderen Assay erbracht (4.3.5.2).

Unterhalb der 47,5 kDa-Bande der Ektodomäne in Abbildung 41 ist im Bereich der Masse der katalytischen Domäne der Abbau des Substrates erkennbar. Diese Tatsache und der Umstand, daß selbst in frisch aufgearbeiteten Enzymproben der Ektodomäne bereits Abbauprodukte

auftauchen, läßt darauf schließen, daß mindestens ein Abbauprodukt proteolytische Aktivität besitzt und daher einen proteolytisch aktiven Teil der katalytischen Domäne enthalten muß. Bei allen in Zymogrammen untersuchten Substraten wurde nahezu gleiche Aktivität der beiden Formen der MT1-MMP beobachtet (Daten ähnlich Abbildung 41; hier nicht gezeigt).

4.3.5 Vergleich der kinetischen Parameter katalytische Domäne-Ektodomäne

Die kinetischen Parameter der katalytischen Domäne und der Ektodomäne wurden durch fluoreszenzkinetische Messungen unter Verwendung des fluorogenen MMP-Substrates MCA-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Darg-NH₂ und Abbau von Gelatin und anschließende Fluoreszenzmarkierung der entstandenen N-Termini bestimmt. Die Auswertung der Daten erfolgte unter Einsatz der Lineweaver-Burk-Methode, wobei die k_{cat}/K_M -Werte der verschiedenen MT1-MMP-Formen bestimmt wurden.

4.3.5.1 Fluoreszenzkinetische Messung mit dem MCA-Peptid

Das fluorogene Peptid MCA-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂ wird von MMPs spezifisch zwischen der Gly-Leu-Bindung gespalten und ermöglicht daher eine unkomplizierte kinetische Messung. Für den Vergleich der kinetischen Parameter (k_{cat}/K_m) der katalytischen Domäne und der Ektodomäne hinsichtlich des synthetischen Substrates wurden die Anfangsgeschwindigkeiten (v) der Substratspaltung in nativem Tris-Puffer bei 25°C und verschiedenen Substratkonzentrationen ermittelt. Die Bestimmung wurde durch die doppeltreziproke Auftragung von $1/v$ gegen $1/[S]$ im Diagramm nach Lineweaver-Burk vorgenommen. Die Ergebnisse dieser Messungen zeigten nahezu die doppelte Aktivität der katalytischen Domäne mit $1,38 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ gegenüber der Ektodomäne mit $0,72 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ in Bezug auf das synthetische Substrat.

Damit wurde einerseits der sehr hohe Grenzwert k_{cat}/K_M -Wert (cdMT1-MMP) früherer Messungen ($8,27 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; Lichte, 1997), der in den Bereich diffusionskontrollierter Enzyme hereinreicht, revidiert. Andererseits zeigen die Messungen den deutlichen Unterschied der beiden Varianten bezüglich der Umsatzgeschwindigkeit relativ kleiner Substratmoleküle.

Die enzymatische Spaltung des Murphy-Substrates wurde auch mit dem Gesamtzym auf lebenden Zellen untersucht. Dazu wurde eine von C. Mauch zur Verfügung gestellte, stabil transfizierte HEK 293 Zelllinie verwendet. Nach Bestimmung der Zahl von aktiven MT1-MMP-Molekülen pro Zelle ($6,3 \cdot 10^5$ MT1-MMP/Zelle) durch *active site*-Titration erfolgte die Messung durch Überschichten der adhärenen Zellen mit substrathaltigem nativen TRIS-Puffer verschiedener Konzentrationen im Bereich von 5-15 mM MCA-Peptid. Diese Messungen ergaben einen $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert von $2,9 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für die Aktivität der MT1-MMP auf der Zelloberfläche.

Mit diesen Messungen konnte eine kinetische Konstante für das Gesamtzym in seiner "nativen Umgebung" (auf der Zellmembran) ermittelt werden. Die vorher für die Fragmente bestimmten Konstanten sind nur unter Vorbehalt mit dem $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert für das Gesamtzym auf menschlichen Zellen zu vergleichen, da Unterschiede im Meßprotokoll aufgrund der Sensibilität der Zellen nicht zu umgehen waren.

Folgende Tabelle faßt die ermittelten kinetischen Parameter für die katalytische Domäne, die Ektodomäne und das Gesamtzym der MT1-MMP zusammen:

Tabelle 7: Kinetische Parameter der MT1-MMP Varianten.

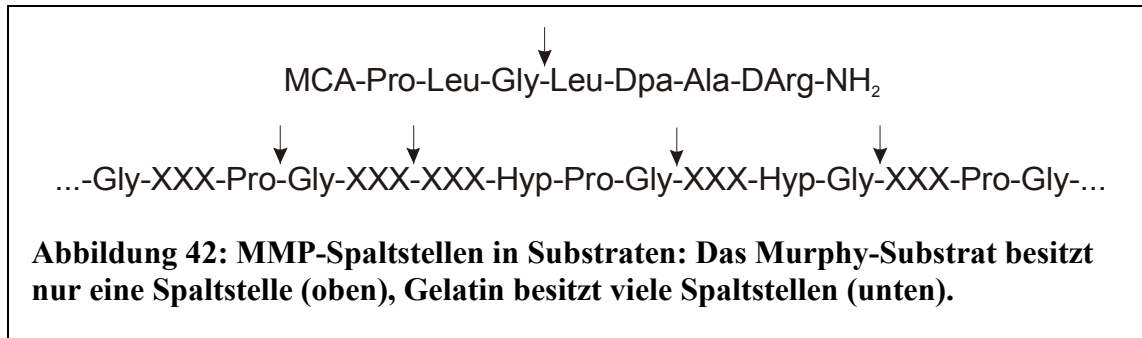
kinetische Größe	katalytische Domäne	Ektodomäne	Gesamtzym (auf Zelle)
k_{cat}	$7,27 \cdot 10^{-1} \text{ s}^{-1}$	$6,59 \cdot 10^{-1} \text{ s}^{-1}$	$4,80 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
K_{M}	5.27 μM	9.12 μM	1.65 μM
$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$	$138 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$72,2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$2,91 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

4.3.5.2 Fluoreszenzkinetische Messungen mit Gelatin als Substrat

Für den Abbau eines natürlichen Substrates ist die Angabe kinetischer Daten aus verschiedenen Gründen erschwert. Bei der Verwendung synthetischer, fluorogener Oligipeptide entspricht die Zahl der für das Enzym verfügbaren Spaltstellen im allgemeinen der Zahl der Substratmoleküle in Lösung, was bei natürlichen Substraten häufig nicht der Fall ist. Außerdem ist die Ermittlung der pro Zeiteinheit hydrolysiertes Peptidbindungen nicht direkt zu messen, wie es bei Verwendung fluorogener Peptide der Fall ist.

Um trotzdem eine Aussage über das kinetische Verhalten der katalytischen Domäne und der Ektodomäne gegenüber einem hochmolekularem Substrat machen zu können, wurden Gelatinproben verschiedener Konzentration hydrolysiert. Dabei nimmt die Zahl der N-Termini durch die Entstehung kleinerer Fragmente zu. Die N-Termini können mit

Fluorescamin, einem fluorogenem Farbstoff, gekoppelt und damit quantifiziert werden. Durch diesen Assay ist die Bestimmung der Bildung von gespaltenem Substrat pro Zeiteinheit, nicht aber eine Aussage über die vorhandenen potentiellen Spaltstellen, möglich.



Um einen relativen Vergleich der beiden $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werte zu ermöglichen, wurde nicht die Zahl potentieller Spaltstellen, sondern die Zahl der Gelatinmoleküle als Substratkonzentration angenommen. Als "relative" $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werte ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}^{\text{rel}}$) wurden auf diese Weise für die katalytische Domäne $40,4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und für die Ektodomäne der MT1-MMP $43,1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ermittelt. Gegenüber hochmolekularen Substraten wie Gelatin wurde also nahezu die gleiche Aktivität ermittelt.

4.3.6 Inhibierung der MT1-MMP-Varianten durch natürliche und synthetische Inhibitoren

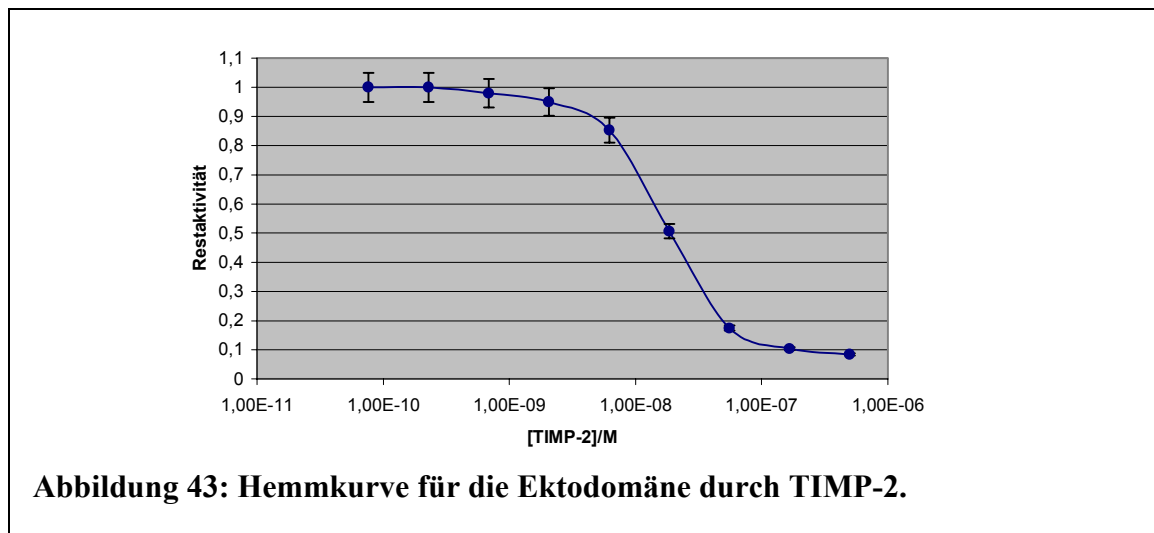
Sowohl die inhibitorische Domäne des humanen TIMP-4 (idTIMP-4) als auch boviner TIMP-2 wurden in Zusammenarbeit mit Dr. B. Stratmann hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkung auf die Ektodomäne der MT1-MMP untersucht. In Zusammenarbeit mit Dr. J. Schröder wurden die Hemmeigenschaften einer neuen Klasse von Thiadiazin-Derivaten gegen MMPs getestet. In allen Hemmstudien wurden die katalytische Domäne und die Ektodomäne parallel getestet.

4.3.6.1 Hemmung durch TIMPs

Kinetische Analysen erlauben genaue Aussagen über die Komplexbildung zwischen TIMPs und Matrixinen. Es wurden sowohl die Katalytische Domäne als auch die Ektodomäne mit verschiedenen Konzentrationen an TIMP-2 und idTIMP-4 inkubiert und die Restaktivität mittels Fluoreszenzkinetik-Analyse bestimmt. Aus den gemessenen IC_{50} -Werten konnten durch folgende Formel die K_i -Werte berechnet werden:

$$K_i = \frac{(IC_{50} - \frac{[E]}{2})}{(1 + \frac{[S]}{K_M})}$$

Die Enzymkonzentrationen ($[E_t]$) konnten durch *active site*-Titration mit Batimastat (*British Biotech, Oxford*) ermittelt werden. Abbildung 43 zeigt die Hemmkurve für die Ektodomäne durch TIMP-2:



Zusammenfassend sind alle ermittelten Hemmparameter in Tabelle 8 dargestellt:

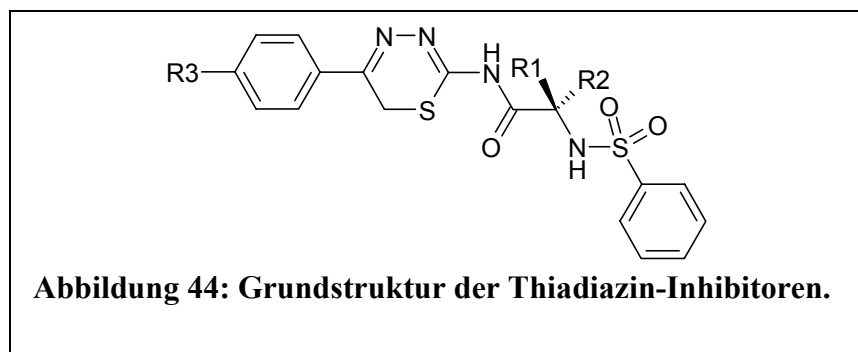
Tabelle 8: Übersicht über die bestimmten Hemmparameter.

	[E]/nM	[S]/ μ M	K_M -Wert/ μ M	TIMP-2		idTIMP4	
				IC_{50} /nM	K_i /nM	IC_{50} /nM	K_i /nM
katalytische D.	1.2	4	5.3	30,4	17,0	19.7	10.9
Ektodomäne	3.4	4	9.1	19,2	12,16	35.2	23.2

Beide Formen der MT1-MMP werden im nanomolaren Bereich durch TIMP-2 und die inhibitorische Domäne des TIMP-4 gehemmt. Während TIMP-2 die Ektodomäne stärker als die katalytische Domäne hemmt, wurde für die Hemmung durch idTIMP-4 eine effektivere Hemmung der katalytischen Domäne gefunden.

4.3.6.2 Hemmung durch synthetische Inhibitoren

Auf der Basis der in Abbildung 44 gezeigten Grundstruktur eines Thiadiazins synthetisierte Dr. J. Schröder ca. 40 Derivate, deren inhibitorische Wirkung gegenüber acht verschiedenen MMPs getestet wurde (Schröder et al., 2001):



Die meisten Inhibitoren zeigten gegen die getesteten MMPs K_i -Werte im „nanomolaren Bereich“ (100-800 nM). Im allgemeinen wurden die katalytische und die Ektodomäne der MT1-MMP gleich stark von den Vertretern dieser Substanzklasse gehemmt. Eine Ausnahme ist die Verbindung (2R)-N-[5-(4-Chlorphenyl)-6H-1,3,4-thiadiazin-2-yl]-2-[(phenylsulfonyl)amino]propanamid (Tabelle 9: C). Der K_i -Wert dieser Substanz für die Hemmung der katalytischen Domäne wurde auf 50 nM bestimmt, während die Ektodomäne mit einem K_i -Wert von 210 nM um den Faktor vier schlechter inhibiert wurde. In Tabelle 9 sind die K_i -Werte von 9 Thiadiazin-Derivaten für beide MT1-MMP-Varianten dargestellt.

Tabelle 9: Übersicht über die ermittelten Hemmparameter.

	R ₁ , R ₂ , R ₃	K _i (katalytische Domäne)/ μ M	K _i (Ektodomäne)/ μ M
A	CH ₃ , H, F	0,39	0,33
B	H, CH ₃ , Cl	0,10	0,21
C	CH ₃ , H, Cl	0,05	0,21
D	CH ₃ , H, Br	0,20	0,18
E	H, CH ₃ , CN	0,24	0,40
F	CH ₃ , H, CN	0,24	0,40
G	CH ₃ , H, CH ₃	0,29	0,15
H	(CH ₃) ₂ CH, H, Cl	0,59	0,33
I	CH ₃ , CH ₃ , Cl	0,15	0,11

Interessant sind in diesem Zusammenhang vor allem die Unterschiede in der Hemmbarkeit der MMPs untereinander. Mit dem zunehmenden Wissen über die Funktion und Regulation der einzelnen Matrixine wurde deutlich, daß pharmazeutisch einsetzbare Inhibitoren keine Breitbandwirkung haben dürfen, sondern spezifisch gegen einzelne MMPs einsetzbar sein müssen. Ein wichtiger Vertreter dieser Stoffklasse ist z.B. (2R)-N-[5-(4-Chlorphenyl)-6H-1,3,4-thiadiazin-2-yl]-3-methyl-2-[(phenylsulfonyl)amino]butanamid (Tabelle 9: H). Durch diese Verbindung werden MMP-1, MMP-2, MMP-12 und die MT1-MMP im Bereich K_i = 300 bis 800 nM gehemmt, während MMP-9 und MMP-13 keine Hemmwirkung im gewählten Konzentrationsbereich zeigten (K_i >15 μ M); (Schröder et al., 2001).

4.3.7 Regulation der Aktivität über die Calcium-Konzentration

Der Einbau von Calcium-Ionen in die Proteinstruktur von MMPs ist für die Stabilisierung der Konformation essentiell. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die MT1-MMP (sowohl die katalytische Domäne als auch die Ektodomäne) reversibel zwischen völliger Inaktivität und Aktivität durch Variation der Calcium-Konzentration „geschaltet“ werden kann. Die Aktivität des Gesamtzyms (auf HEK-293 Zellen) war ebenfalls, jedoch in geringerem Ausmaß als die der löslichen Varianten, von der Variation der Calcium-Konzentration abhängig.

4.3.7.1 Abhängigkeit der proteolytischen Aktivität von der Calcium-Konzentration

Die Aktivitäten der katalytischen Domäne und der Ektodomäne wurden in Tris-gepufferten Lösungen mit Calcium-Konzentrationen zwischen 0 und 100 mM durch den proteolytischen Abbau eines fluorogenen Substrates bestimmt. Die Aktivität des Gesamtzyms auf adhärennten HEK-293 Zellen konnte in einem Konzentrationsbereich von 1 μM – 100 mM Calcium in nativem Tris-Puffer gemessen werden. Es erfolgten keine Messungen bei niedrigeren Konzentrationen, da bei Ca^{2+} -Konzentrationen von $<1\mu\text{M}$ eine Ablösung der Zellen von der Oberfläche zu beobachten war. In folgendem Diagramm sind die Aktivitäten der drei MT1-MMP-Formen gegen die Calcium-Konzentration aufgetragen.

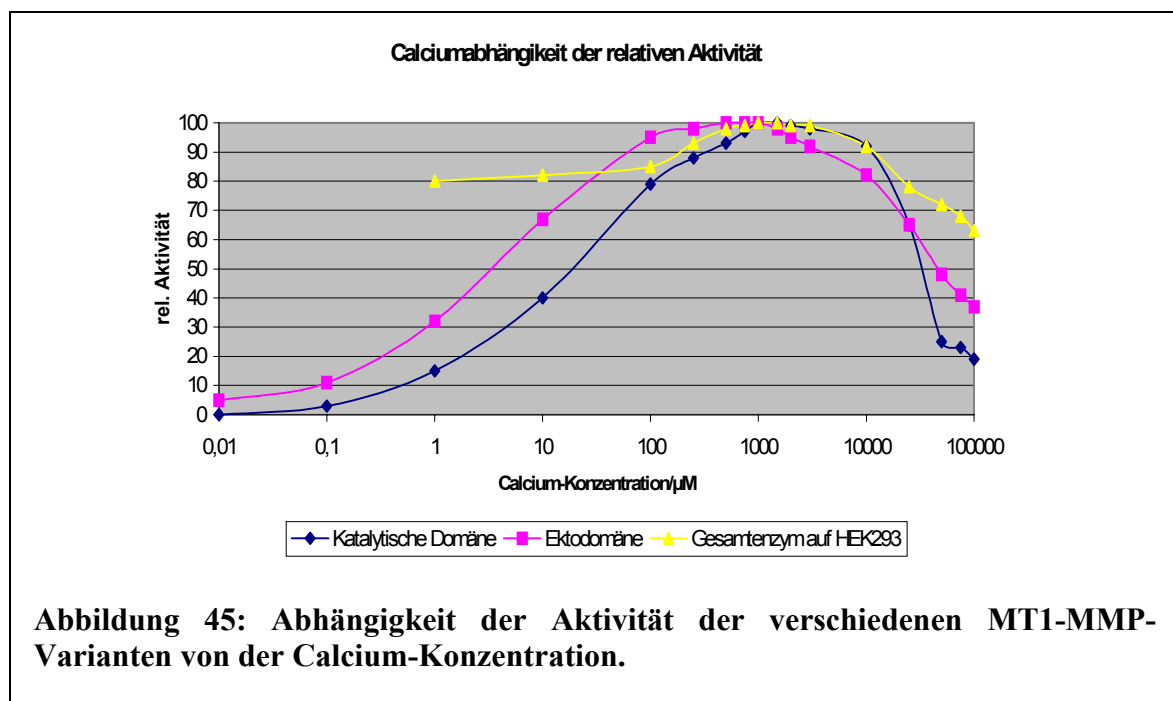


Abbildung 45 zeigt, daß die katalytische Domäne und das Gesamtzym ein Maximum ihrer proteolytischen Aktivität bei 1-2 mM Ca^{2+} aufweisen. Das Aktivitätsmaximum der Ektodomäne ist mit 0,5-1 mM geringfügig zu niedrigeren Konzentrationen hin verschoben. Während die katalytische Domäne bei sehr geringen Ca^{2+} -Konzentrationen (10 nM) völlig inaktiviert ist, geht die Aktivität der Ektodomäne nicht auf Null zurück. Ein vergleichbares Verhalten zeigte sich auch bei sehr hohen Calcium-Konzentrationen. Bei einer Calcium-Konzentration von 100 mM geht die relative Aktivität der katalytischen Domäne auf Werte unter 20% zurück, während die Ektodomäne eine relative Aktivität von knapp 40% behält. Die Aktivität des Gesamtzyms auf HEK293-Zellen wird von der Calcium-Konzentration weniger stark beeinflusst. Die Verringerung der Konzentration auf 1 μM Ca^{2+} in Lösung läßt

die Aktivität auf 80% des Maximalwertes zurückgehen, während bei der Erhöhung auf 100 mM ein Rückgang der relativen Aktivität des Gesamtzyms auf 63% gemessen wurde.

4.3.7.2 Reversible Aktivierung und Deaktivierung der MT1-MMP

Eine Probe der katalytischen Domäne der MT1-MMP wurde abwechselnd für drei Stunden bei 4°C gegen Calcium-freien Tris-Puffer und einen Tris-Puffer mit einer Calcium-Konzentration von 1 mM dialysiert. Die Aktivität der Probe wurde nach jeder Dialyse durch fluoreszenzkinetische Analyse ermittelt und in Abbildung 46 gegen die Calcium-Konzentration in einem Balkendiagramm aufgetragen.

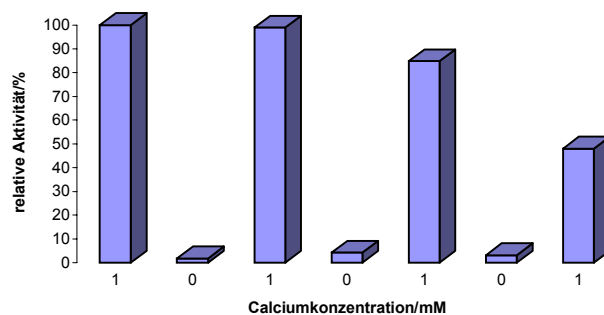


Abbildung 46: Reversible Aktivierung und Deaktivierung der MT1-MMP durch Dialyse.

Es konnte gezeigt werden, daß der Entzug von Calcium durch Dialyse eine nahezu vollständige Deaktivierung des Enzyms bewirkte, wobei die Aktivität durch eine zweite Dialyse gegen einen Calcium-haltigen Puffer fast vollständig wiederhergestellt werden konnte. Die Reversibilität der Aktivierung und Deaktivierung wurde hier nur für sieben Schritte gezeigt, da ein erheblicher Verlust an Enzym aufgrund von Autolyse, bedingt durch die langen Inkubationszeiten, unvermeidbar war (siehe Kapitel 4.3.3: Autolyse).

Um die langen Inkubationszeiten zu umgehen, wurde versucht, das Calcium durch Fällung als Oxalatsalz aus der Lösung zu entfernen. Dazu wurden entsprechend der Calcium-Konzentration äquivalente Mengen an Natriumoxalat zugegeben, der Niederschlag nach 5 Minuten Inkubation auf Eis durch Zentrifugation entfernt und die Restaktivität des Überstandes durch eine fluoreszenzkinetische Messung bestimmt. Nach der ersten Fällung

wurde tatsächlich ein Rückgang der Aktivität um 90 % beobachtet, jedoch konnte durch Zugabe von Calcium nur eine Reaktivierung von 40 % erreicht werden (Daten hier nicht gezeigt).

In einem weiteren Assay wurde versucht, das gelöste Calcium durch Citrat zu maskieren. Dazu wurden abwechselnd die Konzentrationen von Calcium und Citrat um 1 mM erhöht. In Abbildung 47 sind die gemessenen relativen Aktivitäten gegen die Konzentrationen an Calcium und Citrat in Lösung aufgetragen.

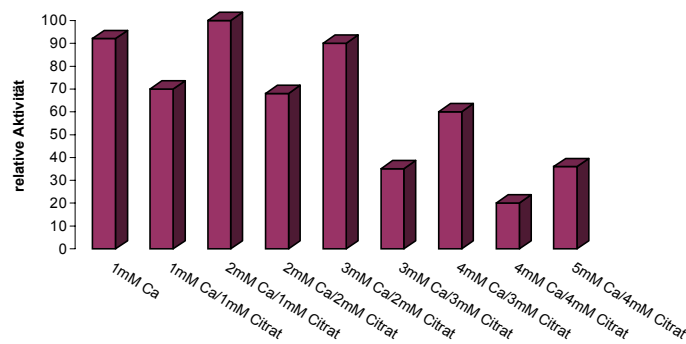


Abbildung 47: Reversible Aktivierung und Deaktivierung durch Citrat.

Es war möglich, die Aktivität des Enzyms durch die Maskierung des gelösten Calciums teilweise zu hemmen und reversibel durch Zugabe von Calcium wiederherzustellen. Dieser Effekt konnte reversibel bis zu acht Mal wiederholt werden.

Deutlicher konnte dieser Effekt durch die Verwendung von Doxycyclin gezeigt werden

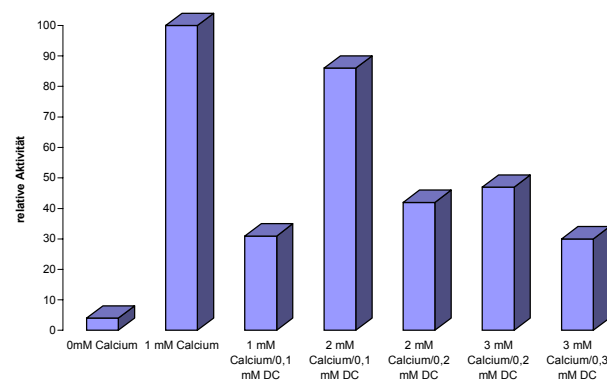


Abbildung 48: Reversible Aktivierung und Deaktivierung durch Doxycyclin.

(Abbildung 48). Dabei wurde abwechselnd die Konzentration von Calcium um 1 mM und die von Doxycyclin um 0,1 mM erhöht. Die Reversibilität konnte mit diesem Assay über vier Schritte gezeigt werden.

5 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Die Umstrukturierung von Geweben ist essentiell für physiologische Prozesse, wie z.B. das Wachstum (Shi et al., 1996) oder die Wundheilung (Parks et al., 1998) und unterliegt daher einer strengen Regulation (Vincenti, 2001). Viele pathologische Vorgänge, wie z.B. die rheumatoide Arthritis (Jackson et al., 2001), das Tumorwachstum (Luca et al., 1997) oder die Metastasierung (Miyamori et al., 2000) zeichnen sich durch eine Fehlregulation der Matrix Metalloproteinase-Aktivität aus und gehen mit exzessivem Abbau von Gewebe einher. Die membranständigen Matrix Metalloproteinasen scheinen unter anderem die Hauptmediatoren der Aktivierung anderer MMPs zu sein und stehen somit am Anfang proteolytischer Aktivierungskaskaden, die letztendlich das physiologische oder pathologische Bild der molekularen Vorgänge prägen (Woessner & Nagase, 2000).

In vorausgegangenen Arbeiten (Roderfeld, 1998) wurden verschiedene Varianten der Ektodomäne der MT1-MMP erfolgreich in *E. coli* kloniert, exprimiert und gereinigt. Es wurde jedoch kein korrekt gefaltetes Protein erhalten, so daß eine Charakterisierung nicht möglich war.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Klonierung und rekombinante Expression der Ektodomäne der membranständigen Matrix Metalloproteinase-1 (Ala²¹-Glu⁵²³) in *Pichia pastoris*. Anschließend sollte die *in vitro*-Charakterisierung der Δ MT1-MMP im Vergleich mit der cdMT1-MMP hinsichtlich Substratspezifität, Kinetik und Hemmung durch TIMPs und synthetische Inhibitoren erfolgen.

5.1 Klonierung

Zu Beginn dieser Arbeit stand das vollständige, für die *wild-type*-MT1-MMP codierende Gen (Lichte, 1997), welches ursprünglich durch Reverse Transkription aus einer Chondrosarcomzelllinie gewonnen wurde (Büttner et al., 1997), zur Verfügung. Die cDNA der MT1-MMP lag im pCRTMII-Vektor vor (Lichte, 1997) und wurde erfolgreich als Templat zur Amplifikation der für die Ektodomäne der MT1-MMP codierenden cDNA mittels PCR eingesetzt. Nach der erfolgreichen Subklonierung in *E. coli* konnte die cDNA der Ektodomäne in den für die Produktion in *P. pastoris* geeigneten Expressionsvektor pPICZ α A kloniert werden. Der Vektor pPICZ α bietet durch das Zeocin-Resistenz-Gen sowohl für die Subklonierung in *E. coli* als auch für die *P. pastoris* Transformanden eine effektive Selektionsmöglichkeit. Durch PCR konnte die erfolgreiche Transformation der *Pichia*

pastoris-Stämme GS115, KM71 und X-33 (Invitrogen, Groningen) mit dem Konstrukt pPICZ α A-(Ala²¹-Glu⁵²³)-MT1-MMP nachgewiesen werden.

5.2 Expression und Reinigung

5.2.1 Expression

Das *Pichia pastoris*-Expressionssystem wurde aus mehreren Gründen für die Produktion der Ektodomäne der MT1-MMP gewählt. Die relativ einfach zu kultivierenden eukaryontischen Zellen garantieren die korrekte Faltung des rekombinanten Proteins. Im Gegensatz zu der Produktion in *E. coli* werden dadurch die Kosten und die Zeit der *in vitro*-Proteinfaltung erspart. Durch Ausnutzung des α -Präpropeptids aus *S. cerevisiae* wurde das exprimierte Protein von den Zellen sekretiert. Die Ausschleusung des rekombinanten Enzyms in das Kulturmedium erleichterte die nachfolgende Aufarbeitung und Reinigung des Proteins.

Die Expression der Ektodomäne (Ala²¹-Glu⁵²³) wurde in allen transformierten Stämmen (X33, KM71 und GS115) nachgewiesen. Hierbei wurde schon deutlich, daß hauptsächlich aktivierte MT1-MMP (Tyr¹¹²-Glu⁵²³; Δ MT1-MMP) als 47,5 kDa Expressionsprodukt in das Medium sezerniert wird. Offensichtlich wird im Golgi-Apparat von *P. pastoris* nicht nur die 85 Aminosäuren lange *a*-Präprosequenz (Brake et al., 1984), sondern auch das Propeptid der MT1-MMP (Ala²¹-Arg¹¹¹) durch Subtilisin-ähnliche Proteasen der Proprotein-Convertase-Familie abgespalten (Yana & Weiss, 2000).

Durch *colony blot* und anschließende Expressionsanalysen wurde ein sehr effizienter Klon des Stammes KM71 für nachfolgende Expressionen ausgewählt. Der ausgewählte Klon KM71/36 zeichnete sich durch starke Produktion des rekombinanten Enzyms aus, wobei das Expressionsmaximum für die Konzentration der Δ MT1-MMP im Kulturüberstand am zweiten Tag der Induktionsphase erreicht wurde. Die nach dem zweiten Tag der Induktionsphase beobachtete Abnahme der Konzentration an aktiver Ektodomäne ist vermutlich auf autolytischen Abbau zurückzuführen (Abbildung 26, Banden der Abbauprodukte nehmen ab Tag 2 der Induktionsphase an Intensität zu.). Im Kulturüberstand wurden am zweiten Tag hohe Enzymkonzentrationen von 25 mg/L MT1-MMP in fluoreszenzkinetischen Messungen mit dem MCA-Peptid festgestellt. Dieser Wert beschreibt allerdings die Anzahl aktiver Zentren und nicht nur die Konzentration an Δ MT1-MMP. Die Aktivität der Zerfallsprodukte, von denen mindestens eins einen aktiven Teil der katalytischen Domäne beinhaltet, trägt ebenfalls zum gemessenen Wert bei (Abbildung 41; Zymogramm). Die Tendenz zur

Autodegradation verminderte somit schon während der Expression und besonders auch in der nachfolgenden Aufarbeitung die Ausbeute an Δ MT1-MMP.

5.2.2 Fermentation

Zur Produktion der Ektodomäne in größerem Maßstab wurde eine neue Kultivierungsmethode im 30 L Fermenter und eine neue Aufarbeitungsstrategie etabliert.

Die variablen Fermentationsparameter zeigen den raschen Wachstumsverlauf und die, bis zur Stunde 40 kontinuierlich verlaufende Expression (Abbildung 30). Im Gegensatz zur Schüttelkolbenkultur wurde im Verlauf der Expression nur die Zunahme der 47,5 kDa großen Δ MT1-MMP und nicht die parallel verlaufende Akkumulation der Fragmente beobachtet. Damit wurde eine "lineare" Maßstabsvergrößerung in Bezug auf die Expressionsrate erzielt. Außerdem ist der primär anfallende Kulturüberstand in wesentlich geringerem Maße durch Fragmente der MT1-MMP verunreinigt.

Der Ausbeuteverlust durch die Ultrafiltration ist vermutlich auf die hohen Temperaturen im Inneren der Querstromfiltrationsanlage zurückzuführen.

5.2.3 Reinigung

Die speziell für die Reinigung der MT1-MMP modifizierte Affinitätschromatographie nach Moore & Spilberg (Moore & Spilberg, 1986) erwies sich als effiziente Methode, kleine Mengen aktiver Δ MT1-MMP mit hoher Reinheit aufzuarbeiten (Roderfeld et al., 2000). Die so aufgearbeiteten Proteinmassen beliefen sich pro Charge auf ca. 200-500 μ g und reichten für eine eingehende Charakterisierung des Enzyms aus. Obwohl die Kapazität der verwendeten Affinitätssäulen die Menge der jeweils gereinigten Chargen um ein Vielfaches übertraf, wurde ein Großteil des Enzyms nicht gebunden und erschien daher im Durchlauf (Abbildung 28). Außerdem wurde festgestellt, daß die Qualität der verwendeten Affinitätssäulen nachließ. Nach drei bis vier Aufarbeitungen konnte auch nach Regeneration meist keine Bindung des Enzyms an das Material mehr nachgewiesen werden. Diese Beobachtung wurde bei der Aufarbeitung der rekombinant in *E. coli* produzierten katalytischen Domäne nicht gemacht. Möglicherweise wird die an das Säulenmaterial gekoppelte Hydroxamsäuregruppe durch *P. pastoris*-eigene Enzyme desaminiert, so daß eine Bindung des Enzyms nicht mehr stattfindet. Die Produktion größerer, für die Kristallisation und anschließende Röntgenstrukturanalyse nötige Mengen der homogenen aktiven Δ MT1-

MMP war mit dieser Methode nicht möglich. Das Einfrieren und Auftauen einer Probe, sowie die Lyophilisierung oder Lagerung über einen längeren Zeitraum war immer mit der Degradation eines Teils des Enzyms verbunden.

5.3 Charakterisierung

Die Charakterisierung der Ektodomäne der MT1-MMP wurde in Anlehnung an bekannte Eigenschaften der katalytischen Domäne oder parallel mit der cdMT1-MMP durchgeführt (Lichte, 1997). Außerdem wurden Essays bezüglich der Calcium-Abhängigkeit der Aktivität parallel auch mit dem Gesamtzym auf HEK-293 Zellen durchgeführt.

5.3.1 Immunologischer Nachweis

Mit einem in Kaninchen hergestelltem polyklonalen Antikörper gegen die Pro- und katalytische Domäne (Ala²¹-Ile³¹⁸) wurde der immunologische Nachweis erbracht, daß die Ektodomäne erfolgreich exprimiert wurde (Abbildung 29); (Lichte, 1997). In der *Western-Blot*-Analyse des Kulturüberstandes konnten neben der gesamten Ektodomäne (Ala²¹-Glu⁵²³), die aktive Ektodomäne (Tyr¹¹²-Glu⁵²³) und auch Autolyseprodukte nachgewiesen werden. Die Tatsache, daß nicht-aktivierte Ektodomäne im Kulturüberstand zu finden war, könnte eine teilweise Fehlfaltung des Enzyms oder eine Überlastung des posttranslationalen Modifikationsmechanismus durch die Überexpression des rekombinanten Enzyms als Ursache haben.

5.3.2 N-terminale Sequenzierung und MALDI-TOF

Die eindeutige Identifizierung des Expressionsproduktes als Δ MT1-MMP mit dem N-Terminus des *wild-type*-Enzyms wurde mit der N-terminalen Sequenzierung durch automatisierten Edman-Abbau erbracht. Der Beweis für die Expression der vollständigen Δ MT1-MMP (Tyr¹¹²-Glu⁵²³) wurde durch eine MALDI-TOF Analyse geliefert.

5.3.3 Autolytische Fragmentierung

Die Untersuchung des autolytischen Fragmentierungsmusters der Δ MT1-MMP ergab die Identifizierung zweier Spaltstellen. Beide Spaltstellen liegen im Bereich der

Verbindungsstelle zwischen katalytischer Domäne und Hinge-Region. Während die erste Schnittstelle Gln²⁸¹-Leu²⁸² am Ende einer α -Helix schon relativ exponiert liegt, befindet sich die Zweite Stelle Pro²⁹⁴-Pro²⁹⁵ sehr exponiert in der Hinge-Region, dem *Verbindungsloop* zwischen katalytischer und Hämapexin-ähnlicher Domäne. Da unter anderem 25-30 kDa große lösliche Formen der MT1-MMP in Zellkulturüberständen durch Immunoassays gefunden aber nicht näher charakterisiert wurden (Li et al., 1998), ist es wahrscheinlich, daß es sich hierbei um Autolyseprodukte der hier beschriebenen Art handelt.

Die Spaltung einer Gln-Leu-Bindung wurde schon durch die Untersuchung möglicher Substratsequenzen unter Verwendung einer Peptidbibliothek gefunden (Ohkubo et al., 1999), während die Spaltung einer Pro-Pro-Bindung bisher in der Literatur noch nicht beschrieben wurde.

5.3.4 Fibrinogen-Proteolyse

In Vorarbeiten wurde die *in vitro*-Proteolyse von Fibrinogen durch die katalytische Domäne der MT1-MMP untersucht, wobei Spaltstellen durch N-terminale Sequenzierung einiger Fragmente identifiziert werden konnten (Tschesche et al., 2000; Hiller et al., 2000). Zum Vergleich des Verhaltens der katalytischen und der Ektodomäne wurde im Rahmen dieser Arbeit der proteolytische Fibrinogen-Abbau unter gleichen Bedingungen mit der Ektodomäne durchgeführt. Schon die durch SDS-PAGE analysierten Fragmentierungsmuster zeigten keinerlei Übereinstimmung. Durch N-terminale Sequenzanalyse der Fragmente konnten drei Spaltstellen in der α -Kette und eine in der γ -Kette von Fibrinogen ermittelt werden. Die Spaltstelle D¹¹⁶-F¹¹⁷ in der α -Kette findet sich auch bei der Prozessierung des Fibrinogens durch die katalytische Domäne der MT1-MMP, wobei das dabei entstandene Fragment nur eine Größe von 6 kDa aufweist (Hiller et al., 2000). Die anderen drei durch Spaltung mit der cdMT1-MMP in der α - und in der γ -Kette bestimmten Schnittstellen wurden bei der in gleicher Weise durchgeführten Spaltung nicht ermittelt (Hiller et al., 2000). Die analysierten Fragmente der Größen 36, 30, 28 und 15 kDa zeigten 100%ige Homologie zum N-Terminus von unprozessiertem Fibrinogen und führten daher nicht zur Identifizierung von Schnittstellen.

Mit diesem Vergleich konnte gezeigt werden, daß die Ektodomäne der MT1-MMP (Tyr¹¹²-Glu⁵²³) hinsichtlich der proteolytischen Degradation von Fibrinogen *in vitro* eine andere Spezifität aufweist als die katalytische Domäne (Tyr¹¹²-Ile³¹⁸). Die Ergebnisse bestärken die

Vermutung, daß die Hämapexin-ähnliche Domäne für die Spezifität der proteolytischen Eigenschaften einer MMP essentiell ist.

5.3.5 MBP-Proteolyse

Aufbauend auf den Ergebnissen von Dr. M. Farr wurde die proteolytische *in vitro* Degradation des *myelin basic protein* (MBP) durch die katalytische Domäne und die Ektodomäne der MT1-MMP untersucht. Das durch SDS-PAGE analysierte Fragmentierungsmuster des MBP war für beide Formen der MT1-MMP identisch. Da aber bis jetzt nur zwei Spaltstellen der Degradation durch die Ektodomäne identifiziert werden konnten, steht der endgültige Beweis der identischen *in vitro*-Spezifität der beiden Varianten gegenüber dem MBP noch aus. Die Ergebnisse liefern einen deutlichen Hinweis auf eine mögliche Beteiligung der MT1-MMP an pathologischen Vorgängen, die mit der Demyelinisierung von Neuronen einhergehen.

5.3.6 Spaltung des Neurotransmitters Substanz-P

Bei der *in vitro*-Spaltung des Neurotransmitters Substanz P bewies die Sequenzanalyse eindeutig die übereinstimmende Spezifität beider MT1-MMP-Varianten. Die hier ermittelte Spaltstelle Gln⁴-Pro⁵ entspricht keiner der vorausgesagten Spezifitäten für die MT1-MMP (Ohkudo et al., 1999).

5.3.7 Kinetische Messungen

Frühere Messungen ergaben für den $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert der Spaltung des „Murphy-Substrates“ durch die Katalytische Domäne der MT1-MMP einen Wert von $8,27 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Die Geschwindigkeit einer durch ein Enzym katalysierten Reaktion kann nicht größer sein, als die Geschwindigkeit der diffusionskontrollierten Begegnung von Enzym und Substrat. Die Diffusion beschränkt den Wert für $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$, so daß die obere Grenze zwischen 10^8 und $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ liegt. Enzyme wie z.B. die Carboanhydrase ($K_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) haben ihr kinetisches Optimum erreicht, und eine weitere Erhöhung der Katalysegeschwindigkeit kann nur durch Senkung der Diffusionszeit erreicht werden.

Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen zeigten nahezu die doppelte Aktivität der katalytischen Domäne mit $1,38 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ gegenüber der Ektodomäne

mit $0,72 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ in Bezug auf das synthetische Substrat. Diese Werte liegen im Bereich der Umsatzgeschwindigkeiten, die für andere MMPs und synthetische Peptidsubstrate ermittelt wurden (z.B. MMP-1/MCA-PLG-LDpaAR: $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 1,48 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Knight, 1995) oder MMP-2/dnp-PLG~LWADR: $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 1,24 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Stack & Gray, 1989)).

Damit wurde einerseits der $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert (KaDo) früherer Messungen ($8,27 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), der in den Geschwindigkeitsbereich „diffusionskontrollierter“ Enzyme hereinreicht, revidiert. Andererseits bestätigten die Messungen den deutlichen Unterschied der beiden Varianten bezüglich der Umsatzgeschwindigkeit relativ kleiner Substratmoleküle.

Die Aktivitätsmessungen mit lebenden Zellen ergaben einen $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert von $2,9 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für die MT1-MMP auf der Zelloberfläche.

Mit diesen Messungen konnte eine kinetische Konstante für das Gesamtzym in seiner „nativen Umgebung“ (auf der Zellmembran) ermittelt werden. Die vorher für die Fragmente bestimmten Konstanten sind nur unter Vorbehalt mit dem $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert für das Gesamtzym auf menschlichen Zellen zu vergleichen, da Unterschiede im Meßprotokoll aufgrund der Sensibilität der Zellen nicht zu umgehen waren. Außerdem ist eine mögliche Regulation der proteolytischen Aktivität durch die Zelle im Zell-Assay nicht auszuschließen.

Um das Verhalten der katalytischen Domäne und der Ektodomäne der MT1-MMP hinsichtlich ihrer Kinetik in Bezug auf den Abbau hochmolekularer Substrate vergleichen zu können, wurden „relative“ $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werte ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}^{\text{rel}}$) ermittelt. Dabei wurde nicht die Zahl potentieller Spaltstellen, sondern die Zahl der Gelatinmoleküle pro Volumen als Substratkonzentration angenommen. Aufgrund dieser Vereinfachung können Werte ermittelt werden, die ausschließlich beim Vergleich der beiden Varianten untereinander in Relation zu setzen sind. Die Verwendung solcher „relativer“ $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werte wurde z.B. schon für den Abbau verschiedener Kollagen-Typen durch MMP-1 beschrieben (Woessner & Nagase, 2000). Gegenüber hochmolekularen Substraten wie Gelatin wurde nahezu die gleiche Aktivität von etwa $40 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für beide Varianten ermittelt. Die Hämopexin-ähnliche Domäne hat dabei keinen Einfluß auf die Kinetik des proteolytischen Abbaus. Eine Verallgemeinerung dieser Aussage erscheint nicht sinnvoll, da z.B. im Falle des Fibrinogens keine einheitliche Substratspezifität vorliegt, und damit auch die kinetischen Parameter der beiden löslichen Varianten der MT1-MMP nicht übereinstimmt.

Bisher ist in der Literatur kein Vergleich kinetischer Konstanten der katalytischen und der Ektodomäne der MT1-MMP beschrieben worden. In dieser Arbeit konnten zum ersten Mal

die kinetischen Eigenschaften der katalytischen und der Ektodomäne der MT1-MMP verglichen werden.

5.3.8 Hemmung

Beide MT1-MMP-Varianten werden sowohl durch TIMP-2 als auch durch die inhibitorische Domäne des TIMP-4 im Verhältnis 1:1 gehemmt. Die stärkere Hemmung der Ektodomäne der MT1-MMP durch TIMP-2 entspricht tendenziell den Ergebnissen der Hemmung für die MMP-1, MMP-2, MMP-3 und MMP-8 durch TIMP-1 und MMP-2 und MMP-9 durch TIMP-2 (Woessner & Nagase, 2000). Die Hämapexin-ähnliche Domäne stabilisiert den Komplex aus MMP und TIMP durch zusätzliche Assoziationsflächen (Bigg et al., 1994).

Der gegenteilige Befund für die Hemmung durch die inhibitorische Domäne des TIMP-4 ist um so interessanter. Die katalytische Domäne wird mit einem K_i -Wert von 10,9 nM für die idTIMP-4 um den Faktor zwei stärker gehemmt als die Ektodomäne. Diese Beobachtung wurde auch bei der MMP-8 gemacht (Stratmann, 2000). In diesem Falle steht die C-terminale Domäne des TIMP für eine assoziative Verbindung mit der Hämapexin-ähnlichen Domäne der MMP nicht mehr zur Verfügung.

Die von Dr. J. Schröder synthetisierten Thiadiazin-Derivate zeigten weitgehend die gleichen Hemmeigenschaften gegenüber der katalytischen Domäne und der Ektodomäne. Für einen künftigen therapeutischen Einsatz ist die hohe Selektivität bezüglich der Hemmung einzelner MMPs unverzichtbar. Einige der getesteten Derivate zeigten diese Eigenschaft und geben daher Anlass zur Hoffnung, daß in Zukunft eine Vielfalt von Inhibitoren mit unterschiedlichsten Selektivitäten für den therapeutischen Einsatz zur Verfügung stehen wird.

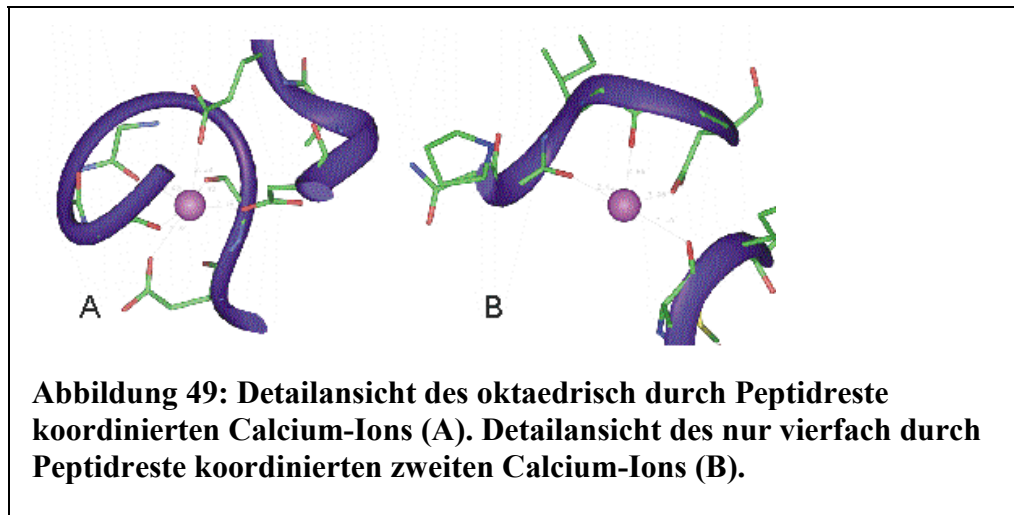
5.3.9 Calciumabhängigkeit der Aktivität

Das Aktivitätsmaximum der MT1-MMP liegt bei einer Calcium-Konzentration von 1 bis 1,5 mM. Die physiologische Serumkonzentration beträgt 1-2,5 mM Calcium, während in der Extrazellulären Matrix Werte um 1,5 mM Calcium beobachtet werden. Die für eine optimale Funktion der MT1-MMP nötige Calcium-Konzentration ist also in der natürlichen Umgebung gegeben.

Verglichen mit der katalytischen Domäne zeigt die Ektodomäne bei Abweichungen von der optimalen Calcium-Konzentration geringere Aktivitätsverluste. Eine noch geringere

Abhängigkeit der katalytischen Aktivität von der Konzentration an gelöstem Calcium zeigt das Gesamtzym auf HEK-293-Zellen.

Abbildung 49 zeigt die zwei unterschiedlich koordinierten Calcium-Ionen in der katalytischen Domäne als Ausschnitt eines durch Röntgenstrukturanalyse ermittelten Raumstrukturmodells der MT1-MMP (Lichte, 1997):



Die unterschiedliche Koordination der beiden Calcium-Ionen wird in der Detailansicht deutlich. Während bei einem Calcium-Ion nahezu perfekte oktaedrische Koordination durch Glutamat-Reste und Carbonyl-Sauerstoff-Atome mit Bindungsabständen um 2,5 Å vorliegt (A), wird das andere Ion nur durch einen Glutamat-Rest und drei Carbonyl-Sauerstoff-Atome mit Bindungslängen über 2,5 Å an das Peptidgerüst gebunden (B). Vermutlich kann dieses schwach gebundene Calcium-Ion durch starke Erniedrigung der Calcium-Konzentration in der Enzymumgebung aus der chelatisierenden Peptidumgebung entfernt werden. Offensichtlich ist das Gesamtzym durch die größere Zahl intramolekularer Wechselwirkungen in seiner Konformation und somit auch der Bindung struktureller Ionen stärker stabilisiert als ein Fragment des Enzyms.

Durch verschiedene Assays konnte gezeigt werden, daß die Aktivität des Enzyms reversibel durch die Variation der Calcium-Konzentration verändert werden kann. Mit dem „Dialyse-Assay“ war abwechselnd durch Entzug und anschließende Zugabe von Calcium eine Inaktivierung und völlige Wiederherstellung des aktiven Zustandes über mehrere Zyklen möglich.

Zu bedenken ist der Umstand, daß die cytoplasmatische Calcium-Konzentration von der Zelle unter 10^{-7} M gehalten wird. Dies könnte unter anderem auch eine Art Selbstschutzmechanismus der Zelle vor ungewollter MMP-Aktivität im Cytoplasma sein.

5.4 Ausblick

Zusammenfassend ist über den Vergleich der Eigenschaften der katalytischen Domäne und der Ektodomäne ein Bild entstanden, welches deutlich zeigt, daß Unterschiede im Verhalten verschiedener Varianten eines Enzyms in *in vitro*-Assays bestehen können. Die Ergebnisse aus *in vitro* Versuchen dienen als Hinweise auf das *in vivo*-Verhalten. Versuche *in vivo* liefern im allgemeinen ein sehr komplexes und damit auch schwieriger zu verstehendes Bild enzymatischer Eigenschaften. Die Ergebnisse aus *in vitro* Vorversuchen sollten daher einen sinnvollen Weg für weitergehende Untersuchungen vorgeben.

In diesem Sinne ist die weitere Untersuchung der Substratspezifität der MT1-MMP in *Knock-out*-Experimenten eine Möglichkeit, ein umfassenderes und genaueres Bild des enzymatischen Verhaltens der MT1-MMP zu liefern. Ebenso könnten *Knock-out*-Experimente hinsichtlich des Zusammenspiels von TIMPs und MMPs sicherlich weitere Ergebnisse liefern. Der Abbau des *myelin basic protein* durch die MT1-MMP kann eine Begleiterscheinung bei der Demyelinisierung von Neuronen sein und bedarf daher weiterer Untersuchungen. Ein möglicher Ansatzpunkt ist hier die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen MT1-MMP-Aktivität und pathologischem Zustand der Demyelinisierung bestimmter Gewebereiche.

Die stärkere Hemmbarkeit der katalytischen Domäne gegenüber der Ektodomäne steht in Kontrast zu bisherigen Erkenntnissen und stellt somit einen interessanten Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen dar.

Anknüpfend an die Ergebnisse von Moy et al. für die MMP-3 (Moy et al., 1998) könnte die Raumstruktur der Calcium-frei aufgearbeiteten katalytischen Domäne der MT1-MMP tiefere Einsicht in das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Calcium-abhängige Verhalten bringen.

Die im Rahmen der Fermentation gewonnenen guten Ergebnisse können für weitere Versuche der Produktion der Δ MT1-MMP im Milligramm-Maßstab richtungsweisend sein. Dabei sollte durch die Kontrolle zusätzlicher Parameter, wie zum Beispiel Methanol-Konzentration, eine Ausbeutesteigerung erzielt werden können. Die rasche Konzentration und Dialyse der großen Menge an Kulturüberstand ist sicherlich vorteilhaft, sollte in Zukunft jedoch nur mit einer modernen Querstromfiltrationsanlage mit interner Kühlung durchgeführt werden.

6 Literatur

Aguilar, M. Hearn, M. (1996) High resolution reversed-phase high performance liquid chromatography of peptides and proteins. *Meth. Enzymol.* 270, 3-26.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (1990) Molekularbiologie der Zelle. 2. Auflage.

Alexander, C.M. & Werb, Z. (1998) Proteinases and extracellular matrix remodelling. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 1, 974-982.

Arthur, M.J. (1997) Matrix degradation in liver: a role in injury and repair. *Hepatology* 26, 1069-1071.

Atkinson, S.J., Patterson, M.L., Butler, M.J., Murphy, G. (2001) Membrane type 1 matrix metalloproteinase and gelatinase A synergistically degrade type 1 collagen in a cell model. *FEBS Lett.* 491(3):222-6.

Bányai, L., Tordai, H., Patthy, L. (1996) Structure and domain-domain interactions of the gelatin binding site of human 72 kDa type IV collagenase (gelatinase-A, matrix metalloproteinase 2). *J. Biol. Chem.* 271, 12003-12008.

Baragi, V.M., Fliszar, C.J., Conroy, M.C., Ye, Q.Z., Shipley, J.M., Welgus, H.G. (1994) Contribution of the C-terminal domain of metalloproteinases to binding by tissue inhibitor of metalloproteinases. C-terminal truncated stromelysin and matrilysin exhibit equally compromised binding affinities as compared to full-length stromelysin. *J. Biol. Chem.* 269, 12692-12697.

Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J.F. (1998) *Handbook of proteolytic enzymes*. 1666 pp., Academic Press, London.

Basbaum, C.D., Werb, Z. (1996) Focalized proteolysis: spatial and temporal regulation of extracellular matrix degradation at the cell surface. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 8, 731-738.

- Basset, P., Okada, A., Chenard, M.P., Kannan, R., Stoll, I., Anglard, P., Bellocq, J.P., Rio, M.C. (1997) Matrix metalloproteinases as stromal effectors of human carcinoma progression: therapeutic implications. *Matrix Biol.* 15, 535-541.
- Bauer, E.A., Stricklin, G.P., Jeffrey, J.J., Eisen, A.Z. (1975) Collagenase production by human skin fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 64, 232-240.
- Beeley, N.R.A., Ansell, P.R.J., Docherty, A.J.P. (1999) Inhibition of matrix metalloproteinases (MMP's). *Curr. Opin. Ther. Pat.* 4, 7-16.
- Belien, A.T., Paganetti, P.A., Schwab, M.E. (1999) Membrane-type 1 matrix metalloprotease (MT1-MMP) enables invasive migration of glioma cells in central nervous system white matter. *J. Cell. Biol.* 25;144(2):373-84.
- Bigg, H.F., Clark, I.M., Cawston, T.E. (1994) Fragments of human fibroblast collagenase: interaction with metalloproteinase inhibitors and substrates. *Biochim. Biophys. Acta* 1208(1):157-65.
- Billinghorst, 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.
- Blake, M.S., Johnston, K.H., Russel-Johnes, G.J., 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. (1995) A helping hand for collagenases: the hemopexin-like domain. *Structure* 3, 527-530.
- Bode, W., Fernandez-Catalan, C., Tschesche, H., Grams, F., Nagase, H., Maskos, K. (1999) Structural properties of matrix metalloproteinases. *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 639-652.
- Bottomley, K.M., Johnson, W.H., Walter, D.S. (1998) Matrix metalloproteinase inhibitors in arthritis. *J. Enz. Inhib.* 13, 79-101.

Brake, A.J., Merryweather, J.P., Coit, D.G., Heberlein, U.A., Masiarz, F.R., Mullenbach, G.T., Urdea, M.S., Valenzuela, P., Barr, P.J. (1984) Alpha-factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 81(15):4642-6.

Brooks, P.C., Strömblad, S., Sanders, L.C., von Schalscha, T.L., Aimes, R.T., Stetler-Stevenson, W.G., Quigley, J.P., 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.

Brown, P.D. (1997) Matrix metalloproteinase inhibitors in the treatment of cancer. *Med. Oncol.* 14, 1-10.

Büttner, F.H., Chubinskaya, S., Margerie, D., Huch, K., Flechtenmacher, J., Cole, A.A., Kuettner, K.E., Bartnik, E. (1997) Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase in human articular cartilage. *Arthritis & Rheumatism* 40, 704-709.

Cao, J., Sato, H., Takino, T., Seiki, M. (1995) The C-terminal region of membrane type matrix metalloproteinase is a functional transmembrane domain required for pro-gelatinase A activation. *J. Biol. Chem.* 270, 801-805.

Chambers, A.F., Matrisian, L.M. (1997) Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J. Natl. Cancer Inst.* 89, 1260-1270.

Chandler, S., Miller, K.M., Clements, J.M., Lury, J., Corkill, D., Anthony, D.C., Adams, S.E., Gearing, A.J. (1997) Matrix metalloproteinases, tumor necrosis factor and multiple sclerosis: an overview. *J. neuroimmunol.* 72, 155-161.

Clare, J.J., Rayment, F.B., Ballantine, S.P., Sreekrishna, K., Romanos, M.A. (1991) High level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Bio/Technology* 9, 455-460.

- Claus, A. (1957) Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. *Acta Haematologica* 17, 237-246.
- Cleutjens, J.P. (1996) The role of matrix metalloproteinases in heart disease. *Cardiovasc. Res.* 32, 816-821.
- Cockett, M.I., Murphy, G., Birch, M.L., O'Connell, J.P., Crabbe, T., Millican, A.T., Hart, I.R., Docherty, A.J. (1998) Matrix metalloproteinases and metastatic cancer. *Biochem. Soc. Symp.* 63, 295-313.
- Cohen, S.N., Chang, A., Boyer, H., Helling, R. (1973) Constructing of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70, 3240-3244.
- Crabbe, T., Ioannou, C., Docherty, A.J.P. (1993) Human progelatinase A can be activated by autolysis at a rate that is concentration-dependent and enhanced by heparin bound to the C-terminal domain. *Eur. J. Biochem.* 218, 431-438.
- Cunnane, G, Hummel, K.M., Muller-Ladner, U., Gay, R.E., Gay, S. (1998) Mechanism of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 46, 1-7.
- DeClerck, Y.A., Yean, T.D., Lee, Y., Tomich, J.M., Langley, K.E. (1993) Characterization of the functional domain of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2). *Biochem. J.* 289, 65-69.
- De Souza, S.J., Peireira, H.M., Jacchieri, S., Brentani, R.R. (1996) Collagen/collagenase interaction: does the enzyme mimic the conformation of its own substrate ? *FASEB J.* 10, 927-930.
- Devlin, J.J., Panganiban, L.C., Devlin, P.E. (1990) Random peptide libraries: a source of specific protein binding molecules. *Science* 249(4967):404-6.
- Edman, P., Begg, G. (1967) A Protein Sequenator. *Eur. J. Biochem.* 1, 80-91.

- Ellis, S.B., Brust, P.F., Koutz, P.J., Waters, A.F., Harpold, M.M., Gingeras, T.R. (1985) Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* (5):1111-21.
- English, W.R., Velasco, G., Stracke, J.O., Knäuper, V., Murphy, G. (2001) Catalytic activities of membrane –type 6 matrix metalloproteinase (MMP25). *FEBS Lett.* 491(1-2), 137-142.
- Fernandez-Catalan, C., Bode, W., Huber, R., Turk, D., Calvete, J.J., Lichte, A., Tschesche, H., 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(17):5238-48.
- Ferrante, F.M., VadeBoncouer, T.R. (eds.) POTOPERATIVE PAIN MANAGEMENT. Churchill Livingstone New York p. 28.
- Fini, M.E., Strissel, K.J., Girard, M.T., West Mays, J., Rinehardi, W.B. (1994) Interleukin-1 α mediates collagenase synthesis stimulated by phorbol 12-myristate 13-acetate. *J. Biol. Chem.* 269, 11291-11298.
- Fischer, P. (1992) 25 Jahre automatisierte Proteinsequenzierung. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 40, 963-971.
- Fitzpatrick, M., Hospelhorn, V.D. (1965) Studies of human pulmonary connective tissue. II. Amino acid composition of residues following collagenase digestion of lung connective tissues. *Am. Rev. Respir. Dis.* 92(5):792-800.
- Fosang, A.J., Last, K., Knäuper, V., Neame, P.J., Murphy, G., Hardingham, T.E., Tschesche, H., Hamilton, J.A. (1993) Fibroblast and neutrophil collagenases cleave at two sites in the cartilage aggrecan interglobular domain. *Biochem. J.* 295, 273-276.
- Fukae, M., Tanabe, T., Uchida, T., Lee, S.K., Ryu, O.H., Murakami, C., Wakida, K., Simmer, J.P., Yamada, Y., Bartlett, J.D. (1998) Enamelysin (matrix metalloproteinase-20): localization in the developing tooth and effects of pH and calcium on amelogenin hydrolysis. *J. Dent. Res.* 77(8):1580-8.

Gomez, D.E., Alonso, D.F., Yoshiji, H., Thorgeirsson, U.P. (1997) Tissue inhibitors of metalloproteinases – structure, regulation and biological functions. *Eur. J. Cell. Biol.* 74, 111-122.

Gomis-Rüth, F.X., Gohlke, U., Betz, M., Knäuper, V., López-Otín, C., 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., Bode, W. (1997) Mechanism of inhibition of human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature* 389, 77-81.

Gottschall, P.E., Deb, S. (1996) Regulation of matrix metalloproteinase expressions in astrocytes, microglia and neurons. *Neuroimmunomodulation* 3, 69-75.

Gross, J., Nagai, Y. (1965) Specific degradation of the collagen molecule by tadpole collagenolytic enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 54(4):1197-204.

Guedez, L., Lim, M.S., Stetler-Stevenson, W.G. (1996) the role of metalloproteinases and their inhibitors in haematological disorders. *Crit. Rev. Oncogen.* 7, 205-225.

Gutman, A., Wasylyk, B. (1990) The collagenase gene promotor contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites. *EMBO J.* 9, 2241-2246.

Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 57-580.

Havemose-Poulsen, A., Holmstrup, P. (1997) Factors affecting IL-1- mediated collagen metabolism by fibroblasts and the pathogenesis of periodontal disease: a review of the literature. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 8, 217-236.

- Heukeshoven, J., 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., Dowdle, E.B. (1980) Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal. Biochem.* 102, 196-202.
- Hiller, O., Lichte, A., Oberpichler, A., Kocourek, A., Tschesche, H. (2000) Matrix metalloproteinases collagenase-2, macrophage elastase, collagenase-3, and membrane type 1-matrix metalloproteinase impair clotting by degradation of fibrinogen and factor XII. *J. Biol. Chem.* 275(42):33008-13.
- Housley, T.J., Baumann, A.P., Braun, I.D., Davis, G., Seperack, P.K., Wilhelm, S.M. (1993) Recombinant Chinese hamster ovary cell matrix metalloproteinase-3 (MMP-3, stromelysin-1). Role of calcium in promatrix metalloproteinase-3 (pro-MMP-3, prostromelysin-1) activation and thermostability of the low mass catalytic domain of MMP-3. *J. Biol. Chem.* 268, 4481-4487.
- Hulboy, D.L., Rudolph, L.A., Matrisian, L.M. (1997) Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Mol. Hum. Reprod.* 3, 27-45.
- Imai, K., Ohuchi, E., Aoki, T., Nomura, H., Fujii, Y., Sato, H., Seiki, M., Okada, Y. (1996) Membrane-type matrix metalloproteinase 1 is a gelatinolytic enzyme and is secreted in a complex with tissue inhibitor of metalloproteinases 2. *Cancer. Res.* 56(12):2707-10
- Jackson, C., Nguyen, M., Arkell, J., Sambrook, P. (2001) Selective matrix metalloproteinase (MMP) inhibition in rheumatoid arthritis--targetting gelatinase A activation. *Inflamm Res.* 50(4):183-6.
- Janicki, J.S., Tyagi, S.C., Campbell, S.E., Reddy, H.K., Henegar, J.R. (1995) Progressive ventricular dilatation in heart failure: The role of myocardial collagenase. *Dev. Cardiovasc. Med.* 169, 261-273.

Kahari, V.M., Saarialho-Kere, U. (1997) Matrix metalloproteinases in skin. *Exp. Dermatol.* 6, 199-213.

Karas M, Hillenkamp F. (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem.* 15;60(20):2299-301.

Kolkenbrock, H., Hecker-Kia, A., Orgel, D., Ulbrich, D., Will, H. (1997) Activation of progelatinase A and progelatinase A/TIMP-2 complex by membrane type-2 matrix metalloproteinase. *Bio. Chem.* 378, 71-76.

Knäuper, V., Cowell, S., Smith, B., López-Otín, C., O'Shea, M., Morris, H., Zardi, L., Murphy, G. (1997) The role of the C-terminal domain of human collagenase-3 (MMP-13) in the activation of procollagenase-3, substrate specificity, and tissue inhibitor of metalloproteinase interaction. *J. Biol. Chem.* 272, 7608-7616.

Knight, C.G., Willenbrock, F., Murphy, G. (1992) A novel coumarin-labelled peptide for sensitive continuous assays of the matrix metalloproteinases. *FEBS Letters* 206, 263-266.

Knight, C.G. (1995) Fluorimetric assays for proteolytic enzymes. *Methods Enzymol.* 248: 18-34.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Langone, J.J., van Vunakis, H. (1982) Immunological techniques. *Meth. in Enzymol.* 92, London/New York (Academic Press).

Lazarus, G.S., Brown, R.S., Daniels, J.R., Fullmer, H.M. (1968) Human granulocyte collagenase. *Science* 159(822):1483-5.

Leco, K.J., Hayden, L.J., Sharma, R.R., Rocheleau, H., Greenberg, A.H., Edwards, D.R. (1992) Differential regulation of TIMP-1 and TIMP-2 messenger RNA expression in normal and Ha-ras-transformed murine fibroblasts. *Gene* 117, 209-217.

Leco, K.J., Khokha, R., Pavloff, N., Hawkes, S.P., Edwards, D.R. (1994) Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 is an extracellular matrix associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse cells and tissues. *J. Biol. Chem.* 269, 9352-9360.

Lehti, K., Lohi, J., Valtanen, H., 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 (Pt 2):345-53.

Lethi, K., Valtanen, H., Wickstrom, S., Lohi, J., Keski-Oja, J. (2000) Regulation of membrane-type-1 matrix metalloproteinase activity by its cytoplasmatic domain. *J. Biol. Chem.* 275(20), 15006-15013.

Li, J., Brick, P., O'Hare, M.C., Skarzynski, T., Lloyd, L.F., Curry, V.A., Clark, I.M., Bigg, H.F., Hazleman, B.L., Cawston, T.E. et al. (1995) Structure of full-length porcine synovial collagenase reveals a C-terminal domain containing a calcium-linked, four-bladed beta-propeller. *Structure* 3, 541-549.

Li, H., Bauzon, D.E., Xu, X., Tschesche, H., Cao, J., Sang, Q.A. (1998) Immunological characterization of cell-surface and soluble forms of membrane type 1 matrix metalloproteinase in human breast cancer cells and in fibroblasts. *Mol. Carcinog.* 22(2):84-94.

Libby, P., Schoenbeck, U., Mach, F., Selwyn, A.P., Ganz, P. (1998) Current concepts in cardiovascular pathology: the role of LDL cholesterol in plaque rupture and stabilization. *Am. J. Med.* 104, 14S-18S.

Libson, A.M., Gittis, A.G., Collier, I.E., Marmer, B.L., Goldberg, G.I., Lattman, E.E. (1995) Crystal structure of the haemopexin-like C-terminal domain of gelatinase A. *Nat. Struct. Biol.* 2(11):938-942

Lichte, A., Kolckenbrock, H., Tschesche, H. (1996) The recombinant catalytic domain of membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) induces activation of progelatinase A and progelatinase A complexed with TIMP-2. *FEBS Lett.* 397, 277-282.

Lichte, A. (1997) Klonierung, Expression und biochemische Charakterisierung verschiedener Varianten der MT1-MMP. Dissertation an der Universität Bielefeld.

Liotta, L.A., Rao, C.N., Barsky, S.H. (1983) Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab. Invest.* 49, 636-649.

Llano, E., Pendas, A.M., Freije, J.P., Nakano, A., Knäuper, V., Murphy, G., López-Otín, C. (1999) Identification and characterization of human MT5-MMP, a new membrane-bound activator of progelatinase A overexpressed in brain tumors. *Canc. Res.* 59, 2570-2576.

Luca, M., Huang, S., Gershenwald, J.E., Singh, R.K., Reich, R., Bar-Eli, M. (1997) Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis. *Am. J. Pathol.* 151(4):1105-13.

Luo, G.X., Reisfeld, R.A., Strongin, A.Y. (1995) Sequenz submittiert an EMBL/GenBank/DDBJ-Datenbank.

Matrisian, L.M. (1994) Matrix metalloproteinase gene expression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 732, 42-50.

Matthews, B.W. 1988 Structural basis of the action of thermolysin and related zinc peptidases. *Acc. Chem. Res.* 21, 333-340.

Miyamori, H., Hasegawa, K., Kim, K.R., Sato, H. (2000) Expression of metastasis-associated mts1 gene is co-induced with membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) during oncogenic transformation and tubular formation of Madin Darby canine kidney (MDCK) epithelial cells. *Clin. Exp. Metastasis* 18(1):51-6.

Moore, W.M., Spilburg, C.A. (1986) Purification of human collagenases with a hydroxamic acid affinity column. *Biochemistry* 9;25(18):5189-95.

Morphy, J.R., Beeley, N.R.A., Boyce, B.A., Leonard, J., Mason, B., Millican, A., Millar, K., Oconnell, J.P., Porter, J. (1994) Potent and selective inhibitors of gelatinase A. Carboxylic and phosphonic acid derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 4, 2747-2752.

Moy, F.J., Chanda, P.K., Cosmi, S., Pisano, M.R., Urbano, C., Wilhelm, J., Powers, R. (1998) High resolution solution structure of the inhibitor-free catalytic fragment of human fibroblast collagenase determined by multidimensional NMR. *Biochemistry* 37, 1495-1504.

Murphy, G., Allan, Willenbrock, Cockett, M.I., O'Connell, J.P., Docherty, A.J.P. (1992) The role of the C-terminal domain in collagenase and stromelysin specificity. *J. Biol. Chem.* 267, 9612-9618.

Murphy, G. & Knäuper, V. (1997) Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the 'hemopexin' domain? *Matrix Biol.* 15, 511-518.

Murphy, G., Knäuper, V., Cowell, S., Hembry, R., Stanton, H., Butler, G., Freije, J., Pendas, A.M., López-Otín, C. (1999) Evaluation of some newer matrix metalloproteinases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 878, 25-37.

Nagase, H., Fields, G.B. (1996) Human matrix metalloproteinase specificity studies using collagen sequence-based synthetic peptides. *Biopolymers* 40, 399-416.

Nagase, H. (1997) Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol. Chem.* 378, 151-160.

Nakayama, K. (1997) Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem. J.* 327, 625-635.

Nguyen, Q., Murphy, G., Hughes, C.E., Mort, J.S., Roughley, P.J. (1993) Matrix metalloproteinases cleave at two distinct sites on human cartilage link protein. *Biochem. J.* 295, 595-598.

Nguyen, Q., Willenbrock, F., Cockett, M.I., O'Shea, M., Docherty, A.J.P. Murphy, G. (1994) Different domain interactions are involved in the binding of tissue inhibitors of metalloproteinases to stromelysin-1 and gelatinase A. *Biochemistry* 33, 2089-2095.

- Ohkubo, S., Miyadera, K., Sugimoto, Y., Matsuo, K., Wierzba, K., Yamada, Y. (1999) Identification of substrate sequences for membrane type-1 matrix metalloproteinase using bacteriophage peptide display library. *Biochem Biophys Res Commun.* 266(2):308-13.
- Okumura, Y., Sato, H., Seiki, M., Kido, H. (1997) Proteolytic activation of the precursor of membrane type 1 matrix metalloproteinase by human plasmin. A possible cell surface activator. *FEBS Lett.* 402(2-3):181-4.
- Osmers, R.G.W., Adelman-Grill, B.C., Rath, W., Stuhlsatz, H.W., Tschesche, H., Kuhn, W. (1996) Biochemical events in cervical ripening dilatation during pregnancy and parturition. *J. Obstet. Gynaecol.* 21, 185-194.
- Overall, C.M., Tam, E., McQuibban, G.A., Morrison, C., Wallon, U.M., Bigg, H.F., King, A.E., Roberts, C.R. (2000) Domain interactions in the gelatinase-A/TIMP-2/MT1-MMP activation complex. *J. Biol. Chem.* 50, 39497-39506.
- Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Prot. Sci.* 4, 2411-2424.
- Pagenstecher, A., Stalder, A.K., Kincaid, C.L., Shapiro, S.D., Campbell, I.L. Differential expression of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase genes in the mouse central nervous system in normal and inflammatory states. *Am. J. Pathol.* 152(3):729-41.
- Parks, W.C., Mecham, R.P. (1998) *Matrix Metalloproteinases*. W.C. Parks and R.P. Mecham (eds.), 362 pp., Academic Press, San Diego.
- Parks, W.C., Sudbeck, B.D., Doyle, G.R., Saarialho-Kere, U.K. (1998) Matrix metalloproteinases in tissue repair. *Matrix Metalloproteinases*. W.C. Parks and R.P. Mecham (eds.), pp. 263-297. Academic Press, San Diego.
- Pei, D., Weiss, S.J. (1995) Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature* 375, 244-247.

- Pei, D., Weiss, S.J. (1996) Transmembrane-deletion mutants of the membrane-type matrix metalloproteinase-1 process progelatinase A and express intrinsic matrix-degrading activity. *J. Biol. Chem.* 271(15):9135-40.
- Pourmotabbed, T. (1994) Relation between substrate specificity and domain structure of 92 kDa type IV collagenase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 732, 372-374.
- Powell, W.C., Matrisian, L.M. (1996) Complex roles of matrix metalloproteinases in tumor progression. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 213, 1-21.
- Puente, X.S., Pendas, A.M., Llano, E., Velasco, G., López-Otín, C. (1996) Molecular cloning of a novel matrix metalloproteinase from a human breast carcinoma. *Cancer Res.* 56, 944-949.
- Reinke, H., Fischer, S., Reimann, F., Tschesche, H. (1991) Methods in protein sequence analysis. (Jörnvall, Höög, Gustavsson) Birkenhäuser Verlag, Basel, 55-66.
- Reynolds, J.J., Meikle, M.C. (1997) The functional balance of metalloproteinases and inhibitors in tissue degradation: relevance to oral pathologies. *J. R. Coll. Surg. Edinb.* 42, 154-160.
- Rockwell, A., Melden, M., Copeland, R.A., Hardman, K., Decicco, C.P., Degrado, W.F. (1996) Complementarity of combinatorial chemistry and structure-based ligand design: application to the discovery of novel inhibitors of matrix metalloproteinases. *J. Am. Soc.* 118, 10337-10338.
- Roderfeld, M. (1998) Gezielte Mutationen zur Stabilisierung der membranständigen Matrix Metalloproteinase-1 (MT1-MMP). Diplomarbeit an der Uni-Bielefeld.
- Roderfeld, M., Büttner, F.H., Bartnik, E., Tschesche, H. (2000) Expression of human membrane-type 1 matrix metalloproteinase in *Pichia pastoris*. *Prot. Exp. Purif.* 19, 369-374.

- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487.
- Salomonsen, L.A., Woolley, D.E. (1996) Matrix metalloproteinases in normal menstruation. *Hum. Reprod.* 11, 124-133.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sammons, D.W., Adams, L.D., Nishizawa, Y. (1981) Ultrasensitive silverbased color staining of polypeptides in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 2, 135.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 5463-5467.
- Sato, H., Seiki, M. (1993) Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. *Oncogene* 8, 395-405.
- Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E., 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., 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 Lett.* 393, 101-104.
- Schägger, H., Aquila, H., von Jagow, G. (1988) Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis. *Anal. Biochem.* 173, 201-205.
- Schröder, J. (2001) Design and Synthesis of Matrix Metalloproteinase Inhibitors Derived from a 6H-1,3,4-Thiadiazine Scaffold. Dissertation an der Universität Bielefeld.

Schröder, J., Henke, A., Wenzel, H., Brandstetter, H., Stammer, H.G., Stammer, A., Pfeiffer, W.D., Tschesche, H. (2001) Structure-based design and synthesis of potent matrix metalloproteinase Inhibitors derived from a 6H-1,3,4-thiadiazine scaffold. *J. Med. Chem.*, in press.

Sciavolino, P.J., Lee, T.H., Vilcek, J. (1994) Interferon- β induces metalloproteinase mRNA expression in human fibroblasts. Role of activator protein-1. *J. Biol. Chem.* 269, 21627-21634.

Sharp, P.A., Sugden, B., Sambrook, J. (1973) Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 12, 3055.

Shi, Y.B., Ishizuya-Oka, A. (1996) Biphasic intestinal development in amphibians: embryogenesis and remodelling during metamorphosis. *Curr. Top. Dev. Biol.* 32, 205-235.

Smith, C.E. (1998) Cellular and chemical events during enamel maturation. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 9, 128-161.

Spurlino, J.C., Smallwood, 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., Kropp, K.E. (1996) *Pichia pastoris*, In: Wolf, K. (Hrsg.) Nonconventional yeasts in biotechnology. Springer Berlin, Heidelberg, New York, S. 203-253.

Stack, M.S., Gray, R.D. (1989) Comparison of vertebrate collagenase and gelatinase using a new fluorogenic substrate peptide. *J. Biol. Chem.* 264: 4277-4281.

Stetler-Stevenson, W.G., Liotta, L.A., Kleiner, D.E. (1993) Extracellular matrix: Role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *FASEB J.* 7, 1434-1441.

Stetler-Stevenson, W.G., Hewitt, R., Corcoran, M. (1996) Matrix Metalloproteinases and tumor invasion: from correlation and causality to clinic. *Semin. Cancer Biol.* 7, 147-154.

Stöcker, W., Grams, F., Baumann, U., Reinemeier, P., Gomis-Rüth, F.X., McKay, D.B., Bode, W. (1995) The metzinkins – Topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins and matrixins (collagenase) define a superfamily of zincpeptidases. *Proc. Sci.*, 4, 823-840.

Stratmann, B. (2000) Klonierung, Expression und Charakterisierung des „human tissue inhibitor of metalloproteinases-4“. Dissertation an der Universität Bielefeld.

Strongin, A., Collier, I.E., Bannikov, G., Marmer, B.L., Grant, G.A., Goldberg, G.I. (1995) Mechanism of surface activation of 72 kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloproteinase. *J. Biol Chem.* 270, 5331-5338.

Stuart, R.O., Barros, E.J., Ribeiro, E., Nigam, S.K. (1995) Epithelial tubulogenesis through branching morphogenesis: relevance to collecting system development. *J. Am. Soc. Nephrol.* 6, 1151-1159.

Takino, T., Sato, H., Shinagawa, A., Seiki, M. (1995) Identification of the second membrane-type matrix metalloproteinase (MT2-MMP) gene from a human placenta cDNA library. MT-MMPs form a unique membrane-type subclass in the MMP family. *J. Biol. Chem.* 39, 23013-23020.

Takino, T., Sato, H., Yamamoto, E., Seiki, M. (1995) Cloning of a human gene potentially encoding a novel matrix metalloproteinase having a C-terminal transmembrane domain. *Gene* 155, 293-298.

Thompson, R.W., Parks, W.C. (1996) Role of matrix metalloproteinases in abdominal aortic aneurysms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 800, 157-174.

Towbin, H., Staehlin, T., Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 4350.

- Tsafriiri, A. (1995) Ovulation as a tissue remodelling process. Proteolysis and cumulus expansion. *Adv. Exp. Med. Biol.* 377, 121-140.
- Tschesche, H., Bläser, J., Kleine, T., Bode, W., Reinemeier, P., Grams, F., Schnierer, S., Thomssen, C., Schmitt, M., Pache, L., Jänicke, F., Graeff, H. (1994) Structure and function of matrix metalloproteinases and their significance in breast cancer. *ICS 1050, Prospects in Diagn. and Treatm.of Breast Cancer*, (eds. M. Schmitt, H. Graeff, G. Kindermann; co-eds. F. Jänicke, T. Genz, B. Lampe), Verlag: Excerpta Medica, Amsterdam, 77-88.
- Tschesche, H., Lichte, A., Hiller, O., Oberpichler, A., Buttner, F.H., Bartnik, E. (2000) Matrix metalloproteinases (MMP-8, -13, and -14) interact with the clotting system and degrade fibrinogen and factor XII (Hagemann factor). *Adv. Exp. Med. Biol.* 477:217-28.
- Tyagi, S.C. (1997) Proteinases and myocardial extracellular matrix turnover. *Mol. Cell. Biochem.* 168, 1-12.
- Ueno, H., Nakamura, H., Inoue, M., Imai, K., Noguchi, M., Sato, H., Seiki, M., Okada, Y. (1997) Expression and tissue localization of membrane-types 1, 2 and 3 matrix metalloproteinases in human invasive breast carcinomas. *Cancer Res.* 57, 2055-2060.
- Ullmann, A., Jacob, F., Monod, J. (1967) Characterization by *in vitro* complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the β -galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 24, 339.
- Van Wart, H.E., 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.
- Wasylyk, C., Gutman, A., Nicholson, R., Wasylyk, B. (1991) The cEts Oncoprotein activates the stromelysin promotor through the same elements as several non-nuclear oncoproteins. *EMBO J.* 10, 1127-1134.
- Vincenti, M.P. (2001) The matrix metalloproteinase (MMP) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) genes. Transcriptional and posttranscriptional regulation, signal transduction and cell-type-specific expression. *Methods. Mol. Biol.* 151:121-48.

- Weiss, B., Jaquemin-Sablon, A., Live, T.R., Fareed, G.C., Richardson, C.C. (1968) Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4. *J. Biol. Chem.* 243, 4543.
- Weber, K., Osborne, M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamid gelelectrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4412.
- West, M.D. (1994) The cellular and molecular biology of skin aging. *Arch. Dermatol.* 130, 87-95.
- Westermeier, R. (1990) Elektrophorese-Praktikum. VCH, Weinheim.
- Wetmore, D.R., Hardman, K.D. (1996) Roles of the propeptide and metal ions in the folding and stability of the catalytic domain of stromelysin (matrix metalloproteinase 3). *Biochemistry* 35, 6549-6558.
- Will, H., Hinzmann, B. (1995) cDNA sequence and mRNA tissue distribution of a novel human matrix metalloproteinase with a potential transmembrane segment. *Eur. J. Biochem.* 231, 602-608.
- Will, H., Atkinson, S.J., Butler, G.S., Smith, B., 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(29):17119-23.
- Williamson R.A., Hutton M., Vogt G., Rapti M., Knäuper V., Carr M.D., Murphy G. (2001) Tyrosine 36 plays a critical role in the interaction of the AB loop of TIMP-2 with matrix metalloproteinase-14. *J. Biol. Chem.* Jun. 4 - in Press.
- Windsor, L.J., Bodden, M.K., Birkedal-Hansen, B., Engler, J.A., Birkedal-Hansen, H. (1994) Mutational analysis of residues in and around the active site of human fibroblast-type collagenase. *J. Biol. Chem.* 269, 26201-26207.

Windsor, L.J., Steele, D.L., LeBlanc, S.B., Taylor, K.B. (1997) Catalytic domain comparisons of human fibroblast-type collagenase, stromelysin-1 and matrilysin. *Biochim. Biophys. Acta* 1334, 261-272.

Woessner, J.F., Jr. (1998) The matrix metalloproteinase family. *Matrix Metalloproteinases*. W.C. Parks and R.P. Mecham (eds), 1-14, Academic Press, San Diego.

Woessner, J. & Nagase, H. (2000) *Matrix Metalloproteinases and TIMPs*. Oxford University Press.

Xu, Q., Shively, J. (1988) Microsequence analysis of peptides and proteins. *Anal. Biochem.* 170,19-30.

Yamada, T., Yoshiyama, Y., Sato, H., Seiki, M., Shinagawa, A., Takahashi, M. (1995) White matter microglia produce membrane-type matrix metalloprotease, an activator of gelatinase A, in human brain tissues. *Acta Neuropathol. (Berl)*. 90(5):421-4.

Yamamoto, M., Mohanam, S., Sawaya, R., Fuller, G.N., Seiki, M., Sato, H., Gokaslan, Z.L., Liotta, L.A., Nicolson, G.L., Rao, J.S. (1996) Differential expression of membrane-type matrix metalloproteinase and its correlation with gelatinase A activation in human malignant brain tumors in vivo and in vitro. *Cancer Res.* 56(2):384-92.

Yana, I., Weiss, S.J. (2000) Regulation of membrane type-1 matrix metalloproteinase activation by proprotein convertases. *Mol. Biol. Cell.* 11(7):2387-2401.

Ye, S., Humphries, S., Henney, A. (1998) Matrix metalloproteinases-implication in vascular matrix remodelling during atherogenesis. *Clin. Sci.* 94, 103-110.

Yu, M., Sato, H., Seiki, M., Spiegel, S., Thompson, E.W. (1997) Calcium influx inhibits MT1-MMP processing and blocks MMP-2 activation. *FEBS Lett.* 412(3):568-72.

Zhou, A., Webb, G., Zhu, X., Steiner, D.F. (1999) Proteolytic processing in the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 274, 20745-20748.

Zucker, S., Drews, M., Conner, C., Foda, H.D., DeClerck, Y.A., Langley, K.E., Bahou, W.F., Docherty, A.J.P., Cao, J. (1998) Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) binds to the catalytic domain of the cell surface receptor, membrane type matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP). *J. Biol. Chem.* 273, 1216-1222.

Lebenslauf

geb. am/in 23.03.1971 in Rüthen
Staatsangehörigkeit deutsch
Familienstand ledig

Schulbildung Grundschule Rüthen
vom 01.08.1977 bis 30.06.1981
Gymnasium Rüthen
vom 01.08.1981 bis 30.06.1990

Abschluß Hochschulreife / Abitur

Zivildienst Caritasverband für den Kreis Soest E. V.
(Individuelle Schwerstbehinderten-Betreuung)
vom 02.07.1990 bis 30.09.1991

Wissenschaftliche Ausbildung Georg-August-Universität, Göttingen
WS 91/92 bis SS 92
Studiengang Physik

Universität Bielefeld
WS 92/93 bis SS 98
Studiengang Chemie

Abschluß Diplom im Fachbereich Chemie/Biochemie I
unter Leitung von Prof. Dr. H. Tschesche
Titel der Diplomarbeit: „Gezielte Mutationen zur
Stabilisierung der membranständigen Matrix
Metalloproteinase-1 (MT1-MMP)“
(Gesamtnote: sehr gut)

Weiterführende Studien ab 01.08.1998 Promotionsstudium
an der Universität Bielefeld
im Fachbereich Chemie/Biochemie I unter
Leitung von Prof. Dr. H. Tschesche
Titel der Doktorarbeit: „Klonierung, Expression und
Charakterisierung der Ektodomäne der MT1-MMP“

Roderfeld, Martin
Splittenbreite 5
33613 Bielefeld
(Tel.: 0521/893025)
e-mail: martin@roderfeld.de