

*Entwicklung eines MMP-13-ELISAs
zur Untersuchung pathophysiologischer Prozesse*

Dissertation

zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades

Bernd Hantke

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

2003

für meine Frau Birgit

Danksagung

Die experimentellen Arbeiten dieser Dissertation wurden in der Zeit von September 1998 bis Juni 2002 unter der Leitung von Prof. Dr. Harald Tschesche an der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld durchgeführt. Ihm möchte ich für diese interessante und vielseitige Themenstellung herzlich danken. Sein stetes Interesse am Fortgang der Experimente, seine zahlreichen Ratschläge sowie seine ständige Bereitschaft zur Diskussion haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Knut Kleesiek vom Herz- und Diabeteszentrum NRW in Bad Oeynhausen danke ich für seine Bereitschaft zur Übernahme des Korreferats.

Ein besonderer Dank gilt weiterhin allen Kollegen der Arbeitsgruppe Biochemie I, die eine angenehme und äußerst kollegiale Arbeitsatmosphäre geschaffen haben. Vor allem die zahlreichen Diskussionen mit Herrn Dr. Bernd Mühlenweg, Herrn Dr. Oliver Hiller, Herrn Tim Fischer, Herrn Dr. Jörg Stute, Herrn Dr. Andreas Kocourek, Herrn Andreas Henke, Herrn Dr. Martin Roderfeld, Frau Martina Mahne und Frau Annika Grabbe waren für eine erfolgreiche Arbeit unentbehrlich. Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. Herbert Wenzel und Herrn Rainer Beckmann für ihre stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung bedanken, ebenso wie bei Herrn Marc-Oliver Luther für die Proteinanalysen und Herrn Nils Paulmann für seine hilfreiche Tätigkeit im Rahmen des Blockpraktikums.

Für die gute Zusammenarbeit während der Laborarbeiten und bei der Veröffentlichung der Ergebnisse möchte ich neben den oben bereits genannten Personen ebenso Frau Ingeborg Claes von der BioCheck GmbH in Münster, Herrn Prof. Dr. Jörg Bergemann, Frau Dr. Christine Lahmann, Frau Kirsten Venzke und Herrn Dr. Franz Stüb von der Beiersdorf AG in Hamburg sowie Frau Prof. Dr. Nadia Harbeck, Frau Prof. Dr. Barbara Schmalfeldt, Frau Anita Welk, Herrn Prof. Dr. Manfred Schmitt von der Klinischen Forschergruppe der Frauenklinik und Herrn Dr. Peter Diehl von der Orthopädischen Klinik der TU München herzlich danken.

Ein weiterer Dank geht an Herrn Michael Brombach von der W.V. Westfalia Druck GmbH in Paderborn für seine Unterstützung im Zusammenhang mit der Erstellung dieser Dissertation. Die Verwendung einiger Abbildungen für diese Dissertation wurde freundlicherweise von der Aventis Pharma Deutschland GmbH, der Beiersdorf AG, der Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, der Signum Communication GmbH sowie von der Royal Society of Chemistry (RSC) im Auftrag der European Society for Photobiology und der European Photochemistry Association genehmigt.

1	EINLEITUNG	1
<hr/>		
1.1	Extrazelluläre Matrix	1
1.2	Matrix-Metalloproteinasen	2
1.2.1	Domänenstruktur und Substratspezifität	3
1.2.2	Regulation	5
1.2.3	Pathologische Prozesse	7
1.2.4	Kollagenase-3	8
1.3	Lichtalterung der Haut	10
1.3.1	Aufbau der Haut	10
1.3.2	UV-Strahlung	13
1.3.3	Reaktive Sauerstoffspezies	14
1.3.4	Photoaging: UV-induzierte Hautalterung	15
1.3.5	Flavonoide	16
1.4	Aseptische Hüftprothesenlockerung	18
1.4.1	Endoprothese	18
1.4.2	MMPs im synovial-ähnlichen Interfacegewebe	18
1.5	Tumorbildung und Metastasierung	20
1.5.1	Entstehung von Krebs	20
1.5.2	Behandlungsmethoden	24
1.5.3	Ovarialkarzinom	25
1.5.4	Tumor- und Prognosemarker	26
1.6	Zusammenfassung der Arbeit	28
2	METHODEN	30
<hr/>		
2.1	Expression der katalytischen Domäne der MMP-13	30
2.1.1	Übernachtskulturen	30
2.1.2	Genexpression	31
2.1.3	Isolierung der Inclusion-Bodies	31
2.1.4	Renaturierung des rekombinanten Proteins	32
2.2	Kultivierung und UVA-Bestrahlung von HDF	33
2.2.1	HDF in Monolayern	33
2.2.2	HDF in Kollagen-Gelen	34
2.2.3	Cytotox-Assay für 8PN und DMSO	34
2.2.4	Inkubation mit Additiven	35
2.2.5	UVA-Bestrahlung	35
2.2.6	Bestimmung der Zellzahl	36
2.2.7	TaqMan-RT-PCR	36
2.3	Protein-Analytik	37

2.3.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
2.3.2	Western-Blot	38
2.3.3	Protein-Sequenzierung	39
2.3.4	MALDI-TOF-Massenspektrometrie	39
2.3.5	Bestimmung der Proteingesamtkonzentration	40
2.3.6	ELISA-Messungen	41
2.3.7	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	43
2.4	Protein-Isolierung und -Reinigung	44
2.4.1	Klinische Daten zur Aszitesflüssigkeit	44
2.4.2	Affinitätschromatographie mit MaxiSorp-Granulat	45
2.4.3	Affinitätschromatographie mit einem Hydroxamat-Inhibitor	45
2.4.4	Ultrafiltration	46
2.4.5	Ionenaustausch-Chromatographie	46
2.4.6	Gelfiltration	47
2.4.7	Reversed-Phase-HPLC	47
2.5	Enzymaktivität	48
2.5.1	Aktivierung mit Quecksilber(II)-chlorid	48
2.5.2	Zymographie	48
2.5.3	Aktivitätstest mit dem Mca-Peptid	49
2.5.4	Spezifische Aktivitäts-Assays	49
3	ERGEBNISSE	50
<hr/>		
3.1	Expression der katalytischen Domäne der MMP-13	50
3.1.1	Expression in E.coli	50
3.1.2	Renaturierung und Reinigung	51
3.2	Entwicklung und Anwendung eines MMP-13-ELISAs	55
3.2.1	Entwicklung des ELISAs	55
3.2.2	Qualitätstests	56
3.2.3	ELISA-Messungen bei verschiedenen pathophysiologischen Prozessen	58
3.3	MMPs und TIMPs in Aszitesflüssigkeit – Korrelation mit dem klinischen Verlauf beim Ovarialkarzinom	60
3.3.1	Bestimmung von MMPs und TIMPs in Aszitesflüssigkeit	60
3.3.2	Korrelation mit den klinischen Daten	62
3.3.3	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie von Tumorzellen	63
3.4	Isolierung nativer MMP-13 aus Aszitesflüssigkeit	65
3.4.1	Optimale Bedingungen für die Affinitätschromatographie	65
3.4.2	Proteinisolierung aus Aszitesflüssigkeit	67
3.4.3	Identifizierung des isolierten Proteins	67
3.5	Erhöhter MMP-13-Gehalt bei aseptischer Hüftprothesenlockerung	69

3.6	Einfluß von Flavonoiden und Vitaminen auf die MMP- und TIMP-Expression dermalen Fibroblasten nach UVA-Bestrahlung	70
3.6.1	Kultivierung von HDF	70
3.6.2	Cytotox-Assays	70
3.6.3	Inkubation mit Flavonoiden und Vitaminen	71
3.6.4	UVA-Bestrahlung	71
3.6.5	Aktivitätsmessungen	72
3.6.6	Bestimmung von MMPs und TIMPs	73
4	DISKUSSION	79
<hr/>		
4.1	Von der Expression zum ELISA	79
4.1.1	Expression und Reinigung der katalytischen Domäne	79
4.1.2	Isolierung nativer MMP-13 aus Aszitesflüssigkeit	79
4.1.3	MMP-13-ELISA	81
4.2	MMP-13 in pathologischen Prozessen	83
4.2.1	Möglicher prognostischer Marker beim Ovarialkarzinom	83
4.2.2	Einfluß auf die aseptische Hüftprothesenlockerung	85
4.3	Beeinflussung der MMP-Aktivität UV-bestrahlter HDF	87
4.3.1	Kultivierung und UV-Bestrahlung von HDF	87
4.3.2	Einfluß von Flavonoiden und Vitaminen	88
4.3.3	Schutz der Haut vor lichtinduzierter Hautalterung	90
5	LITERATUR	92
<hr/>		

Abkürzungen

8PN	8-Prenylnaringenin
ADAM	a disintegrin and metalloproteinase
AFP	α_1 -Fetoprotein
AGR	α -Glucosylrutin
a.i.	absolute intensity
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	bicinchoninic acid
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoyl-phosphat
bFGF	basic fibroblast growth factor
BPB	Bromphenolblau
CA	cancer antigen
CEA	carcinoembryonic antigen
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
ECM	extracellular matrix
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immuno-sorbent assay
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
HaCaT	human adult low calcium high temperature
HCG	human chorionic gonadotropin
HDF	humane dermale Fibroblasten
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure
HPLC	high performance liquid chromatography
HPO	horseradish peroxidase
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
kDa	Kilo-Dalton
LB	Luria Broth
LMW	low molecular weight
MALDI	matrix assisted laser desorption ionization
Mca	(7-Methoxycoumarin-4-yl)acetyl
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger ribonucleic acid

MT	membrane type
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
OD	optische Dichte
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1
PBS	phosphate buffered saline
PBST	phosphate buffered saline Tween20
PSA	prostate-specific antigen
PUMP	putative metalloproteinase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	ribonucleic acid
ROS	reactive oxygen species
RSA	Rinderserumalbumin
RT	reverse transcriptase
PCR	polymerase chain reaction
SCC	squamous cell carcinoma
SD	standard deviation
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	standard error of the mean
TBS	Tris buffered saline
TBST	Tris buffered saline Tween20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinases
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylendiamin
TOF	time of flight
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
uPA	urokinase-type plasminogen activator
UV	ultraviolett
VEGF	vascular endothelial growth factor

Aminosäuren

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

1 EINLEITUNG

1.1 Extrazelluläre Matrix

Die vielfältigen Funktionen tierischer Organismen erfordern ein komplex aufgebautes, an die jeweiligen gewebespezifischen Anforderungen angepaßtes Bindegewebe. Zwischen den einzelnen Zellen liegt die extrazelluläre Matrix (ECM), ein makromolekulares Netzwerk aus fibrillären Proteinen (z.B. Kollagenen, Fibronectin, Laminin), verschiedenen Glykoproteinen und Proteoglykanen (s. Abb. 1.4, S. 12). Die extrazelluläre Matrix bildet einerseits Strukturen mit besonderen mechanischen Eigenschaften aus, wie zum Beispiel die Stützfunktion des Gewebes, andererseits ermöglicht sie die Kommunikation der Zellen mit ihrer Umgebung. Ebenso wird die Zell-Adhäsion, ein entscheidender Schritt bei der Zellwanderung, durch ECM-Komponenten vermittelt. Die Bedeutung der extrazellulären Matrix samt der darin eingebetteten Zellen wird durch ihre Beteiligung an verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen ersichtlich, wie Wundheilung, Embryonalentwicklung, Knochenwachstum, rheumatoide Arthritis (*Sternlicht & Werb, 2001*), Lichtalterung der Haut (s. Abs. 1.3) oder Tumorentstehung und Metastasierung (s. Abs. 1.5).

Um notwendige Gewebeveränderungen im Rahmen physiologischer Prozesse gewährleisten zu können, sezernieren die Zellen der extrazellulären Matrix zahlreiche gewebeabbauende Enzyme. Da die Integrität der Matrix sowie die physiologischen Prozesse ein fein reguliertes Gleichgewicht zwischen Katabolismus und Anabolismus erfordern, sind diese Proteasen im Zusammenspiel mit ihren natürlichen Inhibitoren für viele Vorgänge von zentraler Bedeutung. Zu den vier Hauptklassen proteolytisch wirkender Enzyme, die am Abbau der extrazellulären Matrix beteiligt sind, gehören die Serinproteasen (z.B. Plasmin), die Cysteinproteasen (z.B. Kathepsine B, L und H), die Aspartatproteasen (z.B. Kathepsin D) und die Metalloproteasen. Zu der letztgenannten Gruppe zählen neben den ADAMs (*Blobel, 2002*) vor allem die Matrix-Metalloproteasen (MMPs), denen eine besondere Bedeutung zukommt, da sie in der Lage sind, die meisten Komponenten der extrazellulären Matrix abzubauen (*Birkedal-Hansen et al., 1993; Johnson et al., 1998*).

1.2 Matrix-Metalloproteinasen

Bereits vor mehreren Jahrzehnten begann mit der Entdeckung einer Protease aus Kaulquappen, die im neutralen pH-Bereich aktiv ist und Bestandteile der extrazellulären Matrix abbaut (*Gross & Lapiere, 1962*), die Erforschung dieser ECM-abbauenden Enzyme. Es zeigte sich, daß es sich dabei um eine relativ große Enzymfamilie handelt: die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) mit bisher insgesamt 24 bei Wirbeltieren entdeckten Mitgliedern, von denen 23 beim Menschen nachgewiesen wurden (*Visse & Nagase, 2003*).

MMP	Name	Literaturangabe
MMP-1	Interstitielle Kollagenase	<i>Bauer et al., 1970</i>
MMP-2	Gelatinase A	<i>Sellers et al., 1978</i>
MMP-3	Stromelysin-1	<i>Chin et al., 1985</i>
MMP-7	Matrilysin / PUMP	<i>Woessner & Taplin, 1988</i>
MMP-8	Neutrophile Kollagenase	<i>Hasty et al., 1987</i>
MMP-9	Gelatinase B	<i>Murphy et al., 1989</i>
MMP-10	Stromelysin-2	<i>Jung et al., 1990</i>
MMP-11	Stromelysin-3	<i>Basset et al., 1990</i>
MMP-12	Makrophagen-Elastase	<i>Shapiro et al., 1992</i>
MMP-13	Kollagenase-3	<i>Freije et al., 1994</i>
MMP-14	MT1-MMP	<i>Sato et al., 1994</i>
MMP-15	MT2-MMP	<i>Will & Hinzmann, 1995</i>
MMP-16	MT3-MMP	<i>Takino et al., 1995</i>
MMP-17	MT4-MMP	<i>Puente et al., 1996</i>
MMP-18	Kollagenase-4	<i>Stolow et al., 1996</i>
MMP-19	RASI-1	<i>Pendas et al., 1997</i>
MMP-20	Enamelysin	<i>Bartlett et al., 1996</i>
MMP-21	Xenopus-MMP	<i>Ahokas et al., 2002</i>
MMP-22	Chicken-MMP	<i>Yang & Kurkinen, 1998</i>
MMP-23	Cystein Array-MMP	<i>Velasco et al., 1999</i>
MMP-24	MT5-MMP	<i>Llano et al., 1999</i>
MMP-25	MT6-MMP	<i>Pei, 1999</i>
MMP-26	Matrilysin-2 / Endometase	<i>Park et al., 2000</i>
MMP-28	Epilysin	<i>Marchenko & Strongin, 2001</i>

Tab. 1: Enzymfamilie der Matrix-Metalloproteinasen

Diese Proteasen, die häufig auch als Matrixine bezeichnet werden, bilden eine Familie von Zn^{2+} - und Ca^{2+} -abhängigen Endopeptidasen, die von verschiedenen Zelltypen (zum Beispiel polymorphkernigen neutrophilen Leukozyten, Makrophagen, Osteoblasten und Fibroblasten) sezerniert werden. Ihre Substrate sind alle Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix, also beispielsweise Kollagen, Fibronectin, Laminin, Aggrecan oder Elastin. Die meisten MMPs besitzen neben ihrer Numerierung einen von ihrem Vorkommen oder ihrer Substratspezifität abgeleiteten Namen (s. Tab. 1).

1.2.1 Domänenstruktur und Substratspezifität

Die humanen MMPs lassen sich gemäß ihrer Domänenstruktur (s. Abb. 1.1) und Substratspezifität in die Untergruppen der Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine und MT-MMPs (membrane-type-MMPs) unterteilen (*Bode et al., 1999*). An das Signalpeptid (ca. 17 Aminosäuren) schließt sich bei sämtlichen Mitgliedern der MMP-Familie die Prodomäne (ca. 80 Aminosäuren) an, welche die sogenannte „Cystein-Switch“-Sequenz (*Van Wart & Birkedal-Hansen, 1990*) enthält. Alle Matrixine verfügen neben dem Propeptid auch über eine katalytische Domäne (ca. 170 Aminosäuren) am N-Terminus, die ein für die Substratbindung essentielles Zinkion enthält. Die katalytische Domäne ist über eine sehr flexible, Prolin-reiche Sequenz, die sogenannte Hinge-Region, mit der C-terminalen Domäne verbunden, die vier Wiederholungen (ca. 50 Aminosäuren) einer Sequenzhomologie mit Hämopexin und Vitronectin enthält und daher auch Hämopexin-ähnliche Domäne genannt wird. Die membranständigen MT-MMPs verfügen, im Gegensatz zu den löslichen MMPs, über eine zusätzliche Domäne, durch die eine Verankerung der Enzyme in Membranen ermöglicht wird (*Sato et al., 1994*).

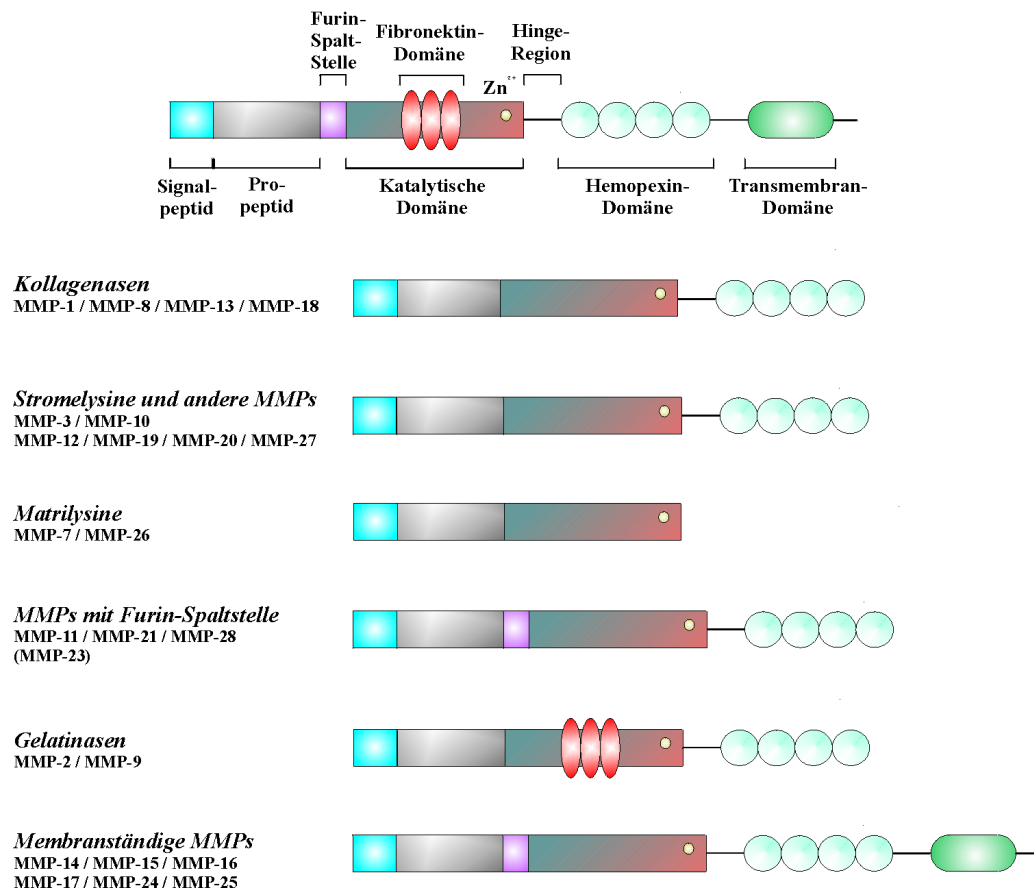


Abb. 1.1: Domänenstruktur der Matrix-Metalloproteinasen [nach (Schröder, 2001)]

Anmerkung: MMP-21 besitzt zusätzlich zur abgebildeten Struktur eine Vitronectin-Domäne, während MMP-23 nicht die abgebildete Hämopexin-Domäne, dafür aber eine Cystein-Array-Region, eine IgG-ähnliche sowie eine Transmembran-Domäne besitzt.

Die Kollagenasen werden von verschiedenen Zellen exprimiert. MMP-1 wird hauptsächlich von Fibroblasten und Makrophagen, MMP-8 u.a. von Leukozyten sezerniert, während MMP-13 von Chondrozyten, Monozyten sowie verschiedenen invasiven malignen Tumorzellen exprimiert wird (Ravanti & Kähäri, 2000). Die Kollagenasen spalten die α -Ketten des tripelhelikalen fibrillären Kollagens in charakteristische $\frac{1}{4}$ - und $\frac{3}{4}$ -Fragmente. Obwohl sie ähnliche kollagenolytische Eigenschaften besitzen, existieren Unterschiede zwischen den einzelnen Kollagenasen bezüglich ihrer Aktivität gegenüber den verschiedenen Kollagen-Typen (Kähäri & Saarialho-Kere, 1997). Die Substratspezifität der Kollagenasen wird vermutlich durch die Hämopexin-ähnliche Domäne bedingt (Murphy & Knäuper, 1997).

MMP-2 (Gelatinase A) wird von mehreren Bindegewebszellen sezerniert, MMP-9 (Gelatinase B) hauptsächlich von Leukozyten und Makrophagen. Das bevorzugte Substrat dieser Proteasen ist Gelatin (denaturiertes Kollagen). Tumorzellen produzieren ebenfalls diese beiden Enzyme, die – im Gegensatz zu den Kollagenasen – das Typ IV-Kollagen der Basalmembran abbauen können. Aus diesem Grund werden die Gelatinasen mit der Invasion und Metastasierung von Tumorzellen in Verbindung gebracht (*Duffy, 1996*). Stromelysin-1 (MMP-3) und Stromelysin-2 (MMP-10), die von Fibroblasten und Keratinozyten exprimiert werden, besitzen eine breite ECM-Substratspezifität, ebenso wie das von Monozyten und Tumorzellen sezernierte Matrilysin (MMP-7). Alle sechs MT-MMPs konnten auf Tumorzellen nachgewiesen werden, weshalb eine Beteiligung dieser membranständigen Protease-Gruppe am Tumorgehen diskutiert wird (*Ravanti & Kähäri, 2000*).

Mehrere Mitglieder der MMP-Enzymfamilie lassen sich aufgrund von mangelnder Homologie oder unbekannter Substrate keiner der oben genannten Untergruppen zuordnen. Das gesamte Spektrum potentieller Substrate der MMPs ist derzeit allerdings noch nicht vollständig bekannt. Zwar wurden grundlegende Zusammenhänge erkannt und bereits zahlreiche Substrate identifiziert, doch existieren naturgemäß Schwierigkeiten, *in vivo*, also z.B. am Tumor, die verschiedenen nachweisbaren Degradationsprodukte den einzelnen Proteinase zuzuordnen. Eine besondere Problematik bei der Untersuchung der MMP-Spezifitäten ergibt sich hierbei durch die Vielzahl der gleichzeitig im Gewebe nachweisbaren Proteinase und der entsprechenden Anzahl an potentiellen Substraten. Daher lassen sich eindeutige Nachweise zunächst nur *in vitro* erbringen, weil nur hier eine genau definierte Beschränkung auf zuvor definierte Proteasen und Substrate erfolgen kann.

1.2.2 Regulation

Unter physiologischen Bedingungen ist die Expression und Aktivierung der MMPs ein streng kontrollierter Prozeß. Die Matrixine werden auf der Ebene der Transkription und Zymogen-Aktivierung reguliert. Darüber hinaus kann ihre Aktivität durch natürliche spezielle Inhibitoren, den sogenannten TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) (*Tschesche, 1998*), chemische MMP-Inhibitoren (*Chambers & Matrisian, 1997*) und unspezifische Proteinase-

Inhibitoren wie α_2 -Makroglobulin (*Woessner, 1999*) gehemmt werden. Die für MMPs spezifische TIMP-Familie, von denen bislang vier Mitglieder (TIMP-1, -2, -3 und -4) bekannt sind, bilden nicht-kovalente, unter physiologischen Bedingungen irreversible Komplexe mit den MMPs (*Bode & Maskos, 2003*). Gerät die Regulation der Matrixine ins Ungleichgewicht, so kann dies schwerwiegende pathologische Folgen haben (s. Abs. 1.2.3).

Der Expressionslevel der MMPs ist in vivo sehr gering. Die Expression wird unter anderem durch Cytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone reguliert. Der Einfluß dieser Faktoren auf die Transkription ist vom Zelltyp und der jeweiligen MMP abhängig (*Birkedal-Hansen et al., 1993; Ries & Petrides, 1995*). Bezüglich der Aktivierung der latenten Protease werden folgende Aktivierungsmechanismen für die Matrixine diskutiert (*Woessner & Nagase, 2000*): die intrazelluläre Aktivierung vor der Sekretion (z.B. durch Furin), die Aktivierung auf der Zelloberfläche durch membranständige Proteasen sowie die extrazelluläre Aktivierung durch bereits katalytisch wirksame MMPs oder das Plasminogen-Aktivator-Plasmin-System. Für viele MMPs wurde diese schrittweise extrazelluläre Aktivierung ihrer Proform nachgewiesen, deren Mechanismus durch die „Cystein-switch“-Hypothese (*Van Wart & Birkedal-Hansen, 1990*) beschrieben wird. Danach besteht eine Wechselwirkung zwischen der Thiolgruppe des propeptidischen Cysteins und dem Zinkion des aktiven Zentrums. Diese Wechselwirkung konserviert das inaktive Zymogen, indem sie die für die Katalyse notwendige Anlagerung eines Wassermoleküls an das Zinkion verhindert. Der entscheidende Schritt der Aktivierung besteht nun darin, diese Wechselwirkung zu schwächen bzw. zu unterbinden, und damit die Wasseranlagerung zu ermöglichen. Dies kann durch Spaltung des Propeptids (durch Proteasen), Modifizierung der Thiolgruppe des Cysteins (durch SH-aktive Substanzen) oder durch Störung der dreidimensionalen Struktur (durch einige denaturierende Reagenzien) geschehen. Die dadurch entstehenden, aktivierten MMPs gelangen durch autokatalytische Spaltung der Prodomäne zu ihrer katalytisch aktiven Form (Abb. 1.2). Aus diesen Erkenntnissen ergeben sich Überlegungen bezüglich einer proteolytischen Kaskade, deren physiologische Relevanz weiterer Aufklärung bedarf (*Murphy & Knäuper, 1997; Nagase, 1997*).

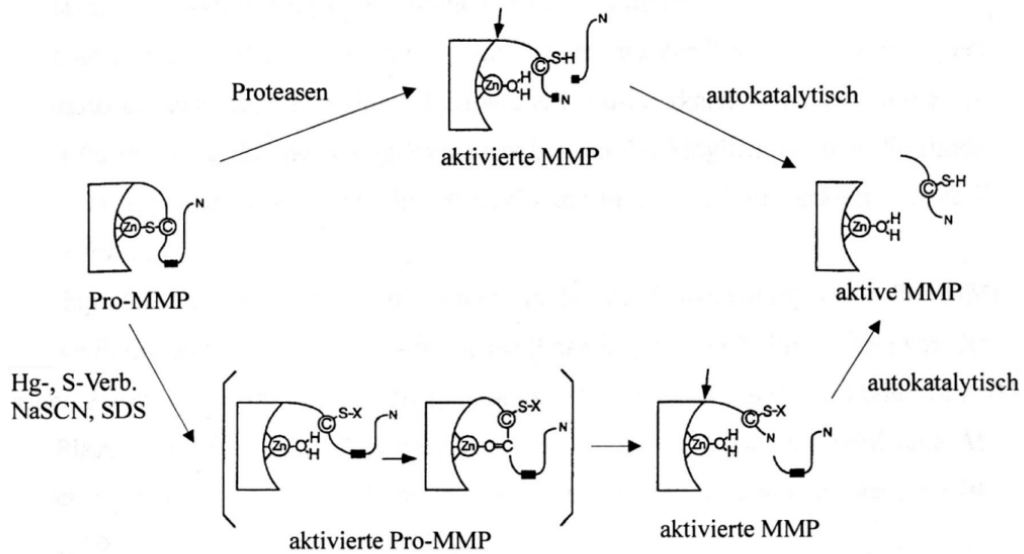


Abb. 1.2: Schrittweise Aktivierung von pro-MMPs [nach (Nagase, 1997)]

1.2.3 Pathologische Prozesse

Der kontrollierte Abbau der extrazellulären Matrix ist ein essentieller Schritt bei einer Vielzahl physiologischer Prozesse, die mit dem Umbau von Bindegewebe einhergehen, wie etwa der Embryonalentwicklung, der postpartalen Involution, dem Knochenwachstum und -abbau oder der Wundheilung (Birkedal-Hansen et al., 1993; Armstrong & Jude, 2002). Exzessiver Bindegewebsabbau aufgrund eines Ungleichgewichts zwischen aktiven MMPs und TIMPs spielt eine wichtige Rolle bei zahlreichen pathologischen Prozessen, wie zum Beispiel Atherosklerose (Galis et al., 1995), Osteo- und rheumatoide Arthritis (Johnson et al., 1998), Fibrose (Trojanowska et al., 1998), Lungenemphysem (Hautamaki et al., 1997), lichtinduzierte Hautalterung (Scharffetter-Kochanek et al., 2000), Melanombildung (Hofmann et al., 2000), aseptische Hüftprothesenlockerung (Takagi, 1996) oder Tumorerkrankung und Metastasierung (Stamenkovic, 2000; Foda & Zucker, 2001). Ein wesentlicher Einfluß der MMPs wird auch bei Erkrankungen des zentralen Nervensystems (Yong et al., 1998) und der Multiplen Sklerose (Chandler et al., 1997) diskutiert.

1.2.4 Kollagenase-3

Eine Untergruppe der MMPs sind die Kollagenasen, zu denen die interstitielle Kollagenase (MMP-1), die neutrophile Kollagenase (MMP-8), die Kollagenase-3 (MMP-13) sowie die Kollagenase-4 (MMP-18) gehören (s. Abb. 1.1, S. 4). Sie katalysieren die Spaltung des tripelhelikalen Kollagens der Typen I, II und III zwischen Gly⁷⁷⁵ und Ile⁷⁷⁶ in der α 1-Kette bzw. zwischen Gly⁷⁷⁵ und Leu⁷⁷⁶ in der α 2-Kette, wodurch typische $\frac{3}{4}$ -Fragmente des N-Terminus und $\frac{1}{4}$ -Fragmente des C-Terminus der Tripelhelices entstehen, die bei 37°C spontan zu Gelatin denaturieren. Während Kollagen Typ I und II hauptsächlich von MMP-8 abgebaut wird, ist Kollagen Typ III das bevorzugte Substrat der MMP-1 (*Hasty et al., 1987*). Verglichen mit anderen MMPs besitzt MMP-13 eine außerordentlich breite Substratspezifität und degradiert vorrangig Kollagen Typ II, aber auch Typ I, III, IV, IX, X und XIV. Weitere Substrate der Kollagenase-3 sind Gelatin, Fibronectin, Fibrillin, Aggrecan und Kernproteine anderer Proteoglykane (*Knäuper et al., 1996a*).

Die humane Kollagenase-3 wurde zuerst im Gewebe eines Brust-Karzinoms entdeckt. Die Primärstruktur weist eine 86%-ige Homologie mit der interstitiellen Kollagenase von Ratte und Maus auf, während die Übereinstimmung mit der humanen MMP-1 jedoch nur 50% beträgt (*Freije et al., 1994*). Die MMP-13 wird als 60 kDa großes Proenzym sekretiert und geht durch Abspaltung des Propeptids in die aktive Form (48 kDa) über (*Cowell et al., 1998*). Aktiviert wird sie durch MMP-2, MT1-MMP und einige andere Proteasen, wobei deren Bedeutung für die Aktivierung der Kollagenase-3 in vivo teilweise noch genauer untersucht werden muß (*Knäuper et al., 1996b*). Sowohl TIMP-1 als auch TIMP-2 hemmen die MMP-13 durch Bildung eines inaktiven Komplexes.

Man kennt bisher nur wenige physiologische Situationen, in denen MMP-13 exprimiert wird. Kollagenase-3 tritt bei Prozessen wie fetaler Knochenbildung, postnatalem Knochenumbau (*Johansson et al., 1997*) und Wundheilung des Zahnfleisches (*Ravanti et al., 1999a*) auf, in denen ein schneller und effektiver Umbau von kollagenhaltiger ECM notwendig ist. Auf der anderen Seite wird MMP-13 in vivo verstärkt unter pathologischen Bedingungen exprimiert, die durch übermäßigen Abbau von kollagenreicher ECM charakterisiert sind. Dies sind zum Beispiel chronische Hautgeschwüre (*Saarialho-Kere, 1998*), Gelenkentzündungen, rheuma-

toide Arthritis (*Wernicke et al., 1996*), Osteoarthritis (*Mitchell et al., 1996*), arteriosklerotische Plaques (*Yoon et al., 2002*) und aseptische Hüftprothesenlockerung (*Imai et al., 1998; Diehl et al., 2003*). Die Expression von MMP-13 wird auch bei verschiedenen invasiven, bösartigen Tumoren beobachtet (*Balbin et al., 1999*), wie beispielsweise Brustkrebs (*Freije et al., 1994; Nielsen et al., 2001*), Plattenepithelkarzinomen des Kopfes und des Nackens (*Kähäri et al., 1998*), Karzinomen der Basalzellen der Haut (*Hattori et al., 2003*) oder Darmkrebs (*Lee-man et al., 2002*). Aufgrund des in klinischen Studien nachgewiesenen Zusammenhangs zwischen MMP-13-Expression und Tumorinvasion bzw. Metastasierung bei einigen Krebsarten stellt die Synthese spezifischer MMP-13-Inhibitoren sowie die Inhibierung der Signaltransduktionswege, die die MMP-13-Expression durch Tumorzellen vermitteln, aktuelle Ansätze zur Krebstherapie dar (*Pendas et al., 2000*).

1.3 Lichtalterung der Haut

1.3.1 Aufbau der Haut

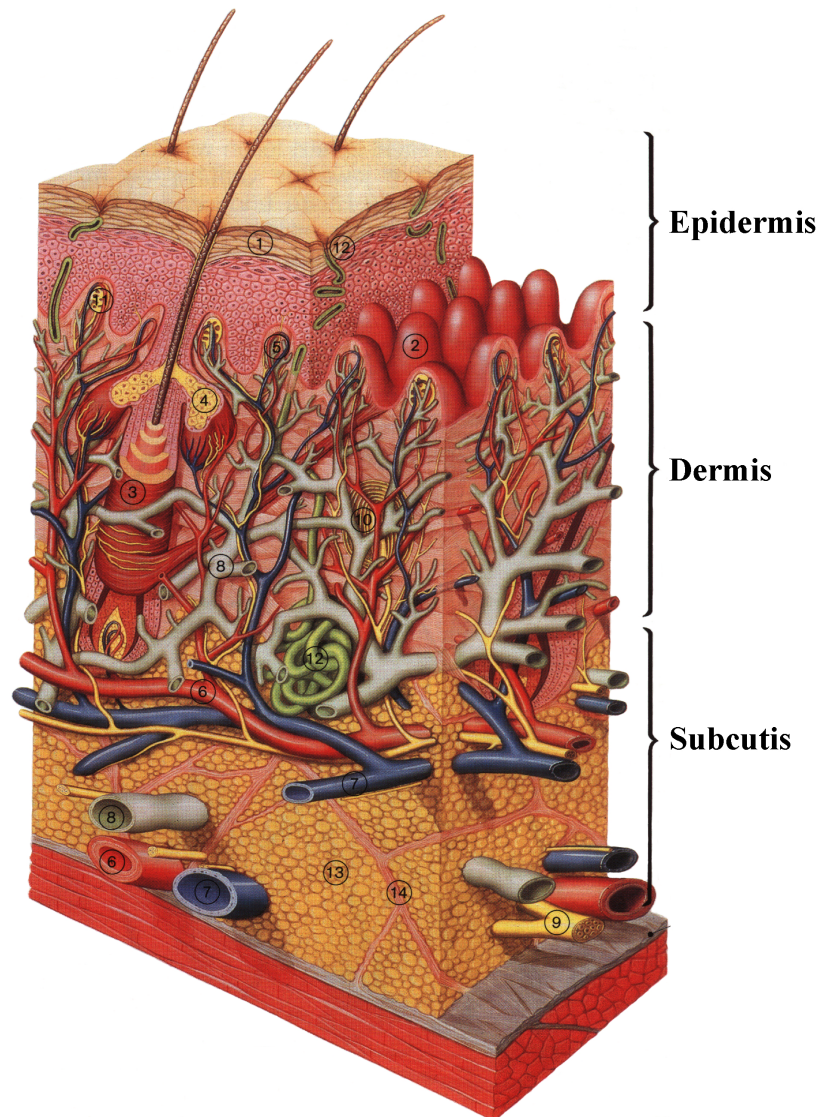


Abb. 1.3: Aufbau der Haut (Asmussen & Söllner, 1993):

- | | |
|----------------------------|----------------------------------|
| 1 : Hornschicht | 8 : Lymphgefäß |
| 2 : Coriumpapillen | 9 : Nerv |
| 3 : Haarfollikel | 10 : Vater-Pacini-Tastkörperchen |
| 4 : Talgdrüse | 11 : Meißnersches Tastkörperchen |
| 5 : Kapillarschlinge | 12 : Schweißdrüse |
| 6 : Arterie bzw. Arteriole | 13 : Subkutanes Fettgewebe |
| 7 : Vene bzw. Venole | 14 : Bindegewebsstränge |

Die Haut, das größte Organ des Menschen, muß vielfältige Funktionen erfüllen. So schützt sie den Körper beispielsweise vor UV-Strahlen, schädlichen Mikroorganismen, Hitze und Kälte, reguliert die Körpertemperatur und vermittelt alle von außen einwirkenden Reize. Man unterscheidet drei Gewebeschichten, aus denen die Haut aufgebaut ist (s. Abb. 1.3). Die äußere Schicht ist die Epidermis, an die sich die Dermis (auch Corium oder Lederhaut genannt) anschließt. Die darunterliegende Subcutis enthält Fett- und lockeres Bindegewebe und stellt die Verbindung zur angrenzenden glatten Muskulatur dar.

Während sich die Epidermis wiederum aus fünf Schichten zusammensetzt und ständig (innerhalb von 27 Tagen) komplett erneuert, unterscheidet man bei der Dermis, deren Zugfestigkeit und Elastizität auf ihrem hohen Anteil an miteinander verflochtenen Bindegewebsfasern beruht, histologisch zwei Schichten: die Zapfen- und die Netzschicht. Bindegewebige Papillen der Zapfenschicht verzahnen die Dermis mit der Epidermis und stellen deren Ernährung durch feine Kapillarschlingen sicher. In dieser Schicht liegen auch Tastsinnesorgane sowie Wärme- und Kälterezeptoren. Das Bindegewebe besteht neben Kollagen hauptsächlich aus Proteoglykanen (z. B. Aggrecan, Decorin, Versican) mit ihren Glykosaminoglykan-Seitenketten. Die dermalen Fibroblasten sind die Orte der Glykosaminoglykan-Produktion sowie der Kollagen- und Elastinsynthesen. Einzelne Fibroblasten differenzieren sich zu Fibrozyten, die sich über ihre langen Zellausläufer zu einem dreidimensionalen Netz verbinden. Im Interstitium, dem Raum zwischen dem Maschenwerk aus Fibrozyten, kollagenen und elastischen Bindegewebsfasern, können sich Bindegewebszellen, wie z.B. Fibroblasten, Makrophagen, Mastzellen, Lymphozyten, Plasmazellen und Monozyten, frei bewegen (s. Abb. 1.4). Die zweite Schicht der Dermis, die Netzschicht, enthält weniger freie Zellen. Ihre Kollagenfasern bilden ein dichtes Netzwerk, das überwiegend parallel zur Körperoberfläche ausgerichtet ist (*Asmussen & Söllner, 1993*).

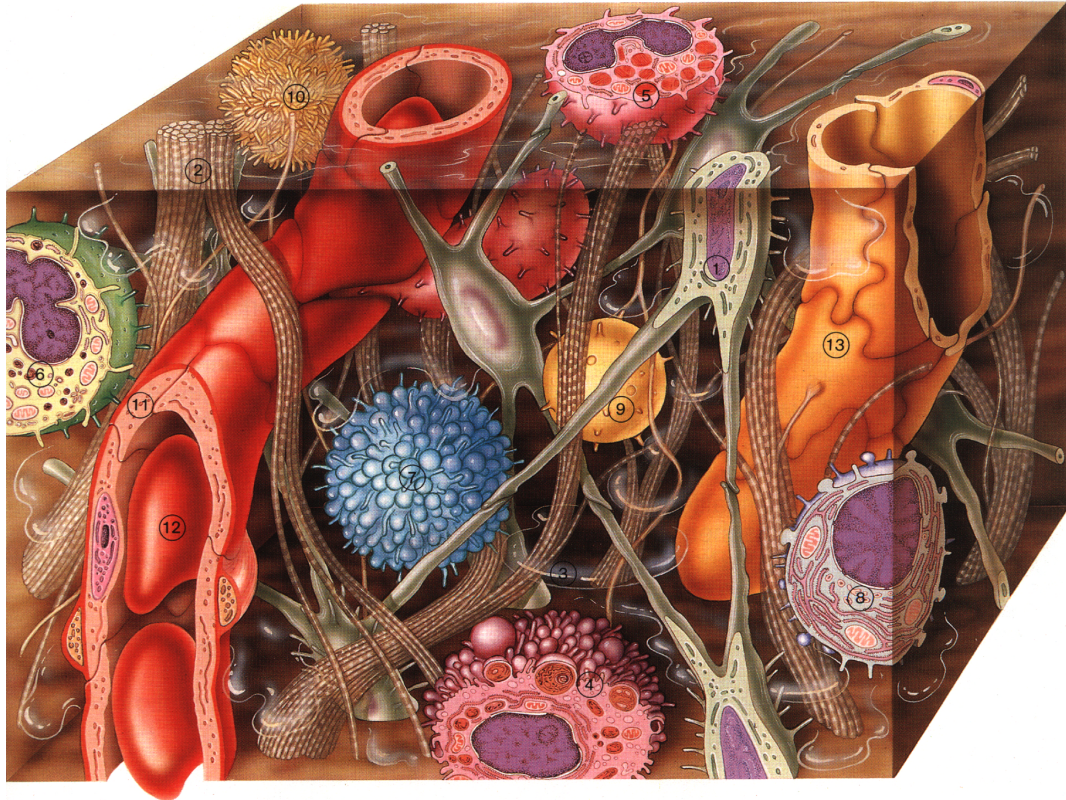


Abb. 1.4: Ausschnitt aus dem lockeren Bindegewebe der Dermis (Corium)
(Asmussen & Söllner, 1993):

Fibrozyten (1) verbinden sich mit ihren langen Fortsätzen zu einem Maschenwerk, das zusätzlich von kollagenen und elastischen Bindegewebsfasern (2) durchzogen wird. Den Raum dazwischen, das Interstitium, füllt die Interzellularsubstanz (3) aus. Darin können sich die freien Bindegewebszellen bewegen. Dies sind zum einen die großen Fresszellen (Makrophagen, 4) mit ihren unregelmäßigen Zellmembranausstülpungen (Mikrovilli) und den in Membranvesikeln eingeschlossenen, aufgenommenen Fremdkörpern, die kleinen Fresszellen (eosinophile Granulozyten, 5) mit ihren körnchenförmigen Zelleinschlüssen und die Monozyten (6), kleinere Fresszellen, die die Blutkapillaren verlassen können und somit ein Reservoir für die Gewebemakrophagen darstellen. Außerdem finden sich hier noch Mastzellen (7), die bei Entzündungen u.a. Heparin, Histamin, Serotonin und Proteinasen ausschütten, Plasmazellen (8) sowie B- und T-Lymphozyten (9, 10), die Bestandteil der spezifischen Immunabwehr sind. In der angeschnittenen Blutkapillare (11) sind rote Blutkörperchen (12) zu sehen. Rechts im Bild befindet sich ein initiales Lymphgefäß (13).

1.3.2 UV-Strahlung

Das Spektrum der Sonnenstrahlung setzt sich aus ultravioletter Strahlung (UVA, UVB und UVC), sichtbarem Licht und infraroter Strahlung zusammen. Während das sichtbare Licht etwa den Wellenlängen-Bereich von 400 bis 700 nm umfaßt, an den sich der infrarote Bereich ($\lambda > 700$ nm) anschließt, ist die UV-Strahlung energiereicher (UVA: 320-400 nm, UVB: 290-320 nm, UVC: 200-290 nm). Die von der Sonne emittierte komplette UVC- und etwa 90% der UVB-Strahlung werden in der Ozonschicht absorbiert oder gestreut, so daß neben dem sichtbaren und infraroten Licht nur UVA- und ein Teil der UVB-Strahlung die Erdoberfläche erreichen.

In Abhängigkeit von ihrer Wellenlänge dringen UV-Strahlen in die Haut ein, wo sie mit verschiedenen Zellen in verschiedenen Hautschichten interagieren. Dabei gelangt Strahlung mit größerer Wellenlänge tiefer in die Haut. UVB-Strahlung wird hauptsächlich in der Epidermis absorbiert, während UVA-Strahlung tiefere Hautzonen erreicht. Dementsprechend beeinflusst UVB vor allem Keratinozyten und andere epidermale Zellen, wohingegen UVA sowohl mit epidermalen als auch mit dermalen, wie z.B. HDF, in Wechselwirkung treten kann (*Krutmann, 2001*).

UV-Strahlung hat sowohl positive als auch negative Wirkungen auf die menschliche Haut. So wird zum Beispiel einerseits Vitamin D₃ (Calcio) in der Haut durch UV-Strahlung aus dessen Vorstufe Provitamin D₃ (7-Dehydrocholesterol) gebildet (*DeLuca, 1988*), andererseits werden aber auch die Lichtalterung (s. Abs. 1.3.4) sowie die Entstehung von Hautkrebs (*Ichihashi et al., 2003*) durch übermäßige UV-Exposition gefördert. Für die Induzierung von Melanomen wurde bis vor einigen Jahren in erster Linie die UVB-Strahlung verantwortlich gemacht, wobei es häufig zu Punktmutationen in der DNA, z.B. durch Pyrimidindimere, kommt (*Beissert & Granstein, 1996*). Es zeigte sich aber weiterhin, daß auch UVA durch seine erbgutschädigende und karzinogene Wirkung die Entstehung von Hautkrebs fördert, im Gegensatz zu UVB allerdings nicht durch charakteristische Punktmutationen im Tumor-Suppressor-Gen p53, sondern mittels sogenannter reaktiver Sauerstoffspezies als Mediatoren (*DeGrujil, 2002*).

1.3.3 Reaktive Sauerstoffspezies

Vor allem durch UV-Strahlung, aber auch durch Luftschadstoffe wie Ozon, entstehen auf der Hautoberfläche sowie in tieferen Hautschichten reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Dabei handelt es sich um reaktive Moleküle, wie beispielsweise Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), Superoxidationen (O_2^-), Peroxidationen (O_2^{2-}) bzw. Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxylradikale ($\text{HO}\bullet$). Die Haut besitzt Abwehrmechanismen gegen ROS in Form von enzymatischen (z.B. Katalase, Superoxiddismutase) und nicht-enzymatischen Antioxidantien (z.B. Ascorbat, Glutathion, α -Tocopherol, β -Carotin). Trotz dieser Vielzahl antioxidativer Systeme, kann es bei einem Übergewicht oxidativer Einflüsse zu „oxidativem Streß“ kommen, was zu Veränderungen von Proteinen, Kohlenhydraten, Lipiden und DNA führt.

Die durch UV-Licht erzeugten ROS können Effekte wie die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (*Wlaschek et al., 2001*), Lipidperoxidation (*Brenneisen et al., 1998*) sowie DNA-Einzelstrang-Brüche (*Nocentini et al., 2001*) hervorrufen. Es gibt auch Anzeichen dafür, daß hauptsächlich Singulett-Sauerstoff und Wasserstoffperoxid diejenigen ROS sind, die an einer UVA-abhängigen Induzierung von MMPs auf mRNA- und auf Proteinebene beteiligt sind (*Wlaschek et al., 1995; Wenk et al., 1999*). Weiterhin schwächen und schädigen ROS sowohl das enzymatische als auch das nicht-enzymatische antioxidative Abwehrsystem der Haut (*Scharffetter-Kochanek et al., 2000*), weshalb sie mit der Entstehung von verschiedensten Hautschäden in Verbindung gebracht werden (*Ichihashi et al., 2003*). Aus diesem Grund wird zur Verringerung von oxidativem Streß und damit von lichtinduzierten Hautschäden u.a. die Verwendung der Vitamine A, C und E (*Sorg et al., 2001*) sowie Zink (*Rostan et al., 2002*) als physiologische Antioxidantien diskutiert.

1.3.4 Photoaging: UV-induzierte Hautalterung

Übermäßige UV-Strahlung kann an der menschlichen Haut vielfältige schädigende Wirkungen entfalten, die zu einem beschleunigten und vorzeitigen Alterungsprozess der Haut, der sogenannten Lichtalterung („Photoaging“), führen können. Diese lichtinduzierte vorzeitige Hautalterung ist durch ausgeprägte Veränderungen in der Zusammensetzung der dermalen extrazellulären Matrix gekennzeichnet, was Falten, Schlaffheit, Blasenbildung, Rauheit und Verlust der Hauttönung zur Folge hat (*Kligman & Kligman, 1986; Scharffetter-Kochanek et al., 2000*). Die molekularen Ursachen für diese Veränderungen im kutanen Bindegewebe sind eine Erhöhung der Elastin-, Fibrillin- und Versicanmengen sowie verringerte Mengen an Typ I-Kollagen und Decorin (*Bernstein et al., 1994; Bernstein et al., 1995*). Andere Untersuchungen zeigen, daß Fibrillin-reiche Mikrofibrillen in lichtgealterter Haut vermindert sind (*Watson et al., 1999*). Es gibt deutliche Hinweise darauf, daß der Verlust von Typ I-Kollagen in derartig UV-geschädigter Haut sowohl durch dessen Abbau (*Fisher et al., 1996*) als auch durch Inhibierung der Synthese von pro-Kollagen (*Varani et al., 2001*) verursacht wird.

Sowohl die langwelligere UVA-Strahlung als auch die kurzwelligere UVB-Strahlung werden für Photo-Schäden der Haut verantwortlich gemacht. Um photoprotektive bzw. regenerative Ansätze zur Prophylaxe und Verminderung der Lichtalterung der menschlichen Haut entwickeln zu können, sind genaue Kenntnisse der zugrundeliegenden biochemischen Mechanismen notwendig. UVA-Strahlung induziert die Expression von MMP-1, MMP-2 und MMP-3 in humanen dermalen Fibroblasten *in vitro* und *in vivo* (*Scharffetter et al., 1991; Wlaschek et al., 1995*), während UVB die Expression von MMP-1, MMP-3 und MMP-9 in normaler humaner Epidermis fördert (*Fisher et al., 1996; Brenneisen et al., 2002*). Sowohl UVA- als auch UVB-Strahlung haben einen erhöhenden Einfluß auf die Expression von MMP-2 und MMP-9 in menschlicher Haut *in vivo* (*Koivukangas et al., 1994*). Auch Matrilysin (MMP-7) und die Makrophagenelastase (MMP-12) scheinen zur Umbildung elastotischer Bereiche sonnen-geschädigter Haut beizutragen (*Saarialho-Kere et al., 1999*). Neben der Induzierung von MMPs führt auch die durch UVA-Strahlung ausgelöste Induzierung von Mutationen in mitochondrialer DNA zum Photoaging (*Krutmann, 2001*). Die durch UV-Strahlung erzeugten ROS scheinen in diesen Prozessen eine entscheidende Rolle als Mediatoren zu spielen.

1.3.5 Flavonoide

Potentiell schützende Agenzien gegen photooxidative Hautschäden könnten möglicherweise Flavonoide sein (Bonina *et al.*, 1996). Diese Verbindungen bilden eine Klasse natürlich vorkommender Benzo- γ -Pyron-Derivate, die in vaskulären Pflanzen weit verbreitet sind. Individuelle Unterschiede innerhalb jeder Untergruppe werden durch Variation von Anzahl und Anordnung der Hydroxylgruppen sowie durch Art und Ausmaß der Alkylierung bestimmt. Flavonoide besitzen vielfältige biologische Eigenschaften, zu denen ihre vasoprotektive, anti-lipidperoxidative, entzündungshemmende, antibakterielle, antimykotische, erbgutschädigende oder (gegenüber Tumorzellen) antiproliferative Wirkung gehört (Ames *et al.*, 1993). Einige Flavonoide, die strukturell den Östrogenen ähnlich sind, können an den Östrogen-Rezeptor binden und somit Östrogen-Aktivität oder Anti-Östrogen-Aktivität aufweisen (Collins *et al.*, 1997; LeBail *et al.*, 1998). Antivirale Eigenschaften werden den Flavonoiden zumindest teilweise aufgrund ihrer antioxidativen und radikalfangenden Wirkung zugeschrieben (Sichel *et al.*, 1991; Ko *et al.*, 1998).

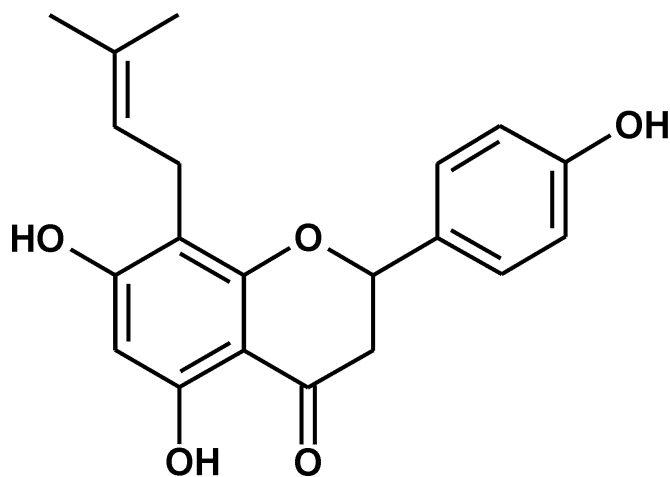


Abb. 1.5: 8-Prenylnaringenin (8PN)

Im Rahmen dieser Arbeit wird der Einfluß der beiden Flavonoide 8-Prenylnaringenin (8PN) und α -Glucosylrutin (AGR) sowie der Vitamine C und E auf die MMP- und TIMP-Expression in HDF nach UVA-Bestrahlung untersucht. 8PN (Abb. 1.5) kommt in Hopfen vor und besitzt eine starke Östrogen-Aktivität, größer als die aller bekannten pflanzlichen Östrogene (Milligan *et al.*, 1999). AGR (Abb. 1.6) ist ein gut wasserlösliches Rutin-Derivat, das in der alpha-Position glykosyliert ist. Es wechselwirkt nicht mit Östrogen-Rezeptoren, verhindert allerdings die durch oxidativen Streß induzierte Phosphorylierung intrazellulärer, proteingebundener Tyrosin-Reste und wirkt der Abnahme intrazellulärer Thiol-Konzentrationen in menschlichen Hautzellen entgegen (Stäb *et al.*, 2000). Topisch applizierte, d.h. auf die Haut aufgetragene Substanzen könnten einen Teil ihrer *in vivo*-Effektivität aufgrund ungenügender Penetration oder Bioverfügbarkeit verlieren. Dennoch können einige angewandte Antioxidantien, wie z.B. AGR, die menschliche Haut signifikant gegen Schäden und Entzündungen durch UV-Strahlung schützen (Hadshiew *et al.*, 1997; Rippke *et al.*, 2001).

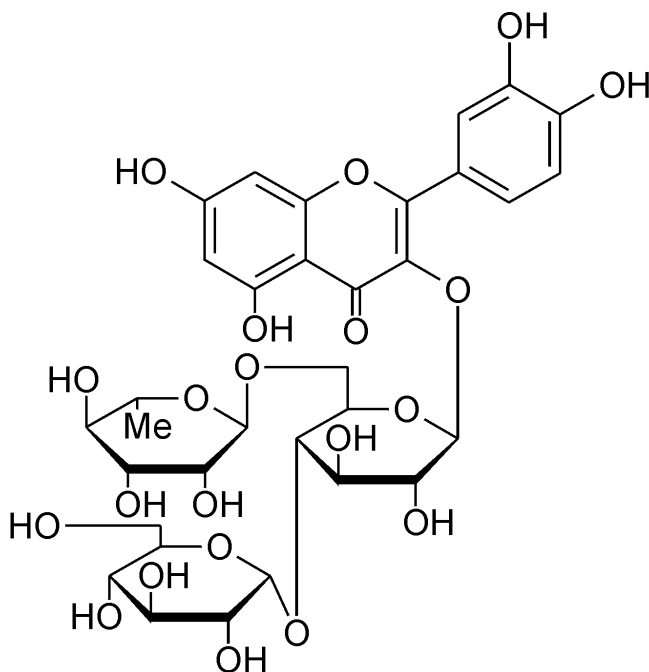


Abb. 1.6: α -Glucosylrutin (AGR)

1.4 Aseptische Hüftprothesenlockerung

1.4.1 Endoprothese

Der Ersatz des Hüftgelenkes durch ein künstliches Gelenk ist mit etwa 180.000 Eingriffen pro Jahr in Deutschland eine der häufigsten Operationen überhaupt. Für den Ersatz des Hüftgelenkes steht eine Vielzahl verschiedener Endoprothesenmodelle zur Verfügung. Die mittlere Lebensdauer der Prothesen beträgt etwa 15 bis 20 Jahre.

Unter einer Hüft-Totalendoprothese versteht man ein künstliches Hüftgelenk, das wie das menschliche aus Gelenkpfanne und Gelenkkopf besteht. Die Materialien eines künstlichen Hüftgelenks müssen zahlreichen Anforderungen genügen, wie z.B. Korrosionsbeständigkeit, Belastbarkeit und ausbleibende Unverträglichkeitsreaktionen, so dass hierfür u.a. Titan, Keramik und Spezialkunststoffe zum Einsatz kommen.

Für eine solche Totalendoprothese muß das künstliche Hüftgelenk mit dem körpereigenen Knochen verbunden werden. Bei den Prothesentypen unterscheidet man grundsätzlich zwischen zementierter und zementfreier Prothese, je nachdem ob die Gelenkpfanne und der Prothesenschaft mit einem speziellen Zement einzementiert oder mit dem Knochen verschraubt werden, so daß der Knochen langfristig an der Prothesenoberfläche anwächst.

1.4.2 MMPs im synovial-ähnlichen Interfacegewebe

Ein Hauptproblem der Endoprothetik sind die aseptischen Prothesenlockerungen, wie neueste Langzeitstudien gezeigt haben (*Södermann et al., 2001*). Bei Hüft-Totalendoprothesen kann es in einigen Fällen (etwa 1%) zu dieser frühen Lockerung der Prothese kommen. Trotz intensiver Forschung konnten die biologischen Mechanismen der aseptischen Hüftprothesenlockerung bislang nur ansatzweise geklärt werden.

Bei jeder Bewegung des künstlichen Hüftgelenkes entstehen kleinste Verschleißpartikel, die von Makrophagen und anderen Körperzellen eingefangen und abtransportiert werden. Bei steigender Partikelbelastung kann ein Mechanismus ausgelöst werden, der zu chronisch granulomatösen Entzündungen führt, was letztendlich den Knochenabbau um die Prothesenkomponenten herum und damit die Lockerung zur Folge hat. Bei diesen Entzündungsreaktionen werden die Verschleißpartikel in das synovial-ähnliche Interfacegewebe, welches Pseudogelenkflüssigkeit produziert, und ins umgebende Pseudokapselgewebe freigesetzt. Histologische Untersuchungen solcher Gewebe zeigen eine granulomatöse Reaktion durch Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten und vaskulären Endothelzellen (*Harris et al., 1976*). Ähnlich wie die in der Gelenkflüssigkeit enthaltenen MMPs bei der rheumatoiden Arthritis und der Osteoarthritis werden die von diesen Zelltypen exprimierten proteolytischen Enzyme, vor allem die MMPs, für die aseptische Hüftprothesenlockerung mitverantwortlich gemacht, da bei diesen Erkrankungen das Interfacegewebe erhöhte mRNA-Mengen an MMP-1, -9, -10, -12 und -13 aufweist (*Takagi, 1996*). Vor allem der Kollagen-Abbau durch MMP-13, die u.a. von Osteoblasten exprimiert wird, scheint der entscheidende Schritt des gesamten Knochenabbaus zu sein (*Uchida et al., 2000*).

1.5 Tumorbildung und Metastasierung

1.5.1 Entstehung von Krebs

Jährlich erkranken in Deutschland über 300.000 Menschen an Krebs, etwa 200.000 sterben an dieser Krankheit. Die häufigsten Krebsarten bei Männern sind Prostata-, Lungen- und Darmkrebs, während Frauen hauptsächlich an Brust- und Darmkrebs erkranken. Der Anteil von Eierstockkrebs (Ovarialkarzinom) an den gesamten Krebserkrankungen bei Frauen beträgt etwa 5%, was der fünfthäufigsten Krebsart entspricht (*Hanke et al., 2003*).

Alle Krebsformen haben das unkontrollierte Wachstum von Zellen eines Organs oder Gewebes, die Umgehung der Apoptose („programmierter Zelltod“), die fortwährende Angiogenese (Neubildung von Blutgefäßen), die Selbstversorgung mit Wachstumsfaktoren sowie das Potential zur Metastasierung gemeinsam (*Hanahan & Weinberg, 2000*). Eine Gewebemasse mit unkontrolliert wachsenden Krebszellen nennt man Tumor, ein von der obersten Zellschicht des Schleimhautgewebes (Epithel) ausgehender Tumor ist ein Karzinom. Alle Vorgänge in Zellen oder Geweben, die bei der Entstehung bösartiger Tumore ablaufen, werden unter dem Begriff der Karzinogenese zusammengefaßt. Die Umwandlung einer normalen, gesunden Zelle in eine Krebszelle erfolgt in mehreren Schritten und kann Jahre bis Jahrzehnte dauern. Voraussetzung für eine Tumorgroße von mehr als einem halben Millimeter Durchmesser ist die Angiogenese (*Neal, 2001*). Nur durch diese von den Krebszellen induzierte Neovaskularisierung kann ein Tumor mit genügend Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden, um zu wachsen. Seine Zellen sind in der Lage, bestimmte Signale (z.B. VEGF und bFGF) auszusenden, um das Einwachsen neuer Blutgefäße zu veranlassen.

Die natürlichen Sicherungssysteme der Zelle können Fehler in der DNA korrigieren oder entartete Zellen durch ein in jeder einzelnen Zelle eingebautes genetisches Programm zur Apoptose treiben (*Lawen, 2003*). Problematisch wird es daher, wenn diese Sicherungssysteme selbst geschädigt werden. Es hat sich gezeigt, daß Zellen vor allem dann aus ihrem geregelten Wachstumsgleichgewicht geraten, wenn zwei bestimmte Gen-Klassen von nicht mehr zu behebbenden Schäden betroffen sind: die sogenannten Onkogene und Tumorsuppressorgene.

Erbanlagen aus der Klasse der Onkogene sind „Wachstumsförderer“, während Tumorsuppressorgene die entgegengesetzte Wirkung haben. Gemeinsam halten sie den natürlichen Fortpflanzungstrieb der Zelle in angemessenen Grenzen. Wenn allerdings Mitglieder aus einer dieser beiden Klassen mutieren, gerät der Teilungszyklus der Zelle aus seinem mit dem Gesamtorganismus harmonisch abgestimmten Wachstumstakt. Eines der Onkogene, das sich bei sehr vielen Krebsarten des Menschen als mutiert und übermäßig aktiv herausgestellt hat, ist das ras-Onkogen. Demgegenüber überwacht das Tumorsuppressorgene p53 (*Oren, 2003*) den Zellteilungszyklus und bewirkt die Apoptose von entarteten Zellen, weshalb es auch als „Hüter des Erbguts“ bezeichnet wird. Mutierte und dadurch unwirksame p53-Gene wurden bei der Hälfte aller menschlichen Tumorarten entdeckt.

Neben genetisch bedingten Ungleichgewichten von wichtigen Steuerungsfunktionen der Zelle können auch karzinogene Stoffe (z.B. das Schimmelpilzgift Aflatoxin oder im Tabakrauch enthaltene Nitrosamine, Benzol und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe) oder elektromagnetische Strahlung hoher Energie (UV- und Röntgen-Strahlung) Auslöser für die Entstehung eines Tumors, also für die progressive Proliferation der Krebszellen sein. Über 30 Prozent der Krebserkrankungen werden durch Tabakkonsum verursacht, und ein ebenso großer Teil wird einer falschen Ernährungsweise zugeschrieben, während Vererbung lediglich für fünf Prozent der Krebserkrankungen verantwortlich gemacht wird (*Eberhard-Metzger, 2003*). Der nicht unerhebliche Einfluß von Krankheitserregern, vor allem von Viren, auf die Krebsentstehung wird auf etwa 15 bis 20 Prozent geschätzt. So gilt beispielsweise eine Infektion mit humanen Papillom-Viren als Hauptrisikofaktor für den Gebärmutterhalskrebs (*Furumoto & Irahara, 2002*).

Die durch Vererbung, Viren, Karzinogene oder andere Auslöser typischerweise stark erhöhte Wachstumsrate der Krebszellen führt zu einer Dysplasie, einer veränderten Morphologie des Gewebes (s. Abb. 1.7). Eine besondere Rolle kommt im weiteren Geschehen den MMPs zu. Sie sind hierbei für den Abbau des Stromas verantwortlich, das den Tumor umgibt und das aus den verschiedenen Komponenten der ECM besteht, hauptsächlich aus Kollagen, Laminin und Fibronectin. Solange die entarteten Zellen die Basalmembran, die aus Kollagen Typ IV und Glykoproteinen bestehende Barriere zur extrazellulären Matrix, noch nicht durchdrungen haben, spricht man von einem gutartigen (benignen) Tumor, wohingegen ein maligner Tumor die Basalmembran bereits durchbrochen hat, in fremdes Gewebe einwandert und sich dort

ausbreitet. Für eine solche Tumorinvasion muß ein Ungleichgewicht zwischen aktiven MMPs, vor allem den Gelatinasen, und deren Inhibitoren vorliegen (*Stetler-Stevenson, 1990*). Durchbrechen invasive Tumorzellen die Basalmembran und gelangen in Lymph- oder Blutgefäße, dann können sie entfernte Stellen des Körpers erreichen und im dortigen Gewebe metastasieren, also Tochtergeschwüre bilden. Invasion und Metastasierung sind die entscheidenden Kriterien, in denen sich ein benigner von einem malignen Tumor unterscheidet. Die Korrelation der MMP-Expression mit aggressivem malignen Verhalten und ungünstigem klinischen Krankheitsverlauf verdeutlicht die bedeutende Funktion der Matrixine in diesem Prozeß. Zu denjenigen MMPs, denen eine Schlüsselrolle bei der Tumorinvasion, Metastasierung und Angiogenese zugeschrieben wird, gehören vor allem MMP-1, -2, -3, -9, und -14 (*Sternlicht & Bergers, 2000*). So ist bekannt, daß hochgradig maligne Zellen weniger aggressiv werden, wenn die Konzentration oder Aktivität der Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9) gesenkt wird, wohingegen relativ gutartige Zellen erhöhte Gelatinase-Aktivität oder verminderte TIMP-Aktivität aufweisen, sobald sie maligne Eigenschaften erlangen (*Sakata et al., 2000*). Auch die Kollagenase-Expression im Tumorgewebe korreliert mit der Aggressivität des Tumors (*Bachmeier et al., 2000; Etoh et al., 2000*). Neben den MMPs werden weitere tumorassoziierte Proteolysefaktoren für die Invasion von Krebszellen in die extrazelluläre Matrix und Basalmembran verantwortlich gemacht, wie z.B. einige Kathepsine und die Serinproteasen Plasmin und uPA (Urokinase-Typ-Plasminogen-Aktivator) sowie dessen Inhibitor PAI-1 (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-Type-1) (*Schmitt et al., 2000*).

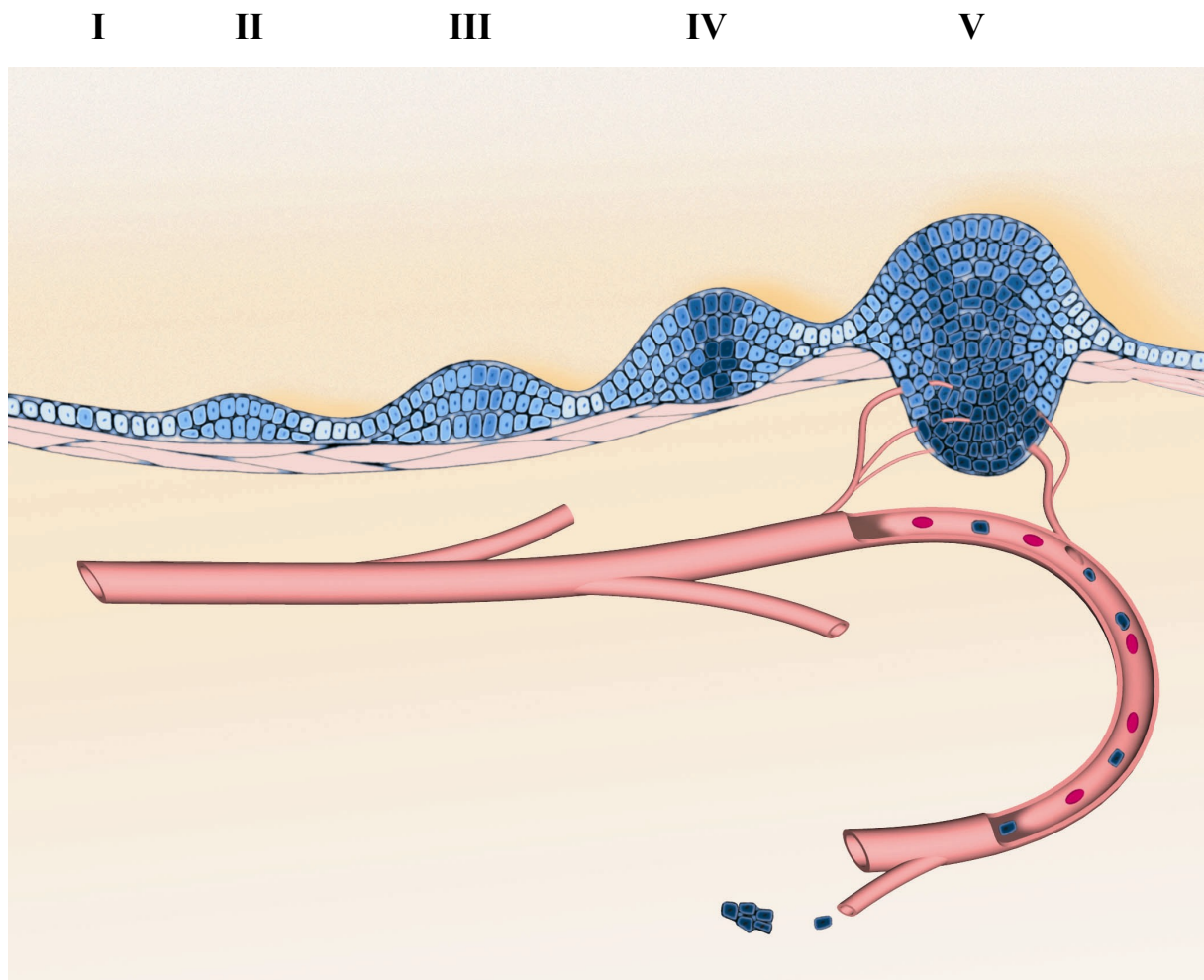


Abb. 1.7: Die Stadien der Krebsentstehung (Hanke et al., 2002)

I) Initiation: Bedingt durch Strahlung oder krebserzeugende Stoffe entsteht eine entartete Zelle, deren DNA verändert ist.

II) Progression: Die mutierte Zelle teilt sich.

III) Dysplasie: Aus einer Reihe genetischer Unfälle können Zellen resultieren, die sich immer schneller teilen.

IV) Präinvasiver Tumor: Durch seine Größe kann der Tumor bereits andere Organe einengen; er ist jedoch immer noch auf das Ursprungsgewebe beschränkt. Im Falle eines gutartigen Tumors bleibt er dort.

V) Invasiver Tumor: Bei bösartigen Tumoren zeigen die Krebszellen mit der Zeit veränderte Formen und produzieren eigene Enzyme. Sie können so die angrenzende Bindegewebschicht durchdringen und in benachbartes Gewebe einwachsen.

1.5.2 Behandlungsmethoden

Die Behandlung eines Tumors kann generell auf drei Ziele ausgerichtet sein: dauerhafte Heilung (kurativ), Verhinderung eines Rückfalls (adjuvant) und lindernd (palliativ). Der Idealfall der dauerhaften Heilung des Patienten ist nur zu erreichen, wenn der Tumor frühzeitig erkannt und behandelt wird, solange er noch nicht in umliegendes Gewebe eingewachsen und nicht metastasiert ist. Beim adjuvanten Therapieansatz wird ergänzend eine Chemotherapie oder eine Bestrahlung eingesetzt, damit nach der operativen Entfernung des lokalen Tumors im gesamten Körper befindliche Krebszellen zerstört werden. Wenn die bösartige Geschwulst bereits in Nachbargewebe eingewachsen ist oder Metastasen gebildet wurden, ist eine vollständige operative Entfernung und damit auch Heilung nicht mehr möglich. In solchen Fällen wird palliativ therapiert, um die Lebensqualität des Patienten zu verbessern.

Ist nach einer Operation zu befürchten, daß sich bereits Metastasen angesiedelt haben, wird eine adjuvante medikamentöse Therapie vorgenommen. Dafür kommen prinzipiell Hormone (Hormontherapie), Zytokine oder Antikörper (Immuntherapie) sowie Zytostatika (Chemotherapie) in Frage. Die Zytostatika bewirken einen Stillstand des Zellwachstums, indem sie in verschiedene Mechanismen des Zellzyklus eingreifen und somit das unkontrollierte Wachstum der Krebszellen stoppen. Bei der Chemotherapie werden allerdings auch immer gesunde Zellen geschädigt, weshalb es zu teilweise sehr heftigen Nebenwirkungen (Durchfall, Übelkeit, Haarausfall, erhöhtes Infektionsrisiko) kommt. Je nachdem, an welcher Stelle Zytostatika in den Zellzyklus eingreifen, werden sie in verschiedene Gruppen eingeteilt. Alkylanzien, Antimetabolite und Platinabkömmlinge verändern die Erbsubstanz im Zellkern so, daß sich die Zelle nicht mehr ordnungsgemäß teilen kann und abstirbt. Camptothecin-Derivate hemmen die Topoisomerase I, die für die Auftrennung des DNA-Doppelstrangs verantwortlich ist, so daß die DNA nicht abgelesen und verdoppelt werden kann. Taxane binden an die Mikrotubuli und verhindern, daß sich die Chromosomenstränge und damit die Krebszellen teilen (*Dutcher et al., 2000*).

Auch wenn die Inhibierung der MMPs als mögliche Krebstherapie in der klinischen Erprobung bislang wenig erfolgreich verlaufen ist, so bleibt dies dennoch ein interessantes und durch spezifischere Inhibitoren möglicherweise zukunftssträchtiges Forschungsgebiet (*Overall & Lopez-Otin, 2002*). Nicht nur bezogen auf MMPs, sondern ganz allgemein wird daher auch versucht, die Metastasierung und das Primärtumorwachstum bei soliden Tumoren durch anti-metastatische niedermolekulare Wirkstoffe zu blockieren (*Sava & Bergamo, 1999; Reuning et al., 2003*). Weitere Ansatzpunkte der gegenwärtigen Krebsforschung sind die Unterbindung der Angiogenese, also die Blutzufuhr zum Tumor abzuschneiden (*Dredge et al., 2003*), sowie die gezielte Induzierung der Apoptose von Krebszellen (*Reed, 2003*). Ebenso sind die Immun- und die Gentherapie zwei aktuelle Forschungsschwerpunkte in der Onkologie. Unter dem Begriff der Immuntherapie (*Ribas et al., 2003*) werden verschiedene Therapiestrategien zusammengefaßt, bei denen das körpereigene Immunsystem zur Begrenzung des Tumorwachstums und zur Bekämpfung bösartiger Zellen angeregt werden soll. In die Gentherapie, bei der geschädigte Gene ersetzt werden sollen, werden große Hoffnungen gesetzt, auch wenn die Ergebnisse bislang eher ernüchternd waren (*St. George, 2003; Zeimet & Marth, 2003*).

1.5.3 Ovarialkarzinom

Das Ovarialkarzinom (Eierstockkrebs) ist die fünfthäufigste Tumorerkrankung bei Frauen in Industriestaaten. In den letzten Jahren wurde durch radikaleres operatives Vorgehen und adjuvante Chemotherapien mit Taxol- und Cisplatin-Verbindungen die Überlebensrate der Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom verbessert. Dennoch liegt die Mortalitätsrate bei über 70% und ist damit eine der höchsten unter allen Tumorarten. Aufgrund des lange Zeit symptomlosen Krankheitsverlaufs und mangels signifikanter prognostischer Marker wird das Ovarialkarzinom oft erst in einem fortgeschrittenen Stadium erkannt (*Partridge & Barnes, 1999*). Ähnlich wie bei anderen Krebsarten befinden sich auch beim Ovarialkarzinom diverse Behandlungsstrategien in der klinischen Erprobung, insbesondere gen- und immuntherapeutische Ansätze sowie der Einsatz von zielgerichteten Wirkstoffen, welche Wachstums- und Signaltransduktionsprozesse maligner Zellen beeinflussen, gesunde Zellen dagegen kaum schädigen (*DiSaia & Bloss, 2003*).

Eine Besonderheit des Ovariakarzinoms gegenüber vielen anderen Tumorarten ist die Ausbreitung in den Bauchraum (*Van der Burg, 2001*). Das Ausmaß der Tumorausbreitung von den Eierstöcken auf die umliegenden Organe (z.B. Uterus, Dünndarm, Magen, Leber) wird durch eine Einteilung in verschiedene Stadien (FIGO I-IV) beschrieben (*Menczer, 2003*). Tumore der Stadien I und II sind auf die Ovarien bzw. den Beckenraum begrenzt, während in den fortgeschrittenen Stadien eine Invasion in den Peritonealraum und/oder Lymphknotenbefall (Figo III) sowie die Bildung von Fernmetastasen (Figo IV) auftritt. Mit den Peritonealmetastasen tritt als Symptom oftmals ein maligner Erguß, die sogenannte Aszitesflüssigkeit (*Hirabayashi & Graham, 1970*), auf.

1.5.4 Tumor- und Prognosemarker

Als Tumormarker werden Proteine bezeichnet, mit deren Hilfe eine Tumorerkrankung besser und teilweise früher diagnostiziert sowie im weiteren Verlauf überwacht werden kann (*Bidart et al., 1999*). Sie werden von Krebszellen gebildet und ins Blut abgegeben, oder ihre Bildung wird durch eine Krebserkrankung ausgelöst. Im Idealfall sollte ein Tumormarker eindeutig auf eine bestimmte Krebserkrankung hinweisen, was in der Praxis allerdings nicht gegeben ist. Vollkommen tumorspezifische Marker konnten beim Menschen bisher nicht gefunden werden, vielmehr sind häufig eine Vielzahl von Tumormarkern bei unterschiedlichen Krebsarten erhöht, für manche Krebserkrankungen sogar gar keine bekannt. Zur Stellung einer Diagnose oder zur Planung einer Behandlung reichen Tumormarkerbestimmungen alleine nicht aus. Sie können aber manchmal geeignet sein, um die Wirksamkeit einer Behandlung oder den Krankheitsverlauf zu beurteilen. Wichtig ist dabei, daß der betreffende Tumormarker vor Beginn einer Therapie bestimmt wird, um im weiteren Verlauf einen Vergleichswert zu haben. Weil bei den meisten verfügbaren Tumormarkern der im Blut gemessene Wert in einem direkten Verhältnis zur Tumormasse im Körper steht, kann eine Veränderung des vor der Therapie festgestellten Wertes Hinweise auf die Wirksamkeit der Behandlung oder auf erneutes Tumorwachstum geben: Sinken erhöhte Werte nach der Operation des Tumors innerhalb von etwa vier bis acht Wochen in den Normbereich, spricht dies für eine vollständige Entfernung der Geschwulst. Weiterhin erhöhte oder gar ansteigende Werte deuten auf verbliebenes Tumorgewebe oder schon bestehende Metastasen hin. Angewandt werden α_1 -Fetoprotein-

tein (AFP) bei Leberzellkarzinom, Keimzelltumoren von Hoden und Ovar, karzinoembryonales Antigen (CEA) bei Dickdarmkarzinom, Magenkarzinom, Brustkrebs und Lungenkrebs, prostataspezifisches Antigen (PSA) beim Prostatakarzinom, Plattenepithelkarzinom-Antigen (SCC) bei Plattenepithelkarzinomen von Gebärmutterhals, Hals-Nasen-Ohren-Trakt, Lunge, Speiseröhre und Enddarm. Weitere Beispiele für Tumormarker sind Choriongonadotropin (HCG), CA 15-3, CA 19-9, CA 125, Vanillinmandelsäure, 5-Hydroxyindolessigsäure sowie Calcitonin.

Wie der Verlauf einer Krebserkrankung einzuschätzen ist, kann mittels Prognosefaktoren abgeschätzt werden. Aufgrund der Komplexität des Tumorprogressions-Prozesses dienen diese Marker lediglich als Anhaltspunkte und können letztendlich keine genaue Vorhersage erlauben. Vorrangig werden sie dazu genutzt, den optimalen Therapieansatz auszuwählen (*Burke & Henson, 1998*). Zu diesen Prognosefaktoren gehören die Tumorgröße und -ausdehnung, der Lymphknotenbefall (hohe Anzahl befallener Lymphknoten bedeutet schlechte Prognose), der Differenzierungsgrad der Zellen (Grad 1 hat die beste Prognose, Grade 3 und 4 neigen zur Metastasierung) sowie die Hormonrezeptoren für Östrogen und Progesteron (beide Rezeptoren verbessern die Prognose aufgrund der Möglichkeit einer Hormontherapie). Ebenso finden die Protease uPA und deren Inhibitor PAI-1 als Prognosefaktoren beim Ovarialkarzinom (*Schmalfeldt et al., 2001*) sowie beim Brustkrebs (*Harbeck et al., 2002*) Verwendung.

1.6 Zusammenfassung der Arbeit

Ausgehend von einem etablierten E.coli-Expressionssystem wurde die Proform der katalytischen Domäne der Kollagenase-3 (Leu¹-Gly²⁴⁸) exprimiert und ein bestehendes Isolierungs- und Reinigungsverfahren verwendet (*Oberpichler, 1999*). Das auf diese Weise gereinigte Protein diente als Antigen zur Herstellung mono- und polyklonaler Antikörper. Diese Antikörper stellten ihre hohe Spezifität bei der Isolierung nativer MMP-13 aus Aszitesflüssigkeit von Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom mittels einer neuentwickelten, universell einsetzbaren Affinitätschromatographie unter Beweis. Die Identifizierung der isolierten Kollagenase-3 erfolgte durch Western-Blot und MALDI-TOF-Massenspektrometrie.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Entwicklung eines MMP-13-ELISAs. Mit Hilfe der mono- und polyklonalen MMP-13-Antikörper konnte ein Sandwich-ELISA-System aufgebaut werden, dessen Zuverlässigkeit durch eine Reihe statistischer Tests nachgewiesen wurde. Mit einer Sensitivität von 0,5 ng/ml wurde der ELISA erfolgreich zur Bestimmung der Konzentration dieser Protease in Gewebe bzw. Gewebeflüssigkeiten bei verschiedenen pathologischen Prozessen eingesetzt. Während bei einem Kollektiv von Brusttumorgewebe keine Korrelation der klinischen Symptome mit der MMP-13-Konzentration gefunden wurde, zeigte sich ein Zusammenhang zwischen dem Krankheitsbild und der Konzentration dieses Enzyms in prothesenahem Gewebe bei aseptischer Hüftprothesenlockerung (*Diehl et al., 2003*) ebenso wie in Aszitesflüssigkeit von Patientinnen mit Ovarialkarzinom (*Hantke et al., 2003*). Bei der letztgenannten Untersuchung wurden die polyklonalen MMP-13-Antikörper weiterhin zur Laser-Scanning-Mikroskopie von Tumorzellen in der Aszitesflüssigkeit eingesetzt. Da ein signifikanter Zusammenhang zwischen der MMP-13-Konzentration in der Aszitesflüssigkeit und der Überlebenszeit der Patientinnen zu bestehen scheint, der jedoch anhand eines größeren Kollektivs noch zweifelsfrei nachgewiesen werden muß, läßt sich diskutieren, ob MMP-13 als prognostischer Marker in Aszitesflüssigkeit beim Ovarialkarzinom dienen kann.

Eine weitere Anwendung fand der MMP-13-ELISA bei einer *in vitro*-Untersuchung zur licht-induzierten Hautalterung. Dabei wurde die MMP- und TIMP-Expression humaner dermaler Fibroblasten (HDF), die sowohl in Monolayern als auch eingebettet in einem Kollagen-Gel kultiviert wurden, nach UVA-Strahlung untersucht (*Hantke et al., 2002*). Unter dem Einfluß der zugesetzten Vitamine C und E sowie der Flavonoide AGR (α -Glucosylrutin) und 8PN (8-Prenylnaringenin) wurden die Genexpression von MMP-1 und TIMP-1, die Proteinexpression von MMP-1, -2, -8, -9, -12, -13, TIMP-1 und TIMP-2 sowie die Enzymaktivität von MMP-1 und MMP-2 bestimmt. Dabei wurden MMP-8, -9, -12 und MMP-13 von den HDF allerdings unter keiner der gewählten Versuchsbedingungen exprimiert. Für MMP-1 und MMP-2 zeigte sich, daß sowohl die Vitamine C und E als auch AGR die Expression und Aktivität dieser beiden Proteasen nach UVA-Bestrahlung deutlich reduzierten, während 8PN interessanterweise den gegenteiligen Effekt erzielte. Dabei veränderte keine der zugesetzten Substanzen die TIMP-Konzentrationen signifikant. Somit bietet neben den Vitaminen C und E vor allem AGR, das die Kollagenase-Expression der bestrahlten HDF um 60% reduzierte, eine gute Möglichkeit, der durch UV-Bestrahlung stark erhöhten MMP-Aktivität in der Haut entgegenzuwirken und damit der vorzeitigen Hautalterung vorzubeugen.

2 METHODEN

Alle verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Lösungsmittel werden in p.A.-Qualität eingesetzt. Doppelt deionisiertes Wasser (H_2O_{bidest}) wird durch eine Millipore-Q-Filtrationsanlage [Millipore, Neu Isenburg] gewonnen.

2.1 Expression der katalytischen Domäne der MMP-13

Zur Expression der latenten katalytischen Domäne der MMP-13 ($\text{Leu}^1\text{-Gly}^{248}$), also des Proenzym ohne Hinge-Region und ohne hemopexinähnliche Domäne, stand in der Biochemie I (AG Tschesche) der Universität Bielefeld ein etabliertes Expressionssystem mit pET-Vektoren zur Verfügung (*Oberpichler, 1999*). Ausgangspunkt waren Tiefkühlkulturen entsprechender Bakterien mit Antibiotikaresistenz. Alle Arbeiten wurden gemäß Gentechnikgesetz durchgeführt.

2.1.1 Übernachtkulturen

E.coli-Übernachtkulturen werden hergestellt, indem man 6 ml LB-Medium (1% Trypton; 0,5% Hefe-Extrakt (Pepton); 1% NaCl) und 6 μl Ampicillin-Lösung (20% Ampicillin [Gibco, BRL, Life Technologies, Paisley, GB] in 70%-igem Ethanol) mit einem E.coli-Klon aus einer entsprechenden Tiefkühlkultur animpft. Dann kultiviert man 16 Stunden bei 37°C im Rollinkubator [Eigenbau, Universität Bielefeld].

2.1.2 Genexpression

Sechs Fernbachkolben mit jeweils 750 ml LB-Medium und 750 µl Ampicillin-Lösung werden mit jeweils 7 ml einer Übernachtskultur angeimpft und im Umluftinkubator [Steri-Cult-Inkubator, Labotec, Göttingen] bei 37°C bis zu einer optischen Dichte bei 578 nm von 0,6 kultiviert. Dann wird die Proteinexpression durch Zugabe von jeweils 375 µl 1 M IPTG-Lösung [Sigma, Taufkirchen] induziert. Nach weiteren drei Stunden bei 37°C werden die Zellen für 20 Minuten bei 350 g pelletiert und der Überstand verworfen.

2.1.3 Isolierung der Inclusion-Bodies

Das Bakterienpellet aus 4,5 l E.coli-Kultur wird in 90 ml Zellyse-Puffer (100 mM Tris/HCl; pH 8,5; 20 mM EDTA; 2% Lysozym [Sigma, Taufkirchen]) resuspendiert und 20 Minuten auf Eis inkubiert, bevor es 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt wird. Es werden 2,6 g (500 mM) NaCl und 900 µl (entsprechend 1%) Triton X-100 [Sigma] hinzugegeben und 10 Minuten auf Eis gerührt. Man zentrifugiert 20 Minuten bei 1.200 g und verwirft den Überstand. Anschließend werden jeweils 5 g des Pellets in 50 ml Waschpuffer I (50 mM Tris/HCl; pH 8,5; 1 M Harnstoff; 1,5% Triton X-100) resuspendiert und mit dem Ultra-Turrax [Typ 18-10, Jahnke & Kunkel KG, Breisgau] homogenisiert. Das Homogenisat wird 10 Minuten bei 1.200 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Das Pellet wird anschließend in 50 ml Waschpuffer II (50 mM Tris/HCl; pH 8,5; 1 M Harnstoff) aufgenommen und mit dem Ultra-Turrax homogenisiert. Es wird erneut für 10 Minuten bei 1.200 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Restpellet resuspendiert man in 70 ml Aufschlußpuffer (50 mM Tris/HCl; pH 8,5; 6 M Harnstoff; 200 mM NaCl; 150 mM β-Mercaptoethanol [Merck, Darmstadt]) und rührt drei Stunden bei Raumtemperatur. Ungelöste Bestandteile entfernt man durch Zentrifugation (20 Minuten bei 1.200 g), während der Überstand bis zur weiteren Aufarbeitung (s. Abs. 2.4.5) bei 4°C gelagert werden kann.

2.1.4 Renaturierung des rekombinanten Proteins

Die im Anschluß an die Expression durch Ionenaustauschchromatographie (s. Abs. 2.4.5) gereinigte katalytische Domäne der MMP-13 wird durch Dialyse renaturiert. Dazu dialysiert man 50 ml der MMP-13-Lösung geringer Konzentration in NaCl-freiem Aufschlußpuffer (50 mM Tris/HCl; pH 8,5; 6 M Harnstoff; 0,15 M 2-Mercaptoethanol) bei 4°C dreimal für jeweils drei Stunden gegen 5 l Faltungspuffer (20 mM Tris/HCl; pH 7,5; 0,5 M NaCl; 5 mM CaCl₂; 0,5 mM ZnCl₂).

2.2 Kultivierung und UVA-Bestrahlung von HDF

Ausgehend von Haut-Biopsien der Schulter eines männlichen sowie des oberen Augenlids eines weiblichen Spenders (beide Photo-Typ II, über 50 Jahre alt und keine Erkrankungen) wurden von der Beiersdorf AG (Hamburg) Kulturen humaner dermaler Fibroblasten (HDF) nach gängigem Verfahren (*Stäb et al., 2000*) erhalten. Für Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden HDF von der Schulter zwischen der 17. und 20. Passage sowie vom oberen Augenlid aus der 4. Passage verwendet. Für alle in den folgenden Abschnitten (Abs. 2.2.1 bis 2.2.7) beschriebenen Arbeiten wurden Laborgeräte und Materialien von der Beiersdorf AG zur Verfügung gestellt.

Das als Additiv verwendete Flavonoid 8-Prenylnaringenin (8PN) wurde von der Biochemie I (AG Tschesche) der Universität Bielefeld nach einem literaturbekannten Verfahren (*Tahara, et al., 1994*) hergestellt.

2.2.1 HDF in Monolayern

Für die Monolayer-Kulturen werden trypsinierte HDF von der Schulter mit einer Zelldichte von 5×10^4 Zellen/ml in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) [Gibco, BRL, Life Technologies, Paisley, GB], versetzt mit 2 mM Glutamin [Gibco], 50 µg/ml Gentamicin [Gibco] und 10% fetalem Kälberserum [Boehringer, Mannheim], verwendet. Die Zellen werden in einer Atmosphäre mit hoher Luftfeuchtigkeit und 7% CO₂ bei 37°C inkubiert und bis zu einer Konfluenz von etwa 80% wachsen gelassen.

2.2.2 HDF in Kollagen-Gelen

Kollagen-Typ I aus Kälberhaut [ICN, Eschwege] wird in 0,1%-iger Essigsäure gelöst, so daß man eine Lösung von 3,5 mg/ml erhält. Für jedes Kollagen-Gel werden 3×10^5 trypsinierte Zellen sowohl von der Schulter als auch vom Augenlid mit Kollagen-Puffer (0,01 ml 2 M HEPES-Puffer; pH 7,4; 0,1 ml 10-fach konzentriertem DMEM; 0,09 ml 0,75 M NaHCO_3 -Lösung; 0,8 ml der zuvor angesetzten Kollagen-Lösung) auf Eis vermischt. Diese Zellsuspension, die somit eine Kollagen-Konzentration von 2,8 mg/ml besitzt, wird dann in ein Well (35 mm Durchmesser) einer 6-Well-Platte [Greiner, Frickenhausen] gegeben. Die Gele polymerisieren bei 37°C in 45 Minuten und werden mit 3 ml DMEM (inkl. oben genannter Zusätze) überschichtet. Die Kultivierung erfolgt analog zu der der Monolayer-Kulturen.

2.2.3 Cytotox-Assay für 8PN und DMSO

Cytotox-Assays für 8PN und DMSO werden mit kultivierten HDF sowie mit der humanen Keratinozyten-Zelllinie HaCaT [Beiersdorf, Hamburg] durchgeführt. 24 Stunden nach der Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von 8PN bzw. DMSO wird die Lebensfähigkeit der Zellen gemessen. Dazu wird Neutral-Rot [Merck, Darmstadt] gemäß den Herstelleranweisungen verwendet, um die lebenden Zellen zu detektieren. Dieser Farbstoff wird von Lysosomen lebender Zellen aufgenommen und kann mittels essigsaurer Fixierlösung wieder extrahiert werden. Die Cytotoxizität ergibt sich als Prozentsatz der Neutral-Rot-Konzentration in den mit 8PN bzw. DMSO behandelten Zellen im Vergleich zur Konzentration in unbehandelten Zellen.

2.2.4 Inkubation mit Additiven

Geeignete Konzentrationen von AGR [Beiersdorf, Hamburg], Vitamin C und E [beide Sigma, Taufkirchen] für entsprechende Zell-Untersuchungen sind literaturbekannt (*Stäb et al., 2000*). Stammlösungen von jeweils 200 mg/ml erstellt man für AGR und Vitamin C in DMEM sowie für Vitamin E in Ethanol. Das Flavonoid 8PN wird in DMSO gelöst, so daß man eine 100 mM Stammlösung erhält. Die HDF in Monolayern und in Kollagen-Gelen werden 24 Stunden vor der UVA-Bestrahlung mit AGR (150 μM), 8PN (30 μM), Vitamin C (150 μM) bzw. Vitamin E (150 μM) in DMEM (versetzt mit Glutamin, Gentamicin und fetalem Kälberserum) inkubiert (s. Abs. 2.2.1).

2.2.5 UVA-Bestrahlung

Vor der UVA-Bestrahlung der HDF werden die Monolayer-Kulturen und die Kollagen-Gele mit PBS-Puffer [Gibco, BRL, Life Technologies, Paisley, GB] gewaschen. Alle Bestrahlungen werden unter einer Schicht von 3 ml PBS-Puffer pro Well durchgeführt. Die Zellen werden mit einer UVA-Quelle hoher Intensität [Uvaspot 400, Dr. Hönle, Gräfelfing], die mit UVB- und UVC-Filtern [Blacklight, Dr. Hönle] mit einem Wellenlängenbereich von 315-400 nm (Maximum-Peak: 365 nm) ausgestattet ist, mit 10 J/cm^2 bestrahlt. Die UV-Intensität wird durch einen Strahlungsmesser [IL-1700 Radiometer, International Light, Newburyport, USA] bestimmt. Die zu errechnende Bestrahlungsdauer der Kollagen-Gele wird um den Prozentsatz verlängert, um den sich die Strahlungsintensität beim Durchgang durch ein halbes Gel (0,5 ml) verringert hat (etwa 5%), um auch in Kollagen-Gelen eine mittlere UVA-Bestrahlung der Zellen von 10 J/cm^2 zu gewährleisten.

2.2.6 Bestimmung der Zellzahl

Um die HDF ab- bzw. herauszulösen, werden die Monolayer trypsiniert und die Kollagen-Gele mit 3 mg/ml Typ-I-Kollagenase [ICN, Eschwege] in DMEM bei Raumtemperatur eine Stunde unter periodischem Vortexen [Vortex-Genie, Bender-Hobein AG, Zürich, Schweiz] verdaut. Die Zellen werden dann für 10 Minuten bei 300 g abzentrifugiert. Die Bestimmung der Zellzahl wird jeweils vierfach durchgeführt und erfolgt in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer [Brand, Wertheim] mit einem Axiovert 25 [Carl Zeiss, Oberkochen].

2.2.7 TaqMan-RT-PCR

Die gesamte RNA wird mit RNazol B [WAK Chemie Medical, Steinbach] gemäß den Herstelleranweisungen isoliert. Die Konzentration und Reinheit der isolierten RNA wird dann durch ein GeneQuant-Spektrophotometer [Pharmacia, LKB Biochrom, Milton Keynes, GB] bestimmt. Die Quantifizierung der mRNA-Expression von MMP-1, TIMP-1 sowie des House-keeping-Gens GAPDH erfolgt damit nach einem literaturbekannten Verfahren (*Lahmann et al., 2001*). Zusätzlich werden einige der lysierten Zellen stichprobenartig ausgewählt und zentrifugiert (2.000 g für 10 Minuten), um die Überstände mittels ELISA zu untersuchen.

2.3 Proteinanalytik

2.3.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur SDS-PAGE werden je nach Größe der zu trennenden Proteine 10-15%-ige Polyacrylamid-Gele verwendet, die in einer radikalischen Polymerisation des Acrylamids mit N,N'-Methylenbisacrylamid [Roth, Karlsruhe] als Quervernetzer (Mischungsverhältnis 75 : 2) hergestellt werden. Die Polymerisation wird durch Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat (APS) zu dem gepufferten (1 M Tris/HCl; pH 9,4; 0,5% SDS; 0,25% TEMED) Acrylamidgemisch gestartet. Die zu untersuchenden Proteingemische versetzt man mit Lämmli-Puffer (25 mM Tris/HCl; pH 6,8; 1% SDS; 8 M Harnstoff; 25 mM NaCl; 1% β -Mercaptoethanol; 0,5% BPB) und erhitzt für eine Minute auf 100°C, damit die Proben denaturiert und vorhandene Disulfidbrücken reduziert werden (*Lämmli, 1970*). Die Trennung der Makromoleküle erfolgt bei konstanter Stromstärke von 35 mA in vertikalen Gelkammern [Eigenbau, Universität Bielefeld] in Elektrodenpuffer (25 mM Tris/HCl; pH 8,5; 190 mM Glycin; 0,1% SDS). Zur Größenabschätzung wird eine Mischung von Eichproteinen [LMW-Marker, Amersham Pharmacia, Freiburg] als Standard verwendet, in der folgende Proteine enthalten sind: Phosphorylase B (94 kDa), Rinderserumalbumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (20,1 kDa) und α -Lactalbumin (14,4 kDa).

Der Nachweis der Proteine erfolgt je nach erforderlicher Sensitivität entweder mit Coomassie Brilliant Blue R250 [Serva, Heidelberg] oder Silbernitrat (*Heukeshoven & Dernick, 1988*). Bei der Coomassie-Färbung wird das Gel nach der Elektrophorese 30 Minuten in Coomassie-Lösung (0,2%) inkubiert und anschließend in Entfärber-Lösung (Ethanol, Wasser, Essigsäure im Volumenverhältnis 5 : 5 : 1) gewaschen. Für die sensitivere Färbemethode mit Silbernitrat werden die Proteine im Gel nach der Elektrophorese etwa 20 Minuten in Entfärber-Lösung fixiert. Nach Inkubation mit „Farmers Reducer“ (1,6% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 1% $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) für drei Minuten, ausgiebigem Waschen, 30-minütiger Inkubation mit 0,1% AgNO_3 -Lösung, erneutem kurzen Waschen sowie Inkubation mit 2,5% Na_2CO_3 -Lösung für 30 Sekunden erfolgt die Färbung durch Zugabe von etwa 100 μl konzentrierter Formaldehyd-Lösung. Die Reaktion wird nach dem Entwickeln der Proteinbanden mit 10%-iger Essigsäure gestoppt.

2.3.2 Western-Blot

Nach erfolgter SDS-PAGE (s. Abs. 2.3.1) und 15-minütiger Inkubation der Gele in Blotpuffer (50 mM Borsäure/NaOH; pH 9,0; 20% Ethanol) werden die im Gel aufgetrennten Proteine im Semi-Dry-Verfahren durch Anlegen eines elektrischen Feldes mit einer Blotting-Apparatur [Fastblot, Biometra, Göttingen] gemäß der Herstelleranweisung aus der Gelmatrix auf eine PVDF-Membran [Millipore, Bedford, USA] übertragen. Bei einer Stromstärke von 150 mA gilt dabei als Richtwert für die Dauer des „Blottings“ eine Minute pro kDa des zu überführenden Proteins.

Zum immunologischen Nachweis der Proteine wird die Membran bei Raumtemperatur mit 2% RSA [PAA Laboratories, Linz, Österreich] in TBST-Puffer (20 mM Tris/HCl; pH 7,5; 500 mM NaCl; 0,05% Tween 20) für 30 Minuten abgesättigt und anschließend mit dem Primärantikörper – je nach Anwendung entweder monoklonaler Maus-anti-MMP-13-Antikörper IVD128 [BioCheck, Münster] oder polyklonaler Kaninchen-anti-MMP-13-Antikörper PK3 [BioCheck] – in TBST-Puffer (1 µg/ml) zwei Stunden inkubiert. Nicht gebundene Antikörper werden durch dreimaliges Waschen mit TBST-Puffer entfernt. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur mit dem Detektionsantikörper (Ziege-anti-Kaninchen bzw. Ziege-anti-Maus [Sigma, Taufkirchen]), der mit alkalischer Phosphatase konjugiert und mit TBST-Puffer (1 : 2.000) verdünnt ist, wird mit WB-Puffer (100 mM Tris/HCl; pH 9,5; 100 mM NaCl; 0,1% MgCl₂) dreimal gewaschen. Für die enzymatische Nachweisreaktion wird BCIP/NBT-Färbelösung [Sigma, Taufkirchen] verwendet und die Färbung gemäß den Herstellerangaben bis zur gewünschten Intensität durchgeführt.

2.3.3 Protein-Sequenzierung

Die schrittweise N-terminale Aminosäure-Sequenzierung erfolgt durch einen automatisierten Flüssigphasen-Sequenzierer [Typ 810/910, Knauer, Berlin] mittels Edman-Abbau (*Edman & Begg, 1967*). Dabei wird die zu analysierende Probe auf einer Membran in den Eluatreaktor eingebracht und dort gemäß den Herstellerangaben mit Phenylisothiocyanat umgesetzt. Die am Ende eines jeden Zyklus vom Restpeptid abgespaltene Aminosäure wird als Phenylthiohydantoin-Derivat in einem angeschlossenen HPLC-System aufgetrennt und durch Vergleich mit Standards identifiziert (*Fischer, 1992*).

2.3.4 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Von der aus Aszitesflüssigkeit isolierten MMP-13 (s. Abs. 2.4.2) werden 10 µl (entsprechend etwa 50 ng) zur SDS-PAGE verwendet. Die nach der Gelelektrophorese Coomassie-gefärbte Bande der latenten MMP-13 (ca. 60 kDa) wird aus dem Gel ausgeschnitten und zunächst mit 250 µl eines Acetonitril-Wasser-Gemisches (50% CH₃CN / 50% H₂O) gewaschen, gefolgt von zwei weiteren Waschsritten mit jeweils 250 µl eines Acetonitril-Ammoniumhydrogencarbonat-Gemisches (zunächst 50% CH₃CN / 50 mM NH₄HCO₃, dann 50% CH₃CN / 10 mM NH₄HCO₃). Das getrocknete Gelstück wird mit 15 µl einer 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung, die 6,7 µg/ml modifiziertes Trypsin [Promega, Mannheim] enthält, über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach der Digestion werden die Peptide durch Ultraschall (10 Minuten bei 4°C) aus dem Gel herausgelöst, wobei einige Mikroliter des Überstandes zur Massenspektrometrie durch das Bruker-Biflex III-Massenspektrometer [Bruker Daltonic, Bremen] gemäß Herstelleranleitung dienen. Eine externe Kalibrierung erfolgt durch die Standardproteine Angiotensin II, Substanz P und das adrenocorticotrope Hormonfragment 1-17 [Sigma, Taufkirchen].

Ein „Peptide-Mass-Fingerprint“ der erhaltenen Massen wird mit der Mascot-Software [Matrix Science Ltd., London, GB] unter Verwendung der NCBIInr-Datenbank durchgeführt (Perkins *et al.*, 1999). Dabei verwendete Mowse-Scores (Pappin *et al.*, 1993) geben die Wahrscheinlichkeit an, daß das erhaltene Spektrum mit dem theoretischen übereinstimmt, daß das zu untersuchende Protein also mit dem Vergleichsprotein aus der Datenbank identisch ist. Mowse-Score-Werte über 64 sind signifikant ($p < 0,05$).

2.3.5 Bestimmung der Proteing Gesamtkonzentration

Die Konzentration an Proteinen in einer Lösung (Proteing Gesamtkonzentration) wird durch Messung der Absorption bei 280 nm [UltraSpec 4000, Pharmacia, Freiburg] ermittelt. Für die Proform der katalytischen Domäne der MMP-13 (Leu¹-Gly²⁴⁸) erhält man einen molaren Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{280} = 32.400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, der sich aufgrund der Anzahl von Tyrosin- und Tryptophan-Resten im Protein ergibt. Über das Lambert-Beersche Gesetz wird daraus die Proteinkonzentration berechnet.

Die Proteing Gesamtkonzentration läßt sich weiterhin durch einen BCA-Test [Pierce, Rochford, USA] bestimmen. Dabei wird eine Stammlösung von 2 mg/ml RSA [PAA Laboratories, Linz, Österreich] in einer Mikrotiterplatte [MaxiSorp F96, Nunc, Wiesbaden] soweit 1 : 1 verdünnt, daß man einen Standardbereich von 50 bis 2.000 µg/ml erhält. Diese Proteinstandards und die zu untersuchenden Proben werden auf die Platte aufgetragen und mit den Reagenzien (Kupfer und Bicinchonininsäure) des Testsystems gemäß den Herstelleranweisungen versetzt. Die Mikrotiterplatte wird für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend mißt man die Absorption bei 560 nm mit dem Spectrafluor Plus-Reader [Tecan, Crailsheim] und bestimmt die jeweiligen Proteinkonzentrationen mit der Software X-Fluor [Tecan].

2.3.6 ELISA-Messungen

Zu untersuchende Zellüberstände bzw. Gewebeflüssigkeiten (Aszitesflüssigkeit u.a.) werden zunächst für 10 Minuten bei 2.000 g zentrifugiert, um eine klare Lösung, frei von Zellfragmenten, zu erhalten. Die Bestimmung der Konzentrationen von MMP-2, TIMP-1 und TIMP-2 wird mittels kommerzieller ELISA-Assays [Amersham Pharmacia, Freiburg] gemäß den Herstellerprotokollen durchgeführt. Diese Tests ermitteln spezifisch die entsprechenden Proteinmengen an latenter MMP-2, gesamtem TIMP-1 bzw. gesamtem TIMP-2.

Zur Bestimmung der MMP-1 wurde ein Sandwich-ELISA-System nach bekanntem Verfahren (*Birkedal-Hansen et al., 1988; Lyons et al., 1993*) aufgebaut und angewandt, ebenso wie für MMP-8 und MMP-9 (*Bergmann et al., 1989*). Die Konzentrationsbestimmung der MMP-12 wurde mittels eines kompetitiven ELISAs (*Kocourek, 2002*) durchgeführt. Alle diese ELISAs sind sowohl für die aktive als auch für die latente Form des jeweiligen Enzyms spezifisch. Die Färbung der ELISA-Platten erfolgte gemäß den Herstellerangaben bzw. den in der o.g. Literatur angegebenen Protokollvorschriften. Die Absorption bei 405 bzw. 450 nm wurde mit dem Spectrafluor Plus-Reader [Tecan, Crailsheim] gemessen und der dazugehörigen Software X-Fluor [Tecan] ausgewertet.

Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte MMP-13-ELISA basiert auf dem Sandwich-System mit mono- und polyklonalen Antikörpern gegen die katalytische Domäne der rekombinanten Kollagenase-3. Zur Durchführung des ELISAs werden die Wells einer ELISA-Platte [Maxi-Sorp F96, Nunc, Wiesbaden] mit 100 µl einer Lösung, die 4 µg/ml des monoklonalen Maus-Anti-MMP-13-Antikörpers IVD128 [BioCheck, Münster] in Carbonatpuffer (1,6% Na₂CO₃; 2,9% NaHCO₃; pH 9,6) enthält, über Nacht bei 4°C inkubiert. Es folgt eine 90-minütige Inkubation bei 37°C mit je Well 230 µl PBST-Puffer (180 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄; pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,05% Tween-20), der 2% RSA [PAA Laboratories, Linz, Österreich] enthält. Nach viermaligem Waschen mit PBST-Puffer werden je 100 µl der entsprechenden Lösungen (Standard und Proben) in die Wells gefüllt. Nach Inkubation über Nacht bei 4°C wird erneut viermal mit PBST-Puffer gewaschen. Die Wells werden mit 100 µl einer Lösung des polyklonalen Kaninchen-anti-MMP-13-Antikörpers PK3 [BioCheck, Münster] befüllt (4 µg/ml in PBS-Puffer). Nach drei Stunden bei Raumtemperatur wird viermal mit PBST-Puffer gewaschen.

Der mit Peroxidase (HPO) konjugierte Detektions-Antikörper Ziege-anti-Kaninchen-IgG [Dianova, Hamburg] wird in PBS-Puffer verdünnt (1 : 5.000), wovon je 100 µl pro Well eingesetzt werden. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wird sechsmal mit PBST-Puffer gewaschen. Die enzymatische Farbentwicklung erfolgt mit TMB [KPL, Maryland, USA] gemäß der Protokollvorschrift des Herstellers für 15 bis 30 Minuten, je nach Geschwindigkeit der Färbung. Dann wird die Substratreaktion durch Zugabe von 100 µl 1 M Schwefelsäure gestoppt, die Absorption bei 450 nm mit dem Spectrafluor Plus-Reader [Tecan, Crailsheim] gemessen.

Zur Auswertung der ELISA-Meßdaten dient die Standardkurve (Abb. 3.6, S. 55), bei der die für die Standardwerte gemessene Absorption gegen die jeweilige Konzentration (in der Regel zwischen 0,5 und 100 ng/ml) aufgetragen ist. Anhand dieser Kurve lassen sich die Konzentrationen der gemessenen Proben aus der optischen Dichte errechnen. Die Umwandlung der gemessenen OD-Werte in entsprechende Konzentrationen erfolgt mittels eines Vier-Parameter-Fits (*Peterman & Butler, 1989*) gemäß folgender Gleichung:

$$OD_i = A + \frac{D - A}{1 + \exp [B (C - \log c_i)]}$$

(A, B, C, D = Parameter; OD_i = OD-Wert bei Meßpunkt i; c_i = Konzentration bei Meßpunkt i)

Die Parameter dienen als Startpunkt für eine Optimierung. Die Ausgangskurve wird durch iterative Näherungen verbessert. Aus den angepaßten Parametern werden die Konzentrationen der entsprechenden OD-Werte errechnet. Voraussetzung für eine solche Vier-Parameter-Interpolation ist ein sigmoider Verlauf der Standarddaten – bezogen auf die Konzentration, die logarithmisch aufgetragen wird.

Je nach Zusammenhang wird die mittels ELISA in „ng/ml“ gemessene Konzentration auf die durch einen BCA-Test (s. Abs. 2.3.5) ermittelte Gesamtproteinmenge bezogen und in „ng/mg“ angegeben (z.B. bei MMP-Konzentrationen in Aszitesflüssigkeit). Für statistische Analysen werden das Software-Paket SPSS [Version 8.0, SPSS, Chicago, USA] sowie das Software-Programm S-Plus [MathSoft 98, MathSoft Engineering & Education, Seattle, USA] verwendet. Zur Beurteilung, ob eine Veränderung von MMP- oder TIMP-Konzentrationen statistisch

signifikant ist oder nicht, wird ein Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben (*Lumley et al., 2002*) durchgeführt bzw. der Spearman-Korrelationskoeffizient (*Zou et al., 2003*) ermittelt. Für univariate Analysen des Gesamtüberlebens wird zu einem bestimmten Signifikanzniveau eine Kaplan-Meier-Kurve (*Nieto & Coresh, 1996*) erstellt.

2.3.7 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie von Tumorzellen, die aus Aszitesflüssigkeit von Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom stammen, wurde in der Frauenklinik der TU München (Klinische Forschergruppe) nach einem literaturbekannten Verfahren durchgeführt (*Noack et al., 1999*).

Die Tumorzellen werden für zehn Minuten mit normalem Mausserum inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Der polyklonale Antikörper PK3 [BioCheck, Münster] aus Kaninchen, gerichtet gegen die katalytische Domäne der rekombinanten MMP-13 (s. Abs. 2.1.1 bis 2.1.4), dient in einer Konzentration von 99 µg pro ml PBS-Puffer (180 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄; pH 7,4; 150 mM NaCl) als Primärantikörper. Entsprechende Detektionsantikörper sind mit fluoreszierendem Farbstoff gekoppelte Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper [Alexa Fluor 488, Molecular Probes, Leiden, Niederlande], die mit PBS-Puffer auf eine Endkonzentration von 5 µg/ml verdünnt werden. Anschließend werden die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen. Negativkontrolle erfolgt durch Auslassen des Inkubationsschrittes mit dem Primärantikörper, Positivkontrolle durch Färbung von HaCaT-Zellen. Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie wird mit einem Axiovert 35 [Carl Zeiss, Oberkochen] gemäß Herstelleranweisungen durchgeführt, welche eine Falschfarbendarstellung liefert. Diese Darstellungsweise zeigt steigende Konzentrationen durch verschiedene Farben an – von Blau (geringste) nach Rot (höchste Konzentration).

2.4 Proteinisolierung und -reinigung

2.4.1 Klinische Daten zur Aszitesflüssigkeit

Die Untersuchungen der Proteinmengen erfolgten in Aszitesflüssigkeiten eines Kollektivs von 30 Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom (davon eine im Stadium FIGO IIIa, eine im Stadium FIGO IIIb, 17 im Stadium FIGO IIIc und elf im Stadium FIGO IV), die in der Frauenklinik der TU München, Abteilung für Geburtshilfe und Gynäkologie, behandelt wurden. Alle Patientinnen wiesen zum Zeitpunkt der Diagnose mehr als 500 ml Aszitesflüssigkeit auf. Die Therapie für alle Patientinnen mit invasivem Eierstockkrebs bestand aus einem chirurgischen Eingriff zum Zwecke der kompletten Resektion des Tumors, gefolgt von einer Chemotherapie mit Platin-Verbindungen und/oder mit Paclitaxel. Das mediane Alter betrug 64 Jahre, wobei sich der Altersbereich von 32 bis 83 Jahre erstreckte. 18 Patientinnen starben an der Krankheit innerhalb des Beobachtungszeitraums, bei den verbleibenden zwölf wurde der Krankheitsverlauf sechs bis 69 Monate (Median 20,5 Monate) verfolgt. Nach Abschluß der Operation waren in fünf Fällen keine makroskopisch sichtbaren Resttumore vorhanden, bei den 25 anderen Patientinnen waren sie vorhanden. Die histopathologische Untersuchung des Tumorgewebes ergab bei 26 Patientinnen einen papillär serösen Tumor, bei einer Patientin einen muzinösen Tumor, bei einer einen endometrioiden Tumor und bei zwei Patientinnen einen Müllerschen Misch tumor des Ovars (Karzinomsarkom). Acht Tumore wurden dem Differenzierungsgrad 1 oder 2 zugeordnet, während der Grad 3 oder 4 auf 22 Tumore zutraf. Die Aszitesflüssigkeit wurde während der Operation erhalten. Als Kontrolle diente Aszitesflüssigkeit zweier Patientinnen mit Leberzirrhose.

2.4.2 Affinitätschromatographie mit MaxiSorp-Granulat

Von der Nunc GmbH (Wiesbaden) wurde ein Granulat als Prototyp zur Verfügung gestellt, das Proteine unspezifisch binden kann. Dabei handelt es sich um mit MaxiSorp beschichtete, zylinderförmige Teilchen mit einer Oberfläche von jeweils etwa 0,4 cm². Ihre Bindungseigenschaften basieren auf den gleichen nicht-kovalenten Wechselwirkungen, wie sie auch bei den im ELISA eingesetzten Mikrotiterplatten vorhanden sind.

Etwa 150 ml des MaxiSorp-Granulats werden mit einer Lösung, die 8 µg/ml des monoklonalen Maus-Anti-MMP-13-Antikörpers IVD128 [BioCheck, Münster] in Carbonatpuffer (1,6% Na₂CO₃; 2,9% NaHCO₃; pH 9,6) enthält, über Nacht bei 4°C inkubiert. Es folgt bei 37°C eine 90-minütige Inkubation mit PBST-Puffer (180 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄; pH 7,4; 0,15 M NaCl; 0,05% Tween-20), der 2% RSA [PAA Laboratories, Linz, Österreich] enthält. Nach viermaligem Waschen mit PBST-Puffer erfolgt eine Inkubation im Batch-Verfahren mit 200 ml MMP-13-haltiger Lösung (Stammlösung verschiedener Konzentrationen bzw. bei 2.000 g für 10 min zentrifugierte Aszitesflüssigkeit) für 120 Minuten bei 4°C. Es wird erneut viermal mit PBST-Puffer gewaschen und die Antigen-Antikörper-Bindung durch Inkubation mit Glycin-Puffer (0,2 M Glycin/HCl; pH 2,7) für drei Minuten bei Raumtemperatur gelöst. Das MMP-13-haltige Eluat wird direkt mit der fünffachen Menge PBST-Puffer neutralisiert und anschließend durch Ultrafiltration (Ausschlußgrenze M = 10 kDa) bei 4°C konzentriert (s. Abs. 2.4.4).

2.4.3 Affinitätschromatographie mit einem Hydroxamat-Inhibitor

Im Gegensatz zur gezielten Isolierung der MMP-13 mittels an MaxiSorp-Granulat gebundenen spezifischen Antikörpern (s. Abs. 2.4.2) wird bei diesem Batch-Verfahren Säulenmaterial, das mit einem Hydroxamat-Inhibitor [Bachem, Heidelberg] gekoppelt ist, zur Isolierung verschiedener MMPs aus Gewebeflüssigkeiten angewandt (*Moore & Spilburg, 1986*). Dazu vermischt man gleiche Teile von Säulenmaterial mit Gewebeflüssigkeit und vortext [Vortex-Genie, Bender-Hobein AG, Zürich, Schweiz] 30 Minuten bei 4°C. Der Überstand wird abgenommen und das Säulenmaterial fünfmal mit Hydroxamat-Puffer (50 mM Tris/HCl; pH 7,5; 1 mM CaCl₂; 0,2 mM ZnCl₂) gewaschen. Dann wird das Säulenmaterial mit dem gleichen

Volumen Hydroxamat-Puffer (versetzt mit 1 M NaCl) für 15 Minuten bei 4°C unter Vortexen inkubiert. Der Überstand wird abgenommen, während man das Säulenmaterial dreimal mit Hydroxamat-Puffer wäscht und mit Regenerierungs-Puffer (50 mM EDTA/NaOH; pH 7,5; 0,5 M NaCl) regeneriert.

2.4.4 Ultrafiltration

Unter gleichbleibenden Pufferbedingungen werden gelöste Proteine konzentriert, indem die Proteinlösung bei 4°C durch einen Stickstoffüberdruck von 3 bar über eine asymmetrische Membran [Amicon, Beverly, USA] filtriert wird. Alternativ werden geringe Volumina einer Proteinlösung in einer Zentrifuge bei 1.000 g mittels Centricons [Amicon, Beverly, USA] konzentriert. Bei beiden Verfahren richtet sich die Wahl der Ausschlußgrenzen nach der Größe des aufzuarbeitenden Proteins.

2.4.5 Ionenaustauschchromatographie

Das Säulenmaterial Q-Sepharose [Pharmacia, Freiburg] wird gemäß der Herstelleranweisung mit 0,3 M HCl regeneriert und anschließend einmal mit Puffer B (50 mM Tris/HCl; pH 8,5; 6 M Harnstoff; 1,0 M NaCl; 50 mM β -Mercaptoethanol), dann dreimal mit Puffer A (50 mM Tris/HCl; pH 8,5; 6 M Harnstoff; 50 mM β -Mercaptoethanol) gewaschen. Die bei der MMP-13-Expression isolierten und resuspendierten Inclusion-Bodies (s. Abs. 2.1.3) werden 1 : 4 mit Puffer A verdünnt und zur Inkubation des Säulenmaterials unter Schütteln bei 4°C über Nacht verwendet. Das inkubierte Material wird in den Säulenkörper gefüllt und mit dem dreifachen Volumen an Puffer A gespült. Die gebundenen Proteine werden durch steigende Salzkonzentration (von 100% Puffer A bis 100% Puffer B) mit einem definierten Stufengradienten (0,5 ml/min; alle 90 min 5 Prozentpunkte weniger Puffer A und mehr Puffer B) vom Säulenmaterial eluiert [Pump-1, GradiFrac, Pharmacia, Freiburg]. Das Eluat wird fraktioniert (je 10 ml) gesammelt [2211 Superrac, LKB, München].

2.4.6 Gelfiltration

Das Säulenmaterial Sephacryl S-100 [Pharmacia, Freiburg] wird gemäß der Herstelleranweisung regeneriert, mit S-100-Puffer (20 mM Tris/HCl; pH 7,5; 0,5 M NaCl; 5 mM CaCl₂) dreimal gewaschen und in eine Chromatographiesäule (1 m Länge, 6 cm Durchmesser) gefüllt. Man trägt 10 ml Proteinlösung auf die äquilibrierte Säule und führt die Gelfiltration bei 4°C und 0,5 ml/min durch [Pump-1, GradiFrac, Pharmacia, Freiburg]. Das Eluat wird fraktioniert (je 10 ml) gesammelt [2211 Superrac, LKB, München].

2.4.7 Reversed-Phase-HPLC

Die Reversed-Phase-HPLC wird mit einer hydrophoben RP-C18-Säule [T.J. Baker, Phillipsburg, USA] gemäß der Herstelleranweisung durchgeführt. Die Substanzen werden in HPLC-Puffer A (0,1% Trifluoressigsäure) auf die Säule gebracht und durch einen linearen Gradienten bis zu 100% HPLC-Puffer B (0,09% Trifluoressigsäure; 80% Acetonitril) eluiert [LaChrome, UV-Detektor L-7400, Merck-Hitachi]. Die Elutionsbedingungen müssen bei jeder Anwendung optimiert werden.

2.5 Enzymaktivität

2.5.1 Aktivierung mit Quecksilber(II)-chlorid

Zur Aktivierung der latenten katalytischen Domäne der MMP-13 (Leu¹-Gly²⁴⁸) wird das Protein in gewünschter Konzentration für zwei Stunden mit 5 mM HgCl₂ in Aktivierungs-Puffer (50 mM Tris/HCl; pH 7,5; 300 mM NaCl; 5 mM CaCl₂; 0,5 mM ZnCl₂) inkubiert.

2.5.2 Zymographie

Zur Herstellung des Substratgels werden 12 mg Gelatin in 7 ml Gelpuffer (1 M Tris/HCl; pH 9,4; 0,5% SDS; 0,25% TEMED) in der Wärme (etwa 60°C) gelöst. Nach dem Abkühlen der Lösung führt man eine Gelelektrophorese (s. Abs. 2.3.1) durch, jedoch ohne die Proben auf 100°C zu erhitzen und ohne β-Mercaptoethanol und Harnstoff zuzusetzen. Stattdessen werden die Proben mit Zymogramm-Puffer (40 mM Tris/HCl; pH 6,8; 5% SDS; 0,03% BPB; 20% Glycerin) versetzt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wird das Gel eine Stunde in einer 2,5%-igen Lösung von Triton X-100 [Sigma, Taufkirchen] inkubiert. Es wird dreimal für jeweils eine Minute gewaschen. Dann erfolgt eine Inkubation über Nacht bei 37°C in Faltungpuffer (20 mM Tris/HCl; pH 7,5; 0,5 M NaCl; 5 mM CaCl₂; 0,5 mM ZnCl₂). Nach zweimaligem Waschen für jeweils drei Minuten erfolgt die Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R250 [Serva, Heidelberg] (s. Abs. 2.3.1).

2.5.3 Aktivitätstest mit dem Mca-Peptid

Zur Untersuchung der MMP-Aktivität wird das synthetische Substrat (7-Methoxycoumarin-4-yl)-acetyl-Pro-Leu-Gly-Leu-(3-[2,4-dinitrophenyl]-L-2,3-diaminopropionyl)-Ala-Arg-NH₂, das sog. Mca-Peptid [Calbiochem, Bad Soden], verwendet, dessen Gly-Leu-Bindung durch verschiedene MMPs gespalten wird (*Knight et al., 1992*). Die Messung erfolgt mit dem Fluoreszenzphotometer LS 50 B [Perkin Elmer, Überlingen] bei einer Anregungswellenlänge von 328 nm. Die Enzymaktivität wird durch die Zunahme der Intensität der Emissionswellenlänge von 398 nm über einen Zeitraum von 90 Sekunden nachgewiesen. Enzymkonzentrationen werden im nanomolaren, Substratkonzentrationen im mikromolaren Bereich eingesetzt. Die erhaltenen relativen Fluoreszenzwerte werden durch Aufnahme einer Eichgeraden mit Mca-Pro-Leu-NH₂ in absolute Substratkonzentrationen umgerechnet. Die Messungen werden im Mca-Puffer (25 mM Tris/HCl; pH 7,0; 100 mM NaCl; 5 mM CaCl₂; 0,1 mM ZnCl₂) bei 25°C durchgeführt.

2.5.4 Spezifische Aktivitäts-Assays

Sowohl die Bestimmung der MMP-1- und MMP-2-Aktivität in den Fibroblasten-Überständen als auch die MMP-13-Aktivität in Aszitesflüssigkeit wird durch spezifische Aktivitäts-Assays für MMP-1, MMP-2 bzw. MMP-13 [BioTrak, Amersham Pharmacia, Freiburg] gemäß den Herstelleranweisungen bestimmt. Dazu werden die zu untersuchenden Lösungen bei 2.000 g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert, um einen klaren Überstand zu erhalten. In Analogie zu einem ELISA bindet der Test im ersten Schritt spezifisch MMP-1, MMP-2 bzw. MMP-13. Durch die jeweilige aktive MMP wird die in dem Test verwendete Proform eines Enzyms (Urokinase) aktiviert, was zur Spaltung eines spezifischen chromogenen Peptid-Substrats führt (*Verheijen et al., 1997*). Zur Detektion des freigesetzten Chromophors wird die Absorption bei 405 nm mit dem Spectrafluor Plus-Reader [Tecan, Crailsheim] gemessen und mit der dazugehörigen Software X-Fluor [Tecan] ausgewertet. Statistische Analysen werden mit dem Software-Paket SPSS [Version 8.0, SPSS, Chicago, USA] sowie dem Software-Programm S-Plus [MathSoft 98, MathSoft Engineering & Education, Seattle, USA] durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Expression der katalytischen Domäne der MMP-13

3.1.1 Expression in E.coli

Die Proform der katalytischen Domäne der MMP-13 (Leu¹-Gly²⁴⁸) wurde nach einem in der Biochemie I (AG Tschesche) der Universität Bielefeld etablierten Verfahren (*Oberpichler, 1999*) in E.coli exprimiert. Ausgangspunkt waren Tiefkühlkulturen entsprechender transformierter Bakterien mit Antibiotikaresistenz. Die Expressionskontrolle (s. Abb. 3.1) durch SDS-PAGE zeigte die mit der Expressionsdauer zunehmende Bande der MMP-13 bei etwa 30 kDa, die bereits drei Stunden nach der Induzierung mit IPTG ihr Maximum erreichte.

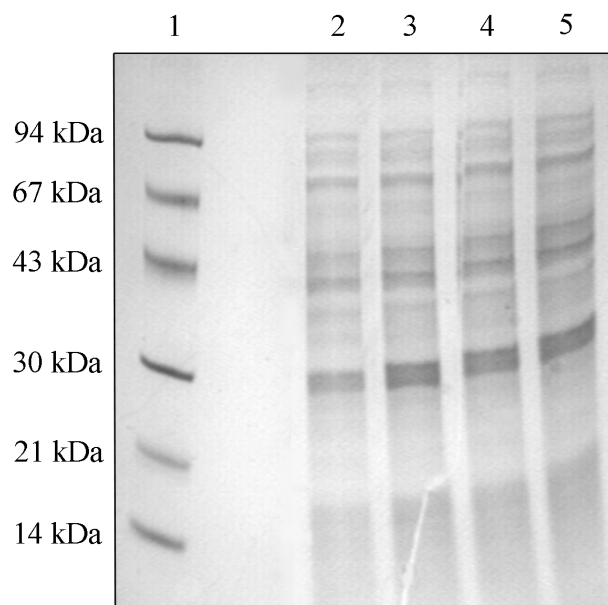


Abb. 3.1: Gelelektrophorese zur Kontrolle der MMP-13-Expression
1: LMW-Marker 2-5: Expression nach 1, 2, 3 bzw. 4 h

3.1.2 Renaturierung und Reinigung

Die aufgearbeiteten Inclusion-Bodies wurden zunächst durch Ionenaustauschchromatographie mit Q-Sepharose gereinigt, wobei mit einem Stufengradienten von 0 bis 1.000 mM NaCl eluiert wurde (s. Abb. 3.2).

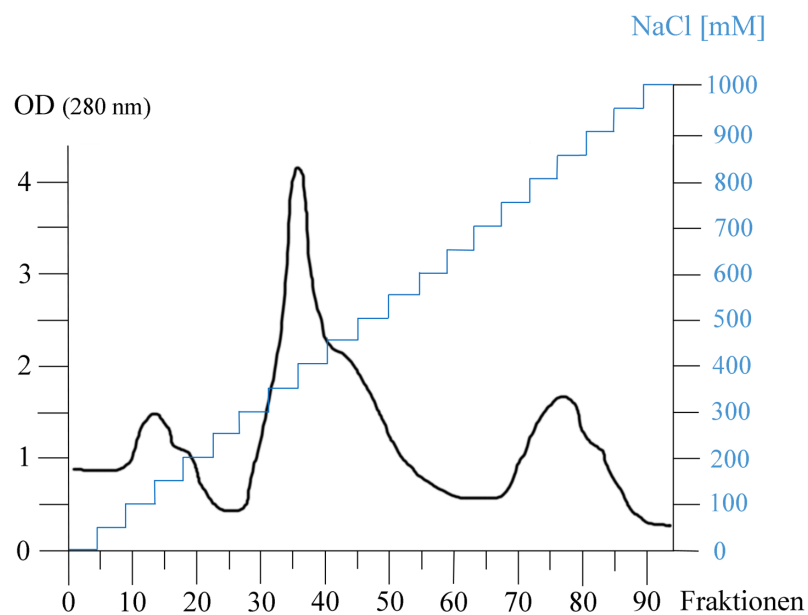


Abb. 3.2: Elutionsprofil der Ionenaustauschchromatographie

An Q-Sepharose gebundene MMP-13 aus IB-Aufschluß wurde mit NaCl eluiert.

Die Ionenaustauschchromatographie lieferte drei deutlich voneinander getrennte Proteinfractionen. Wie sich durch SDS-PAGE (s. Abb. 3.3) zeigte, wurde die MMP-13 (Leu¹-Gly²⁴⁸) bei einer Salzkonzentration von 350-400 mM NaCl eluiert, was der mittleren, großen Fraktion entspricht. Neben der Proform (30 kDa) erkennt man im Gel noch einige Verunreinigungen. Als zusätzliche Kontrolle für die routinemäßige Expression diente eine Leitfähigkeitsmessung der einzelnen Fraktionen, mit deren Hilfe die Elution der MMP-13 im Bereich von 5,0 bis 6,5 mS verfolgt werden konnte.

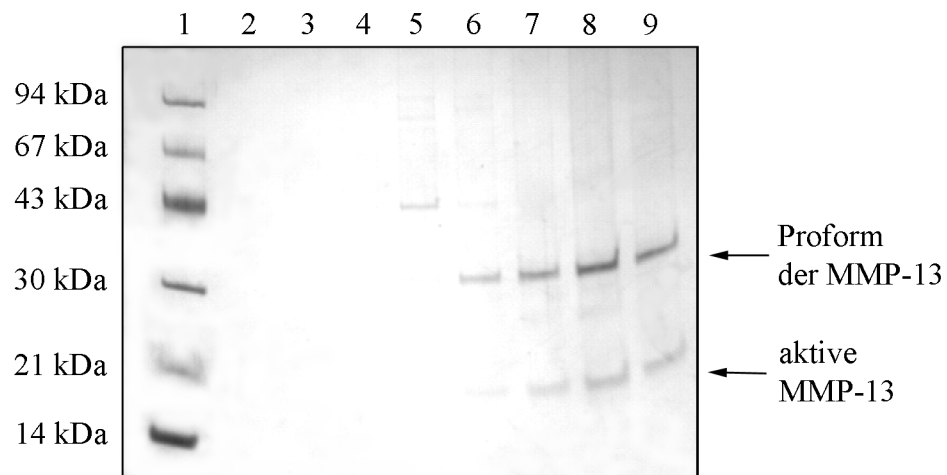


Abb. 3.3: Gelelektrophorese verschiedener Fraktionen der Ionenaustausch-Chromatographie zur Reinigung der MMP-13

1: LMW-Marker 2: leer 3-9: Fraktionen 5, 10, 20, 30, 33, 36 bzw. 40

Vor einer weiteren Reinigung des Proteins mittels Gelfiltration wurde die MMP-13 zunächst durch Dialyse renaturiert, wobei ein Teil des Proteins (ca. 30%) aufgrund von Fehlfaltung und Proteinaggregat-Bildung verloren ging. Die Funktionalität der exprimierten katalytischen Domäne der MMP-13 wurde nach Aktivierung mit HgCl_2 sowohl mit dem Mca-Peptid als auch mit dem Aktivitäts-Assay bestätigt. Im letztgenannten Test wurde für die eingesetzte latente MMP-13 ($\text{Leu}^1\text{-Gly}^{248}$) bei einer Konzentration von 30 ng/ml (1,0 nM) nach Aktivierung ein Wert von 0,7 pmol/ml aktiver MMP-13 erhalten. Durch die Aktivierung mit HgCl_2 wurden also etwa 70% des inaktiven Enzyms in die aktive Form übergeführt.

Die anschließende Gelfiltrationschromatographie mit Sephacryl S-100 diente der vollständigen Reinigung der exprimierten MMP-13. Die hohe Trennleistung der Gelfiltration zeigte sich bei einer Gelelektrophorese der entsprechenden vereinigten Fraktionen mit anschließender Silberfärbung (s. Abb. 3.4). Neben der Bande der latenten Kollagenase-3 ($\text{Leu}^1\text{-Gly}^{248}$) sind bei der verwendeten Konzentration keine weiteren Proteine im Gel erkennbar. Es wurden weiterhin Western-Blots (s. Abb. 3.5) mit mono- und polyklonalen Antikörpern gegen die katalytische Domäne der MMP-13 erstellt. Dabei wurde zusätzlich zur Proform auch die durch HgCl_2 aktivierte MMP-13 eingesetzt und detektiert.

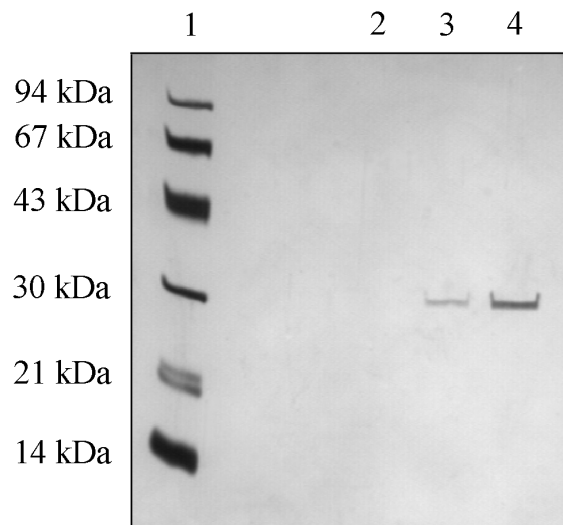


Abb. 3.4: Gelelektrophorese der durch Gelfiltration gereinigten MMP-13
 1: LMW-Marker
 2: vereinigte Fraktionen ohne MMP-13
 3-4: vereinigte Fraktionen mit geringer bzw. hoher MMP-13-Konzentration

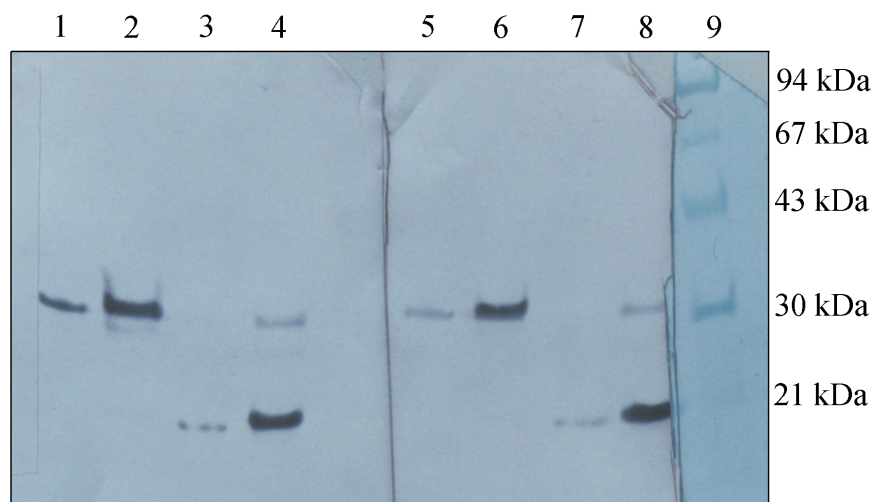


Abb. 3.5: Western-Blot der durch Gelfiltration gereinigten MMP-13 mit polyklonalen (1-4) und monoklonalen (5-8) Antikörpern
 1/5: katalytische Domäne der MMP-13, latente Form (500 ng)
 2/6: katalytische Domäne der MMP-13, latente Form (5 µg)
 3/7: katalytische Domäne der MMP-13, aktiviert mit HgCl₂ (500 ng)
 4/8: katalytische Domäne der MMP-13, aktiviert mit HgCl₂ (5 µg)
 9: LMW-Marker

Durch N-terminale Sequenzierung konnte das abschließend mittels HPLC-Chromatographie gereinigte Protein als Proform der katalytischen Domäne der MMP-13 (Leu¹-Gly²⁴⁸) anhand der ersten 15 Aminosäuren identifiziert werden, da diese Sequenz mit der in der Literatur beschriebenen (*Freije et al., 1994*) vollständig übereinstimmte:

H₂N - L - P - L - P - S - G - G - D - E - D - D - L - S - E - E -

3.2 Entwicklung und Anwendung eines MMP-13-ELISAs

3.2.1 Entwicklung des ELISAs

Nach Abschluß zahlreicher Tests, in denen Bindungseigenschaften, Antikörper-Konjugate, Inkubationszeiten und mehrere andere ELISA-spezifische Parameter in kompetitiven sowie in Sandwich-Systemen untersucht wurden, erwies sich der beschriebene MMP-13-ELISA (s. Abs. 2.3.6, S. 41) für die im folgenden aufgeführten Anwendungen aufgrund seiner hohen Sensitivität und Reproduzierbarkeit als am besten geeignet. Er basierte auf dem Sandwich-System mit einem monoklonalen Maus-Antikörper als Primärantikörper sowie einem polyklonalen Kaninchen-Antikörper als Sekundärantikörper, die beide gegen die Proform der katalytischen Domäne der MMP-13 (Leu¹-Gly²⁴⁸) gerichtet sind. Ein mit Peroxidase konjugierter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper detektierte den Kaninchen-Antikörper und setzte das Substrat TMB um, so daß die entsprechende Konzentration durch Absorptionsmessung bei 450 nm bestimmt wurde. Bei Verwendung der katalytischen Domäne der MMP-13 als Standard mit einer Konzentration von 0 bis 100 ng/ml erhielt man eine Standardkurve (s. Abb. 3.6), die den ELISA-typischen sigmoiden Verlauf aufwies.

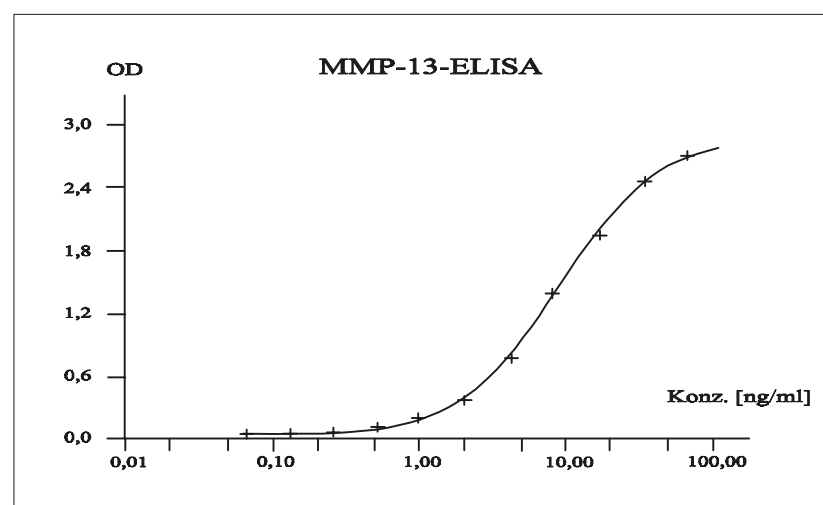


Abb. 3.6: Standardkurve des MMP-13-ELISAs

Der entwickelte MMP-13-ELISA erkennt sowohl die aktive als auch die Proform der Kollagenase-3. Der ideale Meßbereich liegt im linearen Bereich von 2 bis 32 ng/ml, die Sensitivitätsgrenze bei 0,5 ng/ml. Die Kreuzreaktivität mit anderen MMPs ist mit weniger als 3% für alle getesteten MMPs (MMP-1, -2, -8, -9, -12 und -14) sehr gering.

3.2.2 Qualitätstests

Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit des MMP-13-ELISAs wurden einige Tests durchgeführt. Dabei handelte es sich einerseits um standardmäßige Verfahren zur Prüfung der Reproduzierbarkeit des ELISAs (z.B. Intra- und Inter-Assays), andererseits um Qualitätstests, die speziellen Fragestellungen nachgehen, wie etwa dem Einfluß der Dauer des Probenauftrags (und dadurch unterschiedliche Inkubationszeiten) auf das Meßergebnis (*Hantke, 2002*).

Für den Intra-Assay wurden zehn Spalten einer ELISA-Platte mit MMP-13 in den Konzentrationen von 2 bis 32 ng/ml inkubiert und gemessen, also wie eine zehnfache Standardauftragung. Analog wurden für den Inter-Assay auf zehn verschiedenen ELISA-Platten zu verschiedenen Zeitpunkten in jeweils einer Spalte die gleichen MMP-13-Konzentrationen aufgetragen und anschließend gemessen. Dabei ergaben sich Standardabweichungen von 5-12% für den Intra-Assay und von 17-25% für den Inter-Assay, in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration (2 bis 32 ng/ml). Ein weiteres Qualitätsmerkmal eines ELISAs ist die Recovery-Rate. Dabei wird untersucht, wieviel Prozent des entsprechenden Antigens, das verschiedenen Lösungen unterschiedlicher Zusammensetzung zugesetzt wurde, durch den ELISA detektiert werden. Die Recovery-Rate der zugesetzten MMP-13 sowohl in serumfreiem Medium als auch in Aszitesflüssigkeit einer Patientin mit Leberzirrhose wurde mit diesem ELISA fünffach bestimmt und lag jedesmal zwischen 85 und 105%.

Neben diesen beiden standardmäßigen Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit eines ELISAs wurde weiterhin der Einfluß der Füllhöhe der ELISA-Wells untersucht. Es sollte die Frage geklärt werden, inwieweit Abweichungen beim Befüllen der Wells, und damit die MMP-13-Absolutmenge und nicht die Konzentration, für das Meßergebnis entscheidend sind. Dazu

wurde ein ELISA mit unterschiedlichen Füllhöhen des MMP-13-Standards von 50 bis 150 μl durchgeführt (s. Abb. 3.7), wobei die Füllhöhe gemäß der Protokollvorschrift 100 μl beträgt (s. Abs. 2.3.6, S. 41). Diese Messung erfolgte für zwei verschiedene MMP-13-Konzentrationen (3 und 10 ng/ml) jeweils in Vierfach-Bestimmung. Man erkennt deutlich einen Zusammenhang zwischen der gemessenen Absorption und der Füllhöhe der Wells, der in grober Näherung linear ist.

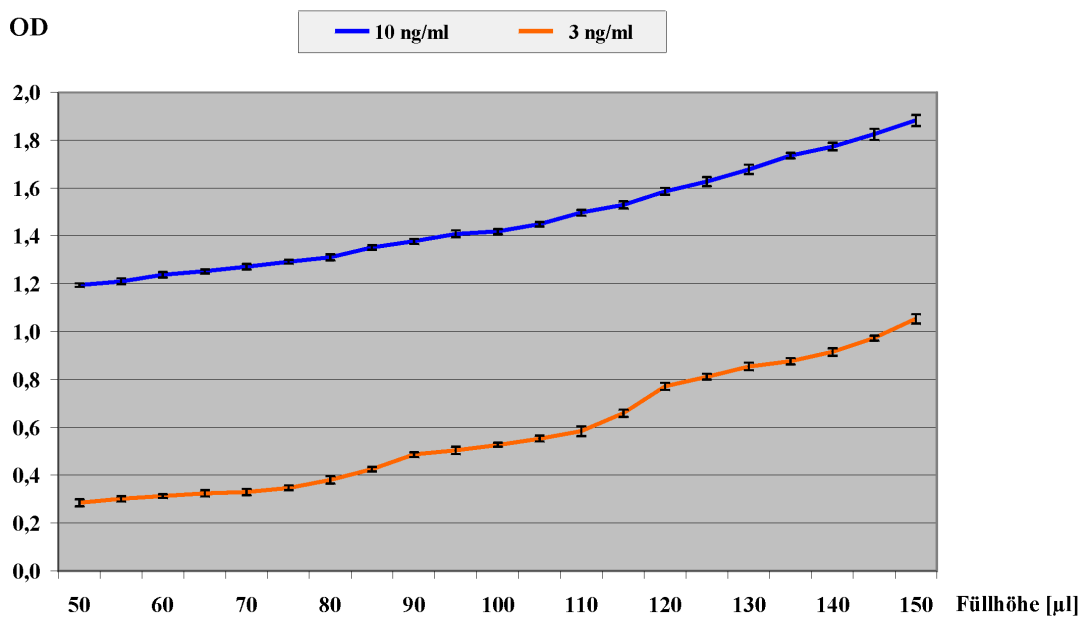


Abb. 3.7: Abhängigkeit der optischen Dichte von der Füllhöhe der Wells des MMP-13-ELISAs

Abschließend sollte der Zeitfaktor beim Probenauftrag untersucht werden. Dabei ging es um die Fragestellung, wie groß der Einfluß von Zeitverzögerungen beim Auftragen der Proben und damit unterschiedlichen Inkubationszeiten ist. Dazu wurden für verschiedene Konzentrationen (zwischen 0 und 100 ng/ml) ELISAs in Vierfach-Bestimmung so durchgeführt, daß nach dem letzten Waschschrift die Proben sofort und dann in Abständen von jeweils fünf Minuten (bis zu 90 Minuten nach dem Waschen) aufgetragen wurden. Als Ergebnis zeigte sich, daß – mit Ausnahme der MMP-13-freien Blindprobe – die gemessene OD bei allen Konzentrationen bereits nach fünf Minuten um knapp 3% zurückgeht. Nach 90 Minuten macht dieser Rückgang dann sogar über 40% aus, d.h. die Absorption hat sich annähernd halbiert (s. Abb. 3.8). Diese zeitliche Abnahme der OD-Werte scheint unabhängig von der Konzentration zu sein.

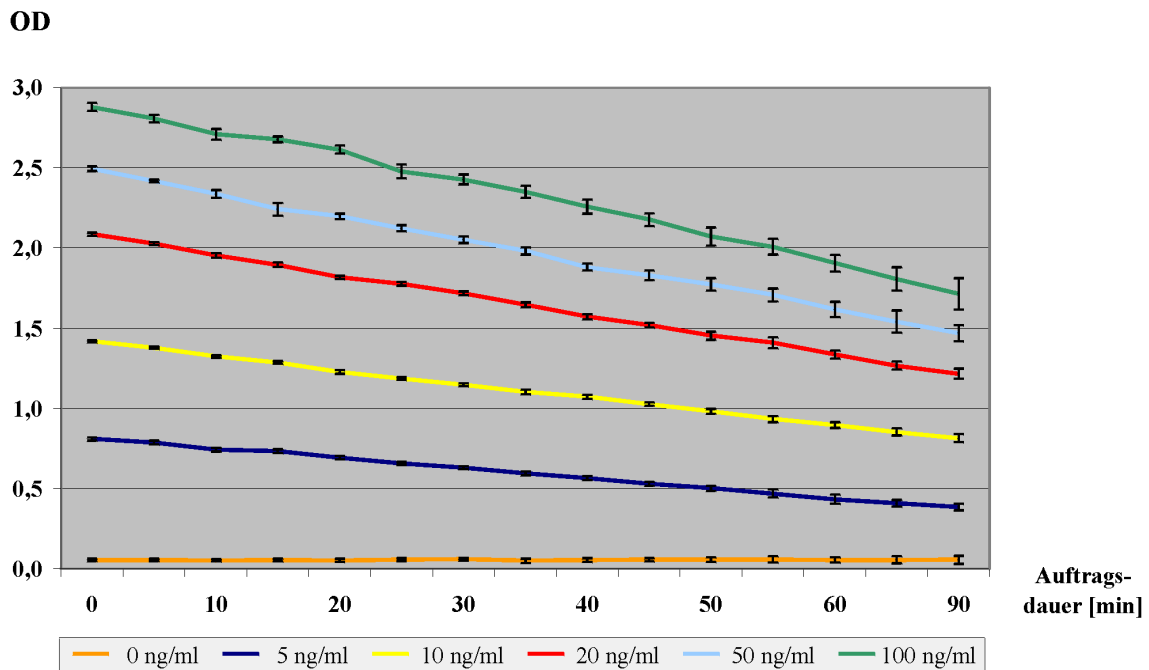


Abb. 3.8: Abhängigkeit der optischen Dichte von der Dauer des Probenauftrags beim MMP-13-ELISA

3.2.3 ELISA-Messungen bei verschiedenen pathophysiologischen Prozessen

Der entwickelte MMP-13-ELISA wurde zur Bestimmung der Konzentration dieser Protease in Gewebe bzw. Gewebeflüssigkeiten bei verschiedenen pathophysiologischen Prozessen eingesetzt. Während MMP-13 von UV-bestrahlten Fibroblasten unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht exprimiert wurde (s. Abs. 3.6.6), konnte mit dem ELISA die Konzentration der Kollagenase-3 in einem Kollektiv von Brusttumorgewebe (St. Vincent's Hospital, Dublin, Irland) bestimmt werden. In diesem Fall wurde jedoch keine Korrelation der verschiedenen Patientinnen- bzw. Tumoreigenschaften (Alter, Gesamtüberleben, uPA/PAI-1-Konzentration, Grad des Tumors, usw.) mit der vorhandenen MMP-13-Menge festgestellt, weshalb die Meßwerte im folgenden nicht explizit aufgeführt sind.

Untersuchungen der MMP-13-Konzentration in Aszitesflüssigkeit von Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom (Klinische Forschergruppe, Frauenklinik der TU München, München) legten die Vermutung nahe, daß ein Zusammenhang zwischen der Konzentration dieser Protease in der Aszitesflüssigkeit und der Überlebenszeit der Patientinnen besteht (s. Abs. 3.3.2). Weiterhin wurde bei einer Untersuchung von aseptischen Hüftprothesenlockerungen (Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Sportorthopädie, Abteilung für Orthopädische Chirurgie, TU München, München) durch Einsatz des MMP-13-ELISAs ein Zusammenhang zwischen dem Krankheitsbild und der Konzentration dieses Enzyms in prothesenahem Gewebe nachgewiesen (s. Abs. 3.5).

3.3 MMPs und TIMPs in Aszitesflüssigkeit – Korrelation mit dem klinischen Verlauf beim Ovarialkarzinom

Die Untersuchung der Proteinmengen erfolgte in Aszitesflüssigkeiten eines Kollektivs von 30 Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom (davon eine im Stadium FIGO IIIa, eine im Stadium FIGO IIIb, 17 im Stadium FIGO IIIc und elf im Stadium FIGO IV), die in der Frauenklinik der TU München, Abteilung für Geburtshilfe und Gynäkologie, behandelt wurden. Alle weiteren klinischen Daten sind im Methodenteil dieser Arbeit (s. Abs. 2.4.1, S. 44) aufgeführt.

3.3.1 Bestimmung von MMPs und TIMPs in Aszitesflüssigkeit

Als ein erster Test der proteolytischen Aktivität wurde von einigen Aszitesflüssigkeiten eine Gelatin-Zymographie durchgeführt. Für alle getesteten Proben zeigte sich in etwa das gleiche Bandenmuster (s. Abb. 3.9): zwei deutliche Banden bei etwa 60 bzw. 90 kDa, von denen sich die erstgenannte nach der Affinitätschromatographie (Hydroxamat-Inhibitor) verstärkt hatte.

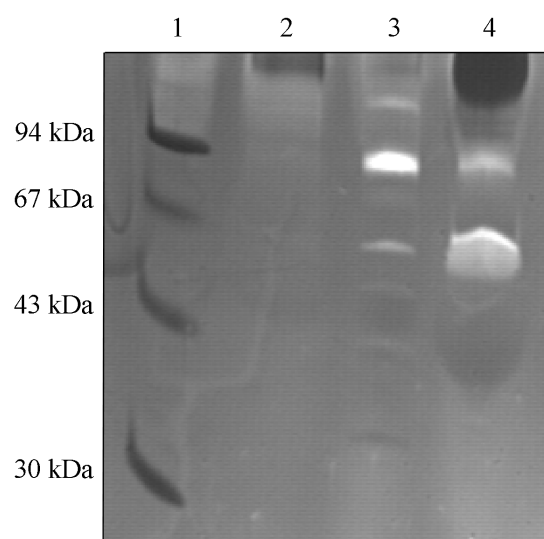


Abb. 3.9: Zymogramm der Aszitesflüssigkeit vor (3) und nach (4) der Affinitäts-Chromatographie mit Hydroxamat-Inhibitor (1: LMW-Marker 2: fetales Kälberserum)

FIGO III	MMP-1	MMP-2	akt. -2	MMP-8	MMP-9	akt. -9	MMP-13	akt. -13	TIMP-1	TIMP-2	Protein
Aszites-Nr.	[ng/ml]	[ng/ml]	[ng/ml]	[ng/ml]	[ng/ml]	[ng/ml]	[ng/ml]	[ng/ml]	[ng/ml]	[ng/ml]	[mg/ml]
26024	8,2	2660	0,3	1350	0,9	0,0	0,0	0,0	1160	93	18,3
27231	4,9	3815	0,5	2095	1,8	0,0	6,1	0,6	1450	134	24,5
27288	8,9	3295	0,4	1690	2,0	0,0	0,5	0,6	1780	118	21,1
27459	6,4	1815	0,4	1550	1,5	0,0	1,7	0,8	1360	273	27,6
27492	5,0	2530	0,5	965	1,1	0,6	0,0	0,0	2840	101	28,8
27958	6,6	2890	0,4	1690	2,1	0,4	3,3	1,0	2230	130	22,8
27968	7,0	3155	0,3	2105	1,2	0,0	11,3	0,0	1340	82	26,0
27992	6,1	2950	0,3	2355	6,5	0,4	3,1	0,0	1270	127	29,0
28514	11,0	5575	0,5	1390	3,2	0,0	0,5	0,3	2790	249	18,5
28541	19,3	4925	1,1	1265	1,4	0,0	1,6	0,7	1720	235	25,7
28542	5,7	3560	0,5	2365	2,3	0,0	4,8	1,8	1520	142	20,9
28662	7,5	4175	0,4	8500	1,1	0,0	1,4	0,9	4180	57	27,1
28758	6,8	4085	0,2	3415	3,5	0,0	37,4	1,1	3330	189	18,0
28868	27,9	4240	0,4	2270	6,5	0,0	1,1	0,4	3410	146	25,8
29065	9,7	7505	0,3	2450	1,0	0,0	1,8	1,3	3780	96	27,8
29192	16,2	7480	0,4	2305	1,0	0,0	5,2	0,6	1800	231	29,1
29198	19,1	2575	0,4	5870	125,0	1,0	35,5	2,2	4530	224	16,9
29235	10,1	2345	0,7	6450	31,1	0,0	1,5	1,2	3450	266	11,0
29250	4,1	3640	0,4	2650	1,7	0,0	1,5	1,9	1490	88	16,8
Mittelwert	10,4	3865	0,4	2782	10,7	0,1	6,5	0,8	2441	161	23,7
Std.-Abw.	6,3	1623	0,2	2050	29,4	0,3	11,2	0,6	1107	69	4,9
FIGO IV	MMP-1	MMP-2	akt. -2	MMP-8	MMP-9	akt. -9	MMP-13	akt. -13	TIMP-1	TIMP-2	Protein
Aszites-Nr.	[ng/ml]	[ng/ml]	[ng/ml]	[ng/ml]	[ng/ml]	[ng/ml]	[ng/ml]	[ng/ml]	[ng/ml]	[ng/ml]	[mg/ml]
27013	17,3	2990	0,3	5790	41,5	1,2	3,7	0,7	4640	163	31,5
27563	18,8	7160	0,2	2010	0,9	0,0	19,9	1,0	4760	60	30,1
27603	46,5	3025	0,2	4650	6,8	0,0	13,9	0,9	6420	115	26,6
27692	9,1	7010	1,1	1335	1,2	0,3	3,5	0,9	2590	57	29,8
27822	15,6	5535	0,3	3535	4,9	0,0	0,7	0,3	4980	204	18,4
27903	11,2	4895	0,2	2125	2,5	0,0	55,8	1,3	5850	185	17,5
27940	21,6	6250	0,3	3650	5,8	0,4	28,8	1,4	3830	220	33,6
28028	8,8	3955	0,4	4410	6,0	0,5	1,4	1,1	4240	145	33,1
28158	30,3	2270	0,5	6250	19,3	0,4	12,8	3,2	2600	271	17,9
28196	5,3	2205	0,4	1990	2,4	0,3	2,8	1,3	1830	210	20,2
28676	12,4	5665	0,3	5860	8,2	0,0	1,7	1,2	4500	196	24,6
Mittelwert	17,9	4633	0,4	3782	9,0	0,3	13,2	1,0	4204	166	28,2
Std.-Abw.	11,8	1839	0,3	1754	11,9	0,4	16,8	0,3	1406	67	4,4

Tab. 3.1: MMP- und TIMP-Konzentrationen in Aszitesflüssigkeit von Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom, gemessen mittels Aktivitäts-Assays, ELISAs bzw. BCA-Test (Gesamtproteingehalt)

In der Aszitesflüssigkeit aller 30 Patientinnen wurden mittels ELISAs, Aktivitäts-Assays und BCA-Test die Konzentration von MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-13, TIMP-1 und TIMP-2 sowie der Gesamtproteingehalt bestimmt (s. Tab. 3.1). Alle Konzentrationen wurden auf den Gesamtproteingehalt bezogen und sind daher im folgenden in ng/mg angegeben.

3.3.2 Korrelation mit den klinischen Daten

Mögliche Korrelationen zwischen verschiedenen MMPs/TIMPs sowie jene zwischen MMPs/TIMPs und klinischen Faktoren (Alter der Patientinnen, FIGO-Stadium, Differenzierungsgrad und Größe des Tumors, PAI-1/uPA-Werte usw.) wurden mit dem Korrelationskoeffizienten nach Spearman (*Zou et al., 2003*) untersucht. Nimmt dieser einen Wert zwischen 0 und +1 an, so zeigt das einen gleichsinnigen Zusammenhang an (je höher die Werte der einen Variable, desto höher auch die Werte der anderen Variable). Die MMP-8-Konzentration korreliert positiv mit der Menge der MMP-9 ($p = 0,045$; Spearman-Koeffizient: 0,679). Weiterhin ergaben sich Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Menge an aktiver MMP-2 und dem Differenzierungsgrad des Tumors ($p = 0,072$; Spearman-Koeffizient: 0,489), d.h. je höher die Konzentration des aktiven Enzyms, desto höher der Grad (1 bis 4) der Differenzierung. Ebenso scheint ein Zusammenhang zwischen der TIMP-1-Konzentration und den Gesamtmengen an MMP-1 (Spearman-Koeffizient: 0,580), MMP-8 (0,525) und MMP-9 (0,521) zu bestehen.

Die MMP-13-Proteinmengen in den Aszitesflüssigkeiten beliefen sich auf 0-2,08 ng/mg Gesamtprotein für FIGO III (Median 0,38) bzw. auf 0,04-3,18 ng/mg für FIGO IV (Median 0,73). Der Median beider Stadien betrug 0,50 ng/mg. Für die aktive MMP-13 lagen die entsprechenden Werte bei 0-0,13 ng/mg für FIGO III (Median 0,04) bzw. bei 0,02-0,16 ng/mg für FIGO IV (Median 0,09), während sich der Median beider Stadien auf 0,07 ng/mg belief. Die mediane Nachverfolgungszeit für die Patientinnen, die zum Zeitpunkt der Untersuchung noch lebten, betrug 24 Monate. Der Median von 0,5 ng/mg Gesamtprotein für beide Stadien (FIGO III und IV) wurde als Cut-off-Grenze gewählt. In univariaten Analysen wurde eine erhöhte MMP-13-Expression mit dem Gesamtüberleben bei grenzwertiger Signifikanz ($p = 0,065$) in Verbindung gebracht. Wie aus einer Kaplan-Meier-Kurve (s. Abb. 3.10) hervorgeht, haben Patientinnen mit hoher MMP-13-Expression ($> 0,5$ ng/mg Gesamtprotein) eine mediane Überlebenszeit von 20,5 Monaten, verglichen mit 36,5 Monaten für jene mit geringer Expression der Kollagenase-3 ($\leq 0,5$ ng/mg Gesamtprotein).

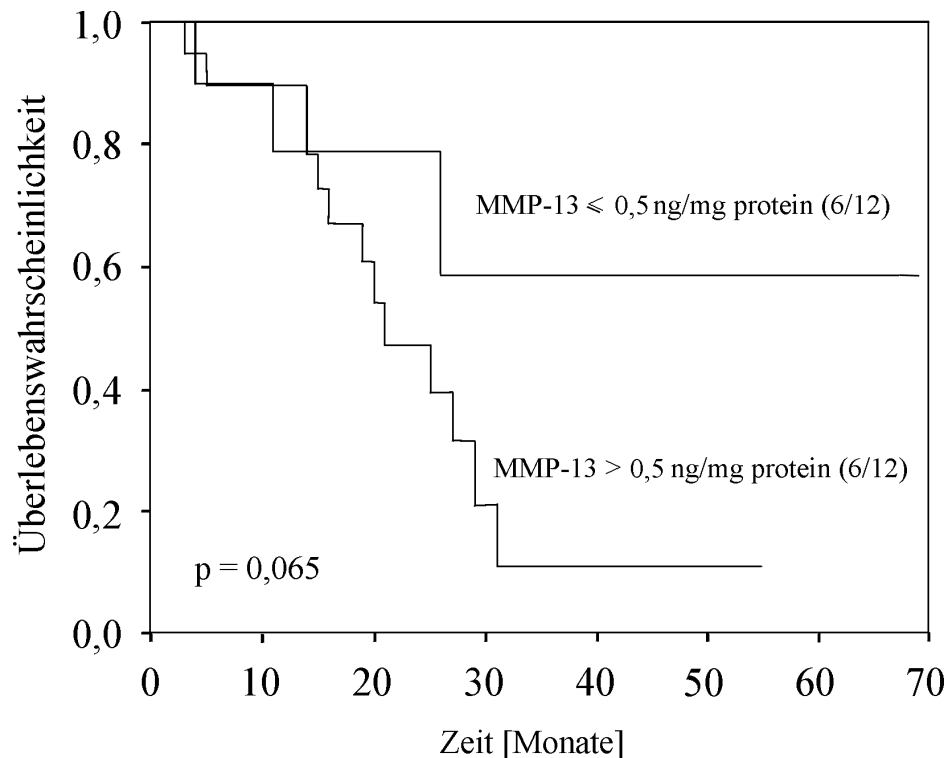


Abb. 3.10: Kaplan-Meier-Kurve der Überlebenswahrscheinlichkeit von Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom in Anhängigkeit von der MMP-13-Konzentration in Aszitesflüssigkeit (zum Signifikanzniveau von $p = 0,065$)

3.3.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie von Tumorzellen

Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie von MMP-13 in Tumorzellen, die aus Aszitesflüssigkeit von zwei verschiedenen Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom stammen, wurde in der Klinischen Forschergruppe der Frauenklinik der TU München durchgeführt (s. Abb. 3.11, A und B). Die Färbung der Tumorzellmembran ist deutlich sichtbar. Geringe, aber klar erkennbare Bindung der MMP-13-Antikörper ist ebenso für nicht-maligne Zellen vorhanden. Als Negativkontrolle diente das Auslassen des Inkubationsschrittes mit dem Primärantikörper, wobei keine Färbung auftrat. HaCaT-Zellen dienten als Positivkontrolle (s. Abb. 3.11, C). Starke zytoplasmatische und Membran-Färbung ist dabei deutlich zu sehen.

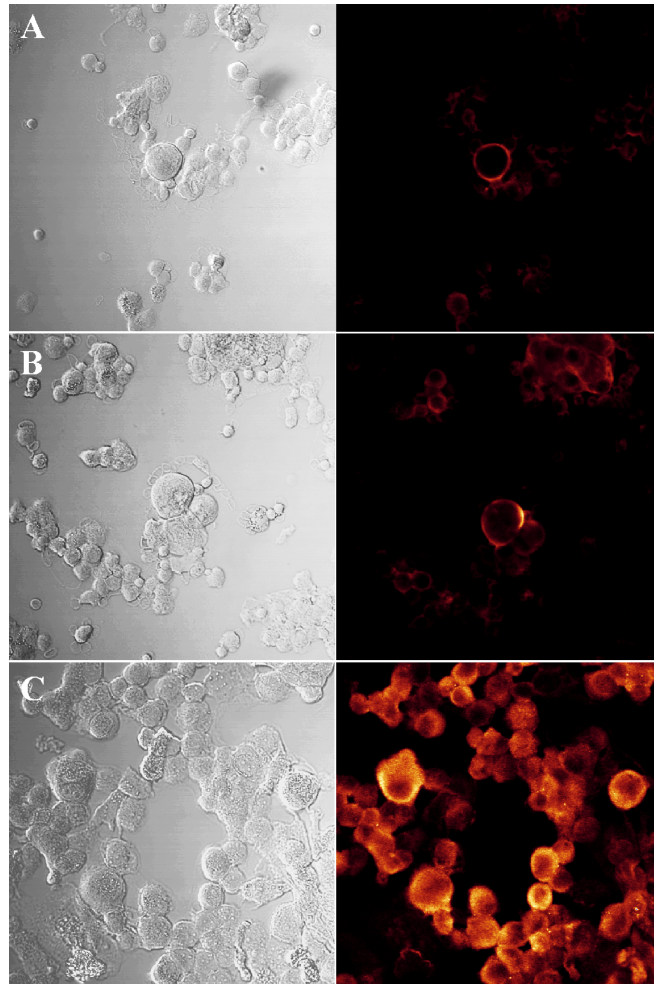


Abb. 3.11: Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie von Tumorzellen aus Aszitesflüssigkeit mit polyklonalen Anti-MMP-13-Antikörpern Aszitesflüssigkeiten zweier Patientinnen (A und B), HaCaT-Zellen als Positivkontrolle (C) (*Hantke et al., 2003*)

3.4 Isolierung nativer MMP-13 aus Aszitesflüssigkeit

3.4.1 Optimale Bedingungen für die Affinitätschromatographie

Zur Proteinisolierung stand ein MaxiSorp-beschichtetes Polystyrol-Granulat zur Verfügung, dessen Funktionalität in Vorversuchen ermittelt wurde. Dabei wurde zunächst untersucht, mit welcher optimalen Konzentration des monoklonalen MMP-13-Antikörpers IVD128 das Granulat beschichtet werden sollte, um eine optimale Antikörper-Sättigung der MaxiSorp-Oberfläche zu erreichen. Dazu wurden jeweils gleiche Granulatmengen mit fünf verschiedenen Antikörperkonzentrationen zwischen 0,1 und 30 µg/ml beschichtet. Nach Absättigung mit RSA erfolgte die Detektion der Menge an gebundenem Beschichtungs-Antikörper durch Zugabe eines Peroxidase(HPO)-gekoppelten Anti-Maus-Antikörpers mit anschließender TMB-Färbung. Da jeweils die gleiche Anzahl an Granulat-Teilchen und somit (in etwa) gleiche Oberflächen eingesetzt wurden, konnte durch die gemessene Absorption auf die Menge des HPO-gekoppelten Antikörpers bzw. auf die Menge des an das Granulat gebundenen IVD128-Antikörpers geschlossen werden (s. Abb. 3.12). Es zeigte sich, daß die Menge an gebundenem Antikörper mit steigender Antikörper-Konzentration in der Beschichtungslösung zunahm. Ab einem Wert von 10 µg/mL setzte jedoch eine Sättigung der gebundenen Antikörpermenge ein. Eine Erhöhung der Konzentration darüber hinaus führte nur zu einer geringen Zunahme der Antikörperdichte auf der Oberfläche des Granulats.

Um zu klären, wieviel MMP-13 an das Antikörper-beschichtete Granulat binden kann, wurde mit 10 µg/mL IVD128 inkubiertes Granulat mit einer Lösung der katalytischen MMP-13-Domäne hoher Konzentration (20 µg/ml) inkubiert. Nach Elution mit einer definierten Menge Glycin-Puffer wurde für die MMP-13-Konzentration des PBST-gepufferten Eluates mit dem entwickelten ELISA (s. Abs. 3.2.1, S. 55) ein Wert von 11,3 ng/ml bestimmt. Für das mit den Antikörpern beschichtete Granulat ergibt sich daraus eine maximale Bindungskapazität von 2,5 ng MMP-13 pro cm² Oberfläche.

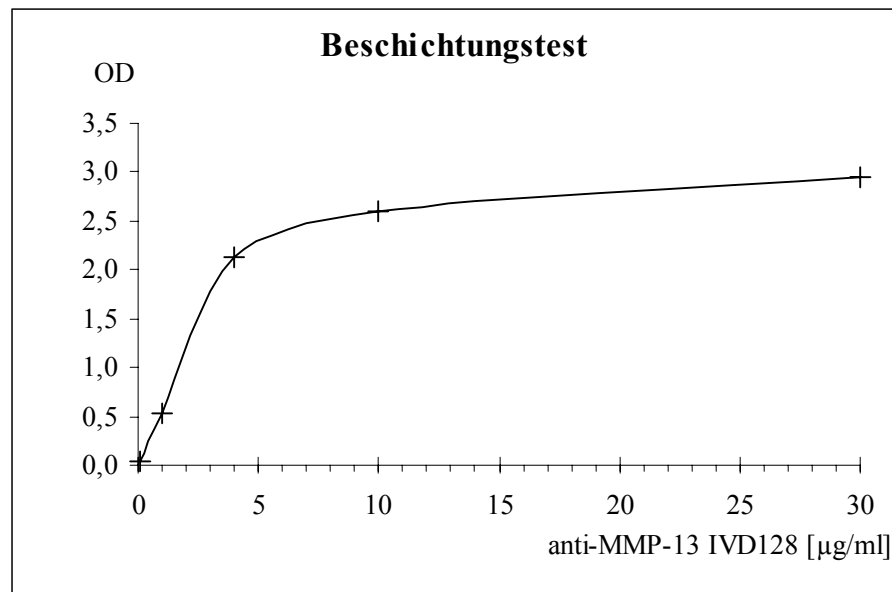


Abb. 3.12: Zusammenhang zwischen der Antikörper-Konzentration der Granulat-Beschichtungslösung und der Anzahl gebundener Sekundärantikörper (OD-Messung des HPO-Substratumsatzes)

Durch erneute Inkubation des bereits einmal verwendeten Granulats mit MMP-13, anschließende Elution mit Glycin-Puffer und ELISA-Messung wurde bestimmt, inwieweit mit den monoklonalen Antikörpern beschichtetes Granulat mehrfach zur Isolierung von MMP-13 eingesetzt werden kann. Die Inkubation mit 20 µg/ml führte zu einer MMP-13-Konzentration im Eluat von 8,1 ng/mL, eine weitere Inkubation des bereits (zweimal) verwendeten Granulats zu 5,5 ng/mL. Es wurden also bei der Wiederverwendung des Granulats, d.h. ohne erneute Inkubation mit IVD128-Antikörpern, nur etwa 70% der MMP-13-Menge erhalten, die man mit neubeschichtetem Granulat isolieren kann. Bei der darauffolgenden, dritten Verwendung lag die Ausbeute nur bei knapp 50% im Vergleich zum erneut mit Antikörpern beschichteten Granulat. Somit wurden durch jede erneute Wiederverwendung jeweils etwa 30% weniger Protein gebunden bzw. isoliert.

3.4.2 Proteinisolierung aus Aszitesflüssigkeit

Die zuvor ermittelten Bedingungen zur Proteinisolierung mittels MaxiSorp-Granulat (s. Abs. 3.4.1) wurden zur Isolierung nativer Kollagenase-3 aus Aszitesflüssigkeit von Patientinnen mit Ovarialkarzinom angewandt. Als Ausgangsmaterial diente dabei die Aszitesflüssigkeit mit der höchsten MMP-13-Konzentration (55,8 ng/ml bzw. 2,54 ng/mg, Patienten-Nr. 27903, Stadium FIGO IV), was mit Hilfe des entwickelten ELISAs bestimmt wurde (s. Tab. 3.1, S. 61). Mit Hilfe dieser Technik, der Affinitätschromatographie mit MaxiSorp-Granulat, konnte native MMP-13 erfolgreich aus Gewebeflüssigkeit isoliert werden. Nach Beschichtung des Granulats mit dem monoklonalen Antikörper (8 µg/ml), Inkubation mit der Aszitesflüssigkeit und Elution mit Glycin-Puffer wurde das Eluat durch Ultrafiltration konzentriert. Dieses Verfahren wurde mehrfach wiederholt, um eine für weitere Untersuchungen ausreichende Menge an nativer MMP-13 zu erhalten. Die anschließende Identifizierung und Charakterisierung erfolgte durch Western-Blot und MALDI-TOF Massenspektrometrie (s. Abs. 3.4.3).

3.4.3 Identifizierung des isolierten Proteins

Der Nachweis, daß es sich bei dem aus der Aszitesflüssigkeit isolierten Protein um MMP-13 handelt, erfolgte u.a. durch Western-Blot mit polyklonalen Antikörpern (s. Abb. 3.13), wobei die rekombinante katalytische Domäne der MMP-13 (Leu¹-Gly²⁴⁸) als Positivkontrolle diente. Neben der latenten Form (ca. 60 kDa) erkennt man auch die Bande des aktiven Enzyms (ca. 48 kDa). Weiterhin erfolgte eine Charakterisierung der nativen MMP-13 durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie (s. Abb. 3.14). Der Vergleich des erhaltenen Spektrums mit einem theoretisch erwarteten MMP-13-Spektrum (NCBIInr-Datenbank) bestätigte, daß es sich bei dem isolierten Protein um humane Kollagenase-3 handelt. Von der verwendeten Mascot-Software unter Verwendung der NCBIInr-Datenbank gelieferte Mowse Score-Werte größer als 64 gelten dabei als signifikant ($p < 0,05$). Die Mascot-Suche mit dem Spektrum des isolierten Proteins (Annahmen: Trypsin-Verdau, monoisotopische Massen, keine fehlenden Spaltungen erlaubt, Massen-Toleranz des Peptids ± 0.04 %) ergab einen Wert von 90 (Accession code: 4505209).

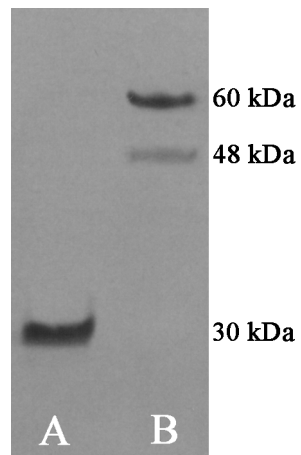


Abb. 3.13: Western-Blot der rekombinanten katalytischen Domäne der MMP-13 (A) und der isolierten nativen MMP-13 (B)

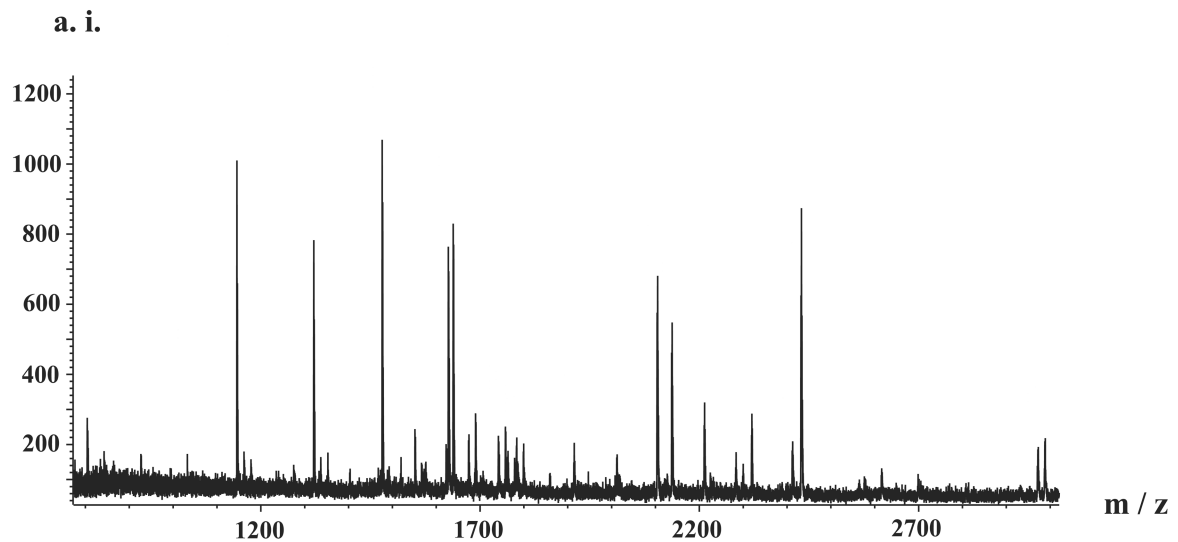


Abb. 3.14: MALDI-TOF-Massenspektrum der aus Aszitesflüssigkeit isolierten MMP-13

3.5 Erhöhter MMP-13-Gehalt bei aseptischer Hüftprothesenlockerung

17 Patienten, die sich aufgrund aseptischer Hüftprothesenlockerung einer operativen Überprüfung ihres künstlichen Hüftgelenkes unterziehen mußten, waren Teil einer Studie der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Sportorthopädie, Abteilung für Orthopädische Chirurgie, der TU München (*Diehl et al., 2003*). Sechs der Patienten waren männlich, elf weiblich. Das mediane Alter betrug 68 Jahre, wobei sich der Altersbereich von 56 bis 83 Jahre erstreckte.

Neben mehreren weiteren, in dem o.g. Institut untersuchten Faktoren (z.B. uPA- und PAI-1-Konzentration, zementierte bzw. zementfreier Prothese) wurde die MMP-13-Konzentration mit Hilfe des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten ELISA bestimmt, um einen möglichen Einfluß dieser Protease auf die aseptische Ablösung künstlicher Hüftgelenke aufzeigen zu können. Dazu wurde bei den Patienten in Gewebeproben von Interfacegewebe zwischen Knochen und Prothese (fünf Proben) sowie in Pseudokapselgewebe (zwölf Proben), welches das künstliche Hüftgelenk umgibt, die MMP-13-Konzentration gemessen. Die Meßwerte reichten von 0,05 ng/mg bis 12,3 ng/mg, wobei der Median 0,40 ng/mg betrug. Als Kontrolle dienten elf Patienten mit Osteoarthritis, denen ein künstliches Hüftgelenk eingesetzt wurde. Bei dieser Gruppe wurden MMP-13-Werte von 0,05 ng/mg bis 3,61 ng/mg gemessen, als Median erhielt man 0,10 ng/mg. So konnte für die MMP-13-Konzentration in (Pseudo-)Kapselgewebe bzw. Interfacegewebe ein signifikanter Unterschied zwischen der Patientengruppe mit Osteoarthritis ($n = 11$) und den Patienten, denen aufgrund der Hüftprothesenlockerung ein neues Gelenk eingesetzt werden mußte ($n = 17$), nachgewiesen werden ($p = 0,048$).

3.6 Einfluß von Flavonoiden und Vitaminen auf die MMP- und TIMP-Expression dermalen Fibroblasten nach UV-Bestrahlung

3.6.1 Kultivierung von HDF

Ausgehend von Haut-Biopsien der Schulter eines männlichen sowie des oberen Augenlids eines weiblichen Spenders (beide Photo-Typ II, über 50 Jahre alt und keine Erkrankungen) wurden von der Beiersdorf AG Kulturen humaner dermalen Fibroblasten (HDF) erhalten. Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden HDF von der Schulter zwischen der 17. und 20. Passage sowie vom oberen Augenlid aus der 4. Passage verwendet, die sowohl als Monolayer als auch eingebettet in Kollagen-Gele kultiviert wurden.

3.6.2 Cytotox-Assays

Die Lebensfähigkeit der Zellen bei Behandlung mit 8PN und DMSO wurde durch Cytotox-Assays untersucht. Dabei zeigte sich, daß die in dieser Arbeit eingesetzten Konzentrationen nicht toxisch waren. Höhere DMSO-Konzentrationen (größer als 5 mM) ließen die Lebensfähigkeit von HDF und HaCaT-Zellen jedoch deutlich sinken. So konnte 8PN, das in DMSO gelöst wurde, nicht in höheren Konzentrationen als 30 µM eingesetzt werden, da dies bereits einer DMSO-Konzentration von 4,2 mM entsprach. Für die anderen Additive wurden keine Cytotox-Tests durchgeführt, da entsprechende Daten bekannt waren und bei den eingesetzten Konzentrationen keine Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit der Zellen zu erwarten war.

3.6.3 Inkubation mit Flavonoiden und Vitaminen

24 Stunden vor der UVA-Bestrahlung wurden die HDF in Monolayern und in Kollagen-Gelen mit AGR (150 μM), 8PN (30 μM), Vitamin C (150 μM) bzw. Vitamin E (150 μM) inkubiert. Die Zellzahl und die Zellmorphologie in den Experimenten mit 8PN blieb im Vergleich zur Negativ- (unbestrahlte Zellen ohne Additive) und zur Positivkontrolle (UVA-bestrahlte Zellen ohne Additive) annähernd unverändert. Lediglich im Fall von HDF, die in Monolayern kultiviert und mit Vitamin E inkubiert worden waren, zeigte sich ein Rückgang der Zellzahl um etwa 20%, wobei die Zellmorphologie keine offensichtlichen Veränderungen aufwies. In allen weiteren Fällen waren keine Veränderungen der Zellzahl oder der Zellmorphologie zu erkennen.

3.6.4 UVA-Bestrahlung

Die die Oberfläche der Monolayer erreichende Strahlungsdosis betrug 4,72 mW/cm^2 , woraus sich die entsprechende Bestrahlungsdauer (35 Minuten und 19 Sekunden) ermitteln ließ, so daß die Zellen mit 10 J/cm^2 UVA bestrahlt wurden. Bei den Kollagen-Gelen betrug die Strahlungsdosis nach Durchgang durch ein halbes Gel (0,5 ml) 4,45 mW/cm^2 , weshalb die Bestrahlungsdauer der Gele entsprechend um 2 Minuten und 8 Sekunden verlängert wurde, um auch in Kollagen-Gelen eine mittlere UVA-Bestrahlung der Zellen von 10 J/cm^2 zu gewährleisten.

Durch die UVA-Strahlung wurden die Zellzahl und Zellmorphologie deutlich beeinträchtigt. Nach Auszählen der HDF zeigte sich, daß die Zellzahl um etwa 10% zurückging. Man konnte weiterhin erkennen, daß der Zellverband der Fibroblasten deutlich ausgedünnt war und einige Zellen abgelöst an der Oberfläche des Überstandes trieben (s. Abb. 3.15).

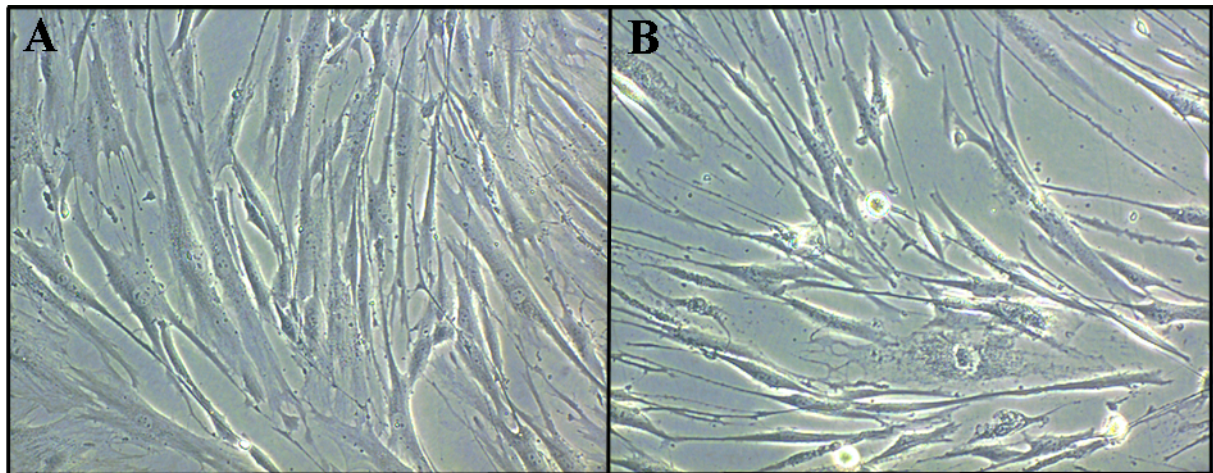


Abb. 3.15: Abbildung der kultivierten HDF-Monolayer vor (A) und sechs Stunden nach (B) der UVA-Bestrahlung

Einige abgestorbene Zellen haben sich nach UVA-Bestrahlung abgelöst und sind deutlich als helle Punkte erkennbar (B)

3.6.5 Aktivitätsmessungen

Zunächst wurde die Aktivität der HDF-Überstände vor und nach der UVA-Bestrahlung sowie nach Inkubation mit Vitamin E durch Gelatin-Zymographie untersucht (s. Abb. 3.16). In dem Substratgel ließen sich Proteinbanden mit deutlicher gelatinolytischer Aktivität bei etwa 40, 60 und 90 kDa erkennen, deren Intensität nach UVA-Bestrahlung zunahm. Die Inkubation mit Vitamin E führte zu einer geringen Abnahme dieser Aktivität.

Weiterhin wurden zur Konzentrationsbestimmung aktiver MMP-1, MMP-2 und MMP-13 spezifische Aktivitäts-Assays eingesetzt. Diese Ergebnisse werden im folgenden zusammen mit denen der ELISA-Messungen dargestellt (s. Abs. 3.6.6).

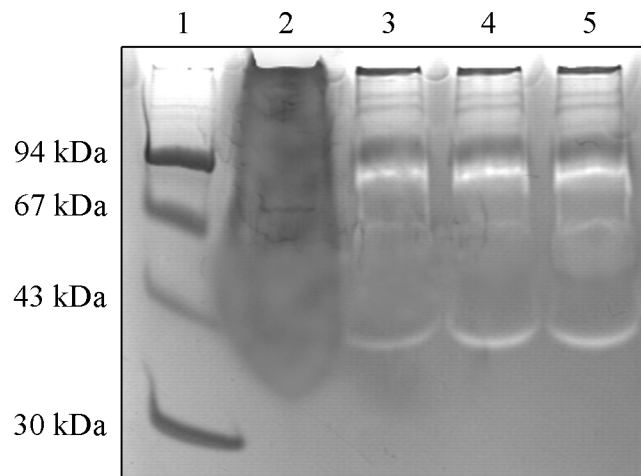


Abb. 3.16: Zymogramm von unbehandelten (3), nur UVA-bestrahlten (4) sowie UVA-bestrahlten und mit Vitamin E inkubierten (5) HDF-Überständen sowie LMW-Marker (1) und fetales Kälberserum (2)

3.6.6 Bestimmung von MMPs und TIMPs

Die Untersuchungen wurden in Monolayern entweder dreifach (mit 8PN) oder sechsfach (mit allen anderen Substanzen) durchgeführt, in Kollagen-Gelen allesamt dreifach. Zur Kontrolle wurden HDF mit Additiven ohne UVA-Bestrahlung unter allen verschiedenen Bedingungen inkubiert. ELISAs und Aktivitäts-Assays wurden in Doppelbestimmung, Untersuchungen mit TaqMan-RT-PCR in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Standardabweichungen (SD) und die Standardfehler des Mittelwerts (SEM) für jedes Experiment (bzw. für jede Gruppe von Experimenten) wurden bestimmt. Die angegebenen Fehlerbalken von ± 2 SEM decken das 95%-Konfidenzintervall ab (s. Abb. 3.17, 3.18 und 3.19). Um beurteilen zu können, ob eine bestimmte Veränderung der MMP- oder TIMP-Expression signifikant ist oder nicht, wurde ein Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben durchgeführt.

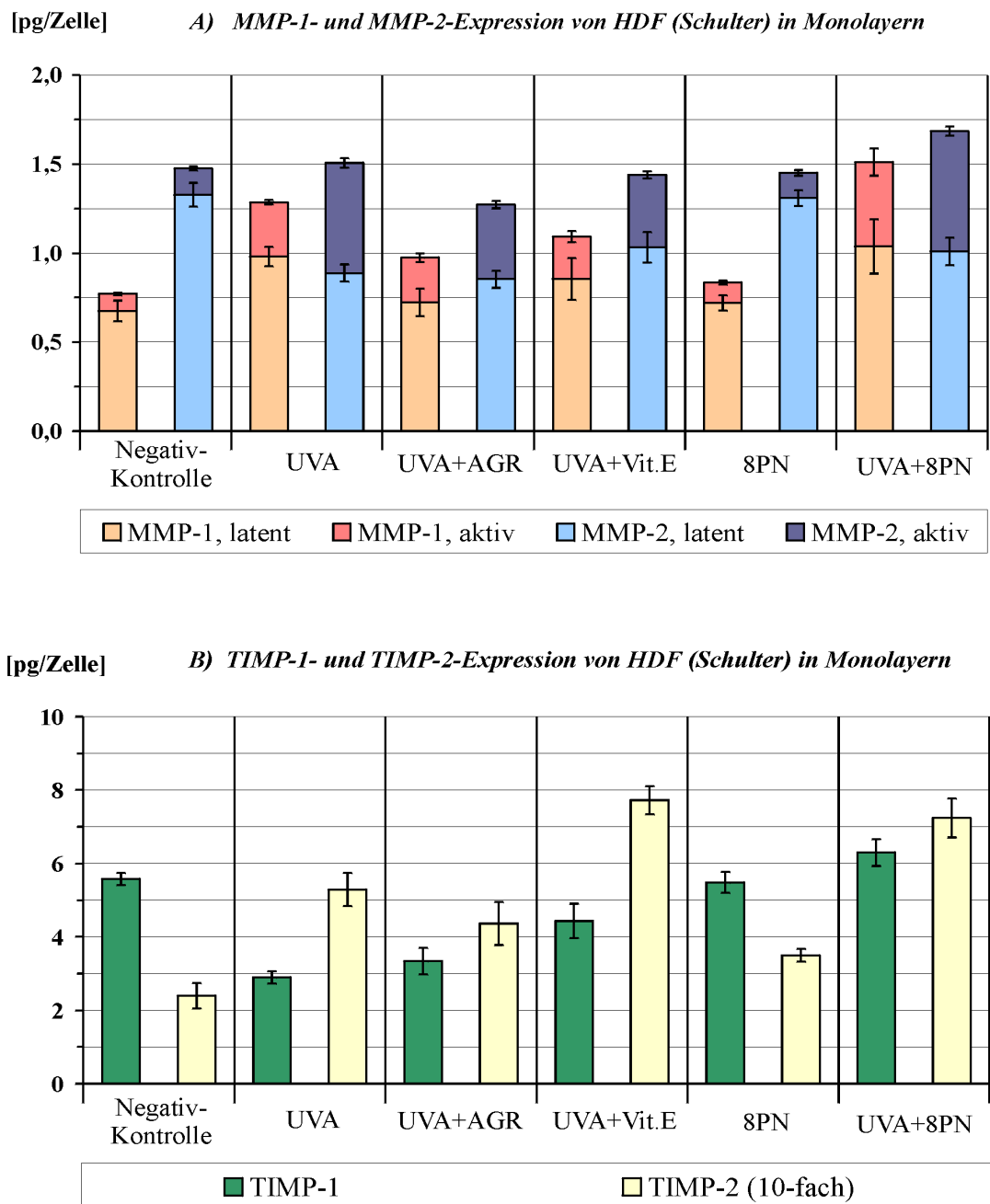
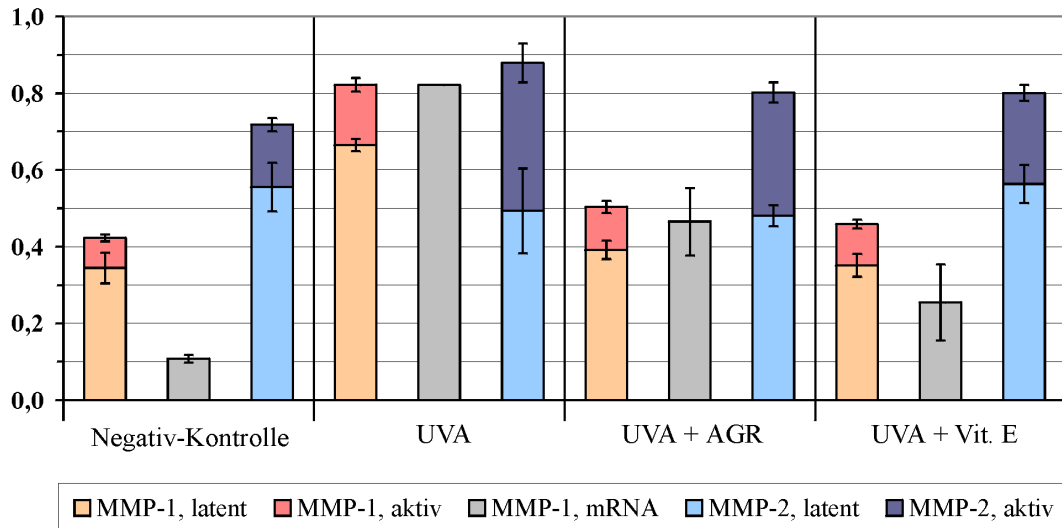


Abb. 3.17: mRNA- und Protein-Expression von HDF (Schulter), kultiviert in Monolayern und teilweise UVA (10 J/cm^2) bestrahlt bzw. mit den aufgeführten Additiven inkubiert. A) Expression von MMP-1 und -2, B) Expression von TIMP-1 und -2
Proteinmengen sind in pg/Zelle, die Mengen der mRNA in relativen Einheiten angegeben. Die Balken sind jeweils Mittelwerte ($\pm 2 \text{ SEM}$) der Messungen.

Protein: [pg/Zelle] A) *MMP-1- und MMP-2-Expression von HDF (Schulter) in Kollagen-Gelen*
 mRNA: rel. Einheit



Protein: [pg/Zelle] B) *TIMP-1- und TIMP-2-Expression von HDF (Schulter) in Kollagen-Gelen*
 mRNA: rel. Einheit

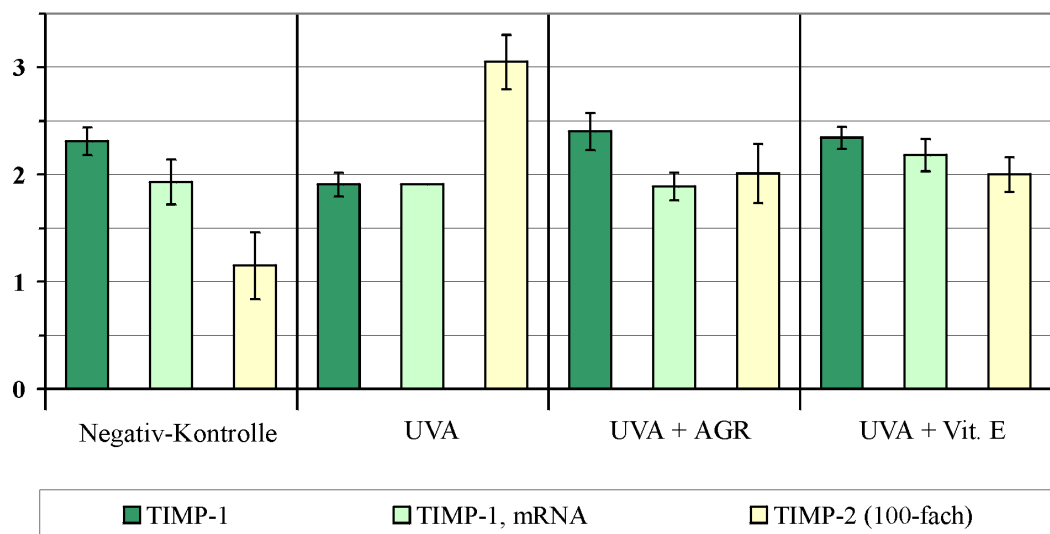


Abb. 3.18: mRNA- und Protein-Expression von HDF (Schulter), kultiviert in Kollagen-Gelen und teilweise UVA (10 J/cm^2) bestrahlt bzw. mit den aufgeführten Additiven inkubiert. A) Expression von MMP-1 und -2, B) Expression von TIMP-1 und -2

Proteinmengen sind in pg/Zelle, die Mengen der mRNA in relativen Einheiten angegeben. Die Balken sind jeweils Mittelwerte ($\pm 2 \text{ SEM}$) der Messungen.

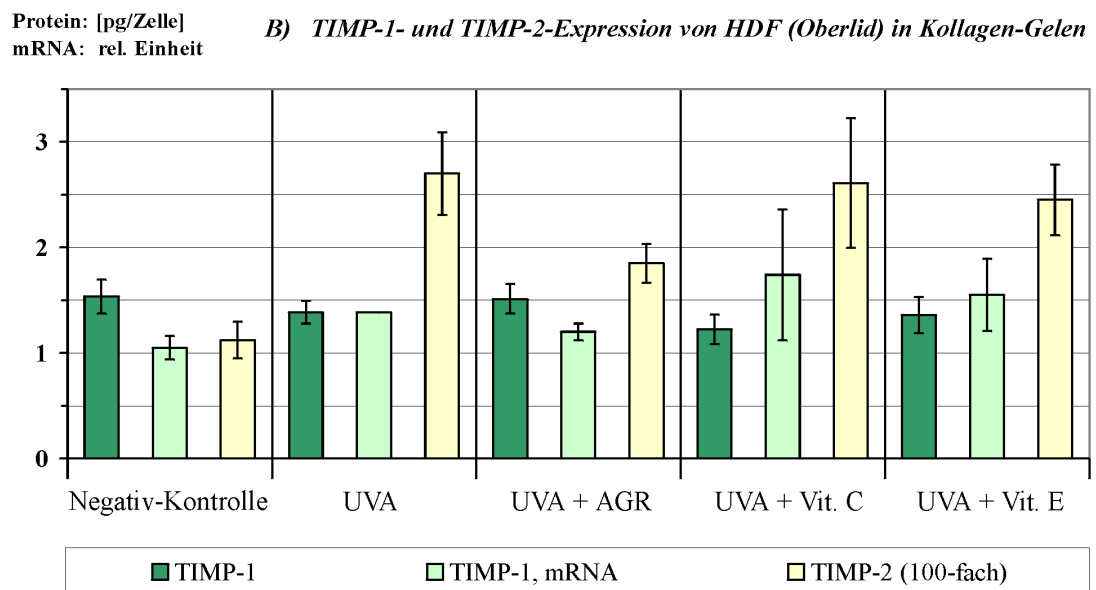
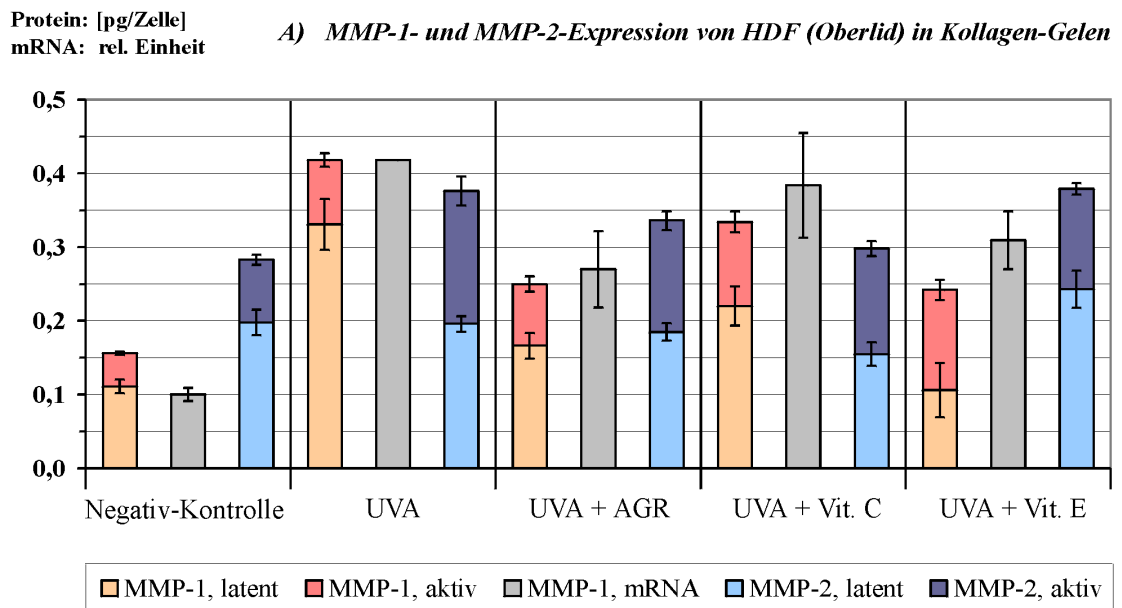


Abb. 3.19: mRNA- und Protein-Expression von HDF (oberes Augenlid), kultiviert in Kollagen-Gelen und teilweise UVA (10 J/cm^2) bestrahlt bzw. mit den aufgeführten Additiven inkubiert. A) Expression von MMP-1 und MMP-2, B) Expression von TIMP-1 und TIMP-2
Proteinmengen sind in pg/Zelle, die Mengen der mRNA in relativen Einheiten angegeben. Die Balken sind jeweils Mittelwerte ($\pm 2 \text{ SEM}$) der Messungen.

Die Mengen aktiver und latenter Proteasen (gemessen in ng/ml) in den Überständen eines Wells der Kultivierungsplatten wurden auf die Zellzahl des entsprechenden Wells bezogen und somit in pg Protein pro Zelle angegeben. Zur besseren Vergleichbarkeit der Protein- und der mRNA-Messungen, wurde die mRNA-Menge der MMP-1 bei der Positivkontrolle (UVA-bestrahlte Zellen ohne Zusätze) der MMP-1-Proteinmenge gleichgesetzt und als Relativwert angegeben. Das gleiche Vorgehen wurde für die TIMP-1-Daten gewählt. Aus diesem Grund enthalten die Diagramme für die bestrahlten Fibroblasten ohne Additive keine Fehlerbalken für die mRNA-Mengen von MMP-1 und TIMP-1 (s. Abb. 3.18 und 3.19).

Die Ergebnisse der ELISA-Messungen, Aktivitäts-Assays und der Untersuchungen mittels TaqMan-RT-PCR sind für HDF von der Schulter in Monolayern (s. Abb. 3.17), für HDF von der Schulter in Kollagen-Gelen (s. Abb. 3.18) sowie für HDF vom oberen Augenlid in Kollagen-Gelen (s. Abb. 3.19) gezeigt. Untersuchungen mittels TaqMan-RT-PCR wurden in den Kollagen-Gelen (s. Abb. 3.18 und 3.19) durchgeführt. Das Additiv 8PN wurde ausschließlich in HDF-Monolayern getestet (s. Abb. 3.17), während mit Vitamin C nur HDF vom Augenlid in Kollagen-Gelen inkubiert wurden (s. Abb. 3.19). Alle weiteren Untersuchungen mit ELISAs und Aktivitäts-Assays bzgl. MMP-8, -9, -12 und -13 waren negativ, die jeweiligen Proteine konnten weder in den Zellüberständen noch im Lysat der HDF nachgewiesen werden. Fetales Kälberserum, DMEM sowie die zum Kollagen-Abbau der Gele verwendete bakterielle Typ-I-Kollagenase ergaben keine Hintergrundsignale in den eingesetzten ELISAs, ebensowenig veränderten fetales Kälberserum oder DMEM die Ergebnisse der Aktivitäts-Assays. Weiterhin zeigte sich, daß die verdauten Kollagen-Gele in etwa die gleichen MMP- und TIMP-Proteinkonzentrationen wie die entsprechenden Überstände enthielten.

Betrachtet man die drei verschiedenen experimentellen Bedingungen (s. Abb. 3.17, 3.18 und 3.19), so unterscheiden sich die MMP- und TIMP-Konzentrationen deutlich voneinander. Die HDF von der Schulter in Kollagen-Gelen (s. Abb. 3.18) exprimierten etwa zweimal so viel der untersuchten MMPs und TIMPs wie die HDF in Kollagen-Gelen, die vom oberen Augenlid stammen (s. Abb. 3.19). Die MMP- und TIMP-Proteinmengen der als Monolayer kultivierten HDF (s. Abb. 3.17) wurden im Vergleich zu den Fibroblasten im Kollagen-Gel (s. Abb. 3.19) sogar verdreifacht. Ohne UVA-Bestrahlung beeinflusste keines der Additive (einschließlich DMSO) die MMP- oder TIMP-Expression signifikant (weniger als 2,5% Abweichung für

alle Substanzen) – mit Ausnahme von 8PN (s. Abb. 3.17). Dieses Flavonoid erhöhte die Gesamtproteinmengen von MMP-1 und TIMP-2 signifikant ($p < 0,01$) ohne UVA-Bestrahlung, jedoch nicht die von MMP-2 und TIMP-1. Mit UVA-Bestrahlung stiegen die Proteinmengen von MMP-1, MMP-2, TIMP-1 und TIMP-2 in Gegenwart von 8PN um deutlich mehr als 10% ($p < 0,05$). Im Gegensatz zu 8PN reduzierten die anderen Additive (AGR, Vitamin C und E) die Expression von MMP-1 und MMP-2 nach UVA-Bestrahlung signifikant, während sie die TIMP-Mengen nur leicht veränderten. Die TIMP-1-Expression war insgesamt etwa 100-fach höher als die von TIMP-2.

UVA-Bestrahlung bewirkte den gleichen Effekt und sogar im gleichen Ausmaß bei beiden HDF-Typen, sowohl in Monolayern als auch in Kollagen-Gelen. Der Einfluß von UVA verdoppelte näherungsweise die exprimierten Proteinmengen von MMP-1 und TIMP-2. Die Expression von MMP-2 wurde nur in einem relativ geringen Ausmaß erhöht, wohingegen der Prozentsatz des aktiven Enzyms durch UVA extrem erhöht wurde. Vitamin C reduzierte die MMP-1- und MMP-2-Expression um etwa 20% ($p < 0,01$), während es die TIMP-Expression unverändert ließ (s. Abb. 3.19). Vitamin E verringerte deutlich die mRNA- und Proteinmenge der MMP-1 ($p < 0,01$), beeinflusste dabei aber weder die Gesamtproteinmenge der TIMPs noch die der MMP-2. Die Konzentration der aktiven Form der MMP-2 wurde durch Vitamin E allerdings um 70% reduziert ($p < 0,05$) (s. Abb. 3.18). Das Flavonoid AGR erwies sich als die effektivste Substanz, um die Proteinexpression der Kollagenase-1 zu senken, da AGR diese um 60% vermindern konnte ($p < 0,005$). Weiter reduzierte dieses Additiv die Proteinmengen der gesamten MMP-2 um mehr als 10% ($p < 0,05$) und die der aktiven MMP-2 um etwa 20% ($p < 0,01$) (s. Abb. 3.18 und 3.19). Die Konzentrationen der TIMPs wurden dagegen von AGR kaum beeinflusst.

4 DISKUSSION

4.1 Von der Expression zum ELISA

4.1.1 Expression und Reinigung der katalytischen Domäne

Die Expression der Proform der katalytischen Domäne der MMP-13 (Leu¹-Gly²⁴⁸) in *E.coli* konnte erfolgreich nach einem etablierten Verfahren (*Oberpichler, 1999*) durchgeführt werden. Die Expressionskontrolle, weitere SDS-Gelelektrophoresen während der chromatographischen Aufarbeitung, Western-Blot und N-terminale Sequenzierung lieferten den Nachweis, das gewünschte Protein in reiner Form vorliegen zu haben (s. Abb. 3.1 bis 3.5, S. 50-54). Die entsprechenden Fraktionen der Ionenaustauschchromatographie (Abb. 3.3, S. 52) beinhalteten neben der katalytischen Domäne der MMP-13 noch ein C-terminal verkürztes Fragment (ca. 26 kDa), das bei dieser Expression bereits häufiger beobachtet wurde (*Oberpichler, 1999*). Insgesamt zeigte sich, daß mit lediglich zwei Chromatographie-Schritten, der Ionenaustauschchromatographie und der anschließenden Gelfiltration, optimale Reinigungsergebnisse zu erzielen sind. Daher wurde dieses Verfahren unverändert zur Expression und Reinigung größerer MMP-13-Mengen angewandt. Die latente MMP-13 wurde weiterhin durch Inkubation mit HgCl₂ aktiviert, so daß ihre Funktionalität mittels Mca-Peptid nachgewiesen werden konnte.

4.1.2 Isolierung nativer MMP-13 aus Aszitesflüssigkeit

Mit Hilfe der Affinitätschromatographie mit MaxiSorp-Granulat konnte native MMP-13 erstmalig aus Gewebeflüssigkeit isoliert werden. Die optimalen Bedingungen zur Proteinisolierung mittels MaxiSorp-Granulat (s. Abs. 3.4.1, S. 65) sollten zur Isolierung nativer MMP-13 aus Aszitesflüssigkeit von Patientinnen mit Ovarialkarzinom angewandt werden, um sowohl die Vorteile dieser neuen Methode aufzuzeigen als auch die Spezifität der monoklonalen Antikörper IVD128 gegenüber der natürlich vorkommenden Kollagenase-3 nachzuweisen, zumal dieser Antikörper als Primärantikörper im ELISA verwendet wurde.

Ab einer Granulat-Beschichtungskonzentration von ca. 10 µg/ml setzte eine Sättigung der gebundenen Antikörpermenge ein, eine Erhöhung der Konzentration über 10 µg/ml führte nur zu einer geringen Zunahme der Antikörperdichte auf der Oberfläche des Granulats (s. Abb. 3.12, S. 66). Auch im Hinblick auf die Vermeidung einer überladenen Oberfläche war eine Beschichtung mit 8 - 10 µg/ml sinnvoll. Setzt man Beschichtungslösungen höherer Antikörperkonzentrationen ein, kommt es zur Ausbildung von Multilayern. Die Antikörper der äußeren Schichten binden zwar auch das Antigen, sie können sich jedoch beim Waschen leicht von der Platte lösen, so daß weniger Antigen detektiert wird, als in der Probe vorhanden war. Unter diesen optimalen Bedingungen konnte native MMP-13 im Batch-Verfahren erfolgreich an das RSA-gesättigte Granulat gebunden und anschließend im sauren Milieu eluiert werden. Die Identifizierung und Charakterisierung erfolgte durch Western-Blot (s. Abb. 3.13, S. 68) und durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie (s. Abb. 3.14, S. 68). Im Western-Blot wurden die aktive (48 kDa) und die latente (60 kDa) Form der MMP-13 gleichzeitig detektiert, was mit dem literaturbekannten Molekulargewicht für die MMP-13 (*Cowell et al., 1998*) übereinstimmt. Ein Vergleich des erhaltenen Spektrums mit dem theoretisch zu erwartenden MMP-13-Spektrum lieferte den Nachweis, daß es sich um humane Kollagenase-3 handelte. Eine zusätzliche Analyse durch Gelelektrophorese mit Silberfärbung war aufgrund der geringen Menge isolierter MMP-13 nicht möglich, ebensowenig wie weitere Untersuchungen zur Aktivität oder zum möglichen Glykosylierungsgrad.

Die neuentwickelte Isolierungsmethode besitzt mit 2,5 ng pro cm² zwar eine relativ geringe Bindungskapazität, bietet jedoch aufgrund der Affinitätstechnik mit immobilisierten Antikörpern eine einfache und universelle Möglichkeit, verschiedene Proteine mit geringem Zeitaufwand aus verschiedensten Gewebeflüssigkeiten zu extrahieren. Das Granulat kann weiterhin mehrfach verwendet werden, ohne mit Antikörpern erneut beschichtet werden zu müssen. Dabei gehen allerdings jeweils etwa 30% des gebundenen Proteins im Vergleich zu neubeschichtetem Granulat verloren.

4.1.3 MMP-13-ELISA

Neben dem monoklonalen Antikörper IVD128, der zuvor erfolgreich zur Isolierung nativer MMP-13 aus Aszitesflüssigkeit verwendet worden war, diente der polyklonale Antikörper PK3 zur Etablierung eines Sandwich-ELISAs, um den Gehalt dieser Kollagenase in Sekreten bei verschiedenen pathophysiologischen Prozessen bestimmen zu können. Der ELISA, mit einem linearen Meßbereich von 2 bis 32 ng/ml und einer Sensitivitätsgrenze von 0,5 ng/ml, zeigte eine ideale Standardkurve (s. Abb. 3.6, S. 55) sowie gute Werte für Spezifität, Reproduzierbarkeit sowie Recovery-Rate. Die Standardabweichungen waren minimal, was für die Genauigkeit der Methodik sprach. Beim Intra-Assay lagen die Standardabweichungen etwas niedriger als beim Inter-Assay, was auf verschiedene Faktoren, wie etwa Beschaffenheit der ELISA-Platten oder Variation bei der Handhabung, zurückzuführen sein dürfte, da der Inter-Assay auf verschiedenen Platten und zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt wurde.

Neben diesen standardmäßigen Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit des ELISAs wurde auch der Einfluß der Füllhöhe der Wells sowie der Zeitfaktor beim Probenauftrag untersucht. Die Angabe der mittels ELISA bestimmten Konzentration in „ng/ml“ legt die Vermutung nahe, daß das Meßergebnis von der Absolutmenge, also der Füllhöhe des Wells, unabhängig wäre und somit lediglich die Konzentration entscheidend ist. Es zeigte sich jedoch, daß dies nicht der Fall ist. Stattdessen scheint ein linearer Zusammenhang zwischen der Füllhöhe und der resultierenden Absorption zu bestehen (s. Abb. 3.7, S. 57), was die Bedeutung einer exakten Befüllung der Wells (im Regelfall mit 100 µl) verdeutlicht. Abschließend sollte der Zeitfaktor beim Probenauftrag untersucht werden. Dabei ging es um die Fragestellung, wie groß der Einfluß von Zeitverzögerungen beim Auftragen der Proben und damit unterschiedlichen Inkubationszeiten ist. Bei einem ELISA mit bis zu 80 zu messenden Proben kommt es häufig vor, daß zwischen erstem und letztem Probenauftrag bis zu über einer Stunde vergeht. Auch hier zeigte sich, wie entscheidend eine akkurate und reproduzierbare Vorgehensweise ist. Bereits ein um fünf Minuten verzögerter Probenauftrag führte zu einem Absorptionsrückgang um 3%, der mit 90 Minuten Verzögerung sogar über 40% betrug. Der Grund für diesen negativen Einfluß der Dauer des Probenauftrags liegt vermutlich in einem Austrocknen der Antikörper. Ein unmittelbares Auftragen der zu untersuchenden Proben bzw. ein eventueller Schutz der Antikörper-Beschichtung mit Polyethylenglykol oder Zuckern ist somit unerlässlich.

Der entwickelte ELISA ist bzgl. Anwendung, Spezifität und Durchführung vergleichbar mit einem kommerziellen, sehr sensitiven MMP-13-ELISA-System (*Tamei et al., 1998*) und wurde erfolgreich zur Bestimmung der Kollagenase-3 im Zusammenhang mit der Lockerung von Hüftprothesen eingesetzt (s. Abs. 4.2.2, S. 85). Außerdem diente der ELISA der Bestimmung des MMP-13-Gehaltes in Aszitesflüssigkeit von Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom (s. Abs. 4.2.1, S. 83).

4.2 MMP-13 in pathologischen Prozessen

4.2.1 Möglicher prognostischer Marker beim Ovarialkarzinom

Aufgrund ihrer ECM-abbauenden Aktivität geht man bislang davon aus, daß die MMPs einen wesentlichen Beitrag zur Proliferation, Invasion und Metastasierung von Tumorzellen leisten, indem sie die angrenzende ECM-Barriere abbauen. Weiterhin sind Matrixine für die tumorinduzierte Angiogenese erforderlich. Daher sollte die Inhibierung der MMPs in Tumoren deren Aggressivität abschwächen. Vor diesem Hintergrund wurden verschiedene synthetische MMP-Inhibitoren entwickelt und erfolgreich bezüglich ihrer hemmenden Wirkung in vitro getestet. Dagegen blieben klinische Studien mit diesen MMP-Inhibitoren jedoch weitestgehend erfolglos (*Coussens et al., 2002*). Eine Möglichkeit, warum diese Inhibitoren keine oder nur geringe Effektivität gegenüber dem Wachstum und der Metastasierung menschlicher Tumore besitzen, könnte auf die stark unterschiedliche Beteiligung der MMPs je nach Stadium der Tumorentwicklung zurückzuführen sein (*Seiki, 2003*). Die Aktivität der MMPs scheint grundsätzlich eher für schnelles Wachstum und Tumorinvasion erforderlich zu sein als für die Weiterentwicklung bereits vorhandener, größerer Tumore, mit denen aber die meisten der klinischen Studien durchgeführt wurden. Auch in Tierversuchen zeigte sich, daß MMP-Inhibitoren nur in der Blockierung der Angiogenese mit sich anschließendem Tumorwachstum erfolgreich sind, die Größe eines Tumors im späten Stadium jedoch nicht reduzieren können (*Bergers et al., 1999*). Auch wenn die Verwendung von MMP-Inhibitoren in der Krebstherapie bislang in der klinischen Erprobung wenig erfolgreich verlaufen ist, so bleibt ihr Einsatz dennoch ein sehr interessantes und durch spezifischere Inhibitoren möglicherweise auch zukunftsträchtiges Forschungsgebiet (*Overall & Lopez-Otin, 2002*).

Letztendlich ist es die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung von Tumorzellen, die die Krebsprognose determiniert. Zu den entscheidenden, daran beteiligten Gruppen von Molekülen zählen die Proteasen, wie uPA, Kathepsin B, D und L sowie zahlreiche MMPs, weshalb sie neue Prognosemarker für Krebserkrankungen sein könnten. Eines der besten Beispiele für eine Korrelation zwischen hoher Protease-Konzentration im Primärtumor und schlechter Prognose ist uPA beim Brustkrebs (*Harbeck et al., 2002*). In ähnlicher Weise könnten Kathepsine oder MMPs als Prognosemarker dienen. Erste, noch vorläufige Ergebnisse auf diesem Gebiet sind für einige Proteasen bei verschiedenen Krebsarten bereits bekannt (*Duffy, 1996*).

Aufgrund des lange Zeit symptomlosen Krankheitsverlaufs und mangels signifikanter prognostischer Marker wird das Ovarialkarzinom oft erst in einem fortgeschrittenen Stadium erkannt, während sich der Verlauf dieser Krebserkrankung beispielsweise mit dem CA 125 relativ zuverlässig überwachen läßt (*Maggino & Gadducci, 2000*). Auch PAI-1, der Inhibitor des uPA, wird mit der Aggressivität vieler Tumore in Verbindung gebracht, was einen weiteren Hinweis für die Bedeutung von uPA und PAI-1 beim Eierstockkrebs darstellt (*Schmalfeldt et al., 1995*). PAI-1 wird ferner als der zuverlässigste prognostische Faktor neben der Beurteilung des Tumors angesehen, um die Überlebenswahrscheinlichkeit von Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom zu bestimmen (*Kuhn et al., 1999*).

Der in dieser Arbeit entwickelte MMP-13-ELISA und die verwendeten Aktivitäts-Assays, die nur freies und kein TIMP-komplexiertes Enzym detektieren, zeigten, daß die Aktivität der MMP-13 in der Aszitesflüssigkeit von Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom offensichtlich recht niedrig ist, was sich durch die hohen TIMP-1-Werte (s. Tab. 3.1, S. 61) erklären läßt, mit einem Median von 137 ng/mg für FIGO III bzw. 245 ng/mg für FIGO IV. Diese Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen von anderen MMPs überein, bei denen nur ein geringer Anteil der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 in Ovarialkarzinom-Gewebe aktiv waren (*Schmalfeldt et al., 2001*). Weiterhin zeigte diese Studie, daß MMP-9 nur als Proenzym vorlag, seine aktive Form konnte mittels Gelatin-Zymographie nicht nachgewiesen werden. Dies ist in Übereinstimmung mit den hier dargestellten Aktivitätsmessungen.

Die Proteinmengen von MMP-8 und MMP-9 korrelieren stark, ebenso die Konzentration von TIMP-1 mit den Gesamtmengen an MMP-1, MMP-8 und MMP-9. Betrachtet man die aktiven Enzyme, so zeigte sich ein Zusammenhang zwischen aktiver MMP-2 und dem Differenzierungsgrad des Tumors, wenn auch die Konzentration an aktiver Protease sehr gering war. Es wurde eine höhere MMP-2-Aktivität in Aszitesflüssigkeit von schwach differenzierten Tumoren (Grad 3 und 4) gefunden als in der von stark differenzierten (Grad 1 und 2). Dies ist ein Hinweis darauf, daß die Aktivierung von MMP-2 in die Entwicklung maligner Ovarialkarzinome involviert ist, was auch durch andere Studien bestätigt wurde (*Schmalfeldt et al., 2001*).

Im Rahmen der Untersuchungen der Aszitesflüssigkeiten von Patientinnen mit Eierstockkrebs wurden die polyklonalen Antikörper gegen MMP-13 auch zur konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie von Tumorzellen aus der Aszitesflüssigkeit eingesetzt (s. Abb. 3.11, S. 64). Es zeigte sich dabei eine starke Färbung der Tumorzellmembran, ebenso aber auch eine geringe Bindung der MMP-13-Antikörper für nicht-maligne Zellen.

Die MMP-13-Konzentrationen, die in den verschiedenen Aszitesflüssigkeiten gefunden wurden, sind im Verhältnis zu den anderen MMP-Konzentrationen beim Ovarialkarzinom relativ gering. Trotzdem scheinen die Mengen an MMP-13 in Aszitesflüssigkeiten von prognostischer Relevanz für das Überleben der Patientinnen zu sein, wie aus der Kaplan-Meier-Kurve (s. Abb. 3.10, S. 63) für geringe ($\leq 0,5$ ng/mg) und höhere ($> 0,5$ ng/mg) Konzentrationen der Kollagenase-3 hervorgeht, wenn auch nur mit schwacher Signifikanz. Diese interessanten, jedoch nur vorläufigen Ergebnisse müssen in einem größeren Patientinnenkollektiv validiert werden. Die Bestimmung der MMP-13-Konzentration in Aszitesflüssigkeit von Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom in den FIGO-Stadien III und IV kann dazu beitragen, die Rolle dieser Protease im Krebsgeschehen weiter zu klären, und könnte möglicherweise, zusätzlich zu den gegenwärtig angewandten uPA und PAI-1 (*Schmalfeldt et al., 2001*) sowie uPA-Rezeptor (*Borgfeldt et al., 2003*), als prognostischer Marker dienen.

4.2.2 Einfluß auf die aseptische Hüftprothesenlockerung

Bei Hüft-Totalendoprothesen besteht generell die Gefahr einer vorzeitigen, durch chronisch granulomatöse Entzündungen hervorgerufenen Lockerung. Histologische Untersuchungen von Interface- und Pseudokapselgewebe zeigen eine derartige Entzündungsreaktion durch Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten und vaskulären Endothelzellen (*Harris et al., 1976*). Neben anderen Faktoren werden besonders proteolytische Enzyme, wie MMP-13, uPA und PAI-1, mit der aseptischen Hüftprothesenlockerung in Verbindung gebracht (*Takagi, 1996; Uchida et al., 2000*).

Im Rahmen einer Studie an der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Sportorthopädie der TU München wurde die MMP-13-Konzentration bei 17 Patienten mit aseptischer Hüftprothesenlockerung sowie elf Patienten mit Osteoarthritis bestimmt (*Diehl et al., 2003*). Dabei wurde in (Pseudo-)Kapselgewebe bzw. Interfacegewebe ein signifikanter Unterschied zwischen der Patientengruppe mit Osteoarthritis (geringere MMP-13-Menge) und den Patienten mit Lockerung der Hüftprothese (höhere Menge) nachgewiesen. Lokal produzierte MMP-13 wird durch Gelenkflüssigkeit weitertransportiert (*Takei et al., 1999*) und gelangt so ins Interface zwischen Knochen und Prothese, von wo sie für die ELISA-Messung entnommen wurde.

Die Aktivierung der MMP-13 beruht auf dem Plasminogen-Aktivierungs-System, welches wiederum durch uPA in die aktive Form umgewandelt wird. Für uPA und dessen Inhibitor PAI-1 erhält man einen ähnlichen signifikanten Unterschied beim Vergleich der beiden o.g. Patientengruppen (*Diehl et al., 2003*). Dies verdeutlicht das Zusammenspiel dieser Proteasen. Somit scheinen MMP-13, uPA und PAI-1 am Prozeß der aseptischen Lockerung von Hüftprothesen entscheidend beteiligt zu sein.

4.3 Beeinflussung der MMP-Aktivität UV-bestrahlter HDF

4.3.1 Kultivierung und UV-Bestrahlung von HDF

Die ausgehend von Biopsien der Schulter bzw. des oberen Augenlids kultivierten Fibroblasten wurden für Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich verwendet. Dabei war es äußerst hilfreich, die Proteinmengen auf die Zellzahl (anstatt auf das Volumen) zu beziehen, um verschiedene Proteinmessungen vergleichen zu können. Dies schien allgemein ein angemessenes Verfahren für derartige Untersuchungen zu sein, zumal die Standardabweichungen der ausgezählten Zellzahlen gering waren. Weiterhin ergab sich durch das Zählen der Zellen der Vorteil, daß ein Absterben oder andere Veränderungen der Zellen berücksichtigt werden konnten. So wurde beispielsweise festgestellt, daß durch die UVA-Strahlung ohne Additive die Zellzahl um etwa 10% zurückgegangen war.

Die HDF-Überstände wurden vor und nach der Bestrahlung mit UVA sowie nach Inkubation mit Vitamin E durch Zymographie untersucht (s. Abb. 3.16, S. 73), um einen ersten Eindruck der durch die UVA-Strahlung veränderten gelatinolytischen Aktivität zu bekommen. Dabei zeigte sich, daß die Aktivität dreier Proteinbanden (ca. 40, 60 und 90 kDa) durch UVA zunahm, während sie durch vorherige Inkubation mit Vitamin E geringfügig zurückging. Es ließ sich nicht abschließend klären, welche Proteasen für das Bandenmuster verantwortlich waren. Aufgrund der im folgenden diskutierten Ergebnisse, die den Einfluß der verwendeten Zusätze auf die MMP- und TIMP-Expression der HDF detaillierter beschreiben und exakte Angaben zur jeweils exprimierten Proteinmenge liefern, könnte vermutet werden, daß es sich bei zwei der drei Banden um MMP-1 bzw. MMP-2 handelt.

4.3.2 Einfluß von Flavonoiden und Vitaminen

Eine Vielzahl von Studien, die den Einfluß von UV-Strahlung auf Zellen untersuchten, hat sich ausschließlich auf die Gen-Expression beschränkt. Nur wenige dieser Studien bestimmten zusätzlich die Protein-Expression oder sogar die entsprechenden Mengen an aktiviertem Enzym. Um den Einfluß von zwei Flavonoiden und zwei Vitaminen auf die MMP- und TIMP-Expression von HDF nach UV-Bestrahlung zu untersuchen, wurden sowohl Protein- als auch mRNA-Mengen verschiedener MMPs und TIMPs mit ELISAs, Aktivitätstests sowie TaqMan-RT-PCR bestimmt. Beim Vergleich der ermittelten ELISA-Ergebnisse mit den Messungen durch TaqMan-RT-PCR ließ sich eine gute Übereinstimmung zwischen mRNA- und Protein-Konzentrationen deutlich erkennen. Auch wenn diese Untersuchungen nur mit zwei verschiedenen Zelltypen (HDF von der Schulter und vom oberen Augenlid) durchgeführt wurden, um die Anzahl der Experimente in einem angemessenen Rahmen zu halten, so wird man dennoch vergleichbare Effekte durch die verwendeten Zusätze auf die MMP- und TIMP-Expression bei anderen HDF-Typen erwarten können.

Während Vitamin E bereits in einer Konzentration von 25 μM in vergleichbaren Studien erfolgreich eingesetzt wurde (*Berneburg et al., 1999*), wurden für diese Untersuchungen sowohl AGR als auch Vitamin C und E in einer Konzentration von jeweils 150 μM eingesetzt, um maximale Effekte zu erzielen. Aus früheren Cytotox-Assays war bekannt, daß Vitamin E in 100-facher Verdünnung von Fibroblasten toleriert wird. Trotz dieser Verdünnung ging die Zellzahl der in Monolayer kultivierten und mit Vitamin E behandelten HDF um etwa 20% zurück. Dieses Ergebnis unterstreicht die enorme Wichtigkeit der Bestimmung der Zellzahl im Rahmen derartiger Experimente. Der beobachtete Rückgang der Lebensfähigkeit ließ sich allerdings kaum der Ethanol-Konzentration zuschreiben, da die Zellzahl durch Zusatz von Vitamin E unbeeinflusst blieb. In den cytotoxischen Tests mit DMSO zeigte sich bereits bei Konzentrationen von etwa 5 mM ein Rückgang der Lebensfähigkeit der Zellen, was deutlich weniger als der literaturbekannte Wert von 30 mM (*Brenneisen et al., 1998*) ist. Aufgrund dieser Konzentrationsabhängigkeit von DMSO, einem der besten Lösungsmittel für 8PN, war es nicht möglich, dieses Flavonoid in höheren Konzentrationen einzusetzen, und damit seinen Einfluß auf die MMP- und TIMP-Expression detaillierter zu untersuchen. In der eingesetzten Konzentration von 30 μM erhöhte 8PN nach Bestrahlung mit UVA überraschenderweise die

Proteinmengen von MMP-1, MMP-2, TIMP-1 und TIMP-2 um mehr als 10%. Auch der Anteil an aktivem Enzym wurde unter diesen Bedingungen gesteigert, während 8PN die Expression dieser Proteine ohne UVA nur geringfügig beeinflusste (s. Abb. 3.17, S.74). Dieser Effekt konnte nicht durch DMSO hervorgerufen worden sein, da DMSO alleine die MMP- und TIMP-Expression nicht signifikant veränderte. AGR sowie Vitamin C und E reduzierten, im Gegensatz zu 8PN, die MMP-Expression deutlich, ohne dabei die TIMP-Mengen entscheidend zu verändern. Vitamin C senkte die Gesamtmenge sowohl von MMP-1 als auch von MMP-2 auf etwa 80%. Besonders Vitamin E zeigte interessante Möglichkeiten, den Anteil aktiver Proteinase entscheidend herabzusetzen, und reduzierte die proteolytische Aktivität unter diesen Bedingungen am stärksten. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen Arbeiten, die die Fähigkeit der Vitamine C und E, den Anstieg von MMP-1 mRNA nach UVA-Bestrahlung unterdrücken zu können, nachgewiesen haben (*Offort et al., 2002*). Im Fall von AGR zeigte sich, daß diese Substanz die durch UVA-Bestrahlung normalerweise erhöhte Menge an Kollagenase mit einem Rückgang von ca. 40% stärker als alle anderen verwendeten Additive verminderte, sein Einfluß auf die Reduzierung der Gelatinasen jedoch schwächer als der der Vitamine war. Zusammengefaßt läßt sich somit festhalten, daß man durch Auswahl geeigneter Additive selektiv Einfluß auf die MMP-1- oder die MMP-2-Expression unter Bedingungen von UV-Bestrahlung nehmen kann.

Flavonoide besitzen als Radikalfänger einige spezielle Eigenschaften. Das für die Radikal-Absorption wichtigste Strukturmerkmal ist die Catechol (L-arabinopyranosid)-Gruppe. Über die 4-oxo-Funktion in Verbindung mit der 2,3-Doppelbindung ist eine Elektronendelokalisation möglich, und das zusätzliche Vorhandensein der 3'- und 5'-Hydroxy-Gruppen bewirkt eine starke Radikal-Absorption und maximales Radikalfänger-Potential. AGR mit der Quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone)-Gruppe als Flavonoid-Struktur (Abb. 1.6, S. 17) besitzt alle diese Eigenschaften und ist somit ein sehr starker Radikalfänger. Im Gegensatz dazu fehlt beim 8PN die Catechol-Struktur im Ring B sowie die 2,3-Doppelbindung. Daher sollte 8PN keine Radikalfänger-Aktivität aufweisen, was erklären kann, warum dieses Additiv die MMP-reduzierende Eigenschaft vermissen läßt. Es erklärt allerdings nicht dessen Effekt, die MMP-Expression sogar zu erhöhen. Dieses Flavonoid könnte möglicherweise als ein Photosensitizer operieren und ROS generieren, die nicht nur TIMPs inaktivieren, sondern auch die Synthese und Aktivierung von MMPs vermitteln (*Scharffetter-Kochanek et al., 2000*).

4.3.3 Schutz der Haut vor lichtinduzierter Hautalterung

UVA-Strahlung kann die Dermis erreichen und dort sowohl mit epidermalen als auch mit dermalen Zellen interagieren (*Krutmann, 2001*). Um die physiologische Strahendosis eines kurzen Sonnenbades zu simulieren (*Kligman & Kligman, 1986*), wurden für diese Untersuchungen HDF mit einer UVA-Dosis von 10 J/cm^2 bestrahlt. Ein Teil der Zellen wurde in Kollagen-Gelen kultiviert, um ein Äquivalent zu den in der Dermis eingebetteten Fibroblasten zu schaffen (*Pascual-LeTallec et al., 1998*). Aufgrund ihrer mechanischen Kräfte begannen die HDF, die Gele zusammenzuziehen, bevor diese dann zum Ende der Experimente verdaut wurden. Andere Studien zeigten eine in Kollagen-Gelen erhöhte MMP-Expression ohne UV-Strahlung im Vergleich zu Monolayern (*Ravanti et al., 1999b*). Diese Ergebnisse konnten überraschenderweise nicht bestätigt werden. Die Monolayer wiesen höhere Konzentrationen von MMPs und TIMPs pro Zelle auf als die Kollagen-Gele (s. Abb. 3.17 und 3.18, S. 74-75). Weil die Gele im Vergleich zu den Monolayern die sechsfache Zellzahl besitzen, könnte dieser Effekt auf die höhere Zelldichte zurückzuführen sein, die die Zellproliferation und die Expression beeinflusst. Weiterhin ist bislang unbekannt, ob hohe Mengen von MMPs (und TIMPs) ihre extrazellulären Konzentrationen möglicherweise durch einen Feedback-Mechanismus regulieren. Ein weiteres Ergebnis, das sich unter diesen Bedingungen nicht bestätigen ließ, betrifft MMP-13. Während in der Literatur die mRNA-Induktion der MMP-13 unter vergleichbaren Bedingungen beschrieben wird (*Ravanti et al., 1999b*), konnte dieses Protein in den Untersuchungen dieser Arbeit weder in Monolayern noch in Gelen nachgewiesen werden. MMP-13 wird von fetalen Hautfibroblasten während der normalen Wundheilung *in vivo* exprimiert, was einen verstärkten Umsatz von Kollagen bedingt (*Ravanti et al., 2001*). In Übereinstimmung mit den Literaturdaten (*Ravanti & Kähäri, 2000*) konnten unter den hier angewandten Bedingungen MMP-8, MMP-9, und MMP-12 weder in Monolayern noch in Kollagen-Gelen nachgewiesen werden.

Es zeigte sich, daß UVA-Strahlung die MMP-Expression verstärkt, teilweise sogar mehr als verdoppelt (s. Abb. 3.19, S. 76). Zusätzlich zu dieser verstärkten Expression wird auch die MMP-Aktivierung auslöst. So vergrößerte sich im Fall von MMP-2 der Anteil an aktivem Enzym um etwa 50%, was sowohl durch Aktivitäts-Assays (s. Abb. 3.17, 3.18 und 3.19, S. 74-76) als auch durch Zymographie (s. Abb. 3.16, S. 73) gezeigt werden konnte, wobei im

letzteren Fall die Zuordnung der Proteinbanden im Zymogramm nicht zweifelsfrei geklärt werden konnte. Im Gegensatz dazu war die Expression von TIMP-1 im allgemeinen nicht erhöht, so daß TIMPs diese verstärkte MMP-Aktivität nicht ausgleichen könnten, was auch im Einklang mit anderen Ergebnissen steht (*Offort et al., 2002*). Während die Kollagenasen (MMP-1, MMP-8 und MMP-13) natives fibrilläres Kollagen-Typ I, II und III spalten können, verdauen die Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9) verschiedene andere Kollagen-Typen und viele andere Substrate (*Ravanti & Kähäri, 2000*). Daher kommt den Gelatinasen auch eine wichtige Rolle beim weiteren Abbau von fibrillärem Kollagen zu, nachdem es von Kollagenasen anfänglich gespalten wurde. Gelatinasen sind daher mitentscheidend für den Kollagen-Turnover. Dennoch scheinen durch UV-Bestrahlung erhöhte Mengen von (aktiver) Gelatinase A aufgrund ihrer elastotischen Aktivität (*Birkedal-Hansen et al., 1993*) und ihrer Fähigkeit, natives Typ I-Kollagen in einem gewissen Ausmaß abzubauen zu können (*Aimes & Quigley, 1995*), nicht wünschenswert zu sein. Es bleibt zu diskutieren, wie weit unter physiologischen Bedingungen auf MMP-Konzentrationen Einfluß genommen werden sollte, wie stark diese also verändert werden dürfen. Der Versuch, MMP-Aktivität möglichst vollständig zu inhibieren (*Denis & Verweij, 1997*), scheint nur bei sehr schweren Erkrankungen angemessen zu sein, wie zum Beispiel bei der Metastasierung von Krebszellen (*Overall & Lopez-Otin, 2002*). Für Anwendungen bei lichtinduzierter Hautalterung sind solche Additive gesucht, die eine mit dem unbestrahlten Zustand vergleichbare Situation erhalten oder wiederherstellen. Vitamin E hat beispielsweise seine antioxidative und MMP-reduzierende Wirkung nach Bestrahlung mit UVA unter Beweis gestellt, bietet jedoch für eine hautschützende Anwendung nicht nur wünschenswerte Eigenschaften. So resultierte ein Zusatz von Vitamin E zu kultivierten HDF in einer erhöhten Anfälligkeit für DNA-Schäden nach UVA-Bestrahlung (*Nocentini et al., 2001*). Aus diesem Grund müssen die Bedingungen, unter denen Additive wie Vitamin E die Haut schützen können, in weiteren Studien exakt untersucht werden. Dennoch scheinen sowohl Vitamin C und E als auch AGR, das die Kollagenase-Expression um bis zu 40% senkte, vielversprechende Kandidaten zum Ausgleichen einer erhöhten MMP-Aktivität in der Haut nach UVA-Bestrahlung zu sein.

5 LITERATURVERZEICHNIS

Ahokas, K., Lohi, J., Lohi, H., Elomaa, O., Karjalainen-Lindsberg, M.L., Kere, J., Saarialho-Kere, U. (2002): Matrix metalloproteinase-21, the human orthologue for XMMP, is expressed during fetal development and in cancer. *Gene* 301, 31-41

Aimes, R.T., Quigley, J.P. (1995): Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J. Biol. Chem.* 270, 5872-5876

Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M. (1993): Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7915-7922

Armstrong, D.G., Jude, E.B. (2002): The role of matrix metalloproteinases in wound healing. *J. Am. Podiatr. Med. Assoc.* 92, 12-18

Asmussen, P.D., Söllner, B. (1993): Die Prinzipien der Wundheilung. *Tutorial medical 1 (Beiersdorf medical Bibliothek; Hippokrates Verlag, Stuttgart)*, 9-17

Bachmeier, B.E., Nerlich, A.G., Boukamp, P., Lichtinghagen, R., Tschesche, H., Fritz, H., Fink, E. (2000): Human keratinocyte cell lines differ in the expression of the collagenolytic matrix metalloproteinases-1, -8, and -13 and of TIMP-1. *Biol. Chem.* 381, 509-516

Balbin, M., Pendas, A.M., Uria, J.A., Jimenez, M.G., Freije, J.P., Lopez-Otin, C. (1999): Expression and regulation of collagenase-3 (MMP-13) in human malignant tumors. *APMIS* 107, 45-53

Bartlett, J.D., Simmer, J.P., Xue, J., Margolis, H.C., Moreno, E.C. (1996): Molecular cloning and mRNA tissue distribution of a novel matrix metalloproteinase isolated from porcine enamel organ. *Gene* 183, 123-128

Basset, P., Bellocq, J.P., Wolf, C., Stoll, I., Hutin, P., Limacher, J.M., Podhajcer, O.L., Chenard, M.P., Rio, M.C., Chambon, P. (1990): A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature* 348, 699-704

Bauer, E.A., Eisen, A.Z., Jeffrey, J.J. (1970): Immunologic relationship of a purified human skin collagenase to other human and animal collagenases. *Biochim. Biophys. Acta* 206, 152-160

-
- Beissert, S., Granstein, R.D.** (1996): UV-induced cutaneous photobiology. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 31, 381-404
- Bergers, G., Javaherian, K., Lo, K.M., Folkman, J., Hanahan, D.** (1999): Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. *Science* 284, 808-812
- Bergmann, U., Michaelis, J., Oberhoff, R., Knäuper, V., Beckmann, R., Tschesche, H.** (1989): Enzyme linked immunosorbent assays (ELISA) for the quantitative determination of human leukocyte collagenase and gelatinase. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 27, 351-359
- Berneburg, M., Grether-Beck, S., Kurten, V., Ruzicka, T., Briviba, K., Sies, H., Krutmann, J.** (1999): Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion. *J. Biol. Chem.* 274, 15345-15349
- Bernstein, E.F., Chen, Y.Q., Tamai, K., Shepley, K.J., Resnik, K.S., Zhang, H., Tuan, R., Mauviel, A., Uitto, J.** (1994): Enhanced elastin and fibrillin gene expression in chronically photodamaged skin. *J. Invest. Dermatol.* 103, 182-186
- Bernstein, E.F., Fisher, L.W., Li, K., LeBaron, R.G., Tan, E.M.L., Uitto, J.** (1995): Differential expression of versican and decorin genes in photoaged and sun-protected skin. Comparison by immunohistochemistry and Northern analysis. *Lab. Invest.* 72, 662-669
- Bidart, J.M., Thuillier, F., Augereau, C., Chalas, J., Daver, A., Jacob, N., Labrousse, F., Voitot, H.** (1999): Kinetics of serum tumor marker concentrations and usefulness in clinical monitoring. *Clin. Chem.* 45, 1695-1707
- Birkedal-Hansen, B., Moore, W.G., Taylor, R.E., Bhowan, A.S., Birkedal-Hansen, H.** (1988): Monoclonal antibodies to human fibroblast procollagenase. Inhibition of enzymatic activity, affinity purification of the enzyme, and evidence for clustering of epitopes in the NH₂-terminal end of the activated enzyme. *Biochemistry* 27, 6751-6758
- Birkedal-Hansen, H., Moore, W.G.I., Bodden, M.K., Windsor, L.J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A., Engler, J.A.** (1993): Matrix metalloproteinases: a review. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* 4, 197-250
- Blobel, C.P.** (2002): Functional and biochemical characterization of ADAMs and their predicted role in protein ectodomain shedding. *Inflamm. Res.* 51, 83-84
- 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

-
- Bode, W., Maskos, K. (2003):** Structural basis of the Matrix Metalloproteinases and their physiological inhibitors, the Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. *Biol. Chem.* 384, 863-872
- Bonina, F., Lanza, M., Montenegro, L., Puglisi, C., Tomaino, A., Trombetta, D., Castelli, F., Saija, A. (1996):** Flavonoids as potential protective agents against photo-oxidative skin damage. *Int. J. Pharm.* 145, 87-94
- Borgfeldt, C., Bendahl, P.O., Gustavsson, B., Langstrom, E., Ferno, M., Willen, R., Grenman, S., Casslen, B. (2003):** High tumor tissue concentration of urokinase plasminogen activator receptor is associated with good prognosis in patients with ovarian cancer. *Int. J. Cancer* 20, 658-665
- Brenneisen, P., Oh, J., Wlaschek, M., Wenk, J., Briviba, K., Hommel, C., Herrmann, G., Sies, H., Scharffetter-Kochanek, K. (1996):** Ultraviolet B wavelength dependence for the regulation of two major matrix-metalloproteinases and their inhibitor TIMP-1 in human dermal fibroblasts. *Photochem. Photobiol.* 64, 649-657
- Brenneisen, P., Wenk, J., Klotz, L.O., Wlaschek, M., Briviba, K., Krieg, T., Sies, H., Scharffetter-Kochanek, K. (1998):** Central role of ferrous/ferric iron in the ultraviolet B irradiation-mediated signaling pathway leading to increased interstitial collagenase (matrix-degrading metalloprotease (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) mRNA levels in cultured human dermal fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 273, 5279-5287
- Brenneisen, P., Sies, H., Scharffetter-Kochanek, K. (2002):** Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 973, 31-43
- Burke, H.B., Henson, D.E. (1998):** Specimen banks for cancer prognostic factor research. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 122, 871-874
- 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

-
- Chin, J.R.,** Murphy, G., Werb, Z. (1985): Stromelysin, a connective tissue-degrading metallo-endopeptidase secreted by stimulated rabbit synovial fibroblasts in parallel with collagenase. Biosynthesis, isolation, characterization, and substrates. *J. Biol. Chem.* 260, 12367-12376
- Collins, B.M.,** McLachlan, J.A., Arnold, S.F. (1997): The estrogenic and antiestrogenic activities of phytochemicals with the human estrogen receptor expressed in yeast. *Steroids* 62, 365-372
- Coussens, L.M.,** Fingleton, B., Matrisian, L.M. (2002): Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* 295, 2387-2392
- Cowell, S.,** Knäuper, V., Stewart, M.L., D'Ortho, M.P., Stanton, H., Hembry, R.M., Lopez-Otin, C., Reynolds, J.J., Murphy, G. (1998): Induction of matrix metalloproteinase activation cascades based on membrane-type 1 matrix metalloproteinase: associated activation of gelatinase A, gelatinase B and collagenase 3. *Biochem J.* 331, 453-458
- DeGrujil, F.R.** (2002): Photocarcinogenesis: UVA vs. UVB radiation. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 15, 316-320
- DeLuca, H.F.** (1988): The vitamin D story: a collaborative effort of basic science and clinical medicine. *FASEB J.* 2, 224-236
- Denis, L.J.,** Verweij, J. (1997): Matrix metalloproteinase inhibitors: present achievements and future prospects. *Invest. New Drugs* 15, 175-185
- Diehl, P.,** Hantke, B., Hennig, M., Tschesche, H., Mittelmeier, W., Schmitt, M., Mühlenweg, B. (2003): Protein expression of MMP-13, uPA, and PAI-1 in pseudocapsular and interface tissue around implants of loose artificial hip joints and in osteoarthritis. *Int. J. Mol. Med.* (eingereicht)
- DiSaia, P.J.,** Bloss, J.D. (2003): Treatment of ovarian cancer: new strategies. *Gynecol. Oncol.* 90, S24-S32
- Dredge, K.,** Dalglish, A.G., Marriott, J.B. (2003): Angiogenesis inhibitors in cancer therapy. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 4, 667-674
- Duffy, M.J.** (1996): Proteases as prognostic markers in cancer. *Clin. Cancer Res.* 2, 613-618
- Dutcher, J.P.,** Novik, Y., O'Boyle, K., Marcoullis, G., Secco, C., Wiernik, P.H. (2000): 20th-century advances in drug therapy in oncology – Part II. *J. Clin. Pharmacol.* 40, 1079-1092

-
- Eberhard-Metzger, C.** (2003): Verlorenes Gleichgewicht. *Future – Das Aventis-Magazin 1 (Aventis S.A., Schiltigheim)*, 6-10
- Edman, P., Begg, G.** (1967): A protein sequenator. *Eur. J. Biochem. 1*, 80-91
- Etoh, T., Inoue, H., Yoshikawa, Y., Barnard, G.F., Kitano, S., Mori, M.** (2000): Increased expression of collagenase-3 (MMP-13) and MT1-MMP in oesophageal cancer is related to cancer aggressiveness. *Gut 47*, 50-56
- Fischer, P.** (1992): 25 Jahre automatisierte Proteinsequenzierung. *Nachr. Chem. Tech. Lab. 40*, 963-971
- Fisher, G.J., Datta, S.C., Talwar, H.S., Wang, Z.Q., Varani, J., Kang, S., Voorhees, J.J.** (1996): Molecular basis of sun-induced premature skin aging and retinoid antagonism. *Nature 379*, 335-339
- Foda, H.D., Zucker, S.** (2001): Matrix metalloproteinases in cancer invasion, metastasis and angiogenesis. *Drug Discov. Today 6*, 478-482
- Freije, J.M., Diez-Itza, I., Balbin, M., Sanchez, L.M., Blasco, R., Tolivia, J., Lopez-Otin, C.** (1994): Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J. Biol. Chem. 269*, 16766-16733
- Furumoto, H., Irahara, M.** (2002): Human papilloma virus (HPV) and cervical cancer. *J. Med. Invest. 49*, 124-133
- Galis, Z.S., Sukhova, G.K., Kranzhofer, R., Clark, S., Libby, P.** (1995): Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92*, 402-406
- Gross, J., Lapiere, C.M.** (1962): Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48*, 1014-1022
- Hadshiew, I., Stäb, F., Untiedt, S., Bohnsack, K., Rippke, F., Hölzle, E.** (1997): Effects of topically applied antioxidants in experimentally provoked polymorphous light eruption. *Dermatology 195*, 362-368
- Hanahan, D., Weinberg, R.A.** (2000): The hallmarks of cancer. *Cell 100*, 57-70
- Hanke, B., Schneider, J., Haiber, G., Weber, I.** (2002): Onkologie – Aventis in Deutschland. *Aventis-Broschüre (Aventis Pharma Deutschland GmbH, Bad Soden)*, 5-22

-
- Hantke, B.** (2002): Statistische Analyse eines Laborverfahrens am Beispiel ELISA, *Diplomarbeit Universität Bielefeld, Fakultät für Wirtschaftswissenschaften*, 31-44
- Hantke, B., Lahmann, C., Venzke, K., Fischer, T., Kocourek, A., Windsor, L.J., Bergemann, J., Stüb, F., Tschesche, H.** (2002): Influence of flavonoids and vitamins on the MMP- and TIMP-expression of human dermal fibroblasts after UVA irradiation. *Photochem. Photobiol. Sci. 1*, 826-833
- Hantke, B., Harbeck, N., Schmalfeldt, B., Claes, I., Hiller, O., Luther, M.O., Welk, A., Kuhn, W., Schmitt, M., Tschesche, H., Mühlenweg, B.** (2003): Clinical relevance of matrix metalloproteinase-13 determined with a new highly specific and sensitive ELISA in ascitic fluid of advanced ovarian carcinoma patients. *Biol. Chem. 384*, 1247-1251
- Harbeck, N., Kates, R.E., Schmitt, M.** (2002): Clinical relevance of invasion factors urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 for individualized therapy decisions in primary breast cancer is greatest when used in combination. *J. Clin. Oncol. 20*, 1000-1007
- Harris, W.H., Schiller, A.L., Scholler, J.M., Freiberg, R.A., Scott, R.** (1976): Extensive localized bone resorption in the femur following total hip replacement. *J. Bone Joint Surg. Am. 58*, 612-618
- Hasty, K.A., Jeffrey, J.J., Hibbs, M.S., Welgus, H.G.** (1987): The collagen substrate specificity of human neutrophil collagenase. *J. Biol. Chem. 262*, 10048-10052
- Hattori, Y., Nerusu, K.C., Bhagavathula, N., Brennan, M., Hattori, N., Murphy, H.S., Su, L.D., Wang, T.S., Johnson, T.M., Varani, J.** (2003): Vascular expression of matrix metalloproteinase-13 (collagenase-3) in basal cell carcinoma. *Exp. Mol. Pathol. 74*, 230-237
- Hautamaki, R.D., Kobayashi, D.K., Senior, R.M., Shapiro, S.D.** (1997): Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science 277*, 2002-2004
- 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
- Hirabayashi, K., Graham, J.** (1970): Genesis of ascites in ovarian cancer. *Am. J. Obstet. Gynecol. 106*, 492-497

-
- Hofmann**, U.B., Westphal, J.R., van Muijen, G.N.P., Ruiter, D.J. (2000): Matrix metalloproteinases in human melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 115, 337-344
- Ichihashi**, M., Ueda, M., Budiyanto, A., Bito, T., Oka, M., Fukunaga, M., Tsuru, K., Horikawa, T. (2003): UV-induced skin damage. *Toxicology* 189, 21-39
- Imai**, S., Konttinen, Y.T., Jumppanen, M., Lindy, O., Ceponis, A., Kemppinen, P., Sorsa, T., Santavirta, S., Xu, J.W., Lopez-Otin, C. (1998): High levels of expression of collagenase-3 (MMP-13) in pathological conditions associated with a foreign-body reaction. *J. Bone Joint Surg. Br.* 80, 701-710
- Johansson**, N., Saarialho-Kere, U., Airola, K., Herva, R., Nissinen, L., Westermarck, J., Vuorio, E., Heino, J., Kähäri, V.M. (1997): Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by hypertrophic chondrocytes, periosteal cells, and osteoblasts during human fetal bone development. *Dev. Dynam.* 208, 387-397
- Johnson**, L.L., Dyer, R., Hupe, D.J. (1998): Matrix metalloproteinases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 466-471
- Jung**, J.Y., Warter, S., Rumpler, Y. (1990): Localization of stromelysin 2 gene to the q22.3-23 region of chromosome 11 by in situ hybridisation. *Ann. Genet.* 33, 21-23
- Kähäri**, V.M., Saarialho-Kere, U. (1997): Matrix metalloproteinases in skin. *Exp. Dermatol.* 6, 199-213
- Kähäri**, V.M., Johansson, N., Grenman, R., Airola, K., Saarialho-Kere, U. (1998): Expression of collagenase-3 (MMP-13) by tumor cells in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Adv. Exp. Med. Biol.* 451, 63-68
- Kligman**, L.H., Kligman, A.M. (1986): The nature of photoaging: its prevention and repair. *Photodermatol.* 3, 215-227
- Knäuper**, V., Lopez-Otin, C., Smith, B., Knight, G., Murphy, G. (1996a): Biochemical characterization of human collagenase-3. *J. Biol. Chem.* 271, 1544-1550
- Knäuper**, V., Will, H., Lopez-Otin, C., Smith, B., Atkinson, S.J., Stanton, H., Hembry, R.M., Murphy, G. (1996b): Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. *J. Biol. Chem.* 271, 17124-17131

-
- Knight**, C.G., Willenbrock, F., Murphy, G. (1992): A novel coumarin-labelled peptide for sensitive continuous assays of the matrix metalloproteinases. *FEBS Lett.* 296, 263-266
- Ko**, F.N., Cheng, Z.J., Lin, C.N., Teng, C.M. (1998): Scavenger and antioxidant properties of prenylflavones isolated from artocarpus heterophyllus. *Free Radic. Biol. Med.* 25, 160-168
- Kocourek**, A. (2002): Darstellung und Charakterisierung der katalytischen Domäne der humanen Makrophagenelastase. *Dissertation Universität Bielefeld, Fakultät für Chemie*, 60-65
- Koivukangas**, V., Kallioinen, M., Autio-Harmainen, H., Oikarinen, A. (1994): UV irradiation induces the expression of gelatinases in human skin in vivo. *Acta Derm. Venereol.* 74, 279-282
- Krutmann**, J. (2001): The role of UVA rays in skin aging. *Eur. J. Dermatol.* 11, 170-171
- Kuhn**, W., Schmalfeldt, B., Reuning, U., Pache, L., Berger, U., Ulm, K., Harbeck, N., Spathe, K., Dettmar, P., Hofler, H., Janicke, F., Schmitt, M., Graeff, H. (1999): Prognostic significance of urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 for survival in advanced ovarian carcinoma stage FIGO IIIc. *Br. J. Cancer* 79, 1746-1751
- Lämmli**, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Lahmann**, C., Young, A.R., Wittern, K.P., Bergemann, J. (2001): Induction of mRNA for matrix metallo-proteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in human skin in vivo by solar simulated radiation. *Photochem. Photobiol.* 73, 657-663
- Lawen**, A. (2003): Apoptosis – an introduction. *Bioessays* 25, 888-896
- LeBail**, J.C., Laroche, T., Marre-Fournier, F., Habrioux, G. (1998): Aromatase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase inhibition by flavonoids. *Cancer Lett.* 133, 101-106
- Leeman**, M.F., McKay, J.A., Murray, G.I. (2002): Matrix metalloproteinase-13 activity is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *J. Clin. Pathol.* 55, 758-762
- Llano**, E., Pendas, A.M., Freije, J.P., Nakano, A., Knäuper, V., Murphy, G., Lopez-Otin, C. (1999): Identification and characterization of human MT5-MMP, a new membrane-bound activator of progelatinase a overexpressed in brain tumors. *Cancer Res.* 59, 2570-2576

-
- Lumley, T., Diehr, P., Emerson, S., Chen, L. (2002):** The importance of the normality assumption in large public health data sets. *Annu. Rev. Public. Health* 23, 151-169
- Lyons, J.G., Birkedal-Hansen, B., Pierson, M.C., Whitelock, J.M., Birkedal-Hansen, H. (1993):** Interleukin-1 β and transforming growth factor- α /epidermal growth factor induce expression of M_r 95,000 type IV collagenase/gelatinase and interstitial fibroblast-type collagenase by rat mucosal keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 268, 19143-19151
- Maggino, T., Gadducci, A. (2000):** Serum markers as prognostic factors in epithelial ovarian cancer: an overview. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 21, 64-69
- Marchenko, G.N., Strongin, A.Y. (2001):** MMP-28, a new human matrix metalloproteinase with an unusual cysteine-switch sequence is widely expressed in tumors. *Gene* 265, 87-93
- Menczer, J. (2003):** Reflections on the FIGO surgical staging of invasive epithelial ovarian cancer. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 24, 215-222
- Milligan, S.R., Kalita, J.C., Heyerick, A., Rong, H., De Cooman, L., De Keukeleire, D. (1999):** Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 2249-2252
- Mitchell, P.G., Magna, H.A., Reeves, L.M., Lopresti-Morrow, L.L., Yocum, S.A., Rosner, P.J., Geoghegan, K.F., Hambor, J.E. (1996):** Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J. Clin. Invest.* 97, 761-768
- Moore, W.M., Spilburg, C.A. (1986):** Purification of human collagenases with a hydroxamic acid affinity column. *Biochemistry* 25, 5189-5195
- Murphy, G., Ward, R., Hembry, R.M., Reynolds, J.J., Kuhn, K., Tryggvason, K. (1989):** Characterization of gelatinase from pig polymorphonuclear leucocytes. A metalloproteinase resembling tumour type IV collagenase. *Biochem. J.* 258, 463-472
- Murphy, G., Knäuper, V. (1997):** Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain? *Matrix Biol.* 15, 511-518
- Nagase, H. (1997):** Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol. Chem.* 378, 151-160

-
- Neal**, M.S. (2001): Angiogenesis: is it the key to controlling the healing process? *J. Wound Care* 10, 281-287
- Nielsen**, B.S., Rank, F., Lopez, J.M., Balbin, M., Vizoso, F., Lund, L.R., Dano, K., Lopez-Otin, C. (2001): Collagenase-3 expression in breast myofibroblasts as a molecular marker of transition of ductal carcinoma in situ lesions to invasive ductal carcinomas. *Cancer Res.* 61, 7091-7100
- Nieto**, F.J., Coresh, J. (1996): Adjusting survival curves for confounders: a review and a new method. *Am. J. Epidemiol.* 143, 1059-1068
- Noack**, F., Helmecke, D., Rosenberg, R., Thorban, S., Nekarda, H., Fink, U., Schütze, K., Harbeck, N., Magdolen, V., Graeff, H., Schmitt, M. (1999): CD87-positive tumor cells in bone marrow aspirates identified by confocal laser scan fluorescence microscopy. *Int. J. Oncol.* 15, 617-623
- Nocentini**, S., Guggiari, M., Rouillard, D., Surgis, S. (2001): Exacerbating effect of vitamin E supplementation on DNA damage induced in cultured human normal fibroblasts by UVA radiation. *Photochem. Photobiol.* 73, 370-377
- Oberpichler**, A. (1999): Klonierung, Expression und Charakterisierung verschiedener Varianten der Kollagenase-3 und Untersuchung des Einflusses der Hämodialyse auf Plasmaproteine. *Dissertation Universität Bielefeld, Fakultät für Chemie*, 91-103
- Offord**, E.A., Gautier, J.C., Avanti, O., Scaletta, C., Runge, F., Kraemer, K., Applegate, L.A. (2002): Photoprotective potential of lycopene, β -carotene, vitamin E, vitamin C and carnosis acid in UVA-irradiated human skin fibroblasts. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 1293-1303
- Oren**, M. (2003): Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ.* 10, 431-442
- Overall**, C.M., Lopez-Otin, C. (2002): Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat. Rev. Cancer* 2, 657-672
- Pappin**, D.J., Hojrup, P., Bleasby, A.J. (1993): Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr. Biol.* 3, 327-332
- Park**, H.I., Ni, J., Gerkema, F.E., Liu, D., Belozerov, V.E., Sang, Q.X. (2000): Identification and characterization of human endometase (Matrix metalloproteinase-26) from endometrial tumor. *J. Biol. Chem.* 275, 20540-20544

-
- Partridge**, E.E., Barnes, M.N. (1999): Epithelial ovarian cancer: prevention, diagnosis, and treatment. *CA Cancer J. Clin.* 49, 297-320
- Pascual-LeTallec**, L., Korwin-Zmijowska, C., Adolphe, M. (1998): Effects of simulated solar radiation on type I and type III collagens, collagenase (MMP-1) and stromelysin (MMP-3) gene expression in human dermal fibroblasts cultured in collagen gels. *J. Photochem. Photobiol. B* 42, 226-232
- Pei**, D. (1999): Leukolysin/MMP25/MT6-MMP: a novel matrix metalloproteinase specifically expressed in the leukocyte lineage. *Cell. Res.* 9, 291-303
- Pendas**, A.M., Knäuper, V., Puente, X.S., Llano, E., Mattei, M.G., Apte, S., Murphy, G., Lopez-Otin, C. (1997): Identification and characterization of a novel human matrix metalloproteinase with unique structural characteristics, chromosomal location, and tissue distribution. *J. Biol. Chem.* 272, 4281-4286
- Pendas**, A.M., Uria, J.A., Jimenez, M.G., Balbin, M., Freije, J.P., Lopez-Otin, C. (2000): An overview of collagenase-3 expression in malignant tumors and analysis of its potential value as a target in antitumor therapies. *Clin. Chim. Acta* 291, 137-155
- Perkins**, D.N., Pappin, D.J., Creasy, D.M., Cottrell, J.S. (1999): Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551-3567
- Peterman**, J.H., Butler, J.E. (1989): Application of theoretical considerations to the analysis of ELISA data. *Biotechniques* 7, 608-615
- Puente**, X.S., Pendas, A.M., Llano, E., Velasco, G., Lopez-Otin, C. (1996): Molecular cloning of a novel membrane-type matrix metalloproteinase from a human breast carcinoma. *Cancer Res.* 56, 944-949
- Ravanti**, L., Häkkinen, L., Larjava, H., Saarialho-Kere, U., Foschi, M., Han, J., Kähäri, V.M. (1999a): Transforming growth factor-beta induces collagenase-3 expression by human gingival fibroblasts via p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 274, 37292-37300
- Ravanti**, L., Heino, J., Lopez-Otin, C., Kähäri, V.M. (1999b): Induction of collagenase-3 (MMP-13) expression in human skin fibroblasts by three-dimensional collagen is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 274, 2446-2455

-
- Ravanti, L., Kähäri, V.M.** (2000): Matrix metalloproteinases in wound repair (review). *Int. J. Mol. Med.* 6, 391-407
- Ravanti, L., Toriseva, M., Penttinen, R., Crombleholme, T., Foschi, M., Han, J., Kähäri, V.M.** (2001): Expression of human collagenase-3 (MMP-13) by fetal skin fibroblasts is induced by transforming growth factor beta via p38 mitogen-activated protein kinase. *FASEB J.* 15, 1098-1100
- Reed, J.C.** (2003): Apoptosis – targeted therapies for cancer. *Cancer Cell* 3, 17-22
- Reuning, U., Sperl, S., Kopitz, C., Keßler, H., Krüger, A., Schmitt, M., Magdolen, V.** (2003): Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPAR): development of antagonists of uPA/uPAR interaction and their effects in vitro and in vivo. *Curr. Pharm. Des.* 9, 1529-1543
- Ribas, A., Butterfield, L.H., Glaspy, J.A., Economou, J.S.** (2003): Current developments in cancer vaccines and cellular immunotherapy. *J. Clin. Oncol.* 21, 2415-2432
- Ries, C., Petrides, P.E.** (1995): Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 376, 345-355
- Rippke, F., Wendt, G., Bohnsack, K., Dörschner, A., Stäb, F., Hölzle, E., Moll, I.** (2001): Results of photoprovocation and field studies on the efficacy of a novel topically applied antioxidant in polymorphous light eruption. *J. Dermatol. Treat.* 12, 3-8
- Rostan, E.F., DeBuys, H.V., Madey, D.L., Pinnell, S.R.** (2002): Evidence supporting zinc as an important antioxidant for skin. *Int. J. Dermatol.* 41, 606-611
- Saarialho-Kere, U.** (1998): Patterns of matrix metalloproteinase and TIMP expression in chronic ulcers. *Arch. Dermatol. Res.* 290, 47-54
- Saarialho-Kere, U., Kerkelä, E., Jeskanen, L., Hasan, T., Pierce, R., Starcher, B., Raudasoja, R., Ranki, A., Oikarinen, A., Vaalamo, M.** (1999): Accumulation of matrilysin (MMP-7) and macrophage metalloelastase (MMP-12) in actinic damage. *J. Invest. Dermatol.* 113, 664-672
- Sakata, K., Shigemasa, K., Nagai, N., Ohama, K.** (2000): Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9, MT1-MMP) and their inhibitors (TIMP-1, TIMP-2) in common epithelial tumors of the ovary. *Int. J. Oncol.* 17, 673-681

-
- Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E., Seiki, M. (1994):** A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 370, 61-65
- Sava, G., Bergamo, A. (1999):** Drug control of solid tumour metastases: a critical view. *Anti-cancer Res.* 19, 1117-1124
- Scharffetter, K., Wlaschek, M., Hogg, A., Bolsen, K., Schothorst, A., Goerz, G., Krieg, T., Plewig, G. (1991):** UVA irradiation induces collagenase in human dermal fibroblasts in vitro and in vivo. *Arch. Dermatol. Res.* 283, 506-511
- Scharffetter-Kochanek, K., Brenneisen, P., Wenk, J., Herrmann, G., Ma, W., Kuhr, L., Meewes, C., Wlaschek, M. (2000):** Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Exp. Gerontol.* 35, 307-316
- Schmalfeldt, B., Kuhn, W., Reuning, U., Pache, L., Dettmar, P., Schmitt, M., Janicke, F., Hofler, H., Graeff, H. (1995):** Primary tumor and metastasis in ovarian cancer differ in their content of urokinase-type plasminogen activator, its receptor, and inhibitors types 1 and 2. *Cancer Res.* 55, 3958-3963
- Schmalfeldt, B., Prechtel, D., Härting, K., Späthe, K., Rutke, S., Konik, E., Fridman, R., Berger, U., Schmitt, M., Kuhn, W., Lengyel, E. (2001):** Increased expression of matrix metalloproteinases (MMP)-2, MMP-9, and the urokinase-type plasminogen activator is associated with progression from benign to advanced ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* 7, 2396-2404
- Schmitt, M., Wilhelm, O.G., Reuning, U., Krüger, A., Harbeck, N., Lengyel, E., Graeff, H., Gänsbacher, B., Kessler, H., Bürgle, M., Stürzebecher, J., Sperl, S., Magdolen, V. (2000):** The plasminogen activation system as a novel target for therapeutic strategies. *Fibrinolysis* 14, 114-132
- Schröder, J. (2001):** Design and synthesis of matrix metalloproteinase inhibitors derived from a 6H-1,3,4-thiadiazine scaffold. *Dissertation Universität Bielefeld, Fakultät für Chemie*, 7-9
- Seiki, M. (2003):** Membrane-type 1 matrix metalloproteinase: a key enzyme for tumor invasion. *Cancer Lett.* 194, 1-11
- Sellers, A., Reynolds, J.J., Meikle, M.C. (1978):** Neutral metallo-proteinases of rabbit bone. Separation in latent forms of distinct enzymes that when activated degrade collagen, gelatin and proteoglycans. *Biochem. J.* 171, 493-496

-
- Shapiro**, S.D., Griffin, G.L., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Welgus, H.G., Senior, R.M., Ley, T.J. (1992): Molecular cloning, chromosomal localization, and bacterial expression of a murine macrophage metalloelastase. *J. Biol. Chem.* 267, 4664-4671
- Sichel**, G., Corsaro, C., Scalia, M., Di Bilio, A.J., Bonomo, R.P. (1991): In vitro scavenger activity of some flavonoids and melanins against O₂⁻. *Free Radic. Biol. Med.* 11, 1-8
- Södermann**, P., Malchau, H., Herberts, P. (2001): Outcome of total hip replacement: a comparison of different measurement methods. *Clin. Orthop.* 390, 163-172
- Sorg**, O., Tran, C., Saurat, J.H. (2001): Cutaneous vitamins A and E in the context of ultra-violet- or chemically-induced oxidative stress. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 14, 363-372
- Stäb**, F., Wolber, R., Blatt, T., Keyhani, R., Sauermann, G. (2000): Topically applied antioxidants in skin protection. *Methods Enzymol.* 319, 465-478
- Stamenkovic**, I. (2000): Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin. Cancer Biol.* 10, 415-433
- Sternlicht**, M.D., Bergers, G. (2000): Matrix metalloproteinases as emerging targets in anti-cancer therapy: status and prospects. *Emerging Ther. Targets* 4, 609-633
- Sternlicht**, M.D., Werb, Z. (2001): How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 463-516
- Stetler-Stevenson**, W.G. (1990): Type IV collagenases in tumor invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 9, 289-303
- St.George**, J.A. (2003): Gene therapy progress and prospects: adenoviral vectors. *Gene Ther.* 10, 1135-1141
- Stolow**, M.A., Bauzon, D.D., Li, J., Sedgwick, T., Liang, V.C., Sang, Q.A., Shi, Y.B. (1996): Identification and characterization of a novel collagenase in *Xenopus laevis*: possible roles during frog development. *Mol. Biol. Cell.* 7, 1471-1483
- Tahara**, S., Katagiri, Y., Ingham, J.L., Mizutani, J. (1994): Prenylated flavonoids in the roots of yellow lupin. *Phytochemistry* 36, 1261-1271

-
- Takagi, M.** (1996): Neutral proteinases and their inhibitors in the loosening of total hip prostheses. *Acta Orthop. Scand. Suppl.* 271, 3-29
- Takei, I., Takagi, M., Santavirta, S., Ida, H., Hamasaki, M., Ishii, M., Fukushima, S., Ogino, T., Konttinen, Y.T.** (1999): Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in joint fluid of the patients with loose artificial hip joints. *J. Biomed. Mater. Res.* 45, 175-183
- Takino, T., Sato, H., Shinagawa, A., Seiki, M.** (1995): Identification of the second membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP-2) gene from a human placenta cDNA library. MT-MMPs form a unique membrane-type subclass in the MMP family. *J. Biol. Chem.* 270, 23013-23020
- Tamei, H., Azumano, I., Iwata, K., Yoshihara, Y., Lopez-Otin, C., Vizoso, F., Knäuper, V., Murphy, G.** (1998): One-step sandwich enzyme immunoassays for human matrix metalloproteinase 13 (collagenase-3) using monoclonal antibodies. *Connective Tissue* 30, 15-22
- Trojanowska, M., LeRoy, E.C., Eckes, B., Krieg, T.** (1998): Pathogenesis of fibrosis: type I collagen and the skin. *J. Mol. Med.* 76, 266-274
- Tschesche, H.** (1998): Bimolecular interaction of matrix metalloproteinases and their inhibitors TIMPs. *J. Protein Chem.* 17, 549-551
- Uchida, M., Shima, M., Shimoaka, T., Fujieda, A., Obara, K., Suzuki, H., Nagai, Y., Ikeda, T., Yamato, H., Kawaguchi, H.** (2000): Regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) by bone resorptive factors in osteoblastic cells. *J. Cell. Physiol.* 185, 207-214
- Van der Burg, M.E.** (2001): Advanced ovarian cancer. *Curr. Treat. Options Oncol.* 2, 109-118
- Van Wart, H.E., Birkedal-Hansen, H.** (1990): The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 5578-5582
- Varani, J., Spearman, D., Perone, P., Fligiel, S.E., Datta, S.C., Wang, Z.Q., Shao, Y., Kang, S., Fisher, G.J., Voorhees, J.J.** (2001): Inhibition of type I procollagen synthesis by damaged collagen in photoaged skin and by collagenase-degraded collagen in vitro. *Am. J. Pathol.* 158, 931-942

-
- Velasco, G., Pendas, A.M., Fueyo, A., Knäuper, V., Murphy, G., Lopez-Otin, C. (1999):** Cloning and characterization of human MMP-23, a new matrix metalloproteinase predominantly expressed in reproductive tissues and lacking conserved domains in other family members. *J. Biol. Chem.* 274, 4570-4576
- Verheijen, J.H., Nieuwenbroek, N.M., Beekman, B., Hanemaaijer, R., Verspaget, H.W., Ronday, H.K., Bakker, A.H. (1997):** Modified proenzymes as artificial substrates for proteolytic enzymes: colorimetric assay of bacterial collagenase and matrix metalloproteinase activity using modified pro-urokinase. *Biochem. J.* 323, 603-609
- Visse, R., Nagase, H. (2003):** Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ. Res.* 92, 827-839
- Watson, R.E.B., Griffiths, C.E.M., Craven, N.M., Shuttleworth, A., Kielty, C.M. (1999):** Fibrillin-rich microfibrils are reduced in photoaged skin. Distribution at the dermal-epidermal junction. *J. Invest. Dermatol.* 112, 782-787
- Wenk, J., Brenneisen, P., Wlaschek, M., Poswig, A., Briviba, K., Oberley, T.D., Scharffetter-Kochanek, K. (1999):** Stable overexpression of manganese superoxide dismutase in mitochondria identifies hydrogen peroxide as a major oxidant in the AP-1-mediated induction of matrix-degrading metalloproteinase-1. *J. Biol. Chem.* 274, 25869-25876
- Wernicke, D., Seyfert, C., Hinzmann, B., Gromnica-Ihle, E. (1996):** Cloning of collagenase-3 from the synovial membrane and its expression in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *J. Rheumatol.* 23, 590-595
- 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
- Wlaschek, M., Briviba, K., Stricklin, G.P., Sies, H., Scharffetter-Kochanek, K. (1995):** Singlet oxygen may mediate the ultraviolet A-induced synthesis of interstitial collagenase. *J. Invest. Dermatol.* 104, 194-198
- Wlaschek, M., Tancheva-Poór, I., Naderi, L., Ma, W., Schneider, L.A., Razi-Wolf, Z., Schüller, J., Scharffetter-Kochanek, K. (2001):** Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J. Photochem. Photobiol. B* 63, 41-51
- Woessner, J.F., Taplin, C.J. (1988):** Purification and properties of a small latent matrix metalloproteinase of the rat uterus. *J. Biol. Chem.* 263, 16918-16925

Woessner, J.F. (1999): Matrix metalloproteinase inhibition. From the Jurassic to the third millennium. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 878, 388-403

Woessner, J.F., Nagase, H. (2000): Matrix metalloproteinases and TIMPs. *Oxford University Press*, 72-86

Yang, M., Kurkinen, M. (1998): Cloning and characterization of a novel matrix metalloproteinase (MMP), CMMP, from chicken embryo fibroblasts. CMMP, Xenopus XMMP, and human MMP19 have a conserved unique cysteine in the catalytic domain. *J. Biol. Chem.* 273, 17893-17900

Yong, V.W., Krekoski, C.A., Forsyth, P.A., Bell, R., Edwards, D.R. (1998): Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. *Trends Neurosci.* 21, 75-80

Yoon, S., Kuivaniemi, H., Gatalica, Z., Olson, J.M., Buttice, G., Ye, S., Norris, B.A., Malcom, G.T., Strong, J.P., Tromp, G. (2002): MMP-13 promoter polymorphism is associated with atherosclerosis in the abdominal aorta of young black males. *Matrix Biol.* 21, 487-498

Zeimet, A.G., Marth, C. (2003): Why did p53 gene therapy fail in ovarian cancer? *Lancet Oncol.* 4, 415-422

Zou, K.H., Tuncali, K., Silverman, S.G. (2003): Correlation and simple linear regression. *Radiology* 227, 617-622

LITERATURLISTE

Teile der vorliegenden Arbeit sind in den folgenden Fachzeitschriften veröffentlicht bzw. anlässlich folgender Veranstaltungen präsentiert worden:

Publikationen

Hantke B., Lahmann C., Venzke K., Fischer T., Kocourek A., Windsor L.J., Bergemann J., Stüb F., Tschesche H. (2002): Influence of flavonoids and vitamins on the MMP- and TIMP-expression of human dermal fibroblasts after UVA irradiation. *Photochem. Photobiol. Sci. 1* (10), 826-833

Hantke B., Harbeck N., Schmalfeldt B., Claes I., Hiller O., Luther M.O., Welk A., Kuhn W., Schmitt M., Tschesche H., Mühlenweg B. (2003): Clinical relevance of matrix metalloproteinase-13 determined with a new highly specific and sensitive ELISA in ascitic fluid of advanced ovarian carcinoma patients. *Biol. Chem. 384* (8), 1247-1251

Diehl P., Hantke B., Hennig M., Tschesche H., Mittelmeier W., Schmitt M., Mühlenweg B. (2003): Protein expression of MMP-13, uPA, and PAI-1 in pseudocapsular and interface tissue around implants of loose artificial hip joints and in osteoarthritis. *Int. J. Mol. Med.* (eingereicht)

Vorträge

Hantke B., Bergmann U., Tschesche H. (1999): "Expression and purification of MMP-2 and TIMP-2 for crystallization experiments" 17th Winter school on proteinases and their inhibitors: recent developments, Tiers, Italien

Hantke B., Tschesche H. (2000): "Collagenase (MMP-1 and MMP-13) expression in human skin fibroblasts after UVA irradiation" 18th Winter school on proteinases and their inhibitors: recent developments, Tiers, Italien

Posterbeiträge

Hantke B., Guthaus E., Harbeck N., Schmalfeldt B., Schmitt M., Tschesche H., Mühlenweg B. (2001): "Isolation of native collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) from ascites of ovarian carcinoma patients and determination of MMP-13 utilizing a newly developed ELISA." DFG-Workshop: *Matrix-Metalloproteinasen: Struktur, Funktion und physiologische Bedeutung*, Bielefeld

LEBENS LAUF

Name: Bernd Hantke

Adresse: An der Jüpke 17
33803 Steinhagen

Geburtsdatum: 21. Mai 1970

Geburtsort: Bielefeld

Familienstand: verheiratet

Schulbildung: Aug. 1976 - Juni 1980 Osningschule Bielefeld (Grundschule)
Aug. 1980 - Mai 1989 **Ratsgymnasium Bielefeld**

Wehrdienst: **Juni 1989 - Mai 1991** **3./Pionierbataillon 110 in Minden**
Juni 1992 Beförderung zum Leutnant d.R.

Studium: **Okt. 1991 - Sept. 1993** **Universität Mainz**
September 1993 Diplom-Vorprüfung in Chemie

Okt. 1993 - Aug. 1998 **Universität Bielefeld**
November 1997 Diplomprüfungen in Chemie
August 1998 Abgabe der Diplomarbeit

Auslandsaufenthalte:
Febr. 1995 - Mai 1995 Universität Burgos, Spanien
Okt. 1995 - Jan. 1996 Universität Oslo, Norwegen
Dez. 1997 - Aug. 1998 Diplomarbeit am **Karolinska Institut**
(Prof. Tryggvason), Stockholm, Schweden

Promotion: **Sept. 1998 - Juni 2002** Arbeitsgruppe von **Prof. Tschesche**
voraussichtlich Feb. 2004 (Biochemie I, Universität Bielefeld)
Promotionsprüfung

Berufstätigkeit: Aug./Sept. 1994 - 1996 Chemiefacharbeiter (**BASF AG**,
Ludwigshafen)
seit Juli 2002 Controlling Wirkstoffe (**Aventis Pharma**
Deutschland GmbH, Frankfurt a.M.)

Steinhagen, 20.12.2003