

Darstellung und Charakterisierung der katalytischen Domäne der humanen Makrophagenelastase

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
an der Universität Bielefeld

vorgelegt von
Andreas Kocourek
aus Eutin

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

*Für meine Familie,
die mich immer liebevoll unterstützt hat.*

Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. H. Tschesche für die freundliche Überlassung des interessanten Themas, der Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der finanziellen Mittel sowie sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. K. Kleesiek vom Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen in Bad Oeynhausen für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Rahmen der immunhistologischen Untersuchungen sowie für die freundliche Übernahme des Korreferats danken.

Herrn Dr. H. Wenzel und Herrn R. Beckmann danke ich für ihre ständige Hilfsbereitschaft bei wissenschaftlichen und technischen Fragestellungen.

Weiterhin danke ich den Blockpraktikanten Timo und Nils für ihre engagierte Mitarbeit. Ferner gilt mein Dank Sabine, Katharina, Kerstin und Marc-Oliver für die Durchführung der Proteinsequenzierungen sowie Marc-Oliver für MALDI-TOF-MS Messungen. Für weitere Unterstützung von Claudia, Markus und Natalie möchte ich mich bedanken.

Herrn Prof. Dr. J. Wienands und seinen MitarbeiterInnen danke ich für die gute Zusammenarbeit insbesondere bei Fragen zur Zellkulturtechnik, bei denen Frau Dr. Petra Budde ebenfalls eine große Hilfe war.

Außerdem möchte ich mich bei Rupert (MPI für Biochemie, Martinsried) für die gute Zusammenarbeit in Bezug auf die Aufklärung der Kristallstruktur bedanken.

Für die Bereitstellung von Gewebeproben, Liquor und Blutplasma gilt mein Dank: Herrn Dr. med. K. Dumke (Pathologie, Bethel), Herrn Prof. Dr. med. R. Lahl (Neuropathologie, Bethel) und Herrn Dr. C. Sunderkötter (Hautklinik, Münster). In diesem Zusammenhang möchte ich mich bei Sylvia bedanken, die mir u.a. einige Wege nach Bethel erspart hat.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. J.-W. Bartsch und seinen MitarbeiterInnen für die gute Kooperation in Bezug auf die Untersuchungen an Mäusen.

Der ehemaligen und der jetzigen „guten Seele“ der Arbeitsgruppe Frau M. Müller und Frau A. Schmidt gilt ganz besonderer Dank.

Dem gesamten Arbeitskreis danke ich für kollegiale Zusammenarbeit und für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Hierbei möchte ich besonders Bernd, Martin, Martina, Olli und Rodi für das Lesen des Manuskripts danken. Weiterhin werden mich die Erinnerungen an das Labor F4-270 mit dem Brummisklaven, Firefighter und Zivi noch lange begleiten.

Mein besonderer Dank gilt außerdem meinen Eltern und Großeltern, ohne deren Hilfe mein Studium nicht möglich gewesen wäre. Weiterhin danke ich Katja für die ständige Aufheiterung und das mir entgegengebrachte Verständnis.

Inhaltsverzeichnis

1 Abkürzungsverzeichnis	1
2 Zusammenfassung	2
3 Einleitung	5
3.1 Die Matrix Metalloproteinasen	5
3.2 Die humane Makrophagenelastase (HME, MMP-12)	15
4 Material und Methoden	24
4.1 Molekularbiologische Methoden	24
4.2 Proteinbiochemische Methoden	29
4.3 Immunhistochemische Untersuchungen	37
4.4 Bakterienstämme und Vektoren	39
5 Ergebnisse	42
5.1 Klonierungen	43
5.2 Expression und Reinigung der rekombinanten Proteine	46
5.3 Aktivitätsuntersuchungen	48
5.3.1 Inhibierung der Met ⁹⁹ - und Phe ¹⁰⁰ -KaDo der MMP-12 durch TIMPs	51
5.4 Substratspaltungen	53
5.4.1 Spaltung von Faktoren der Blutgerinnungskaskade	53
5.4.2 Spaltung von weiteren potentiellen Substraten	58
5.5 Entwicklung eines ELISAs für die MMP-12	60
5.6 Immunhistochemische Untersuchungen	66
5.7 Bestimmung der Kristallstruktur der MMP-12	73
6 Diskussion und Ausblick	80
6.1 Klonierungen	80
6.2 Expression und Reinigung	81
6.3 Aktivitätsuntersuchungen	82
6.3.1 Inhibierung	83
6.4 Substratspaltungen	84
6.4.1 Spaltung von Faktoren der Blutgerinnungskaskade	85
6.4.2 Spaltung von weiteren potentiellen Substraten	88
6.5 Entwicklung eines ELISAs für die Makrophagenelastase	89
6.6 Immunhistochemische Untersuchungen	91
6.7 Bestimmung der Kristallstruktur der MMP-12	93
7 Literatur	97
8 Lebenslauf	108

1 Abkürzungsverzeichnis

ADAM	<i>a disintegrin and a metalloproteinase</i>
Ala ²¹⁹ -KaDo	katalytische Domäne der MMP-12 mit Glu219Ala
Amp	Ampicillin (α -D-Aminobenzylpenicillin)
AP-1	<i>activator protein 1</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
Dpa	3-(2,4-Dinitrophenyl)-L-2,3-diaminopropionyl
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (Na-Salz)
FCS	<i>fetal calf serum</i>
HME	humane Makrophagenelastase
IPTG	1-Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid
KaDo	katalytische Domäne der MMP-12
Kan	Kanamycin
Mca	(7-Methoxycoumarin-4-yl)-acetyl
Mca-Peptid	Mca-P-L-G-L-Dpa-A- R-NH ₂
Met ⁹⁹ -KaDo	katalytische Domäne der MMP-12 mit N-terminalem Methionin
MMP	Matrix Metalloproteinase
MT-MMP	membranständige Matrix Metalloproteinase
p. A.	<i>pro analysis</i>
PAA	Polyacrylamid
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
Phe ¹⁰⁰ -KaDo	katalytische Domäne der MMP-12 mit N-terminalem Phenylalanin
ProKaDo	katalytische Domäne der MMP-12 mit Propeptid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rpm	<i>rounds per minute</i>
t-PA	<i>tissue-type-Plasminogenaktivator</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u-PA	Urokinase-Plasminogenaktivator
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoyl- β -D-galactopyranosid

2 Zusammenfassung

Die Matrix Metalloproteinasen (Matrixine, MMPs) spielen sowohl bei physiologischen als auch bei pathologischen Umstrukturierungen der extrazellulären Matrix eine wichtige Rolle. Ein Vertreter dieser Gruppe, die Makrophagenelastase (MMP-12), wird für den verstärkten Abbau des Elastin-reichen Alveolargewebes beim Lungenemphysem verantwortlich gemacht. Zudem wird die Beteiligung dieser Proteinase an arteriosklerotischen Veränderungen der Blutgefäßwände und an antiangiogenetischen Prozessen beim Tumorwachstum vermutet. Mit dem Ziel einer eingehenden Charakterisierung, wurde die humane Makrophagenelastase rekombinant hergestellt. Damit konnten umfassende Untersuchungen der Aktivität, die Entwicklung eines *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISAs) und die Kristallisierung zur Bestimmung der dreidimensionalen Struktur erfolgreich durchgeführt werden.

Die rekombinante Darstellung der katalytischen Domäne (KaDo) der humanen Makrophagenelastase mit und ohne Propeptid erfolgte ausgehend von der mRNA aus Chondrozytensarkomzellen und Plazentagewebe. Nach erfolgreicher Reverser Transkription und Polymerase-Kettenreaktion wurde die jeweilige cDNA kloniert und die rekombinanten Proteine in *Escherichia coli* exprimiert. Dieses wurde durch Sequenzierung der cDNA, durch N-terminale Aminosäuresequenzierung sowie durch Detektion im Western-Blot bestätigt. Bei der Faltung der katalytischen Domäne mit Propeptid wurde die autokatalytische Abspaltung der Prodomäne beobachtet. Nach effizienter Reinigung an einer Affinitätsmatrix konnten somit zwei Varianten der KaDo der MMP-12 homogen isoliert werden: Die ohne Propeptid klonierte KaDo wurde mit einem N-terminalen Methioninrest (Met⁹⁹-KaDo) erhalten. Im Gegensatz dazu wies die aus der ProKaDo generierte katalytische Domäne die Wildtyp-Form (Phe¹⁰⁰-KaDo) auf.

Zymogramme mit Gelatin und Casein belegten eindeutig die enzymatische Aktivität beider Varianten. Nach Spaltung eines synthetischen Mca-Peptids konnte mit Hilfe von MALDI-TOF-MS Messungen eine unterschiedliche Spezifität der KaDo der MMP-12 im Vergleich mit anderen MMPs festgestellt werden. Zusätzlich wurden kinetische Parameter für beide Varianten bestimmt. Für die Phe¹⁰⁰-KaDo konnte eine ca. 10-fach höhere Aktivität verglichen mit der Met⁹⁹-KaDo nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis bestätigt die bereits für andere MMPs bekannte sogenannte „Superaktivierung“. Dabei ist der N-Terminus der superaktivierten Form durch Ausbildung einer ionischen Wechselwirkung im Gegensatz zum frei beweglichen N-Terminus der Met⁹⁹-KaDo fixiert. Dieser strukturelle Unterschied beeinflusste

auch die Inhibierung durch die *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs). Da bei der Komplexbildung mit den TIMPs der fixierte N-Terminus gelöst wird, sind die Hemmkonstanten für die Phe¹⁰⁰-KaDo durch TIMP-1 und TIMP-2 höher als die entsprechenden Werte der Met⁹⁹-Variante. Die Inhibierung beider Formen mit TIMP-4 zeigte keinen signifikanten Unterschied. Für die oben genannten TIMPs wurden in dieser Arbeit erstmals die Hemmkonstanten bestimmt. Bislang wurde die inhibitorische Wirkung von TIMP-1 nur qualitativ beschrieben. Die K_i -Werte lagen in Übereinstimmung mit Werten für die katalytische Domänen anderer MMPs im nanomolaren Bereich, wobei sich TIMP-4 als bester Inhibitor erwies.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit waren *in vitro* Untersuchungen der Spaltung potentieller Substrate der humanen Makrophagenelastase. Zunächst wurden das *myelin basic protein* (MBP) und der Neurotransmitter Substanz P bezüglich der Spaltung durch MMP-12 untersucht. Beide Substrate wurden *in vitro* degradiert und es konnten bislang unbekannte Spaltstellen identifiziert werden. Weiterhin konnte die Degradierung von Faktor XII (Hagemann Faktor), Prothrombin und Fibrinogen gezeigt werden. Dabei wurden mehrere für MMPs bislang unbekannte Spaltstellen durch N-terminale Sequenzierung der Fragmente identifiziert. Anschließende Untersuchungen zur Aktivität der Fragmente des Faktors XII waren negativ. Prothrombin wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal als Substrat einer Matrix Metalloproteinase untersucht. Die durch die MMP-12 generierten Fragmente zeigten proteolytische Aktivität gegenüber einem spezifischen Substrat für Thrombin. Die Identifizierung des dafür verantwortlichen Spaltprodukts des Prothrombins steht noch aus. Mit Hilfe eines Koagulationstests konnte die funktionelle Fibrinogenmenge nach Inkubation mit der Makrophagenelastase bestimmt werden. Diese Menge war bereits nach 15 Minuten auf ca. 50 % reduziert. Diese Untersuchungen weisen auf einen Einfluss der humanen Makrophagenelastase auf die Blutgerinnungskaskade hin.

Für den Aufbau eines ELISAs wurden polyklonale Kaninchen-Antikörper gegen die katalytische Domäne der MMP-12 gewonnen. Nach Reinigung der Antikörper an Protein A-Sepharose konnten spezifische anti-KaDo-MMP-12 IgGs durch Immunoaffinitätschromatographie isoliert werden. Mit Hilfe dieser Antikörper wurde im Folgenden erfolgreich ein kompetitiver ELISA aufgebaut. Der Messbereich liegt bei 5-100 ng/mL, was einer guten Sensitivität entspricht. Somit könnte die Konzentration der MMP-12 zum Beispiel im Tumorgewebe bestimmt werden, um sie zum einen mit der Angiostatin-Konzentration und zum anderen mit dem Angiogenese-Stadium zu korrelieren.

Weiterhin wurden die Antikörper für immunhistochemische Untersuchungen eingesetzt. Dabei konnte die MMP-12 in Hautgeweben mit den Erkrankungen Ekzem, Lupus erythematosus und Dermatitis herpetiformis im Bereich des Stratum granulosum detektiert werden. Ein Zusammenhang der MMP-12-Expression mit diesen pathologischen Veränderungen konnte bislang nicht nachgewiesen werden. Bei Hautgewebe mit dem Befund Lepra lepromatosa zeigte sich eine intensive Anfärbung der MMP-12 innerhalb infiltrierter Makrophagen. Da diese Form der Lepra mit einer massiven Infiltration von Bakterien einhergeht, kann durch die verstärkte Expression der MMP-12 eine potentielle Beteiligung bei Abwehrprozessen angenommen werden.

Weitere interessante Ergebnisse ergaben immunhistochemische Färbungen an Rückenmarksgewebe von *wobbler* Mäusen im Vergleich zu gesunden Tieren. *Wobbler* Mutanten sind durch eine Neuronendegeneration gekennzeichnet. In den betroffenen Bereichen konnte die Expression der MMP-12 in Mikrogliazellen gezeigt werden, was die Beteiligung dieser Proteinase an Abbauprozessen in der Umgebung der degenerierten Neuronen nahe legt. Zusätzlich könnte dabei die Fähigkeit der MMP-12 das *myelin basic protein* zu degradieren eine Rolle spielen.

Zur Aufklärung der molekularen Struktur sollte die KaDo der MMP-12 in hoher Konzentration dargestellt werden. Aufgrund von Stabilitätsproblemen der aktiven Varianten bei hohen Konzentrationen wurde zusätzlich durch Mutagenese-PCR die für eine inaktive Variante kodierende cDNA amplifiziert. Die Inaktivierung wurde durch eine Punktmutation, bei der Glutamat 219 durch Alanin im katalytischen Zentrum ersetzt wurde, erreicht. Diese inaktive Form der KaDo konnte erfolgreich konzentriert werden. Im Komplex mit Batimastat bildeten sich Kristalle, die mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse vermessen und nach Auswertung der Daten in ein Atommodell mit dreidimensionaler Struktur umgesetzt wurden. Diese stellt mit einer Auflösung von 1,09 Ångström die höchste erzielte Auflösung aller bislang publizierten MMP-Strukturen dar. In einem Vergleich mit Strukturen anderer MMPs konnten Unterschiede identifiziert werden, die eine Bedeutung der MMP-12 für die äußerst effiziente Elastinspaltung vermuten lassen. Weiterhin eröffnet diese Struktur die Möglichkeit zu Entwicklung selektiver und spezifischer Inhibitoren, welche zu Behandlung z.B. des Lungenemphysems eingesetzt werden könnten.

Die im Rahmen dieser Arbeit erlangten Kenntnisse über Aktivität, Vorkommen und Kristallstruktur der humanen Makrophagenelastase leisten somit einen entscheidenden Beitrag zur Charakterisierung dieser Matrix Metalloproteinase. Diese *in vitro* Ergebnisse können als Grundlage für weiterführende *in vivo* Untersuchungen dienen.

3 Einleitung

Höhere Organismen bestehen aus einer Vielzahl verschiedener, zum Teil hoch spezialisierter Zellen. Diese Zellen sind in Gewebeverbänden organisiert, wobei ein erheblicher Teil des Gewebevolumentums vom Extrazellulärraum eingenommen wird. Dieser wird von einem komplexen Makromolekülgeflecht, der extrazellulären Matrix (ECM), ausgefüllt. Die Zusammensetzung dieser strukturell vielfältigen Matrix variiert je nach Herkunft und biologischer Funktion des Gewebes. Dieses wird an den unterschiedlichen Gewebeformen, wie sie z.B. im Knochen, Knorpel oder Blutgefäßen vorkommen, deutlich. Insgesamt finden sich in der extrazellulären Matrix weit über 100 verschiedene Makromolekültypen, die diese große funktionelle Vielfalt ermöglichen [Woessner, 1998; Ayad et al., 1998].

Bei vielen physiologischen Prozessen unterliegt die ECM einer Umstrukturierung, wie z.B. bei der Wundheilung, der Angiogenese und der Embryogenese [Crawford & Matrisian, 1995; Gustafsson & Fässler, 2000]. Neben diesen wichtigen Ereignissen existieren viele pathologische Vorgänge, die durch eine Schädigung der ECM gekennzeichnet sind. Hierzu zählen die rheumatoide Arthritis [Birkedal-Hansen et al., 1993; Cawston, 1996], die Tumordinvasion bzw. Metastasierung [Liotta et al., 1991; Stetler-Stevenson et al., 1993] und die Zerstörung des Lungengewebes bei dem Krankheitsbild des Lungenemphysems [Shapiro, 1994].

3.1 Die Matrix Metalloproteinasen

Die meisten Proteine der extrazellulären Matrix werden von den Matrix Metalloproteinasen (Matrixine, MMPs) hydrolysiert. Diese Gruppe von funktionell und strukturell verwandten Proteinasen vermittelt die wichtigsten Prozesse, die zur Remodellierung der ECM führen [Birkedal-Hansen et al., 1993]. Gross und Lapière zeigten 1962 erstmals die kollagenolytische Eigenschaft eines Enzyms in verschiedenen Geweben der Kaulquappe [Gross & Lapière, 1962]. Die komplette Reinigung der humanen MMP-1 wurde 1970 beschrieben und die zugehörige cDNA-Sequenz konnte 16 Jahre später aufgeklärt werden [Bauer et al., 1970; Goldberg et al., 1986]. Bis heute sind 21 humane Mitglieder der MMP-Familie identifiziert und charakterisiert worden [Ravanti & Kähäri, 2000; Marchenko et al., 2001].

Alle MMPs enthalten das konservierte Zinkbindungsmotiv **HExxHxxGxxHZ** im aktiven Zentrum. Ihm folgt der sogenannte „Met-turn“, weshalb sie in die Überfamilie der Metzinkine

eingordnet werden. Die einzelnen Vertreter dieser Familie unterscheiden sich durch die mit Z bezeichnete Aminosäure im Zinkbindungsmotiv [Bode et al., 1996].

Neben den Matrixinen sind in den letzten Jahren weitere Metalloproteinasen entdeckt worden. Zu ihnen gehören unter anderem die ADAMs (A Disintegrine and A Metalloproteinase) mit einer zusätzlichen Disintegrin-Domäne [Wolfsberg et al., 1995] sowie die ADAMTS-Proteine, die Thrombospondin-Motive enthalten [Tang, 2001].

Domänenstruktur der Matrix Metalloproteinasen

Alle MMPs enthalten mehrere funktionell homologe Domänen. Diese sind in der folgenden Abbildung (Abb. 1) für einige charakteristische Vertreter dargestellt.

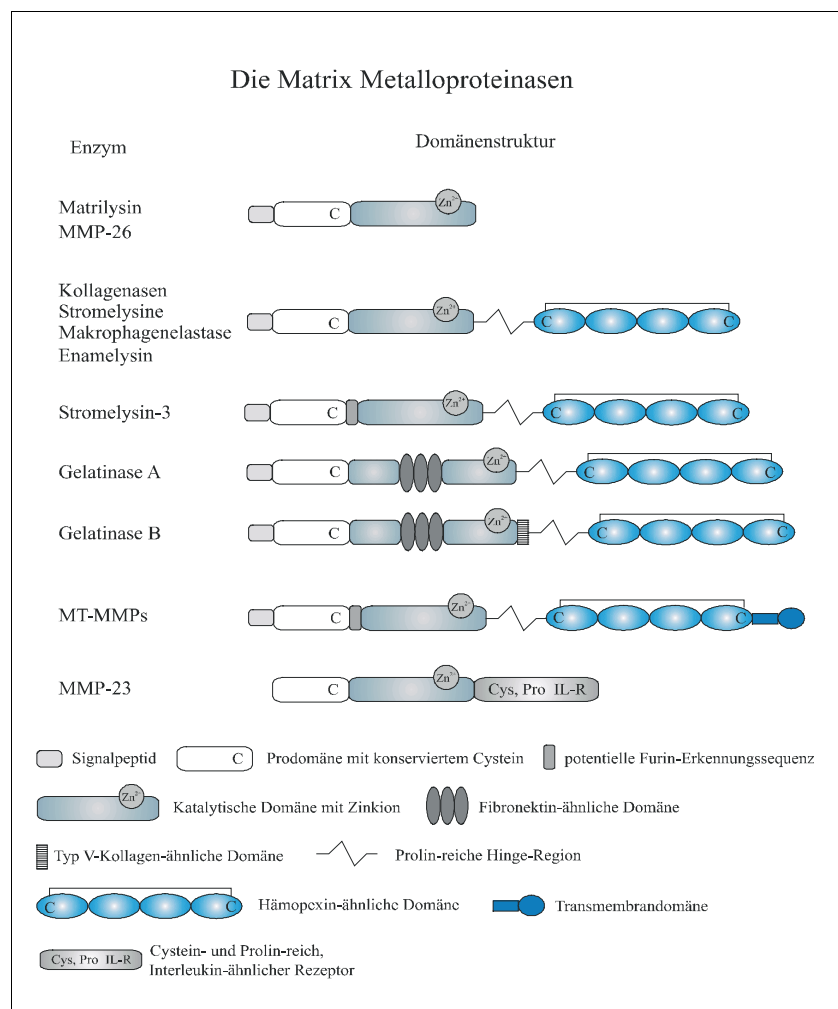


Abb. 1: Domänenstruktur der Matrix Metalloproteinasen.

Aus der Abbildung wird deutlich, dass MMP-23 ohne Signalpeptid und mit einzigartigem C-Terminus eine Ausnahme darstellt. Die Minimalstruktur der MMPs wird von Matrilysin und MMP-26 repräsentiert [De Coignac et al., 2000]. Dabei dient das hydrophobe

Signalpeptid (ca. 17 bis 20 AS) zur Zielsteuerung der Proenzyme und wird während ihres Transportes abgespalten [McDonnell & Fingleton, 1993].

Mit Ausnahme von MMP-23 besitzen alle MMPs die hochkonservierte PRCG(V/N)PD Sequenz innerhalb der Prodomäne (ca. 80 AS). Das auch bei MMP-23 vorhandene Cystein erhält durch Wechselwirkung mit dem Zinkion des katalytischen Zentrums die Latenz der Enzyme aufrecht [Docherty et al., 1992]. Bei der Umwandlung des Zymogens zum aktiven Enzym wird diese Domäne abgespalten.

Die ca. 170 Aminosäuren umfassende katalytische Domäne enthält das hochkonservierte Motiv **HExxHxxGxxH** mit drei Histidinresten für die Bindung des Zinkions. Der konservierte Glutamatrest wird neben dem Zinkion für die „Aktivierung“ des Wassermoleküls verantwortlich gemacht [Spurlino et al., 1994; Stöcker et al., 1995]. Weiterhin sind vor und hinter dem Zinkbindungsmotiv konservierte Bereiche für die strukturunterstützende Bindung von Calcium- bzw. Zinkionen lokalisiert [Birkedal-Hansen et al., 1993]. Dies ist beispielhaft in der folgenden Abbildung (Abb. 2) gezeigt.

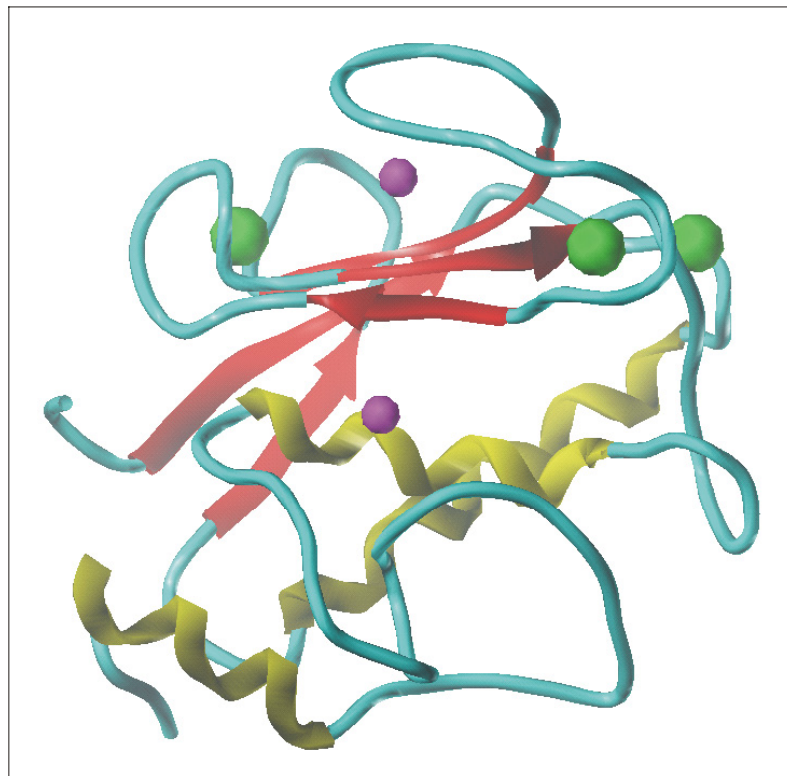


Abb. 2: Ribbondarstellung der katalytischen Domäne der MMP-8.

Die Calcium- bzw. Zinkionen sind als grüne bzw. magentafarbene Kugeln dargestellt.

Eine sehr flexible Prolin-reiche Hinge-Region (2 bis 72 AS), verbindet die katalytische Domäne mit der Hämopexin-ähnlichen Domäne [Woessner & Nagase, 2000].

Diese besitzt eine große Homologie zu Vertretern der Hämopexin-Familie wie dem Hämopexin selbst, dem Vitronektin und dem Plazenta Protein II. Die „vierblättrige Propeller“

Struktur besteht aus vier sich wiederholenden Einheiten (je ca. 50 AS). Stabilisiert wird diese Anordnung durch eine Disulfidbindung zwischen der ersten und letzten Einheit. Die Hämopexin-ähnliche Domäne wird für die Substratspezifität der Kollagenasen verantwortlich gemacht. ProMMP-2 kann über diese Domäne zur Aktivierung an den MT1-MMP/TIMP-2 Komplex gebunden werden und sie ist eine zusätzliche Bindungsdomäne für die natürlichen MMP-Inhibitoren (TIMPs) [Lichte et al., 1996; Murphy & Knäuper, 1997]. Ausnahmen bilden Matrilysin und MMP-26, die kleinsten Vertreter der MMPs, denen die Hinge-Region und die Hämopexin-ähnliche Domäne fehlen. Bei MMP-23 ist dieser Abschnitt durch einen Cystein- und Prolin-reichen Bereich und einen Interleukin-Rezeptor ersetzt.

Die MT-MMPs, Stromelysin-3 und MMP-23 enthalten zwischen der Prodomäne und der folgenden katalytischen Domäne eine Sequenz von basischen Aminosäuren mit dem Motiv RR(K/R)R [Ravanti & Kähäri, 2000]. Dieses Motiv wird von Mitgliedern der Proprotein-konvertase-Familie, z.B. Furin, erkannt. Furin ist zum einen in der Membran von Vesikeln des Golgi-Apparates lokalisiert. Dies führt möglicherweise zu einer intrazellulären Aktivierung dieser MMPs. Zum anderen liegt Furin extrazellulär in einer löslichen Form vor, so dass die Aktivierung auch dort erfolgen könnte [Pei & Weiss, 1995 und 1996]. Die physiologische Relevanz dieses Aktivierungsweges ist jedoch noch umstritten [Murphy & Knäuper, 1997].

Die Gelatinasen besitzen in der katalytischen Domäne eine Sequenz von 58 Aminosäuren, die sich dreimal wiederholt und dem Fibronectin Typ II-Modul ähnelt. Dieser Bereich der MMP-2 und MMP-9 ist für die Bindung an Gelatin sowie Elastin essentiell [Murphy & Knäuper, 1997]. Ein weiterer Abschnitt zwischen der katalytischen und nachfolgenden Hämopexin-ähnlichen Domäne der Gelatinase B weist Ähnlichkeiten mit der α_2 -Kette des Typ V Kollagens auf [Matrisian, 1990].

Die MT1-, MT2-, MT3- und MT5-MMP zeichnen sich durch eine Transmembrandomäne und einen cytoplasmatischen Teil aus [Sato & Seiki, 1996; Ravanti & Kähäri, 2000]. Im Gegensatz dazu sind die MT4- und MT6-MMP durch einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) mit der Zellmembran verbunden [Puente et al., 1996; English et al., 2001].

Die einzelnen Mitglieder der Familie der MMPs werden nach ihrer Substratspezifität und Struktur in verschiedene Klassen eingeteilt: die Kollagenasen, die Gelatinasen, die Stromelysine, die membranständigen MMPs (MT-MMPs) und andere MMPs. In der folgenden Tabelle (Tab. 1) sind die bislang bekannten humanen Matrixine zusammengefasst.

Tab. 1: Humane Matrix Metalloproteinasen.

Die angegebenen Molekulargewichte beziehen sich auf die von der cDNA abgeleiteten Proteinsequenz.

Bezeichnung	MMP	weitere Bezeichnung	M _r (kDa) latent / aktiv	Chromosomale Lokalisierung
Kollagenasen				
Kollagenase 1	1	Fibroblasten-Kollagenase, Interstitielle Kollagenase	52 / 42	11q22.2-22.3
Kollagenase 2	8	Neutrophile Kollagenase, PMNL-Kollagenase	85 / 64	11q22.2-22.3
Kollagenase 3	13		52 / 42	11q22.2-22.3
Gelatinasen				
Gelatinase A	2	72 kDa Gelatinase	72 / 66	16q13
Gelatinase B	9	92 kDa Gelatinase	92 / 84	20q12-13
Stromelysine				
Stromelysin-1	3	Transin-1	57 / 45	11q22.2-22.3
Stromelysin-2	10	Transin-2	54 / 44	11q22.2-22.3
Membranständige				
MT1-MMP	14		66 / 54	14q12.2
MT2-MMP	15		72 / 60	16q12.2
MT3-MMP	16		64 / 53	8q21
MT4-MMP	17		57 / 53	12q24
MT5-MMP	24		73 / ?	20q11.2
MT6-MMP	25	Leukolysin	63 / ?	16p13.3
Andere				
Matrilysin	7		28 / 19	11q22.2-22.3
Stromelysin-3	11		64 / 46	22q11.2
Makrophagenelastase	12	Metalloelastase	54 / 22	11q22.2-22.3
RASI	19		57 / 46	12q14
Enamelysin	20		54 / 22	11q22
MMP-23	23		44 / ?	1p36
Endometase	26		28 / 19	?
Epilysin	28	MMP-27	56 / 34	17q11.2

nach [Woessner, 1998; Ravanti & Kähäri, 2000; Sternlicht & Werb, 2001]

Vorkommen und Substrate der Matrix Metalloproteinasen

Die meisten MMPs erkennen und spalten *in vitro* eine Vielzahl von Substraten [Chandler et al., 1997; Ravanti & Kähäri, 2000]. Bis jetzt liegen jedoch nur sehr wenige Untersuchungen vor, die belegen, dass ein bestimmtes Substrat *in vivo* wirklich von der jeweiligen MMP gespalten wird [Woessner, 1998]. Trotzdem existieren viele indirekte Hinweise für eine physiologische bzw. pathologische Bedeutung der einzelnen Matrixine und ihrer potentiellen Substrate in diesem Zusammenhang. Im Folgenden wird exemplarisch auf die jeweilige Gruppe eingegangen.

Kollagenasen

Die Kollagenase 1 wird hauptsächlich von Fibroblasten und Makrophagen sezerniert, während die Neutrophile Kollagenase unter anderem von Leukozyten synthetisiert wird [Birkedal-Hansen et al., 1993]. Die MMP-13 wird von Chondrozyten, Monozyten und verschiedenen invasiven malignen Tumorzellen exprimiert [Freije et al., 1994; Ravanti & Kähäri, 2000]. Diese drei Kollagenasen spalten die α -Ketten des tripelhelikalen fibrillären Kollagens (Typ I, II und III) des Bindegewebes in charakteristische $\frac{3}{4}$ - und $\frac{1}{4}$ -Fragmente. Obwohl sie ähnliche kollagenolytische Eigenschaften besitzen, existieren Unterschiede zwischen den Kollagenasen in ihrer Aktivität gegenüber den einzelnen Kollagen-Typen [Chandler et al., 1997; Kähäri & Saarialho-Kere, 1997]. Für die Spezifität der Kollagenasen ist die Hämapexin-ähnliche Domäne essentiell [Knäuper et al., 1996].

Gelatinasen

Die Gelatinase A wird von vielen Bindegewebszellen sezerniert, die Gelatinase B von Leukozyten und Makrophagen. Beide Proteinase werden von Tumorzellen exprimiert. Aufgrund ihrer Fähigkeit, das Kollagen IV der Basalmembran zu degradieren, werden die Gelatinasen mit der Invasion und Metastasierung dieser malignen Zellen in Verbindung gebracht [Cawston, 1996]. Weiterhin wird angenommen, dass diese Matrixine eine zentrale Rolle beim Umbau der ECM einnehmen [Kähäri & Saarialho-Kere, 1997; Yu et al., 1998].

Stromelysine

Die einander sehr homologen Stromelysine-1 und -2 werden von Fibroblasten und Keratinozyten synthetisiert und spalten eine große Anzahl von Substraten der ECM [Kähäri & Saarialho-Kere, 1997]. Das Katalysoptimum von Stromelysin-1 liegt im sauren pH-Bereich. Es wird eine Aktivierung durch den niedrigen pH-Wert vermutet [Wilhelm et al., 1993].

MT-MMPs

Alle sechs MT-MMPs konnten auf Tumorzellen nachgewiesen werden, weshalb eine Beteiligung dieser Subfamilie am Tumorgeschehen diskutiert wird [Ravanti & Kähäri, 2000]. Weiterhin sind die MT-MMPs in der Lage, ProMMP-2 zu aktivieren. In MT1-MMP *knockout* Mäusen wurde eine verringerte Aktivierung der ProMMP-2 gefunden, so dass dieser Aktivierung eine physiologische Relevanz *in vivo* zugeschrieben wird [Zhou et al., 2000].

Andere MMPs

Matrilysin wird von Monozyten und Tumorzellen sezerniert und besitzt *in vitro* eine breite Substratspezifität [Cawston, 1996].

Stromelysin-3 wird in Brustkrebs-umgebenden Stromazellen und invasiven Tumorzellen exprimiert und weist eine geringere Homologie zu den anderen Stromelysinen auf [Basset et al., 1997]. Bis heute konnte die Spaltung von α 1-Proteinase Inhibitor (α 1-PI), jedoch keine Aktivität gegen Komponenten der ECM nachgewiesen werden [Stamenkovic, 2000].

MMP-19 wird unter anderem von glatten Muskelzellen der Plazenta und Fibroblasten der Lunge exprimiert. Ein potentielles Substrat ist Gelatin [Ravanti & Kähäri, 2000].

Enamelysin wird nur von epithelialen Adamantoblasten sezerniert und spaltet Amelogenin, die Hauptproteinkomponente des Zahnschmelzes [Bartlett et al., 1996; Llano et al., 1997].

Die mRNA der MMP-23 wurde in erhöhter Konzentration in Ovarien, Testis und Prostata nachgewiesen, weshalb eine Rolle bei der Reproduktion vermutet wird. Bislang konnte nur die Spaltung von synthetischen MMP-Substraten gezeigt werden [Velasco et al., 1999].

Endometase (MMP-26) wird im Uterus- und Plazentagewebe exprimiert und zeigt gelatinolytische Eigenschaften [De Coignac et al., 2000; Park et al., 2000].

Die cDNA der MMP-28 konnte z.B. im Lungen-, Gehirn-, Skelettmuskel-, Nieren-, und in verschiedenen Tumorgewebe detektiert werden [Marchenko & Strongin, 2001]. Mit Hilfe von immunhistologischen Untersuchungen wurde die Expression von Epilysin in Keratinozyten der Haut gezeigt. Proteolytische Aktivität der rekombinant dargestellten MMP-28 konnte bislang nur gegenüber Casein nachgewiesen werden [Lohi et al., 2001].

Auf die Makrophagenelastase wird im Abschnitt 3.2 ausführlich eingegangen.

Regulation der Aktivität der Matrixine

Die Aktivität der MMPs wird hauptsächlich auf der Ebene der Transkription, der Zymogen-Aktivierung und der Inhibierung reguliert [Stamenkovic, 2000].

Die Transkription der Matrix Metalloproteinasen wird unter anderem durch Cytokine, Wachstumsfaktoren oder Hormone reguliert. Der Einfluss dieser Faktoren auf die Transkription ist abhängig vom Zelltyp und der jeweiligen Matrix Metalloproteinase [Birkedal-Hansen et al., 1993; Ries & Petrides, 1995; Benbow & Brinckerhoff, 1997].

Zur Zeit werden drei Aktivierungsmechanismen der einzelnen Mitglieder der Matrixine diskutiert: Die stufenweisen Aktivierung, die Aktivierung auf der Zelloberfläche und die intrazellulären Aktivierung [Woessner & Nagase, 2000].

Die meisten MMPs werden als Zymogene in den extrazellulären Raum sezerniert, wo sie aktiviert werden. *In vitro* erfolgt eine Aktivierung unter anderem durch chaotrope Reagenzien (Natriumthiocyanat, NaSCN), durch Detergentien (SDS) oder durch Quecksilber- und Schwefelverbindungen [Birkedal-Hansen, 1995]. Dabei wird die Bindung des Cysteins zum Zinkion gelöst, was eine Veränderung der Tertiärstruktur zur Folge hat. Anschließend lagert sich ein Wassermolekül an das Zinkion an. Die aktivierte MMP gelangt nach autokatalytischen Spaltungen der Prodomäne zu ihrer katalytisch aktiven Form (Abb. 3). Dieser Aktivierungsmechanismus wird als *cysteine-switch* bezeichnet [Springman et al., 1990; Van Wart & Birkedal-Hansen, 1990].

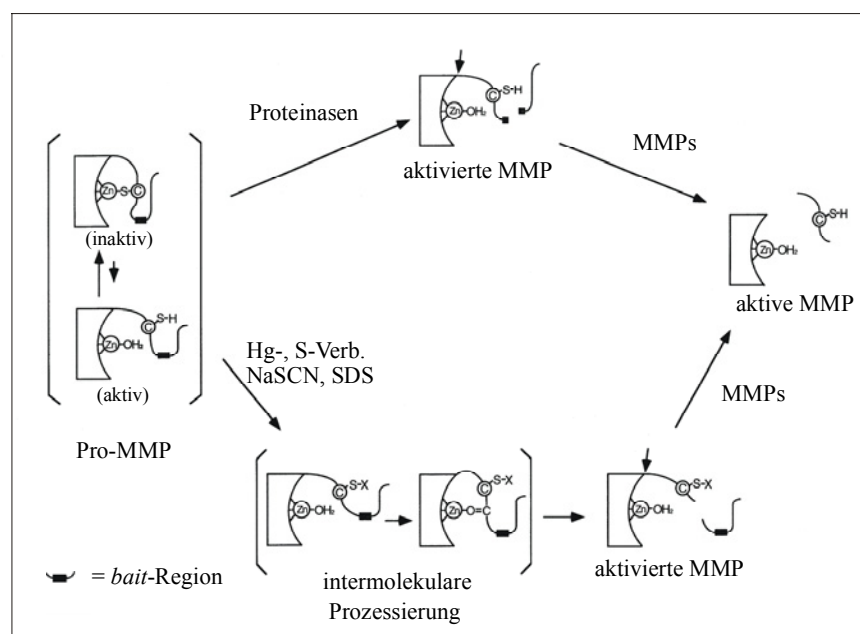


Abb. 3: Aktivierung der ProMMPs [Woessner & Nagase, 2000].

Die Abbildung zeigt die Aktivierung der ProMMPs durch Proteinasen und verschiedene chemische Verbindungen.

Die Aktivierung durch Proteinase wie Plasmin, Trypsin und Kallikrein verläuft ähnlich. Im ersten Schritt spaltet die Proteinase die Prodomäne in der *bait*-Region, die den aktivierenden Proteinase exponiert ist. Durch die Spaltung werden Strukturänderungen möglich, die das katalytische Zentrum öffnen, so dass nach Anlagerung eines Wassermoleküls die Prodomäne autokatalytisch abgespalten wird (Abb. 3).

Für die Progelatinase A haben Untersuchungen ergeben, dass die latente MMP durch viele Proteinase, wie z.B. Trypsin, Plasmin, und Kallikrein nicht aktiviert werden kann [Okada et al., 1990]. Eine sehr langsame Aktivierung erfolgt durch MMP-1 und MMP-7. Sato et al. (1994) identifizierten die MT1-MMP als Aktivator der Progelatinase A. In den folgenden Jahren wurden weitere MT-MMPs entdeckt, die alle die Fähigkeit besitzen, ProMMP-2 zu aktivieren [Takino et al., 1995; Kolkenbrock et al., 1997; Ravanti & Kähäri, 2000; Morrison et al., 2001]. Die Aktivierung wird durch Anwesenheit von TIMP-2 beschleunigt, wobei ein Komplex aus zwei MT1-MMPs, TIMP-2 und ProMMP-2 gebildet wird [Strongin et al., 1995; Overall et al., 2000]. Diese Prozesse finden aufgrund der Membranständigkeit der MT-MMPs an der Zelloberfläche statt.

Die intrazelluläre Aktivierung spielt bei den Zymogenen der MT-MMPs, des Stromelysin-3 und der MMP-28 eine Rolle. Sie besitzen am C-Terminus der Prodomäne die Sequenz RR(K/R)R, die von Mitgliedern der Proproteinkonvertasen, wie z.B. Furin, erkannt wird. Furin ist an Vesikel des *trans*-Golgi-Apparates assoziiert und kann somit die Prodomäne intrazellulär abspalten. Es erfolgt danach eine Sezernierung der aktiven MMP [Pei & Weiss, 1995 und 1996; Woessner & Nagase, 2000].

Der Serinproteinase Plasmin wird eine Hauptrolle bei der Umwandlung vieler ProMMPs in die aktive Form zugeschrieben. Sie entsteht aus Plasminogen durch Einwirkung von den spezifischen Plasminogenaktivatoren t-PA (*tissue-type*-Plasminogenaktivator) oder u-PA (Urokinase-Plasminogenaktivator) [Birkedal-Hansen et al., 1993]. Untersuchungen an Mäusen, die ein defektes Gen für u-PA besitzen, belegen die physiologische und pathologische Bedeutung des u-PA/Plasmin Systems [Carmeliet et al., 1997]. Des Weiteren wird eine Aktivierung der MMPs untereinander diskutiert [Nagase, 1997; Murphy & Knäuper, 1997].

Eine andere Ebene der Regulation der Matrixine bildet die Wechselwirkung mit den natürlichen Inhibitoren, den TIMPs. Diese binden in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 nichtkovalent an die MMPs. Die Struktur der Matrixine ist bei dieser Bindung von entscheidender Bedeutung. Dies wurde durch Untersuchungen der Komplexbildung der

TIMPs mit korrekt gefalteten MMPs belegt, die durch eine Punktmutation im katalytischen Zentrum inaktiviert waren [Birkedal-Hansen, 1995].

Bis heute sind vier strukturell sehr homologe TIMPs bekannt [Fassina et al., 2000]. Sie besitzen zwölf konservierte Cystein-Reste, die sechs Disulfidbindungen ausbilden. Dabei entsteht eine ausgeprägte Domänenstruktur mit sechs Schleifen. Für die spezifische Bindung der TIMPs an die MMPs werden die drei N-terminalen Schleifen verantwortlich gemacht. Dieses konnte durch Strukturaufklärungen der Komplexe von humanem TIMP-1 mit der katalytischen Domäne der MMP-3 und bovinem TIMP-2 mit der katalytischen Domäne der MT1-MMP belegt werden [Gomis-Rüth et al., 1997; Fernandez-Catalan et al., 1998]. Die Hemmung erfolgt durch die Bindung der TIMPs an das katalytische Zinkion. Insgesamt finden Wechselwirkungen auf einer Fläche von 1300 Å² statt [Brew et al., 2000].

TIMP-1, -2, und -4 werden in löslicher Form sezerniert, wohingegen TIMP-3 an die extrazelluläre Matrix assoziiert vorliegt [Gomez et al., 1997]. TIMP-1 und TIMP-2 zeigen inhibitorische Wirkung gegenüber allen MMPs. Zusätzlich bilden sie Komplexe mit den Progelatinasen: Der Komplex von TIMP-2 mit MT1-MMP und ProMMP-2 spielt für die Aktivierung der Progelatinase A eine Rolle, der Komplex aus TIMP-1 mit ProMMP-9 kann weitere Matrixine inhibieren [Lichte et al., 1996; Kolkenbrock et al., 1995].

Ein unspezifischer Proteinase-Inhibitor ist das in der Leber produzierte α 2-Makroglobulin, das mit einer Größe von 750 kDa im Serum enthalten ist. Es spielt z.B. bei Entzündungsprozessen eine Rolle als Inhibitor für die MMPs [Birkedal-Hansen et al., 1993; Cawston, 1996].

Für viele pathologische Prozesse wird ein Ungleichgewicht zwischen aktivierten MMPs und TIMPs als auslösender Faktor angenommen. Die Erforschung und der Einsatz synthetischer Inhibitoren zur Kontrolle des Gleichgewichts steht in den letzten Jahren immer mehr im Mittelpunkt des Interesses. Die Wirkung dieser Hemmstoffe beruht im Allgemeinen auf der Chelatisierung des Zinkions im katalytischen Zentrum. Bislang zeigen einige synthetische Hydroxamate *in vitro* sowie *in vivo* die größte inhibitorische Wirkung [Wojtowicz-Praga et al., 1997]. Zur Zeit steht die Synthese von Inhibitoren mit einer Spezifität gegen einzelne Matrix Metalloproteinasen im Vordergrund. Röntgenstrukturanalysen von Matrixinen komplexiert mit TIMPs oder mit synthetischen Inhibitoren, z.B. Batimastat, bilden die Grundlage für die Entwicklung neuer Hemmstoffe [Grams et al., 1995; Lichte, 1997].

3.2 Die humane Makrophagenelastase (HME, MMP-12)

Viele dehnbare Gewebe, wie z.B. Lunge, Blutgefäße und Haut, bestehen zu einem wesentlichen Anteil aus Elastin, einem fibrillärem, unter anderem durch Desmosin querverbrücktem Strukturprotein. Dieses wird nur durch wenige Proteinasen hydrolysiert. In Vertebraten bilden die Elastasen die wichtigsten Elastin-degradierenden Enzyme. Allgemein werden die Elastasen in Serin-Proteinasen, z.B. die neutrophile Elastase, und Metalloelastasen, z.B. die Makrophagenelastase, eingeteilt [Dong et al., 1997].

Die Makrophagenelastase wurde 1975 zuerst von Werb und Gordon in intraperitonealen, Thioglykolat-stimulierten Makrophagen der Maus gefunden. Die erste Reinigung und Isolierung aus Makrophagen der Maus gelang sechs Jahre später [Banda & Werb, 1981]. Nach Charakterisierung der Makrophagenelastase wurde eine Zugehörigkeit zur Familie der Matrixine vermutet. Durch Klonierung, rekombinante Expression in *Escherichia coli* und weitergehende Charakterisierung von Shapiro et al. (1992) wurde dieses Enzym eindeutig der Klasse der MMPs zugeordnet. Erstmals wurden auch die cDNA-Sequenz und die chromosomale Lokalisierung ermittelt. Ein Jahr später berichteten Shapiro et al. von der Entdeckung der cDNA der humanen Makrophagenelastase (HME) durch *screening* einer Lungenmakrophagen-cDNA-Bank. Sie weist eine 74 %ige Homologie zu der cDNA der Makrophagenelastase der Maus auf und ist in der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz zu 64 % identisch. Die größte Übereinstimmung (49 %) im Vergleich mit anderen humanen MMPs besitzt die HME zu Stromelysin-1 und der Interstitiellen Kollagenase [Shapiro et al., 1993].

Genetische Regulation und Expression der HME

Zum ersten Mal wurde von Belaaouaj et al. (1995) über die chromosomale Lokalisierung des HME-Gens und gewebespezifische Expression der HME berichtet. Das Gen ist, wie auch bei MMP-1, -3, -7, -8, -10 und -13, auf dem Chromosom 11, Bande q22.2-22.3 lokalisiert. Auf der 5'-Seite befinden sich folgende promotorspezifische Erkennungssequenzen: Nmyc (-533 bp), CCAAT (-398 bp), PEA3 (-349 bp), AP-1 (-81 bp), STAT5 (-59 bp) und ets-1 (-17 bp). Durch Deletions- und Mutationsexperimente innerhalb dieser Bereiche und anschließender Stimulation von Monozyten oder Makrophagen mit dem Wachstumsfaktor

GM-CSF¹ wurde gezeigt, dass die AP-1 Erkennungssequenz der entscheidende Promotor ist. Bei beiden Zelltypen waren sowohl die mRNA- als auch die Proteinkonzentration der MMP-12 stark erhöht [Wu et al., 2001].

Diese Ergebnisse wurden durch vergleichbare Untersuchungen an der Makrophagenzelllinie RAW246.7 mit den Cytokinen und Wachstumsfaktoren IL-1 β , TNF- α , M-CSF, VEGF, PDGF-BB und TPA² belegt. Der Wachstumsfaktor TGF- β 1³ wirkt in diesem Zusammenhang inhibierend und aktiviert rezeptorvermittelt den intrazellulären Effektor Smad3, der seinerseits die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die AP-1 Erkennungssequenz blockiert. Das hat zur Folge, dass die Transkription der MMP-12 mRNA verhindert wird, wobei die Stimulation nur die Transkription des Gens beeinflusst und nicht die Stabilität der mRNA [Feinberg et al., 2000]. Dies bestätigten Untersuchungen an einer Makrophagenzelllinie der Maus, bei denen die Zellen nach Behandlung mit einem Phorbol-ester (4 β -Phorbol-12-myristat-13-acetat) erhöhte bzw. mit Dexamethason erniedrigte mRNA Konzentrationen der MMP-12 enthielten [Monet-Kuntz et al., 1997].

Eine verstärkte Expression der MMP-12 auf mRNA- und Proteinebene wurde bei Makrophagen nach Stimulation ihres CD40-Rezeptors nachgewiesen. Dieser Rezeptor interagiert *in vivo* mit dem CD40-Liganden, einem Oberflächenprotein aktivierter T-Zellen. Diese Zell-Zell Stimulation von Makrophagen und aktivierten T-Zellen kann u.a. bei arteriosklerotischen Prozessen, bei denen beide Zelltypen verstärkt auftreten, eine Rolle spielen [Wu et al., 2000]. Die Plasmin- oder Thrombin-induzierte Aktivierung des PAR-1 (*proteinase-activated receptor-1*) durch die Abspaltung eines N-terminalen Abschnitts führt nur zu einer Erhöhung der Konzentration an aktiver MMP-12. Dieser Signalweg wird über ein aktiviertes G-Protein, Protein Kinase C und MAP-Kinasen⁴ vermittelt [Raza et al., 2000]. Weiterhin konnte eine Erhöhung der MMP-12 mRNA-Menge durch Behandlung von Makrophagen mit Diethylmaleat, einem elektrophilen Signalmolekül für oxidativen Stress, nachgewiesen werden [Kawane et al., 1999]. Hyaluron Fragmente mit geringem Molekulargewicht (200 kDa), die bei entzündlichen Prozessen im Lungengewebe vorkommen, stimulieren Makrophagen ebenfalls zur Produktion einer erhöhten Menge der MMP-12 mRNA [Horton et al., 1999].

Eine Erniedrigung der MMP-12 mRNA- und Proteinkonzentration wurde durch Inkubation von Makrophagen mit einem synthetischen Lipopeptid JBT 3002 gezeigt. Dieses ist ein

¹ GM-CSF: *granulocyte macrophage-colony stimulating factor*

² IL-1 β : Interleukin-1 β , TNF- α : Tumornekrose Faktor- α , M-CSF: *macrophage-colony stimulating factor*, VEGF: *vascular endothelial growth factor*, PDGF-BB: *platelet derived growth factor-BB*, TPA: 12-o-Tetradecanoylphorbol-13-acetat

³ TGF- β 1: *transforming growth factor- β 1*

⁴ MAP-Kinasen: *mitogen activated protein-Kinasen*

synthetisches Analogon von Lipopeptiden der äußeren Membran von gram-negativen Bakterien [Kumar et al., 2000]. Gegensätzliche Untersuchungen von Trask et al. zeigten, dass das Oberflächen Protein D (SP-D, *surfactant protein D*) nach Aktivierung in der Lage ist, die Biosynthese von MMP-1, -3 und -12 in Makrophagen zu induzieren. Dieses kann als eine schützende Funktion gegen bakterielle Infektionen interpretiert werden [Trask et al., 2001].

Insgesamt wird durch diese sehr verschiedenen Untersuchungen deutlich, dass immer mehr Moleküle gefunden werden, die die Transkription und Sezernierung der MMP-12 durch äußere Stimulierung von Makrophagen beeinflussen. Dabei sind aktuell immer mehr die Rezeptoren und intrazellulären Signalmoleküle von Interesse, da z.B. ein Signalmolekül bei verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Prozesse induzieren kann.

Bislang sind nur wenige Zelltypen bekannt, die *in vivo* die MMP-12 exprimieren. Nachdem Shapiro (1994) die Expression der HME in Lungenmakrophagen beschrieben hatte, konnte das Protein in nachfolgenden Arbeiten in aktivierten Gewebemakrophagen im Peritoneum und im zentralen Nervensystem detektiert werden [Shapiro & Senior, 1998]. In Hauttumoren wurde die MMP-12 durch immunhistologische Untersuchungen in kanzerogenen Epithelzellen nachgewiesen [Kerkelä et al., 2000]. Weiterhin wurde die mRNA mit Hilfe von Northern Blots im Plazentagewebe und in Lebertumorzellen entdeckt. In Gewebeproben aus Herz, Gehirn, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Magen konnte keine Expression der entsprechenden mRNA festgestellt werden [Belaouaj et al., 1995; Gorrin-Rivas et al., 1998].

Aktivierung und Prozessierung

Bei der Aktivierung des latenten Enzyms (54 kDa) wird nicht nur die Prodomäne (8 kDa), sondern auch der C-Terminus (23 kDa) abgespalten. Diese autokatalytische Prozessierung des Enzyms wird durch Plasmin, Trypsin und Stromelysin-1 beschleunigt und stellt eine Besonderheit im Vergleich zu allen anderen bislang bekannten MMPs dar [Shapiro & Senior, 1998]. Für viele ProMMPs wird eine Aktivierung durch Plasmin angenommen. Dieses entsteht aus Plasminogen durch t-PA oder u-PA. Verschiedene Mäuse mit t-PA (t-PA $-/-$) oder u-PA (u-PA $-/-$) Gendefekt wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, aktive MMP-12 zu exprimieren. Dabei wurde bei t-PA $-/-$ Mäusen unveränderte Expression und Aktivität der MMP-12 nachgewiesen, wohingegen die u-PA $-/-$ Tiere nicht in der Lage waren, aktive MMP-12 zu prozessieren [Carmeliet et al., 1997]. Die u-PA/Plasmin vermittelte Aktivierung der ProMMP-12 zum aktiven Enzym scheint damit eine bedeutende Rolle zu spielen.

Sequenz-Spezifität und mögliche Substrate

Bei ersten Spaltversuchen mit der Makrophagenelastase der Maus mit Elastin und der Insulin B-Kette zeigte das Enzym eine Spezifität für Leucin in P₁' Position [Banda & Werb, 1981; Kettner et al., 1981].

Die humane Makrophagenelastase spaltet α 1-Proteinase Inhibitor zwischen Phe³⁵²-Leu³⁵³ und Glu¹⁹⁹-Val²⁰⁰ mit wesentlich größerer Effektivität als andere MMPs [Gronski et al., 1997]. Mit Hilfe von Spaltversuchen an synthetischen Oktapeptiden konnte für die MMP-12 eine Spezifitätsreihe mit bevorzugten Aminosäureresten in P₁' Position aufgestellt werden: Leu >> Ala > Lys > Phe > Tyr > Trp > Arg > Ser > Glu [Gronski et al., 1997]. Dabei ist interessant, dass sie als einzige von den untersuchten MMPs N-terminal zu Arginin spalten kann.

Aufgrund der herausragenden Stellung der HME bei der Spaltung von Elastin verglichen mit anderen MMPs wurde diese Fähigkeit genauer untersucht. Mecham et al. (1997) konnten zeigen, dass MMP-12 auch hier Leucin in P₁' bevorzugt, wohingegen Gelatinase B eher „sperrige“ aliphatische bzw. Thermolysin kleine Aminosäuren in P₁' tolerieren. Diese Spaltung vor Leucin ermöglicht eine höhere Abbauraten für anschließende Degradierungsprozesse als eine Spaltung an anderen Aminosäureresten [Shapiro & Senior, 1998]. Es wurden viele weitere Substrate für *in vitro* Spaltungsuntersuchungen eingesetzt, wobei jedoch nur selten die N-terminalen Aminosäurereste bestimmt wurden. In der folgenden Tabelle (Tab. 2) sind die *in vitro* gespaltenen Substrate aufgeführt.

Tab. 2: *In vitro* degradierte Proteine der MMP-12 nach [Gronski et al., 1997; Chandler et al., 1996; Belaaouja et al., 2000 ; Edelstein et al., 1999].

ECM-Proteine	Aggrekan Elastin κ -Elastin Entaktin Fibrinogen Fibrillin Fibronectin Gelatin Kollagen I und IV Laminin <i>myelin basic protein</i> Vitronectin
Plasma-Proteine	α 1-Proteinase Inhibitor α 2-Makroglobulin Fibrinogen Insulin B-Kette <i>tissue factor pathway inhibitor</i> Apolipoprotein A-I

Im Folgenden werden weitere potentielle Substrate der MMP-12 vorgestellt, die im Rahmen dieser Arbeit eingehend untersucht werden sollten.

Der Einfluss der Matrix Metalloproteinasen auf die Blutgerinnungskaskade und das fibrinolytische System ist aktuell von großem Interesse [Tschesche et al., 2000; Ugwu et al., 2001]. Dabei stehen zum einen die Faktoren der Blutgerinnungskaskade als Substrate und zum anderen der Einfluss von z.B. Plasmin und Thrombin auf die Aktivierung und Expression von MMPs im Mittelpunkt [Hiller et al., 2000; Raza et al., 2000].

Der **Hagemann Faktor (Faktor XII)** ist die latente Form einer Serin-Proteinase (80 kDa), die im Blutplasma zirkuliert. Der aktivierte Faktor XIIa fungiert als Initiator mehrerer Reaktionen, wie z.B. des intravaskulären Systems der Blutgerinnung, der Fibrinolyse und der Bradikinin Freisetzung [Reddigari et al., 1993]. Für die Aktivierung des Hagemann Faktors ist die Bindung an anionische Oberflächen nötig. Dort kann durch das Kallikrein/Kinin-System oder durch Autokatalyse der aktive α -Faktor XIIa entstehen [Silverberg et al., 1980]. Dieser α -Faktor XIIa besteht aus zwei Ketten mit einer Größe von 50 und 28 kDa, die über eine Disulfidbrücke verknüpft sind. Eine weitere Degradierung durch Trypsin führt zum β -Faktor XIIa, wobei die 50 kDa Kette zu einem Nonapeptid gespalten wird und die Aktivität erhalten bleibt [McMullen & Fujikawa, 1985].

Thrombin ist eine multifunktionelle Serin-Proteinase, die eine zentrale Rolle bei der Blutgerinnung und Plättchenaggregation spielt. Weiterhin hat Thrombin einen Einfluss auf zelluläre Prozesse wie Chemotaxis, Proliferation und Sezernierung von Cytokinen [Goldsack et al., 1998]. Prothrombin wird durch Spaltung durch Faktor Xa an zwei Stellen aktiviert. Das entstehende Thrombin besteht aus zwei Ketten, α und β , die über eine Disulfidbrücke verknüpft sind [Di Cera et al., 1997]. Diese Proteinase spaltet die Fibrinopeptide A ($A\alpha$ 1-16) und B ($B\beta$ 1-14) von dem im Blutplasma zirkulierenden **Fibrinogen** ab. Dieses 340 kDa große Protein besteht aus drei Paaren von Polypeptidketten ($A\alpha$, $B\beta$ und γ), welche über Disulfidbrücken in einer zentralen Domäne verbunden sind. Nach Abspaltung der dort lokalisierten Fibrinopeptide polymerisieren die Monomere zu Fibrin.

Die aus 11 Aminosäuren bestehende **Substanz P** wird von den primären sensorischen Neuronen im zentralen Nervensystem synthetisiert. Dieses Neuropeptid dient der chemischen Übertragung von Impulsen von peripheren Nerven auf Nervenzellen des Rückenmarks. Es ist ein Hauptmediator bei der Weiterleitung von Schmerzempfindungen [Zubrzycka & Janeck, 2000]. Weiterhin vermittelt dieser Neurotransmitter die Kontraktion glatter Muskelzellen, die Reduktion des Blutdrucks und die Stimulation sekretorischer Gewebe [Snijdelaar et al., 2000; Hökfelt et al., 2001].

Die Nervenfasern des zentralen Nervensystems sind von Myelinscheiden umgeben. Diese Isolationsschicht enthält verschiedene Isoformen des *myelin basic proteins* (MBP) als Hauptbestandteile. Das MBP stabilisiert die einzelnen Axone und sorgt für eine hohe Geschwindigkeit bei der Weiterleitung von Nervenimpulsen [Readhead et al., 1990].

Physiologische und pathologische Bedeutung der MMP-12

Makrophagen sind in Prozessen bei Wundheilung, Entzündungsreaktionen und Gewebumbau involviert. Die von diesen Zellen sezernierte Makrophagenelastase spielt aufgrund ihrer breiten Substratspezifität gegenüber Bestandteilen der ECM eine wichtige Rolle. Weiterhin sind Makrophagen die wichtigsten Abwehrzellen in der Lunge. Nach der Lungenlavage gesunder Menschen und Patienten mit Lungenemphysem ermittelten Finlay et al. (1997a/b) bei den isolierten Zellen einen Anteil von über 90 % Makrophagen und ca. 1 % Leukozyten. Dabei war die Zahl der Zellen bei Patienten mit Lungenemphysem gegenüber der bei gesunden Menschen leicht erhöht. Es konnte jedoch keine verstärkte Transkription der HME cDNA nachgewiesen werden. Vielmehr wurden erhöhte mRNA-Konzentrationen der Gelatinase B und der Interstitiellen Kollagenase festgestellt, welche mit den pathologischen Prozessen des Lungenemphysems in Verbindung gebracht werden [Finlay et al., 1997a].

Im Gegensatz dazu diskutiert Shapiro (1994) eine Beteiligung der HME an destruktiven Vorgängen des Lungenemphysems unter der Voraussetzung, dass die Regulation der Aktivität der MMP-12 gestört ist. Diese Annahme wird durch die Fähigkeit des Enzyms Elastin abzubauen und durch ein verstärktes Auftreten der Makrophagen im Lungengewebe unterstützt. Weiterhin kann die HME den physiologischen Inhibitor der Leukozytenelastase, α 1-Proteinase Inhibitor, spalten. Dieses führt zu einer beschleunigten Ausbildung des Lungenemphysems [Gronski et al., 1997].

Aktuelle Untersuchungen an MMP-12 *knockout* Mäusen belegen die pathologische Bedeutung dieser Proteinase bei dem durch Zigarettenrauch induzierten Lungenemphysem. Mäuse mit defektem MMP-12 Gen bilden trotz Einwirkung von Zigarettenrauch im Gegensatz zur gesunden Maus kein Emphysem aus [Shipley et al., 1996]. Zusätzlich ist das Lungengewebe bei der Wildtyp Maus stark von Makrophagen infiltriert, wohingegen keine erhöhte Anzahl bei Mäusen mit MMP-12 Gendefekt festgestellt werden konnte. Diese Infiltration kann aber durch zusätzliche Applikation von MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) angeregt werden, wodurch aber keine Degradierung des Lungengewebes wie beim Emphysem der Wildtyp Maus einsetzt [Hautamaki et al., 1997]. Diese Ergebnisse lassen

einen positiven *feedback* Mechanismus vermuten: In gesunden Mäusen wird durch Zigarettenrauch der Abbau des Lungengewebes induziert, wobei die MMP-12 für die Spaltung des Elastins verantwortlich ist. Entstehende Fragmente des Elastins wirken chemotaktisch auf weitere Monozyten, die dann in das Lungengewebe einwandern und als ausgereifte Makrophagen in der Lage sind, weiteres Gewebe abzubauen. Dadurch entsteht der positive *feedback* und der verstärkte Gewebeabbau führt zum Emphysem [Shapiro & Senior, 1998].

Auch im Zusammenhang mit der Arteriosklerose sind die Makrophagen von besonderem Interesse. Dieser chronisch entzündliche Prozess wird in drei Stadien eingeteilt (Abb. 4).

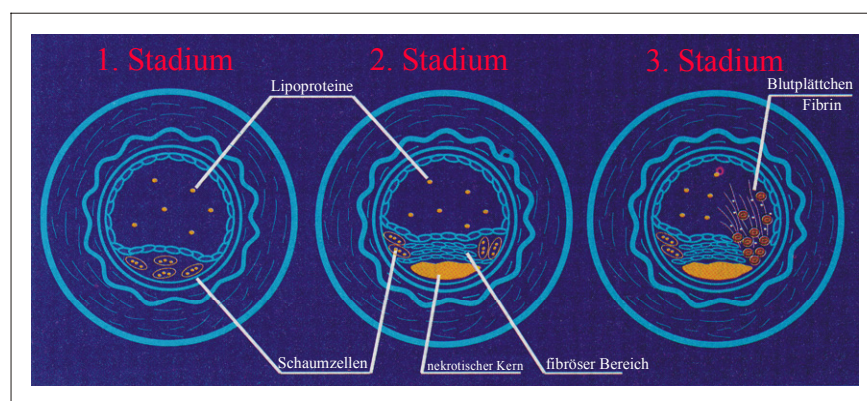


Abb. 4: Drei Stadien der Arteriosklerose [Breslow, 1996].

Im ersten Schritt lagern sich Monozyten an Endothelzellen an und wandern in den subendothelialen Raum. Nach Aufnahme von Lipiden und Transformation zu sogenannten Schaumzellen (*macrophage foam cells*, MCFs) bilden sie die *fatty streaks* (1. Stadium). Mit der Zeit entstehen aus ihnen fibröse Plaques (2. Stadium). Diese sind durch nekrotische MCFs und aus glatten Muskelzellen (*smooth muscle cells*, SMCs) und Kollagenen bestehende Bereiche gekennzeichnet. Die Plaques können durch Fibrin- und Blutplättchen-Anlagerung zum Gefäßverschluss (Thrombose) oder durch proteolytische Prozesse zum Riss der Gefäßwand mit anschließenden Blutungen führen (3. Stadium) [Breslow, 1996]. Bei diesen komplexen Prozessen spielen die Makrophagen und Schaumzellen und die von ihnen sezernierte MMP-12 eine wichtige Rolle.

Eine Thrombose tritt auch nach Ablösung eines Teils der Plaques auf, wobei proteolytische Prozesse für die Instabilität verantwortlich sind [Halpert et al., 1996]. Dadurch werden Risse der Gefäßwand mit anschließenden Blutungen möglich. Für diese vorausgehenden proteolytischen Vorgänge wird unter anderem die MMP-12 verantwortlich gemacht, was durch eingehende Untersuchungen an Kaninchen belegt wurde [Matsumoto et al., 1998].

Ähnliche Zusammenhänge treten bei dem Krankheitsbild des Aortenaneurysmas auf. Hierbei handelt sich um eine massive Infiltrierung von Makrophagen in die Gefäßwand der Aorta, die mit umfassender Umstrukturierung des elastischen Gewebes und sackartiger Gefäßerweiterung einhergeht. In dem betroffenen Gewebe wurde eine starke Expression der MMP-12 nachgewiesen [Curci et al., 1998]. Mäuse mit einer Apolipoprotein E Defizienz (Apo E $-/-$) und gleichzeitiger fettreicher Diät bilden arteriosklerotische Plaques und Mikroaneurysmen in ihren Blutgefäßen aus. Das hauptsächlich in der Leber vorkommende Apolipoprotein E ist ein Oberflächenbestandteil von Lipoproteinpartikeln und ein Ligand für die Lipoprotein Erkennung und deren Aufnahme mit Hilfe eines Rezeptors. Durch einen genetischen Defekt dieses Apolipoprotein E Gens kommt es zu verminderter Aufnahme von Lipoproteinen aus dem Blut, wodurch die zu Aneurysma führenden krankhaften Gefäßwandveränderungen ausgelöst werden. Mäuse mit zusätzlicher Defizienz des u-PA Gens (u-PA $-/-$) aber nicht t-PA $-/-$ sind gegen die Ausbildung von Aneurysmen geschützt. Diese Tatsache lässt eine entscheidende Rolle der u-PA/Plasmin vermittelten Aktivierung der ProMMPs insbesondere der ProMMP-12 vermuten, da sie in dem betroffenen Gewebe stark exprimiert wird [Carmeliet et al., 1997; Curci et al., 1998]. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Beteiligung der MMP-12 bei der Infiltrierung der Makrophagen und den anschließenden krankhaften Gefäßveränderungen wie Arteriosklerose und Aneurysma.

Die MMPs werden weiterhin in zunehmendem Maß mit dem Krebsgeschehen in Zusammenhang gebracht. Dabei werden sie für folgende Prozesse verantwortlich gemacht: Zum einen unterstützen sie das Tumorstadium durch den Abbau der umgebenden ECM. Zum anderen können metastasierende Zellen mit Hilfe der Matrixine die Basalmembran durchdringen. Zusätzlich fördert z.B. die MMP-2 durch Bindung an das Integrin $\alpha_v\beta_3$ auf Endothelzellen die Angiogenese des Tumors. Angiogenese ist einer der zentralen Prozesse beim Wachstum von Geschwüren, da ohne die Neubildung von Blutgefäßen eine Versorgung des Tumors mit Nährstoffen und Sauerstoff nicht möglich ist und die Tumorstadium damit auf weniger als einen halben Millimeter beschränkt bleiben würde. Eine Hemmung der Angiogenese stellt damit einen vielversprechenden Ansatz bei der Unterdrückung des Tumorstadiums dar.

In diesem Zusammenhang wird in letzter Zeit die Funktion der MMP-12 intensiv untersucht. Sie wird in den meisten Tumorgeweben von umgebenden oder von infiltrierten Makrophagen, die teilweise bis zu 60 % der Tumormasse ausmachen, sezerniert [Heppner et al., 1996; Dong et al., 1997]. Einige Arbeiten zeigten, dass auch kanzerogene Epithelzellen der Haut und Leberzellen beim HCC (*hepatocellular carcinoma*) in der Lage sind MMP-12 zu exprimieren [Kerkelä et al., 2000; Gorrin-Rivas et al., 1998]. Die MMP-12 besitzt im Vergleich zu allen

anderen MMPs die größte proteolytische Aktivität gegenüber dem im Gewebe und im Plasma vorkommenden Plasminogen. Bei der Degradierung wird Angiostatin freigesetzt, welches die Proliferation von Endothelzellen inhibiert und somit antiangiogene Wirkung besitzt. Somit hat die von Tumor-infiltrierten Makrophagen sezernierte MMP-12 wahrscheinlich positive Eigenschaften durch Hemmung der Angiogenese des Tumors [O'Reilly et al., 1994; Cornelius et al., 1998].

Gorrin-Rivas et al. konnte durch eine klinische Studie an Patienten mit Lebertumoren eine direkte Korrelation zwischen MMP-12-Expression und Angiostatin-Produktion feststellen. Zusätzlich zeigten Patienten mit starker Expression von MMP-12 eine höhere Angiostatin Konzentration und eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit als Patienten mit geringer oder nicht detektierbarer MMP-12 Sekretion [Gorrin-Rivas et al., 1998]. Diese Ergebnisse wurden bei Patienten mit Dickdarmkrebs bestätigt. Dort hatten Patienten mit einer Überexpression der MMP-12 mRNA eine signifikant höhere Überlebenswahrscheinlichkeit [Yang et al., 2001]. In einer weiteren Studie wurden diese positiven Effekte zum Teil durch erhöhte Mengen des Wachstumsfaktors VEGF⁵ aufgehoben [Gorrin-Rivas et al., 2000b]. Diese Tatsache demonstriert die Bedeutung des Zusammenspiels zwischen Stimulierung der Angiogenese durch z.B. VEGF, PD-EGF und FGF⁶ und Inhibierung durch z.B. Angiostatin, Endostatin und Thrombospondin.

Mit Hilfe der Genterapie wurden in diesem Zusammenhang die bedeutendsten Ergebnisse erzielt. Grundlage waren Mäuse mit subkutan wachsenden Darmtumorzellen, die keine Makrophagenelastase exprimieren. Diese Tumorzellen wurden mit HVJ⁷ kationischen Liposomen transfiziert, die ein Plasmid mit der cDNA für MMP-12 enthalten. Nach erfolgreicher Transfektion sezernierten diese Zellen MMP-12 und das Tumorwachstum wurde gestoppt. Gleichzeitig wurden eine höhere Angiostatin-Konzentration und mehr apoptotische Zellen im Vergleich zum unbehandelten Tumor gefunden [Gorrin-Rivas et al., 2000a und 2001].

Diese Ergebnisse zeigen die wichtige Funktion der MMP-12 bei den hier aufgeführten Prozessen. Für eine Korrelation der Makrophagenelastase-Konzentration im Tumorgewebe und der damit einhergehenden Angiogenese ist die Entwicklung eines *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISAs) von Interesse. Dieser ELISA könnte z.B. bei den genterapeutischen Ansätzen in Mausmodellen eingesetzt werden. Damit wäre es möglich, die Menge der MMP-12 zu quantifizieren, um nachfolgend die Behandlung des Tumors zu optimieren.

⁵ VEGF: *vascular endothelial growth factor*

⁶ PD-EGF: *platelet derived-endothelial growth factor*, FGF: *fibroblast growth factor*

⁷ HVJ: *hemagglutinating virus of Japan*

4 Material und Methoden

Die verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Lösungsmittel werden in p.A.-Qualität eingesetzt. Doppelt destilliertes Wasser ($\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$) wird durch eine Millipore-Q-Filtrationsanlage (Millipore, Neu Isenburg) gewonnen.

4.1 Molekularbiologische Methoden

Zur Manipulation und Analyse von Nukleinsäuren, Proteinen und *Escherichia coli* kommen Standardmethoden zum Einsatz, die ausführlich unter Sambrook et al. (1989) beschrieben sind. Dort sind auch die verwendeten Lösungen und Puffer aufgeführt. Im Folgenden werden nur Techniken dargestellt, die von den dort erläuterten Methoden abweichen, bzw. eine Abwandlung enthalten.

Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe

Die RNA wird aus dem Cytoplasma von Gewebezellen unter Verwendung des „RNeasy Midi Kits“ (QIAGEN, Hilden) isoliert. Zusätzlich werden zum vollständigen Homogenisieren des Gewebes im Lyse-Puffer „QIAshredder“-Säulen (QIAGEN, Hilden) eingesetzt. Die Durchführung erfolgt gemäß Herstellerprotokoll [QIAGEN, 1997].

Formaldehyd-Agarose Gelelektrophorese

Die Formaldehyd-Agarose (FA) Gelelektrophorese wird zur Trennung und Analyse von RNA genutzt [Lehrach et al., 1977]. Die FA-Gelelektrophorese wird in horizontalen Elektrophoresekammern (Eigenbau, Universität Bielefeld) gemäß Protokoll durchgeführt [QIAGEN, 1997].

Reverse Transkription

Die Reverse Transkription (RT) wird eingesetzt, um ausgehend von einzelsträngigen RNA-Matrizen die ersten cDNA Stränge zu synthetisieren [Newton & Graham, 1994]. Es wird eine Mutante der Reversen Transkriptase des Moloney-Maus-Leukämie-Viruses (SuperScript™ RNase-H⁻, Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein) verwendet. Die unspezifische Reverse Transkription wird mit d(T)₁₂₋₁₈-Oligonukleotiden als Primer gemäß Herstellerangaben (Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein) durchgeführt.

Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) werden unter Verwendung eines modifizierten Standardprotokolls in dem MiniCycler PTC-150-16 (MJ Research, Watertown, USA) durchgeführt [Saiki et al., 1988].

Für die zielgerichtete Mutagenese wird das „QUIKchange™ Site Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene, Heidelberg) nach zugehörigem Protokoll eingesetzt.

Standard-PCR-Programm

Schritt	Anmerkung	Dauer	Temperatur
1.	Denaturierung	2 min	95°C
2.	Denaturierung	1 min	95°C
3.	Primeranlagerung + 0,1°C / Zyklus	30-45 s	50-58°C (Starttemperatur)
4.	Polymerisation + 1 s / Zyklus	1 min	72°C
5.	39 × zu Schritt 2		
6.	Nachbehandlung	10 min	72°C
7.	Reaktionsstopp		4°C

Mutagenese-PCR-Programm

Schritt	Anmerkung	Dauer	Temperatur
1.	Denaturierung	30 s	95°C
2.	Denaturierung	30 s	95°C
3.	Primeranlagerung	60 s	55°C
4.	Polymerisation	12 min	72°C
5.	13 × zu Schritt 2		
6.	Reaktionsstopp		4°C

Folgender Standard-PCR-Ansatz wird verwendet:

- 41,5 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$
- 1,5 μL DNA-Templat (1-10 ng)
- 5,0 μL GeneAmp[®] 10 \times PCR-Puffer (Perkin Elmer, Branchburg, USA)
- 0,5 μL *forward*-Primer (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
- 0,5 μL *reverse*-Primer (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
- 0,7 μL dNTP-Mix 10 mM (Boehringer Mannheim, Mannheim)
- 0,3 μL AmpliTaq[®]-DNA-Polymerase (5 U/ μL) (Perkin Elmer, Branchburg, USA)
- überschichtet mit 50 μL Paraffin

Die Mutagenese-PCR wird mit 5 μL 10 \times Pfu-Puffer (Stratagene, Heidelberg) und 0,8 μL Pfu-Polymerase (5 U/ μL) (Stratagene, Heidelberg) durchgeführt.

Verwendete Oligonukleotide (MWG-Biotech, Ebersberg):

KaDo1.F	5'-GATCTCCATATGTTTCAGGGAAAT-3'
ProHME.F	5'-GCTTCTCATATGCTTCCCCTGAAC-3'
hPro1.F	5'-CTTCCCCTGAACAGCTCTAC-3'
ProKaDoHME.R	5'-GGATCCTTATCCATACAGGGACTGAAT-3'
hKaDo1.R	5'-TCCATACAGGGACTGAATGC-3'
KaDoEA1.F	5'-GCTGTTCACGCGATTGGC-3'
KaDoEA2.R	5'-GCCAATCGCGTGAACAGC-3'
bFor1	5'-ATCTTGCACCACACCTTCTACAAT-3'
bRev1	5'-CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCC-3'

Agarosegelelektrophorese

Die DNA-Gelelektrophorese wird in einer horizontalen Elektrophoresekammer (Eigenbau, Universität Bielefeld) durchgeführt. Die Bestimmung des Molekulargewichts erfolgt durch Vergleich mit einem DNA-Längenstandard (1 kb DNA Leiter, Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein). Die DNA-Fragmente werden mit Ethidiumbromid (3,8-Diamino-6-ethyl-5-phenylphenanthridiniumbromid) angefärbt.

Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wird mit dem „High Pure[®] PCR Product Purification Kit“ (Boehringer Mannheim, Mannheim) durchgeführt.

Kultivierung von Escherichia coli

Die Kultivierung der *E. coli*-Stämme XL1-Blue (Stratagene, Heidelberg), BL21 (DE3) (Novagen Inc., Madison, USA) und TOP10 (Invitrogen, Leek, Niederlande) erfolgt in LB-Medium [Sambrook et al., 1989].

Nach Transformation mit pET11a, pET12b (Novagen Inc., Madison, USA) oder pCR[®]2.1 TOPO Vektoren (Invitrogen, Leek, Niederlande), die den Zellen Ampicillinresistenz vermitteln, wird dem Medium noch 1,0 µL Amp²⁰⁰ (Gerbu Biotechnik GmbH, Galberg) pro Milliliter Medium zugesetzt.

Zur Herstellung von über Nacht (üN)-Kulturen positiver Transformanden werden 5,0 mL LB-Medium mit 5,0 µL Amp²⁰⁰ versetzt, mit *E. coli*-Zellen angeimpft und über Nacht bei 37°C im Rollinkubator (Eigenbau, Universität Bielefeld) inkubiert.

Zur Langzeitlagerung von Bakterienkulturen bei -20°C oder -70°C werden die Flüssigkulturen (1:1) mit Glycerin versetzt.

Isolierung von DNA aus E. coli

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus üN-Kulturen für Restriktionsanalysen wird die „Alkalische Lyse“ nach Standardvorschrift angewendet [Sambrook et al., 1989].

Die Plasmid-DNA für die Sequenzierung oder Spaltung mit folgender Ligation eines Fragments und Transformation wird unter Verwendung des „High Pure[®] Plasmid Isolation Kit“ (Boehringer Mannheim, Mannheim) isoliert.

Sequenzierung von DNA

Die Nukleinsäuren werden gemäß der Didesoxymethode sequenziert [Sanger et al., 1977]. Die Sequenzierungen werden von Frau Dr. W. Engelhard (IIT, Universität Bielefeld) mit dem „LI-COR Sequencer“ (MWG Biotech) bzw. mit dem „ABI-DNA-Sequencer“ (Perkin Elmer) durchgeführt. Es werden fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide bei dem „LI-COR Sequencer“ und fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide bei dem „ABI-DNA-Sequencer“ eingesetzt.

Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Restriktionsenzyme *Bam*HI, *Xho*I, (GeneCraft, Münster) und *Nde*I (Biolabs, Beverly, USA) werden gemäß Herstellerangaben mit den empfohlenen Puffern eingesetzt. Für Restriktionsanalysen wird der Ansatz 2 h und für Klonierungen über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Trennung der Fragmente erfolgt im Agarosegel, woraus die DNA für anschließende Klonierungsversuche isoliert werden kann.

Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektor-DNA

Die T4-DNA-Ligase (GeneCraft, Münster) katalysiert die Ligation von DNA [Weiss et al., 1968]. Um eine Rezyklisierung der Vektoren zu unterdrücken, werden die linearen Vektoren mit Hilfe der Alkalischen Phosphatase (Promega, Madison, USA) am 5'-Ende dephosphoryliert. Die Ligation erfolgt gemäß Vorschrift des Herstellers über Nacht bei 14°C.

Transformation von E. coli

Die Transformation wird nach Standardvorschrift unter Verwendung von LB-Medium statt SOC-Medium durchgeführt [Sambrook et al., 1989].

Die Herstellung transformationskompetenter Zellen erfolgt nach einer modifizierten Vorschrift: 100 mL LB-Medium werden mit 1,5 mL der üN-Kultur versetzt und bei 37°C im Schüttelinkubator bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5 inkubiert. Die Zellkultur wird 10 min auf Eis gekühlt und anschließend in eisgekühlte 50 mL Zentrifugenröhrchen übergeführt. Die Lösung wird 10 min bei 3500 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wird vorsichtig in 5,0 mL einer eiskalten CaCl₂ / MgCl₂ (80 / 50 mM) Lösung resuspendiert, anschließend 20 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 3500 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird vorsichtig in 3,0 mL eisgekühlter CaCl₂-Lösung (0,1 M) resuspendiert und in 200 µL Portionen aliquotiert. Zur Langzeitlagerung bei -20 oder -70°C werden 200 µL eiskaltes Glycerin zugegeben und vorsichtig durchmischt.

Klonierung mit dem „TOPO TA Cloning[®] Kit“ (Invitrogen, Leek, Niederlande)

Bei dieser Klonierungsmethode wird ausgenutzt, dass Polymerasen wie AmpliTaq[®] ein Adenosin-Nukleotid an die 3'-Enden der Amplifikate bindet. Der pCR[®]2.1 TOPO Vektor verfügt über einen Thymidin-Überhang am 3'-Ende, wodurch das Anlagern von PCR-Produkten erleichtert wird. Eine kovalent an den Enden des Vektors gebundene Topoisomerase ligiert die komplementären Enden. Die Durchführung der „TOPO TA“-Klonierung richtet sich nach der Vorschrift des Herstellers (Invitrogen, Leek, Niederlande).

Zusätzlich erfolgt die Selektion der Bakterienklone auf eine erfolgreiche Transformation von Plasmid-DNA mit *Insert*-DNA über den X-Gal-Test [Ullmann et al., 1967; Sambrook et al., 1989].

4.2 Proteinbiochemische Methoden

Proteinexpression

Zur Proteingewinnung werden Bakterienkulturen im Schüttelinkubator bei 37°C bis zu einer OD₅₇₈ von 0,6 inkubiert. Durch Zugabe von IPTG (Eurogentec Bel S.A., Seraing, Belgien) (0,4 mM Endkonzentration) wird die Expression induziert und nach vier Stunden durch Kühlen auf Eis abgebrochen. Expressionskontrollen werden durchgeführt, indem 1 mL-Proben in bestimmten zeitlichen Abständen entnommen werden. Diese Proben werden fünf Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Bestandteile des Pellets werden anschließend mit Hilfe der SDS-PAGE getrennt und mit der Coomassie-Blue Färbung nachgewiesen.

Für Testexpressionen werden 50 mL LB-Medium mit 50 µL Amp²⁰⁰ und 1 mL üN-Kultur angeimpft.

Proteinpräparation aus E. coli

Die rekombinant exprimierten Proteine werden von *E. coli* häufig in Form sogenannter *inclusion bodies* abgelagert. Um diese unlöslichen Proteinaggregate zu isolieren, werden die Bakterienzellen einer Zell-Lyse unterworfen. Die Präparation der rekombinanten Proteine aus *E. coli* erfolgt nach einer etablierten Vorgehensweise [Lang et al., 2001]. Zum Überprüfen der Proteinpräparation wird eine Probe im SDS-PAGE analysiert.

Proteinfaltung durch Dialyse gegen Nativpuffer

Die Proteinfaltung erfolgt durch eine erste Dialyse der Proteinlösung gegen Nativpuffer (20 mM Tris/HCl pH 7,5; 0,5 M NaCl; 5 mM CaCl₂; 0,5 mM ZnCl₂; 0,005% NaN₃) und zweimal gegen Puffer E (5 mM Tris/HCl pH 7,5; 0,1 M NaCl; 5 mM CaCl₂; 0,005% NaN₃) für jeweils mindestens drei Stunden bei 4°C.

Dialyse

Die Proteinlösung wird in einem semipermeablen Celluloseschlauch (Roth, Karlsruhe) mit einer Ausschlussgrenze von 12-14 kDa bei 4°C und leichtem Rühren über Nacht gegen das 50-fache Volumen des entsprechenden Puffers dialysiert.

Reinigung der rekombinanten, katalytischen Domäne der MMP-12

Die Reinigung der katalytischen Domäne der MMP-12 erfolgt mit Hilfe einer Affinitäts-Chromatographie. Dafür wird Pro-Leu-Gly-NHOH an CH-aktivierte Sepharose 4B

(Pharmacia, Uppsala, Schweden) nach Herstellerangaben gekoppelt [Moore & Spilburg, 1986]. Nach Auftragen der Proteinlösung auf die Affinitätssäule wird die Säule mit fünf Säulenvolumen des Puffer E (5 mM Tris/HCl pH 7,5; 0,1 M NaCl; 5 mM CaCl₂; 0,005% NaN₃) gewaschen. Nach Elution mit Puffer F (100 mM Tris/HCl pH 7,5; 0,1 M NaCl; 5 mM CaCl₂; 6 M Harnstoff) wird das Protein durch Dialysen gefaltet [Lang et al., 2001]. Die Reinheit der Probe wird durch SDS-PAGE überprüft.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Es werden vertikale Gelkammern (Eigenbau, Universität Bielefeld) mit 10-15 %igen PAA-Gelen verwendet. Zur Größenabschätzung wird eine Mischung von Eichproteinen (LMW-Marker; Pharmacia, Freiburg) als Standard eingesetzt. Neben denaturierenden Gelelektrophoresen in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) und β -Mercaptoethanol (SDS-PAGE), werden auch nichtdenaturierende, nichtreduzierende Elektrophoresen bei 10 mA und 4°C durchgeführt [Laemmli, 1970]. Der Nachweis der Proteine erfolgt entweder durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R250 (Serva, Heidelberg) oder mit Silbernitrat [Sammons et al., 1981; Heukeshoven & Dernick, 1988].

Blotting

Gelelektrophoretisch getrennte Proteine werden auf eine spezielle PVDF-Membran (Millipore Cooperation, Bedford, USA) gemäß den Herstellerangaben mit der *Blotting*-Apparatur „Fastblot“ (Biometra, Göttingen) übertragen [Millipore, 1995]. Die Proteine werden auf der Membran immunologisch (Western-Blot) oder für anschließende Proteinsequenzierung durch Coomassie-Blue Färbung nachgewiesen [Towbin et al., 1979].

Immunologische Detektion von Proteinen

Für den immunologischen Nachweis von Proteinen wird die Membran nach dem *Blotting*-Vorgang mit BSA (2 %) in TBST-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7,5; 500 mM NaCl; 0,05 % Tween 20; 0,005% NaN₃) abgesättigt und anschließend mit dem Primärantikörper aus Kaninchen in TBST-Puffer (1:1000) über Nacht inkubiert. Nach drei Waschschritten wird die Membran 1 h mit einem mit Alkalischer Phosphatase konjugierten Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (Sigma, Deisenhofen) in TBST-Puffer (1:10000) geschüttelt. Die Farbreaktion wird mit 5-Brom-4-chlor-3-indoylphosphat (BCIP, Biomol, Hamburg) und Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT, Sigma, München) analog Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

Proteinsequenzierung

Die auf die PVDF-Membran transferierten und mit Coomassie-Blue angefärbten Proteine können durch den automatisierten Edman-Abbau sequenziert werden [Edman & Begg, 1967]. Die Sequenzierung wird mit dem Protein Sequencer 810/910 (Knauer, Berlin) durchgeführt (S. Grabolle, M.-O. Luther, K. Köster und K. Böker, Biochemie I, Universität Bielefeld).

Ultrafiltration

Die Lösung wird bei 4°C in Amicon-D2 Ultrafiltrationskammern (Amicon, Beverly, USA) mit 3 bar Stickstoffatmosphäre durch YM3-Membranen (Amicon, Beverly, USA) mit einer Ausschlussgrenze von 3 kDa gepresst.

Nachweis der Aktivität durch Zymographie

Bei dieser Methode wird ein Substrat für Proteinasen wie Casein oder Gelatin in ein Polyacrylamidgel einpolymerisiert. Nach elektrophoretischer Trennung der zu analysierenden Probe unter nichtdenaturierenden Bedingungen wird das Gel im Puffer Z (20 mM Tris/HCl pH 7,5; 0,2 M NaCl; 10 mM CaCl₂; 0,005 % Triton X-100) bei 37°C inkubiert. Nach Coomassie-Blue Färbung erscheinen die durch die aktiven Proteinasen fragmentierten Substrate als helle Banden auf dem blau gefärbten Hintergrund [Heussen & Dowdle, 1980]. Die Zymogramme werden nach etablierter Vorschrift mit Gelatin (Sigma, Deisenhofen) und β-Casein (Fluka, Buchs, Schweiz) angefertigt [Kröger, 1998].

Aktivitätstest mit Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂

Verschiedene MMPs spalten das synthetische Substrat, (7-Methoxycoumarin-4-yl)acetyl-Pro-Leu-Gly-Leu-(3-[2,4-dinitrophenyl]-L-2,3-diaminopropionyl)-Ala-Arg-NH₂ (Mca-Peptid; Calbiochem, Bad Soden), an der Gly-Leu Bindung [Knight et al., 1992]. Die Messung erfolgt mit dem Fluoreszenzphotometer LS 50 B (Perkin Elmer, Überlingen) bzw. Spectra-Fluor Plus (Tecan, Crailsheim) bei einer Anregungswellenlänge von 328 bzw. 330 nm. Die Aktivität der Enzyme wird durch die Zunahme der Intensität der Emissionswellenlänge von 398 bzw. 405 nm über 90 s nachgewiesen. Enzymkonzentrationen werden im nanomolaren und 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 Puffer M (25 mM Tris/HCl pH 7,0; 0,1 M NaCl; 5 mM CaCl₂; 0,1 mM ZnCl₂) bei 25°C durchgeführt.

Die Hemmung dieser Mca-Peptid Spaltung durch MMPs wird mit TIMP-1, *bovine* TIMP-2 und der inhibitorischen Domäne von TIMP-4 durch *active site*-Titration bestimmt. Die Messungen erfolgen analog Stratmann (2000) und die IC₅₀-Werte werden nach Ermittlung der Restaktivität mit Hilfe des Programmes „GraFit 4.06“ (Erithacus Software, Surrey, England) berechnet.

MALDI-TOF-MS-Untersuchungen

Die Spaltprodukte des Mca-Peptids und der Substanz P werden nach Inkubieren mit der MMP-12 für 15 Minuten bei 37°C mit Hilfe der MALDI-TOF-MS-Untersuchung (*matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight - mass spectrometry*) identifiziert. Die Messung wird mit dem Bruker Biflex III Massenspektrometer (Bruker Daltonic, Bremen) durchgeführt (M.-O. Luther, Fakultät für Biologie, Universität Bielefeld).

Protein-Konzentrationsbestimmung

▪ Photometrische Bestimmung

Die Proteinkonzentrationen bei pH 7,0 wird bei 280 nm nach dem Lambert-Beer Gesetz mit folgender Formel für den Extinktionskoeffizienten bestimmt [Pace et al., 1995]:

$$\varepsilon [\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}] = (\text{Anzahl Tryptophan}) \cdot 5500 + (\text{Anzahl Tyrosin}) \cdot 1490 + (\text{Anzahl Cystin}) \cdot 125$$

$$\Rightarrow \varepsilon_{\text{KaDo-MMP-12}} = (3 \cdot 5500 + 7 \cdot 1490 + 0 \cdot 125) \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1} = 26930 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

▪ BCA-Test

Die Reduktion von Cu^{II} zu Cu^I durch Proteine mit anschließender photometrischer Bestimmung des Cu^I/Bicinchoninsäure-Komplexes bei 560 nm im Spectra-Fluor Plus (Tecan, Crailsheim) wird gemäß dem Herstellerprotokoll des BCA-Tests durchgeführt (Pierce, Oud-Beijerland, Niederlande). Für die quantitative Auswertung dient eine BSA-Lösung (0,0625 – 2 mg/mL) als Standard.

▪ *active site*-Titration

Die katalytische Domäne der MMP-12 wird von Batimastat durch einen 1:1 Komplex gehemmt. Deshalb kann die Konzentration an aktiver MMP-12 durch *active site*-Titration mit Batimastat (BB94, British Biotech) bestimmt werden [Stratmann, 2000].

Proteolytische Spaltung von Proteinen

▪ Fibrinogen

Fibrinogen (Sigma, München) wird im Verhältnis 10:1 mit der katalytischen Domäne der MMP-12 in einem Tris-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7,3; 100 mM NaCl; 5 mM CaCl₂; 0,1 mM ZnCl₂; 0,3 mg/mL Pefabloc[®] SC) bei 37°C inkubiert. Nach bestimmten Zeiten werden Proben entnommen und die Reaktion dieser Proben durch Aufkochen in Laemmli-Puffer mit 1 mM EDTA abgestoppt. Die Proben werden mittels SDS-PAGE und *Blotting* mit anschließender N-terminaler Sequenzierung analysiert [Hiller et al., 2000].

▪ Faktor XII und Prothrombin

Die Spaltung von Faktor XII (ICN Biochemicals, Eschwege) bzw. Prothrombin (Sigma, München) durch die katalytische Domäne der MMP-12 und die anschließende Analyse der Proben verlaufen analog der Spaltung von Fibrinogen. Der Tris-Puffer wird jedoch ohne Pefabloc[®] SC verwendet [Hiller et al., 2000]. Zusätzlich wird der Spaltungsansatz des Prothrombins auf Thrombinaktivität mit dem spezifischen, synthetischen Substrat S-2238 (Chromogenix, Mölndal, Schweden) nach Herstellerangaben überprüft [Rosing et al., 1980].

▪ *myelin basic protein* (MBP)

Das MBP (Fluka, Steinheim) wird im Tris-Puffer (5 mM Tris/HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 5 mM CaCl₂) mit der katalytischen Domäne der MMP-12 im Verhältnis 20:1 bei 37°C inkubiert. Die weitere Durchführung erfolgt analog der Spaltung von Fibrinogen.

Funktionelle Fibrinogenbestimmung

Bei diesem Gerinnungstests wird der Gehalt an funktionellem Fibrinogen in einer Probe bestimmt. Dafür wird eine Fibrinogenspaltung durch aktive MMP-12 zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit Batimastat abgestoppt. Diese Probelösungen werden 1:4 mit Owren's Puffer (Dade[®], Florida, USA) verdünnt und 200 µL davon in das rotierende Reaktionsgefäß des Kugelkoagulometers (Amelung Modul 17, KC 10, Amelung GmbH, Lemgo) pipettiert und dort für 3 Minuten bei 37 °C vorinkubiert. Durch anschließende Zugabe von 200 µL Thrombinlösung (90 NIH-Units/mL (Dade[®], Florida, USA)) wird die Gerinnung initiiert. Da die Gerinnungszeit nun im Wesentlichen von der Fibrinogen-Konzentration abhängig ist, kann durch Messung der Zeitdauer zwischen Thrombin-Zugabe und Gerinnungsendpunkt auf die Konzentration an funktionellem Fibrinogen rückgeschlossen werden. Die Berechnung erfolgt auf Basis einer zuvor erstellten Eichkurve.

Herstellung polyklonaler Antikörper

Für die Immunisierung wird zum einen ein an den Träger KHL (keyhole limpet hemocyanin) gekoppeltes, 14 Aminosäuren umfassendes Peptid (TYKYVDINTFRLSA) aus der katalytischen Domäne der humanen MMP-12 und zum anderen die katalytische Domäne direkt eingesetzt (Pineda, Berlin). Es erfolgen vier intradermale Injektionen am 1., 62., 100. und 115. Tag, wobei jeweils 0,5 mg als Antigen verwendet werden. Die Serumgewinnung erfolgt nach dem 90. und 115. Tag.

Antikörperreinigung durch Affinitäts-Chromatographie

Die IgG-Antikörper werden mit Hilfe der Protein A-Sepharose (Pharmacia, Uppsala, Schweden) aus dem Serum isoliert. Dafür wird 1 mL partikelfreies Serum mit 9 mL Bindungspuffer (0,14 M Na₂HPO₄ pH 8,0) verdünnt und in einem Säulenkörper mit 1,5 mL Protein A-Sepharose bei 4°C 1,5 h langsam gedreht. Nicht gebundene Proteine werden durch Waschen mit 50 mL Bindungspuffer entfernt. Die Elution der gebundenen Antikörper erfolgt mit 10 mL Elutionspuffer (0,2 M Glycin/HCl pH 2,7). Das Eluat wird in Neutralisierungspuffer (1 M K₂HPO₄ pH 8,0) aufgefangen und bei 4°C dreimal mindestens drei Stunden gegen H₂O_{bidest} dialysiert und anschließend lyophilisiert. Die Antikörper werden bei -20°C gelagert.

Antikörperreinigung durch Immunoaffinitäts-Chromatographie

Für die Immunoaffinitäts-Chromatographie wird das entsprechende Antigen an CH-aktivierte Sepharose 4B (Pharmacia, Uppsala, Schweden) nach Herstellerangaben gekoppelt. In einem Säulenkörper werden 1,5 mL äquilibriertes Säulenmaterial mit 3-4 mg Protein A gereinigte Antikörper in 10 mL PBS-Puffer (140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄ pH 7,3) 1,5 Stunden bei 4°C langsam gedreht. Die nachfolgenden Schritte entsprechen der Antikörperreinigung durch Affinitäts-Chromatographie, es wird jedoch statt Bindungspuffer PBS-Puffer verwendet.

Konjugation von Antikörpern mit Meerrettich-Peroxidase

Die Kopplung der Meerrettich-Peroxidase an polyklonale Antikörper erfolgt nach einer Methode von Tijssen und Kurstak (1984). Diese Methode wird in abgewandelter Form verwendet und die Durchführung verläuft analog Oberpichler (1999). Dabei wird Meerrettich-Peroxidase (Boehringer Mannheim, Mannheim) eingesetzt und die konjugierten Antikörper in 250 µL PBST-Puffer und 250 µL Glycerin bei -20°C gelagert.

Konjugation von Antikörpern mit Biotin

Zur Kopplung werden 5 mg Antikörper in 500 μL PBS-Puffer (180 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH 8,5; 150 mM NaCl) gelöst und 0,5 mg Biotinyl- ϵ -amidocaprinsäure-N-hydroxy-succinimidester (Boehringer Mannheim, Mannheim) in 50 μL DMSO zugegeben. Die Lösung wird 5 Stunden unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend gegen PBS-Puffer bei Raumtemperatur dialysiert. Das Konjugat wird nach Zugabe von 0,05 % NaN_3 bei 4°C gelagert.

Bestimmung von Antikörpertitern

Die einzelnen Chargen der Antikörper enthaltenden Seren werden mit Hilfe der Titerbestimmung miteinander verglichen. Hierfür wird ein indirekter ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) nach etablierter Vorgehensweise verwendet [Bläser, 1994]. Im Folgenden sind die Modifizierungen der einzelnen Schritte aufgeführt. Als Antigen wird Ala^{219} -KaDo der MMP-12 eingesetzt. Für die Immobilisierung des Antigens wird eine Antigenlösung mit einer Konzentration der Ala^{219} -KaDo von 100 ng/mL in Carbonat-Puffer (100 mM $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ pH 9,6) eingesetzt. Die Antiseren werden ausgehend von einer Verdünnung von 1:10000 in 12 Stufen immer 1:1 in PBS-Puffer mit 2 % BSA (w/v) verdünnt. Als Detektionsantikörper wird der Peroxidase konjugierte Ziege-anti-Kaninchen-IgG (dianova, Hamburg) 1:2500 in PBS-Puffer mit 2 % BSA verwendet. Die Färbung erfolgt mit $\text{ABTS}/\text{H}_2\text{O}_2$ in Citrat-Puffer (80 mM Citronensäure pH 4,2; 110 mM Na_2HPO_4 ; 0,05 % Triton X-100 (w/v)) und die Absorption wird bei 405 nm im Spectra-Fluor Plus (Tecan, Crailsheim) bestimmt.

Als Antikörpertiter wird die Verdünnungsstufe definiert, bei der die OD um die 3-fache Standardabweichung des Leerwertes oberhalb des Leerwertes liegt.

Sandwich-ELISA

Die Mikrotiterplatte wird mit 100 μL einer Antikörperlösung (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in Carbonat-Puffer) je Well über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit PBST-Puffer (33 mM NaH_2PO_4 pH 7,4; 146 mM Na_2HPO_4 ; 150 mM NaCl; 0,05 % (w/v) Tween 20) werden freie Bindungsstellen durch Inkubation mit 250 μL in Block-Puffer (PBST-Puffer mit 2 % BSA (w/v)) je Well für 1,5 Stunden bei 37°C blockiert. Die Platte wird zweimal mit PBST-Puffer gewaschen und 100 μL der Proben und des Standards pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach vier Waschschritten mit PBST-Puffer werden 100 μL des Detektionsantikörpers in PBS-Puffer mit 2 % BSA in die Platte gegeben und 1-2 Stunden bei Raum-

temperatur inkubiert. Zum einen wurde Meerrettich-Peroxidase und zum anderen Biotin konjugierter Kaninchen-anti-Ala²¹⁹-KaDo-MMP-12 als Detektionsantikörper eingesetzt. Nach sechsmaligem Auswaschen mit PBST-Puffer wird die Färbung mit dem ABTS/H₂O₂-System wie bei der Titerbestimmung oder dem TMB-System (KPL, Gaithersburg, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Bei Verwendung des Biotin-konjugierten Antikörpers erfolgt nach Auswaschen des Detektionsantikörpers eine weitere Inkubation mit 100 µL des Streptavidin-Peroxidase-Konjugates in PBS-Puffer mit 2 % (w/v) BSA je Well für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur vor Durchführung der Färbung.

Kompetitiver ELISA

Eine Mikrotiterplatte (Platte A) wird mit 100 µL Ala²¹⁹-KaDo der MMP-12 in Carbonat-Puffer (75 ng/mL) und eine weitere (Platte B) mit 250 µL Block-Puffer über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach vier Waschschritten mit PBST-Puffer wird in die Wells der Platte B 100 µL der Proben und des Standards pipettiert. Hierzu werden 50 µL der Antikörperlösung (2 µg/mL Kaninchen-anti-Ala²¹⁹-KaDo-MMP-12 in PBS-Puffer mit 2 % (w/v) BSA) gegeben und die Platte B 2 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Parallel dazu werden nach viermaligen Waschen freie Bindungsstellen der Platte A mit 250 µL Block-Puffer je Well bei 37°C für 1,5 Stunden blockiert. Anschließend wird die Platte A viermal mit PBST-Puffer gewaschen und 100 µL der einzelnen Wells der Platte B auf die Platte A übertragen. Nach Inkubation über Nacht bei 4°C erfolgt die Detektion und Färbung wie bei der Titerbestimmung.

Auswertung der ELISA-Daten

Die ELISA Messdaten werden mit Hilfe des Programm „easyWIN fitting Version V6.1“ (Tecan, Crailsheim) ausgewertet. Die Standardkurve wird mit folgender vier Parameter Gleichung bestimmt:

$$y = D + \frac{A - D}{1 + \left[\frac{x}{C}\right]^B}$$

mit A, B, C und D als Parameter.

Anschließend kann mit den vier Parametern die Konzentration bei einer bestimmten OD ermittelt werden.

4.3 Immunhistochemische Untersuchungen

Gewebeproben

Es werden Proben von unterschiedlichen Geweben untersucht. Diese sind mit den jeweiligen Eigenschaften in der folgenden Tabelle (Tab. 3) zusammengefasst.

Tab. 3: Für die immunhistochemischen Untersuchungen eingesetzten Gewebe.

Gewebe	Pathologischer Befund	Anzahl	Vorbehandlung
Haut	keiner	2	Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet
	Ekzem	3	Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet
	Lupus erythematodes	2	Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet
	Dermatitis herpetiformis	2	Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet
	Vaskulitis	1	Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet
	Lepra lepromatosa	1	Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet
Fett- und Bindegewebe	Rheumaknoten	2	Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet
synoviales Bindegewebe	Rheumatismus nodosus	2	Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet
Milz	keiner	2	Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet
Arterie	keiner	2	Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet
Lunge	keiner	2	Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet
Dickdarm	keiner	2	Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet
Myokard	keiner	2	Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet
Niere	keiner	1	Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet
Dünndarm	keiner	1	Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet
Pankreas	keiner	1	Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet
Rückenmark (Maus)	keiner	2	Kryostatschnitt
Rückenmark (Maus)	wobbler Maus	2	Kryostatschnitt

Die Gewebeproben wurden von der pathologischen und neuropathologischen Abteilung der Krankenanstalten Bethel (Bielefeld), der Arbeitsgruppe Jokusch (Fakultät Biologie, Universität Bielefeld) und der Pathologie der Hautklinik Münster zur Verfügung gestellt.

Vorbereitung der Gewebeproben

Die Kryostatschnitte der Rückenmarkproben der Mäuse wurden auf Objektträger aufgezogen und nach Auftauen direkt für die Färbung eingesetzt.

Von den Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebestücken werden mit dem Mikrotom (DMRE, Leica, Wetzlar) 4 µm dünne Schnitte angefertigt und je nach Größe zwei bis drei Cluster auf einen beschichteten Objektträger aufgezogen und bei 52°C getrocknet.

Das Einbettungsmedium wird durch dreimaliges Eintauchen (15, 10, 10 min) in Xylol entfernt. Das Xylol wird durch Inkubation für jeweils 10 Minuten in nacheinander folgend 100, 70 und 2 mal 40 % Ethanol und anschließend PBS-Puffer (10 mM Na₂HPO₄ pH 7,2) für jeweils 10 Minuten abgewaschen. Zur Demaskierung werden die Proben zwei Minuten in Citrat-Puffer (10 mM Natriumcitrat, pH 6,0) im Schnellkochtopf bei Maximaldruck gekocht. Nach dem Abkühlen werden die Proben entnommen und unter fließendem Wasser und anschließend in TBS-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,6; 150 mM NaCl) gespült. Die einzelnen Cluster werden mit einem PAP-Stift (DAKO, Kopenhagen, Dänemark) umrandet und können für die Färbung eingesetzt werden.

Färbung

Die Schnitte werden fünf Minuten in ca. 100 µl TBS-Puffer und anschließend 30 Minuten in ca. 100 µl TBS-Puffer mit 2 % BSA und 3 % FCS inkubiert. Alle Inkubationen erfolgen in einer feuchten Kammer (Biorad, München) bei Raumtemperatur. Nach „Abklopfen“ der Lösung wird jeweils ein Cluster mit ca. 150 µl Primärantikörper gegen MMP-12 (Kaninchen-anti-Ala²¹⁹-KaDo-MMP-12, Pineda, Berlin) 1:50 verdünnt mit TBS-Puffer mit 5 % BSA für 60 Minuten inkubiert. Ein weiterer Cluster wird mit Maus-anti-CD68 Antikörper (DAKO) 1:50 verdünnt und ein dritter mit Präimmenserum behandelt. Nicht gebundener Antikörper wird durch „Abklopfen“ der Antikörper Lösung und durch zweimal fünfminütiges Waschen in TBS-Puffer entfernt. Nach Auftropfen von 1-2 Tropfen der Sekundärantikörper Lösung (DAKO) werden die Schnitte 15 Minuten inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wird wie vorher beschrieben entfernt. Anschließend werden die Schnitte für 15 Minuten mit 1-2 Tropfen der Strept-AB-Komplex Lösung (DAKO) inkubiert. Die Entfernung der Lösung erfolgt durch dreimal fünfminütiges Waschen mit TBS-Puffer. Für die Anfärbung werden die Proben mit jeweils ca. 100 µL „Fuchsin Plus Substrat-System“ (DAKO) fünf Minuten inkubiert. Diese Substrat Lösung wird mit 1 Tropfen Levamisol (DAKO) pro Milliliter versetzt, um eventuell vorhandene endogene Alkalische Phosphatase Aktivität zu inaktivieren [Ponder et al., 1981]. Anschließend werden die Objektträger zweimal mit H₂O_{bidest} gewaschen und 75 Sekunden mit Hämatoxilin (DAKO) gefärbt, welches unter fließendem Wasser abgespült wird. Nach kurzem Trocknen werden die Schnitte mit dem wässrigen Eindeckmedium Aquatex (Merck, Darmstadt) eingedeckt. Die mikroskopische Auswertung erfolgt mit dem Mikroskop RM 2155 (Leica, Wetzlar) unter Verwendung der Software DC-Viewer (Leica, Wetzlar).

4.4 Bakterienstämme und Vektoren

Escherichia coli-Stämme

Es werden *E. coli*-Stämme verwendet, die als Sicherheitsstämme bezeichnet werden, da sie Mutationen in Proteinen des Aminosäure-Stoffwechsels besitzen. Sie benötigen Vollmedien zum Wachsen, wodurch ein Überleben außerhalb des Genlaboratoriums unmöglich ist. Den *E. coli*-Stämmen fehlt der Fertilitätsfaktor F, weshalb kein konjugativer Gentransfer zwischen Bakterienstämmen stattfinden kann. Weiterhin weisen die Stämme eine Rekombinationsdefizienz auf, wodurch die Rekombination von chromosomaler DNA mit Plasmid DNA ausgeschlossen wird. Die verwendeten *E. coli*-Stämme sind phänotypisch antibiotikassensitiv (Ampicillin). Die Genotypen sind in der folgenden Tabelle (Tab. 4) aufgeführt.

Tab. 4: Genotypen der verwendeten *E. coli*-Stämme.

Stamm	Genotyp
TOP10	F' <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Δ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacZX74 deoR recA1 AraD139 Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i></i>
XL1-Blue	F' Tn 10 <i>proA⁺B⁺ lacI^q</i> Δ (<i>lacZ</i>) M15/ <i>recA1 endA1 gyrA96</i> (Nal ^r) <i>thi hsdR17</i> (<i>r_K⁻m_K⁺</i>) <i>supE44 relA1 lac</i>
BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) <i>gal dcm</i> (DE3)

Der mit dem „TOPO TA Cloning[®] Kit“ (Invitrogen, Leek, Niederlande) gelieferte *E. coli*-Stamm TOP10 ermöglicht eine Insertionskontrolle durch den X-Gal-Test unter Verwendung des pCR[®]2.1 TOPO Vektors.

Der *E. coli*-Stamm XL1-Blue wird für die Transformation von Ligationsansätzen und Plasmidanreicherungen eingesetzt.

Für die Expression rekombinanter Proteine wird der *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) in Verbindung mit den pET-Vektoren eingesetzt. Der Stamm BL21 (DE3) verfügt durch Integration der DNA des lysogenen Phagen λ -DE3 über das T7 RNA-Polymerase-Gen, dessen Transkription durch den *lacUV5*-Promotor kontrolliert wird. Die Transkription dieses Gens wird durch Zugabe von IPTG induziert. Die pET-Vektoren besitzen einen T7-Promotor, der von der T7 RNA-Polymerase erkannt wird. Damit wird die Transkription der klonierten cDNA gestartet, und infolgedessen die Expression des rekombinanten Proteins induziert. Diese Fremdproteine werden durch die *Ion*- und *ompT*-Proteinase Defizienz des BL21 (DE3) Stammes vor Degradierung geschützt.

pCR[®]2.1 TOPO

Der pCR[®]2.1 TOPO Vektor wird für die „TOPO TA“-Klonierung eingesetzt. Durch den Vektor wird Ampicillin- und Kanamycinresistenz vermittelt, und durch ein Fragment des *lacZα*-Gens wird α -Komplementation ermöglicht (Abb. 5). Die Insertionsstelle befindet sich im *lacZα*-Gen, wodurch eine Insertionskontrolle durch Blau-Weiß-Selektion auf X-Gal-haltigen Nährböden möglich ist (X-Gal-Test).

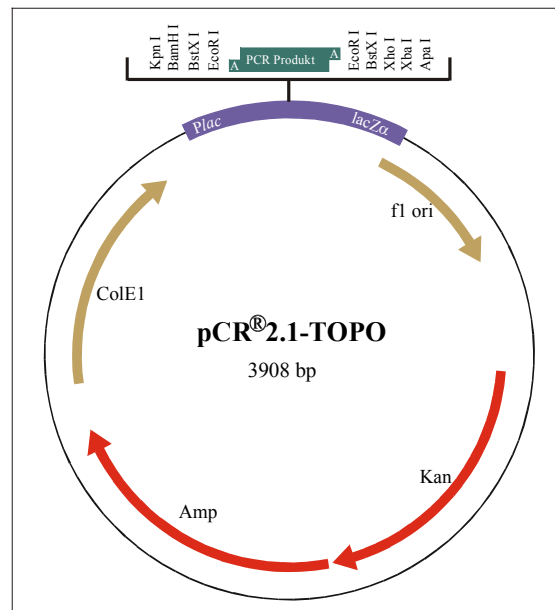


Abb. 5: Karte des Vektors pCR[®]2.1 TOPO.

- ColE1 ori : Replikationsursprung des Plasmids;
- Plac : lac Promotor;
- lacZ α : *lacZ α* Fragment;
- F1 ori : f1 Replikationsursprung für Mutagenese und Einzelstrangsequenzierung;
- Kan : Kanamycinresistenzgen;
- Amp : Ampicillinresistenzgen.

pET-Vektoren

Die Vektoren pET11a (Abb. 6) und pET12b (Abb. 7) ermöglichen die Klonierung und Expression rekombinanter Proteine mit den *E. coli*-Stämmen BL21 (DE3). Die Vektoren verfügen über ein β -Lactamase-Gen, das transformierten *E. coli*-Stämmen Ampicillinresistenz vermittelt, so dass eine Selektion möglich wird. Weiterhin besitzen die pET-Vektoren einen T7-Promotor, der von der T7 RNA-Polymerase erkannt wird und für eine Transkriptionskontrolle genutzt wird.

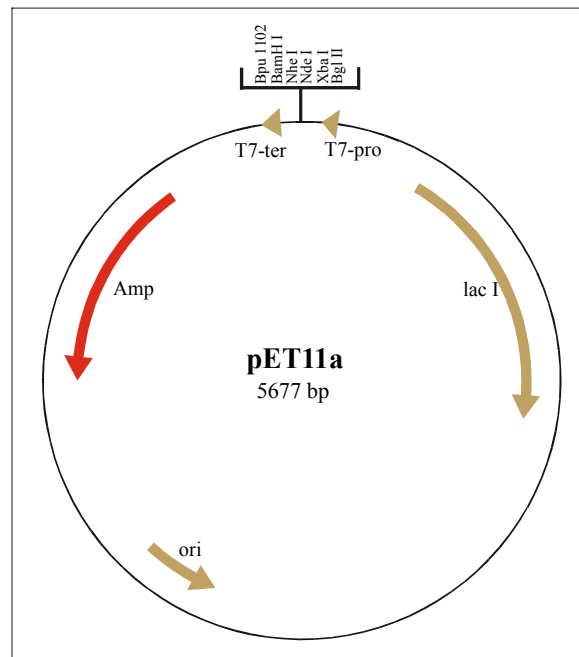


Abb. 6: Karte des Vektors pET11a.

ori : Replikationsursprung des Plasmids;
 Amp : Ampicillinresistenzgen;
 T7-ter : T7 Terminator;
 T7-pro : T7 Promotor;
 lac I : lac-Repressor.

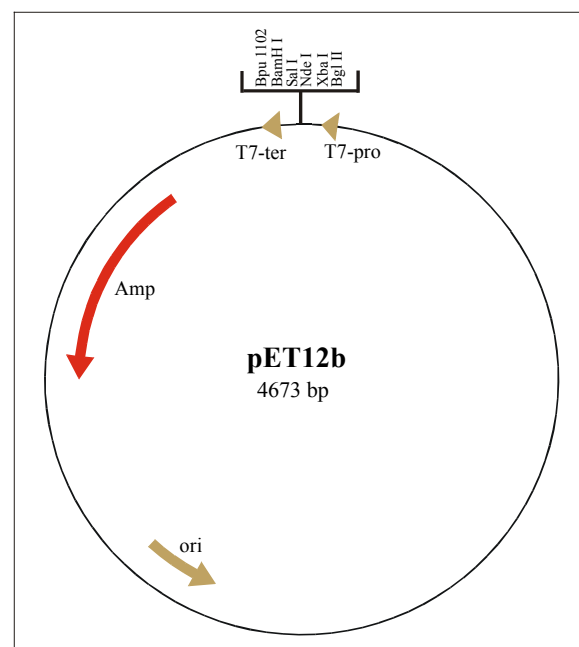


Abb. 7: Karte des Vektors pET12b.

ori : Replikationsursprung des Plasmids;
 Amp : Ampicillinresistenzgen;
 T7-ter : T7 Terminator;
 T7-pro : T7 Promotor.

5 Ergebnisse

Die Nukleinsäuresequenz der humanen Makrophagenelastase (MMP-12) wurde zum ersten Mal 1993 beschrieben [Shapiro et al., 1993]. Zu Beginn der molekularbiologischen Arbeiten wurde diese mit den Sequenzen anderer Matrix Metalloproteinasen verglichen. Danach erfolgte die Einteilung der cDNA in die Bereiche für einzelne Domänen [Takino et al., 1995]. Demnach beginnt das Propeptid mit Leu¹⁷ und die katalytische Domäne (KaDo) umfasst den Bereich Phe¹⁰⁰ bis Gly²⁶³ (Abb. 8).



Abb. 8: Einteilung der Aminosäuresequenz in die einzelnen Domänen der MMP-12 nach Takino et al. 1995.

Als Ausgangsmaterial standen die cDNA der katalytischen Domäne im Vektor pET11a sowie die cDNA der katalytischen Domäne mit Propeptid (ProKaDo) im Vektor pET12b zur Verfügung [Kocourek, 1998]. Sie wurden durch Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion aus der Gesamt-RNA der Chondrosarkom-Zelllinie SW 1353 dargestellt.

5.1 Klonierungen

RNA-Isolierung aus Plazentagewebe

Die mRNA der humanen Makrophagenelastase konnte bereits durch Northern-Blots im Plazentagewebe nachgewiesen werden [Belaouaj et al., 1995]. Aus diesem Grund wurde die Gesamt-RNA aus Plazentagewebe isoliert. Um den Erfolg der Präparation zu überprüfen, wurde die erhaltene RNA-Probe in einem Formaldehyd-Agarosegel analysiert (Abb. 9).

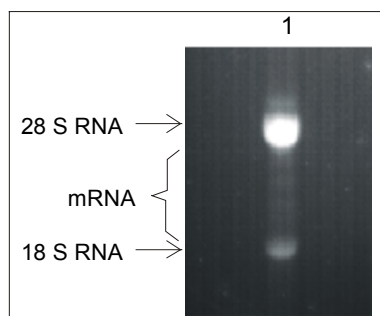


Abb. 9: Überprüfung der Gesamt-RNA-Isolierung.

Bahn 1: Gesamt-RNA aus Plazentagewebe.

In der Abbildung 9 ist die mRNA als heller Bereich zwischen den deutlichen Banden der ribosomalen RNA zu erkennen.

Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion

Die isolierten mRNA-Fragmente wurden mit Hilfe einer unspezifischen Reversen Transkription in entsprechende cDNA umgeschrieben. Als Positivkontrolle der Reaktion eignete sich die Polymerase-Kettenreaktion mit den Primern bFor1 und bRev1, wobei ein Teil der β -Actin-cDNA (838 bp) amplifiziert wurde (Abb. 10).

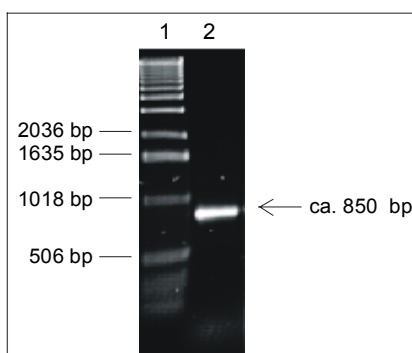


Abb. 10: Positivkontrolle der Reversen Transkription.

Bahn 1: 1 kb DNA Leiter;

Bahn 2: Fragment der β -Actin cDNA aus Plazentagewebe.

Im Anschluss wurde die bei der Reversen Transkription synthetisierte cDNA für mehrere PCRs mit verschiedenen Primer-Kombinationen eingesetzt. Die Amplifizierung der cDNA der katalytischen Domäne (KaDo, ca. 510 bp) bzw. der katalytischen Domäne mit Propeptid (ProKaDo, ca. 850 bp) gelang mit den Primern KaDo1.F und ProKaDoHME.R bzw. ProHME.F und ProKaDoHME.R (Abb. 11A). Diese cDNA-Amplifikate wurden mit Hilfe des „TOPO TA Cloning® Kits“ (Invitrogen, Leek, Niederlande) mit dem Vektor pCR®2.1 TOPO ligiert und anschließend erfolgreich in die entsprechenden *E. coli* Expressionsvektoren kloniert (Abb. 11B).

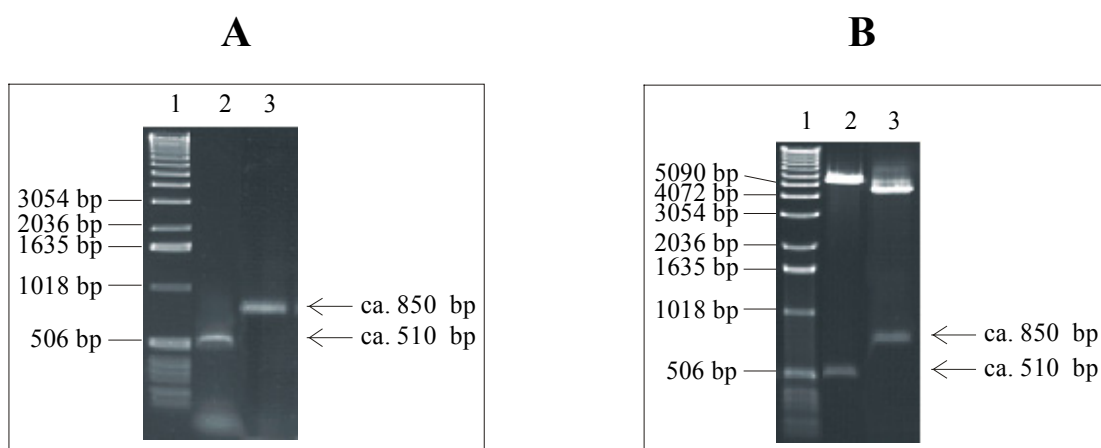


Abb. 11: PCR-Amplifikat-Analyse;

Bahn 1: 1 kb DNA Leiter;
Bahn 2: cDNA der MMP-12 KaDo;
Bahn 3: cDNA der MMP-12 ProKaDo.

Restriktionsanalyse.

Bahn 1: 1 kb DNA Leiter;
Bahn 2: pET11a-KaDo (*NdeI/BamHI*);
Bahn 3: pET12b-ProKaDo (*NdeI/BamHI*).

Die Sequenzierung der jeweiligen cDNA wies zwei Mutationen für die KaDo (T714C und T741C) und eine weitere für die ProKaDo (G114A) im Vergleich zur veröffentlichten Sequenz auf [Shapiro et al., 1993]. Da die Mutationen jeweils die dritte Base betrafen, änderte sich die abgeleitete Aminosäuresequenz nicht.

Somit wurden die mRNA der KaDo und ProKaDo der MMP-12 erfolgreich aus Plazentagewebe isoliert. Weiterhin konnten die entsprechenden *E. coli* Expressionssysteme generiert werden.

Austausch der Aminosäure Glutamat 219 gegen Alanin

Das Plasmid pET11a-KaDo diente als Template für eine Mutagenese-PCR. Bei dieser zielgerichteten PCR wurden die Primer KaDoEA1.F und KaDoEA2.R verwendet. Die dadurch kodierte DNA-Sequenz wies nach Translation den entsprechenden Aminosäureaustausch von Glutamat 219 zu Alanin auf. Nach der PCR wurde die parentale DNA im PCR-Ansatz durch Behandlung mit der Endonuklease Dpn I (Stratagene, Heidelberg) abgebaut und die Qualität des Produktes im Agarosegel überprüft (Abb. 12).

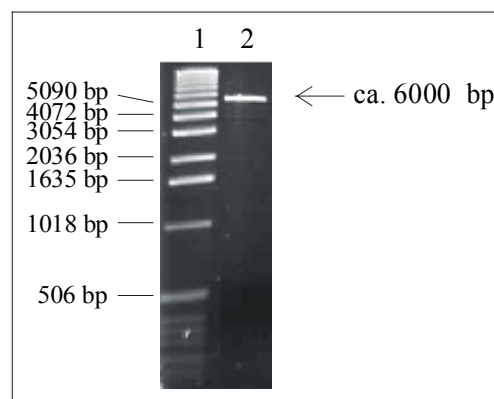


Abb. 12: PCR-Amplifikat-Analyse nach Dpn I Behandlung.

Bahn 1: 1 kb DNA Leiter;
 Bahn 2: pET11a-Ala²¹⁹-KaDo.

Wie die Abbildung 12 zeigt, wurde die erwartete cDNA mit einer entsprechenden Größe von ca. 6000 bp erfolgreich amplifiziert. Anschließend wurden kompetente *E. coli* XL1 blue-Zellen mit dem Amplifikat transformiert, die Plasmide isoliert und zur DNA-Sequenzierung eingesetzt. Diese bestätigte die gewünschte Mutation, woraufhin *E. coli*-Zellen des Expressionsstammes BL21 (DE3) mit dem Plasmid pET11a-Ala²¹⁹-KaDo transformiert wurden. Damit konnte im weiteren Verlauf der Arbeit die Ala²¹⁹-KaDo der MMP-12 exprimiert werden.

5.2 Expression und Reinigung der rekombinanten Proteine

Katalytische Domäne der MMP-12 mit und ohne Mutation

Im Folgenden wird exemplarisch die Expression und Reinigung der KaDo der MMP-12 ohne Mutation dargestellt, da hierbei die gleichen Ergebnisse wie für die Ala²¹⁹-KaDo erhalten wurden. Die Expression der katalytischen Domäne der MMP-12 wurde mit Hilfe des *E. coli*-Stammes BL21 (DE3) durchgeführt, der zuvor mit dem Plasmid pET11a-KaDo transformiert wurde. Aufgrund der cDNA-Sequenz der MMP-12 KaDo wurde die Expression eines Proteins von ca. 20 kDa erwartet. Dieses konnte anhand der Gelelektrophorese bestätigt werden (Abb. 13).

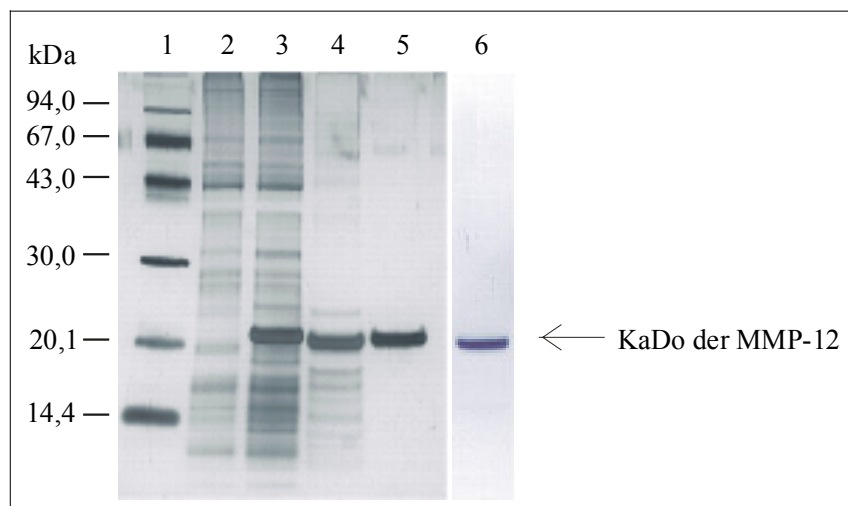


Abb. 13: Expression und Reinigung der KaDo der MMP-12.

- Bahn 1: LMW-Marker;
- Bahn 2: Kulturprobe vor Induktionsstart;
- Bahn 3: Kulturprobe 3 h nach Induktion;
- Bahn 4: Probe nach Faltung;
- Bahn 5: Probe nach Affinitätschromatographie;
- Bahn 6: Western-Blot.

Die *inclusion bodies* der transformierten BL21 (DE3) Zellen wurden nach Zell-Lyse in Lysozym-haltigem Aufschlusspuffer isoliert und nach mehreren Waschschritten vollständig in i.b.-Puffer gelöst. Die katalytische Domäne der humanen Makrophagenelastase konnte anschließend durch Dialyse gegen Nativpuffer gefaltet und mit Hilfe der Affinitätschromatographie bis zur Homogenität gereinigt werden. Dies wurde durch SDS-PAGE und Western-Blot bestätigt (Abb. 13). Damit standen die katalytischen Domänen der MMP-12 mit und ohne Mutation für weitere Versuche zur Verfügung.

Katalytische Domäne der MMP-12 mit Propeptid

Zur Expression der ProKaDo der MMP-12 wurde das Expressionssystem BL21 (DE3) mit pET12b-ProKaDo verwendet. Vor (0 h) und 3 h nach Beginn der Induktion der Expression wurden 1 mL-Proben zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Laemmli-Puffer aufgekocht und die exprimierten Proteine durch SDS-PAGE mit Silberfärbung analysiert (Abb. 14). Die Überexpression eines Proteins mit der erwarteten Größe von ca. 30 kDa ist deutlich zu erkennen.

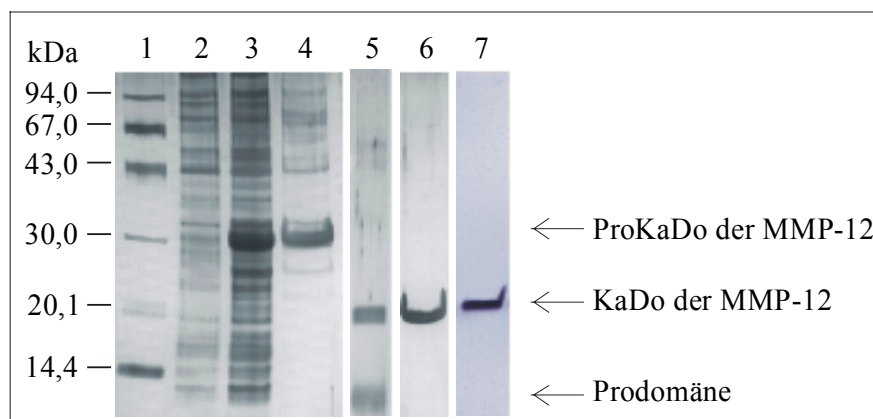
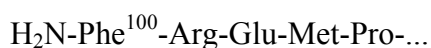


Abb. 14: Expression und Reinigung der ProKaDo der MMP-12.

- Bahn 1: LMW-Marker;
- Bahn 2: Kulturprobe vor Induktionsstart;
- Bahn 3: Kulturprobe 3 h nach Induktion;
- Bahn 4: Probe in i.b.-Puffer;
- Bahn 5: Probe nach Faltung;
- Bahn 6: Probe nach Affinitätschromatographie;
- Bahn 7: Western-Blot.

Die ProKaDo wurde in Form von *inclusion bodies* in *E. coli* abgelagert. Diese wurden nach Zell-Lyse und mehreren Waschschrinen vollständig in i.b.-Puffer gelöst. Die Faltung des Proteins erfolgte durch Dialyse gegen Nativpuffer. Die anschließende Analyse der Probe durch SDS-PAGE mit Silberfärbung ließ die autokatalytische Abspaltung der Prodomäne erkennen, so dass ein Protein mit einer Größe von ca. 20 kDa und ca. 12 kDa erhalten wurde. Durch Affinitätschromatographie konnte dieses Protein bis zur Homogenität gereinigt werden (Abb. 14). Im Western-Blot wurde dieses Protein von Kaninchen-anti-Ala²¹⁹-KaDo-MMP-12 Antikörpern erkannt (Bahn 7). Zusätzlich wurde der N-Terminus durch Sequenzierung bestimmt:



Bei diesem N-Terminus handelt es sich um den Beginn der katalytischen Domäne (Abb. 8).

N-terminale Sequenzierung der Expressionsprodukte

Die N-Termini der KaDo, Ala²¹⁹-KaDo und ProKaDo wurden nach SDS-PAGE und *Blotting* auf eine PVDF-Membran durch Proteinsequenzierung mit Hilfe des Edman-Abbaus bestätigt (Tab. 5). N-terminal wurde bei allen drei Expressionsprodukten durch das Start-Codon zusätzlich ein Methionin erhalten, welches nach Expression nicht prozessiert wurde.

Tab. 5: Vergleich der Proteinsequenzierungen mit Literatursequenzen [Takino et al., 1995].

Expressionssystem	Protein	N-terminale AS-Sequenz
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pET11a-KaDo	KaDo MMP-12	H ₂ N-M-F-R-E-M-P-G-G-P-V-
	Literatur	H ₂ N-F-R-E-M-P-G-G-P-V-
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pET11a-Ala ²¹⁹ -KaDo	Ala ²¹⁹ -KaDo MMP-12	H ₂ N-M-F-R-E-M-P-G-G-P-V-
	Literatur	H ₂ N-F-R-E-M-P-G-G-P-V-
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pET12b-ProKaDo	ProKaDo MMP-12	H ₂ N-M-L-P-L-N-S-S-T-S-L-
	Literatur	H ₂ N-L-P-L-N-S-S-T-S-L-

Wie im vorausgehenden Abschnitt beschrieben wurde, führte die Reinigung der ProKaDo zu einer katalytischen Domäne mit N-terminalem Phe¹⁰⁰. Deshalb werden die Varianten der KaDo im Folgenden mit den Bezeichnungen Met⁹⁹-KaDo, Phe¹⁰⁰-KaDo und Ala²¹⁹-KaDo unterschieden.

5.3 Aktivitätsuntersuchungen

Die Aktivität der Varianten der katalytischen Domäne der MMP-12 wurde anhand von Gelatin- und Casein-Zymogrammen überprüft (Abb. 15).

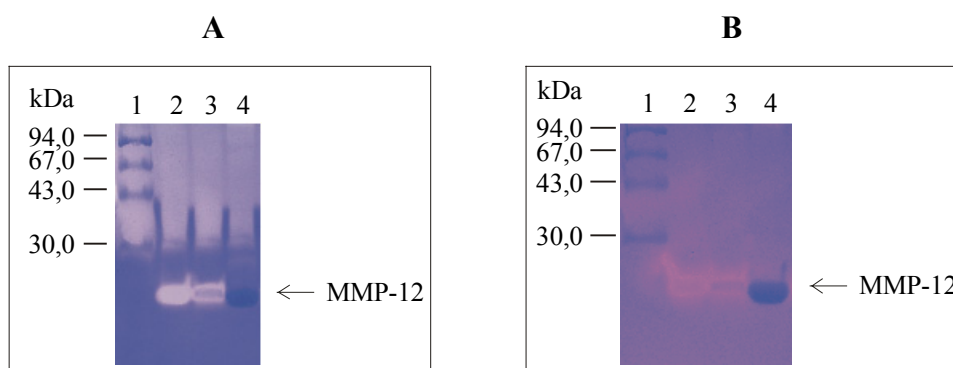


Abb. 15: Gelatin Zymogramm (A); Casein Zymogramm (B).

A und B: Bahn 1: LMW-Marker;
 Bahn 2: Met⁹⁹-KaDo der MMP-12;
 Bahn 3: Phe¹⁰⁰-KaDo der MMP-12;
 Bahn 4: Ala²¹⁹-KaDo der MMP-12.

Beide Zymogramme zeigen eindeutig die Aktivität der KaDo der MMP-12 mit und ohne N-terminalem Methionin. Die Variante der KaDo mit Alanin an Stelle von Glutamat im katalytischen Zentrum zeigte wie erwartet keine Aktivität.

Aktivitätstest mit Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂

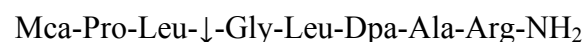
Das synthetische Mca-Peptid eignet sich besonders gut für fluoreszenzkinetische Untersuchungen der MMPs [Knight et al., 1992]. Zunächst wurde dieses Peptid mit den verschiedenen Varianten der KaDo der MMP-12 für 15 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend eine MALDI-TOF Messung durchgeführt. Das Ergebnis ist in der folgenden Abbildung (Abb. 16) für die KaDo mit N-terminalem Methionin gezeigt.

Fehler! Keine gültige Verknüpfung.

Abb. 16: MALDI-TOF Spektrum des Mca-Peptids nach Inkubation mit Met⁹⁹-KaDo der MMP-12.

→ Fragmente des Mca-Peptids, die anderen Banden konnten nicht zugeordnet werden.

In dem Spektrum sind Signale bei den Masse-Ladungs-Verhältnissen von 445,16 Da und 650,16 Da vorhanden. Diese Größen stimmen mit den Massen der zwei Fragmente Mca-Pro-Leu-NH₂ (444,5 Da) und Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂ (649,7 Da) überein. Somit wurde auf die Spaltung folgender Bindung geschlossen:



Das Spektrum der Spaltung des Mca-Peptids mit Phe¹⁰⁰-KaDo enthielt die gleichen Signale. Die Alanin-Mutante der KaDo der MMP-12 zeigte keine Aktivität.

Bestimmung der kinetischen Parameter K_M und k_{cat}/K_M

Die Spaltung des synthetischen Mca-Peptids kann über fluoreszenzkinetische Messungen quantitativ analysiert werden. Dafür wurde die Anfangsgeschwindigkeit der Substratspaltung v_0 über 90 Sekunden bei einem pH-Wert von 7,3 und einer Temperatur von 25°C ermittelt. Es wurden jeweils acht verschiedene Peptidkonzentrationen (0,25 – 1,75 μM) in Vierfachbestimmung eingesetzt. Die Aktivitätsmessungen wurden mit der rekombinanten KaDo mit und ohne N-terminalem Methionin durchgeführt. Die genaue Konzentration dieser aktiven Enzyme wurde mittels der *active site*-Titration mit Batimastat bestimmt. Für eine Umrechnung der Fluoreszenzeinheiten wurde eine Eichgerade mit verschiedenen Konzentrationen des Peptids Mca-Pro-Leu-NH₂ aufgenommen. Die erhaltenen Messwerte wurden in

einem Lineweaver-Burk-Diagramm aufgetragen. Mit Hilfe der linearen Regression ergab sich eine Gerade, aus deren Steigung sich die Michaelis-Menten-Konstante K_M berechnen ließ. In der folgenden Abbildung ist das mit der Met⁹⁹-KaDo erhaltene Lineweaver-Burk-Diagramm dargestellt (Abb. 17).

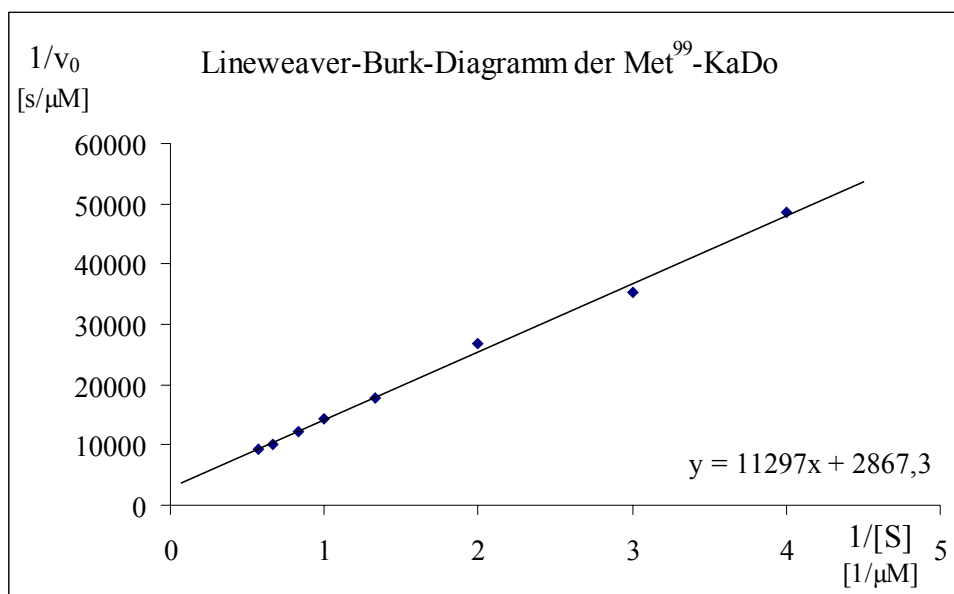


Abb. 17: Lineweaver-Burk-Diagramm der Met⁹⁹-KaDo.

Die eingesetzte Enzymkonzentration betrug $5,46 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}$.

Die Michaelis-Menten-Konstante für die Met⁹⁹-KaDo wurde aus der Geradengleichung berechnet: $K_M = 3,94 \mu\text{M}$. Damit wurde die Spezifitätskonstante $k_{\text{cat}}/K_M = 16,2 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ bestimmt.

Die folgende Abbildung zeigt die Auftragung für die kinetischen Untersuchungen der Phe¹⁰⁰-KaDo (Abb. 18).

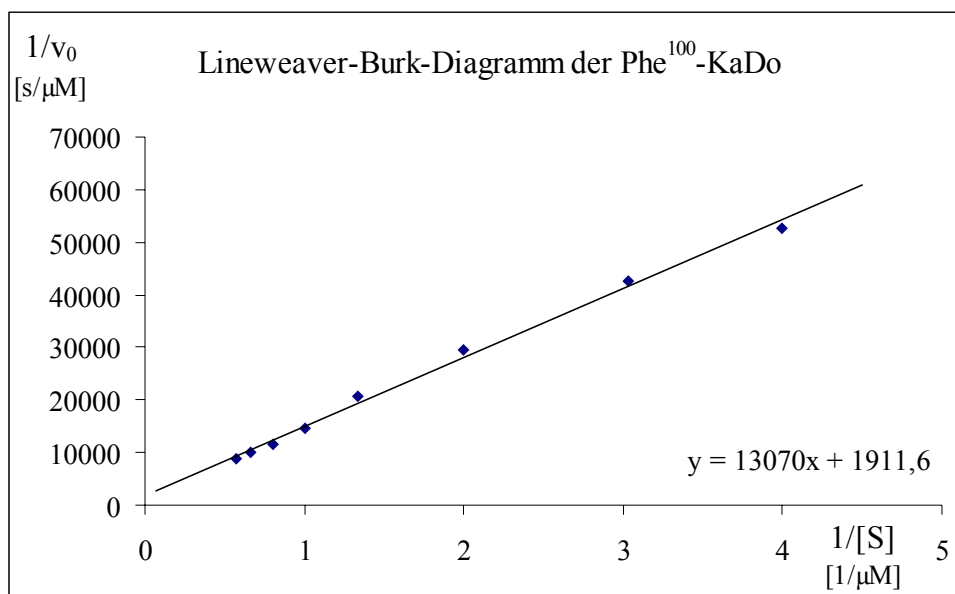


Abb. 18: Lineweaver-Burk-Diagramm der Phe¹⁰⁰-KaDo.

Die eingesetzte Enzymkonzentration betrug $5,14 \cdot 10^{-4} \mu\text{M}$.

Aus der Geradengleichung wurde die Michaelis-Menten-Konstante berechnet: $K_M = 6,84 \mu\text{M}$. Damit ergab sich für die Spezifitätskonstante $k_{\text{cat}}/K_M = 149 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$. Dieser k_{cat}/K_M -Wert der Phe¹⁰⁰-KaDo war somit ca. 10-fach größer als der Wert der Met⁹⁹-KaDo.

5.3.1 Inhibierung der Met⁹⁹- und Phe¹⁰⁰-KaDo der MMP-12 durch TIMPs

Für diese Inhibierungsstudien standen TIMP-1, bTIMP-2 (*bovine* TIMP-2; Calvete, Valencia, Spanien) und die inhibitorische Domäne des humanen TIMP-4 (idTIMP-4; Stratmann, 2000) zur Verfügung. Nach Bestimmung der Konzentration der aktiven MMP-12 Varianten durch *active site*-Titration mit Batimastat wurden diese mit unterschiedlichen Konzentrationen des jeweiligen TIMP für 15 Minuten bei 25°C inkubiert. Anschließend erfolgte die fluoreszenzkinetische Messung der Restaktivität mit dem Mca-Peptid als Substrat. Der Zusammenhang der Restaktivität mit dem IC₅₀-Wert ist über die folgende Formel gegeben:

$$\text{Restaktivität} = \frac{1}{1 + \left(\frac{[I]}{\text{IC}_{50}} \right)} \quad [\text{Copeland et al., 1995}].$$

Wenn die Restaktivität $\frac{1}{2}$ beträgt, ist der IC₅₀-Wert gleich der Inhibitorkonzentration. Durch Auftragung der Restaktivität gegen die Inhibitorkonzentration und der Auswertung mit dem Programm GraFit 4.06 (Erithacus Software, Surrey, England) kann der IC₅₀-Wert bestimmt

werden. Dies ist exemplarisch für TIMP-1 mit Phe¹⁰⁰-KaDo in der folgenden Abbildung dargestellt (Abb. 19).

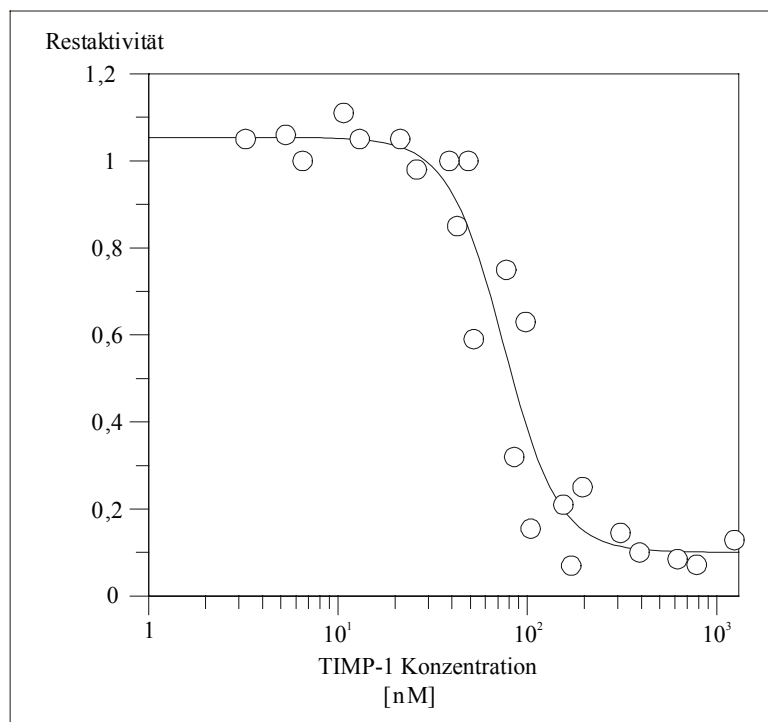


Abb. 19: Auftragung der Restaktivität der Phe¹⁰⁰-KaDo der MMP-12 nach Inkubation mit verschiedenen TIMP-1 Konzentrationen.

Die K_i -Werte konnten mit der Formel

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

bestimmt werden [Copeland et al., 1995]. Die Konzentrationen der Met⁹⁹-KaDo bzw. Phe¹⁰⁰-KaDo betragen 5,46 bzw. 4,12 nM. Als Substrat wurde das Mca-Peptid mit einer Konzentration von 2,0 μ M eingesetzt. Die Standardabweichungen betragen ≤ 10 %. In der folgenden Tabelle 6 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Tab. 6: Hemmwerte der Met⁹⁹- und Phe¹⁰⁰-KaDo der MMP-12.

		TIMP-1		bTIMP-2		idTIMP-4	
	K_M -Wert [μ M]	IC_{50} [nM]	K_i -Wert [nM]	IC_{50} [nM]	K_i -Wert [nM]	IC_{50} [nM]	K_i -Wert [nM]
Met ⁹⁹ -KaDo	3,04	60,4	34,8	20,7	10,8	17,9	9,15
Phe ¹⁰⁰ -KaDo	6,84	74,8	56,3	24,2	17,1	13,0	8,46

5.4 Substratspaltungen

5.4.1 Spaltungen von Faktoren der Blutgerinnungskaskade

Das Potential der Makrophagenelastase, Plasmaproteine wie z.B. Plasminogen zu spalten, wird bereits seit einigen Jahren intensiv untersucht [Cornelius et al., 1998]. Daher ist auch der Einfluss der MMP-12 auf die einzelnen Faktoren der Blutgerinnungskaskade von Interesse. Für diese Arbeit standen Faktor XII (Hagemann Faktor), Prothrombin und Fibrinogen zur Verfügung. Die jeweiligen Proteine wurden mit der katalytischen Domäne der MMP-12 mit N-terminalem Methionin im molaren Verhältnis von 10:1 bei 37°C inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und durch SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert. Zusätzlich wurden die N-Termini einiger Fragmente nach *Blotting* und anschließendem Edman-Abbau bestimmt. Die Nummerierung der Aminosäuren beinhaltet das Signalpeptid (Swiss-Prot, ExPasy). Im Folgenden sind die Ergebnisse der einzelnen Spaltungen erläutert.

Spaltung von Faktor XII (Hagemann Faktor)

Bei der intravaskulären Reaktionsfolge der Blutgerinnungskaskade setzt durch eine unphysiologische Oberfläche die autokatalytische Aktivierung des Faktor XII ein [Silverberg et al., 1980]. Zusätzlich ist das Kallikrein/Kinin-System durch Proteolyse in der Lage, den Faktor XII zu aktivieren [Reddigari et al., 1993]. In Abbildung 20 ist der *in vitro* Abbau des Faktors XII durch die Met⁹⁹-KaDo der MMP-12 deutlich zu erkennen.

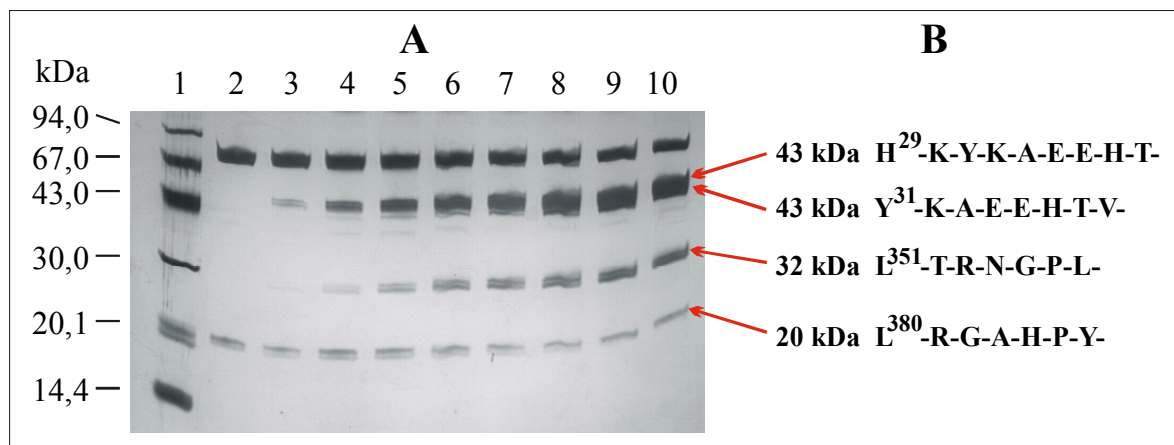


Abb. 20: Zeitlicher Verlauf der Spaltung von Faktor XII durch Met⁹⁹-KaDo der MMP-12 (A); N-Termini der Fragmente (B).

Bahn 1 : LMW-Marker;

Bahn 2-10 : Inkubation von Faktor XII mit Met⁹⁹-KaDo der MMP-12 nach 0, 2, 4, 8, 15, 30, 60, 90 und 120 min.

Die Fragmente der Größe 20 und 43 kDa sind bereits nach wenigen Minuten nachweisbar. Durch N-terminale Sequenzierung wurden für das Protein mit 43 kDa zwei unterschiedliche Sequenzen bestimmt. Insgesamt wurden vier Spaltstellen identifiziert (Tab. 7).

Tab. 7: Ermittelte Spaltstellen von Faktor XII durch Met⁹⁹-KaDo der MMP-12.

Molekulargewicht [kDa]	Spaltstelle	Region der Spaltung
43	Glu ²⁸ -↓-His ²⁹	N-terminal der Fibronektin-Typ II ähnlichen Domäne
43	Lys ³⁰ -↓-Tyr ³¹	
32	Ser ³⁵⁰ -↓-Leu ³⁵¹	C-terminal in der schweren Kette des α-Faktor XIIa
20	Ala ³⁷⁹ -↓-Leu ³⁸⁰	N-terminal innerhalb der katalytischen Domäne

Diese *in vitro* Untersuchungen zeigen, dass der Hagemann Faktor ein potentielles Substrat der MMP-12 darstellt. Ein nach dem kompletten Abbau des Faktor XII durch die Met⁹⁹-KaDo durchgeführter Test mit dem Substrat S-2302 auf proteolytische Aktivität der Fragmente war negativ.

Spaltung von Prothrombin

Prothrombin wird von Faktor Xa an den Positionen Arg³²⁷-Thr³²⁸ und Arg³⁶³-Ile³⁶⁴ gespalten und hierdurch aktiviert. Das entstehende Thrombin besteht aus zwei Ketten α und β, die über eine Disulfidbrücke verknüpft sind [Di Cera et al., 1997]. Die Spaltung des Prothrombins durch Met⁹⁹-KaDo der MMP-12 ist in der folgenden Abbildung dargestellt, wobei die Proben ohne Zusatz von β-Mercaptoethanol aufgetragen wurden (Abb. 21). Damit blieben die Disulfidbrücken erhalten.

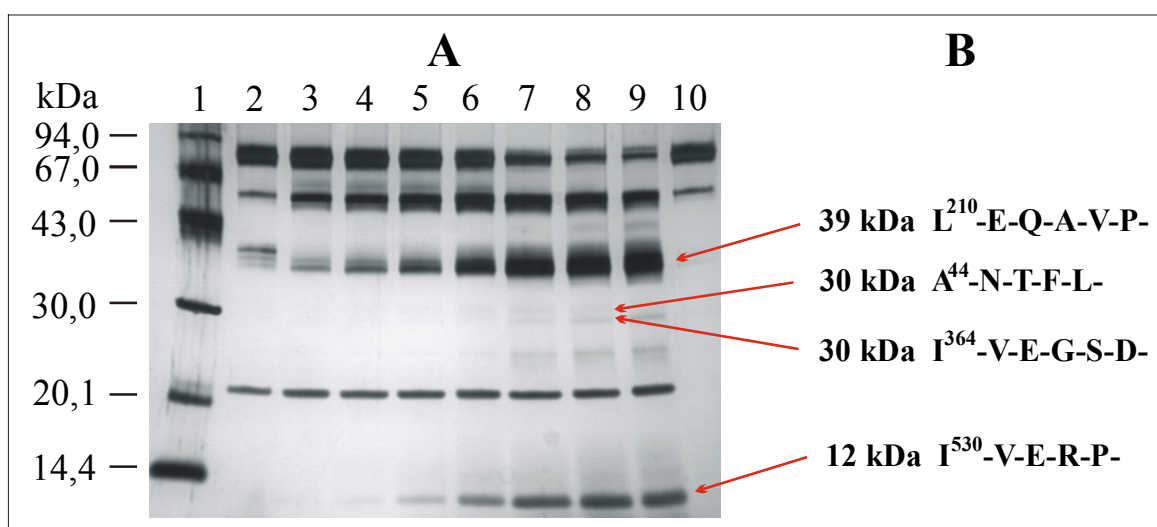


Abb. 21: Zeitlicher Verlauf der Prothrombinspaltung durch Met⁹⁹-KaDo der MMP-12 (A); N-Termini ausgewählter Fragmente (B).

- Bahn 1 : LMW-Marker;
- Bahn 2-9 : Proben nach 0, 2, 4, 8, 15, 30, 60, 90 min;
- Bahn 10 : Probe nach 90 min ohne Met⁹⁹-KaDo der MMP-12.

Der Verlauf der Spaltung zeigt eine deutliche Abnahme der Intensität der Bande des Prothrombins bei ca. 80 kDa. Bereits direkt nach Zugabe der Met⁹⁹-KaDo der MMP-12 (0 min) treten Fragmente mit einer Größe von ca. 38-40 kDa auf. Innerhalb von 15 Minuten sind drei Hauptbanden bei ca. 12, 39 und 55 kDa zu erkennen. Das 12 kDa Fragment ist ein Teil der β -Kette und enthält den Serinrest 568 der katalytischen Triade (Tab. 8).

Tab. 8: Ermittelte Spaltstellen von Prothrombin durch Met⁹⁹-KaDo der MMP-12.

Molekulargewicht [kDa]	Spaltstelle	Region der Spaltung
39	Pro ²⁰⁹ -↓-Leu ²¹⁰	Aktivierungspeptid 2
30	Arg ⁴³ -↓-Ala ⁴⁴	N-Terminus von Prothrombin
30	Arg ³⁶³ -↓-Ile ³⁶⁴	N-Terminus der β -Kette
12	Pro ⁵²⁹ -↓-Ile ⁵³⁰	Fragment der β -Kette mit Ser ⁵⁶⁸ der katalytische Triade

Die Sequenzierung der Proteine bei 30 kDa ergab zum einen den N-Terminus von Prothrombin (Ala⁴⁴) und zum anderen den N-Terminus der β -Kette (Ile³⁶⁴). Zusätzlich erfolgte eine Spaltung bei Leu²¹⁰ innerhalb des Aktivierungspeptids 2.

Der nach 15 minütiger Inkubationszeit von Prothrombin mit Met⁹⁹-KaDo durchgeführte Thrombin-Aktivitätstest mit dem Substrat S-2238 verlief positiv. Durch *in vitro* Spaltung von Prothrombin durch MMP-12 entsteht somit ein Fragment mit Thrombinaktivität.

Spaltung von Fibrinogen

Fibrinogen ist ein ca. 340 kDa großes im Blutplasma zirkulierendes Protein, das nach Abspaltung der Fibrinopeptide A (A α 1-16) und B (B β 1-14) durch Thrombin aggregiert. Der proteolytische Abbau des Fibrinogens durch Met⁹⁹-KaDo der MMP-12 wird in der folgenden Abbildung dokumentiert (Abb. 22).

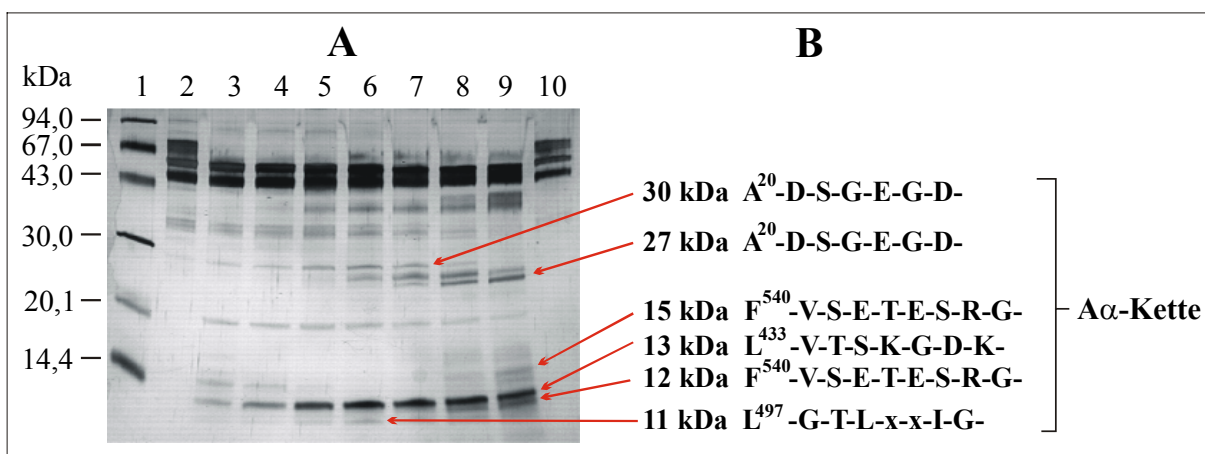


Abb. 22: Zeitlicher Verlauf der Fibrinogenspaltung durch Met⁹⁹-KaDo der MMP-12 (A); N-Termini ausgewählter Fragmente (B).

Bahn 1 : LMW-Marker;

Bahn 2-9 : Proben nach 0, 1, 2, 5, 15, 30, 60, 120 min;

Bahn 10 : Probe nach 120 min ohne Met⁹⁹-KaDo der MMP-12.

Durch die reduzierenden Bedingungen bei der Probenvorbereitung wurden die Disulfidbrücken gespalten. Die Polypeptidketten des Fibrinogens sind nach SDS-PAGE als drei Banden zu erkennen. In den Bahnen 2 (0 h) und 10 (2 h ohne MMP-12) sind die Ketten nicht degradiert, somit kann eine Autoproteolyse ausgeschlossen werden. Bereits nach einer Minute (Bahn 3) ist die A α -Kette des Fibrinogens völlig abgebaut, wohingegen die B β - und γ -Kette selbst nach 2 Stunden noch erhalten sind. Die N-terminale Sequenzierung der Fragmente mit der Größe 30 und 27 kDa ergab eine 100 %ige Übereinstimmung mit dem N-Terminus der unprozessierten A α -Kette (Tab. 9).

Tab. 9: Ermittelte Spaltstellen von Fibrinogen durch Met⁹⁹-KaDo der MMP-12.

Molekulargewicht [kDa]	Spaltstelle	Region der Spaltung
30	Thr ¹⁹ -↓-Ala ²⁰	N-Terminus der A α -Kette
27	Thr ¹⁹ -↓-Ala ²⁰	
15	Glu ⁵³⁹ -↓-Phe ⁵⁴⁰	offenkettiger Bereich am C-Terminus der A α -Kette
13	Lys ⁴³² -↓-Leu ⁴³³	
12	Glu ⁵³⁹ -↓-Phe ⁵⁴⁰	
11	Asp ⁴⁹⁶ -↓-Leu ⁴⁹⁷	

Weiterhin konnten drei Spaltstellen (L⁴³³, L⁴⁹⁷, F⁵⁴⁰) innerhalb der A α -Kette des Fibrinogens identifiziert werden.

Funktionelle Fibrinogenbestimmung

Weitere Untersuchungen des Einflusses der MMP-12 auf Fibrinogen erfolgten durch den Koagulationstest [Claus, 1957]. Fibrinogen wurde bis zu zwei Stunden mit Met⁹⁹-KaDo der MMP-12 bei 37°C inkubiert und zu unterschiedlichen Zeiten die MMP-12 Aktivität durch einen 10-fachen molaren Überschuss an Batimastat gehemmt. Nach Thrombin-Zugabe konnte anschließend die Menge an gerinnbarem Fibrinogen bestimmt werden (Abb. 23). Die Gerinnungsaktivität der Ausgangslösung des Fibrinogens ohne MMP-12 Zugabe wurde mit 100 % angenommen.

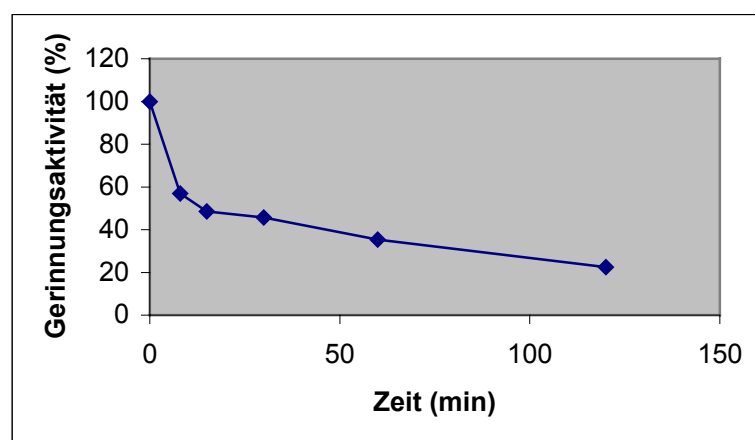


Abb. 23: Gerinnungsaktivität des Fibrinogens nach verschiedenen Inkubationszeiten mit Met⁹⁹-KaDo der MMP-12.

Im Vergleich zu normalem Fibrinogen ist die Gerinnbarkeit bereits nach 15 Minuten Inkubation mit MMP-12 auf 50 % reduziert. Durch Inkubation der Ausgangslösung ohne Met⁹⁹-KaDo für zwei Stunden bei 37°C und anschließendem Koagulationstest konnte eine autokatalytische Degradierung des Fibrinogens sowie resultierende Abnahme der Gerinnungsaktivität ausgeschlossen werden.

5.4.2 Spaltung von weiteren potentiellen Substraten

Spaltung von Substanz P

Die Substanz P besteht aus 11 Aminosäuren und dient der chemischen Übertragung von Nervenimpulsen. Dieses Peptid wurde 15 Minuten mit der Phe¹⁰⁰-KaDo der humanen Makrophagenelastase bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit Hilfe der MALDI-TOF-MS Analyse untersucht. In der folgenden Abbildung sind die entstandenen Fragmente mit den entsprechenden Größen gezeigt (Abb. 24).

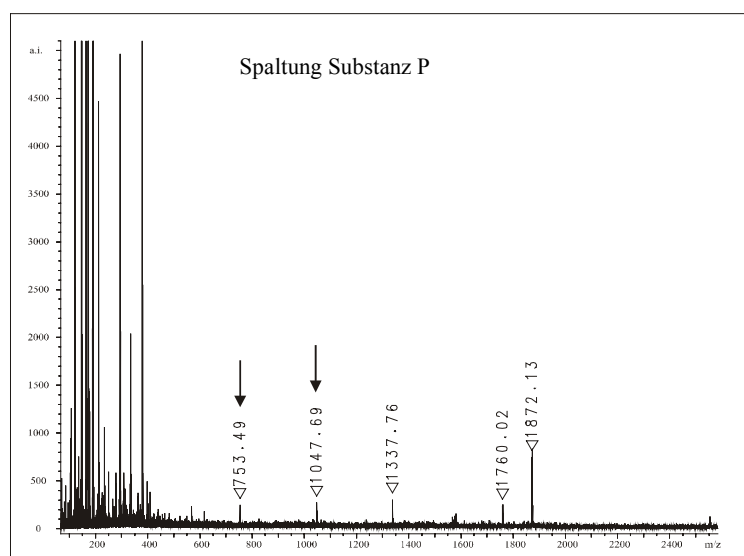
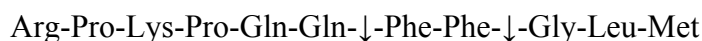


Abb. 24: MALDI-TOF-MS Spektrum der Substanz P nach Inkubation mit Phe¹⁰⁰-KaDo der MMP-12.

→ Fragmente der Substanz P, die weiteren Banden konnten nicht zugeordnet werden.

In diesem Spektrum sind Signale bei dem Masse-Ladungs-Verhältnis 753,49 und 1047,69 Da enthalten. Diese Größen stimmen mit den protonierten Massen $[m-H^+]$ der folgenden Aminosäuresequenzen überein: Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln \cong 753,44 Da und Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe \cong 1047,57 Da. Damit wird die Substanz P an zwei Positionen von der Phe¹⁰⁰-KaDo der MMP-12 gespalten:



Diese *in vitro* Untersuchung zeigt die Fähigkeit der MMP-12 zur Spaltung der Substanz P.

Spaltung des myelin basic proteins

Das *myelin basic protein* (MBP) ist der Hauptbestandteil der Myelinscheide, die die Axone von Neuronen umgibt. Bei entzündlichen Prozessen wie bei der Multiplen Sklerose kommt es zu einer Degradierung des *myelin basic proteins*. Dieses Protein wurde bereits als potentielles Substrat der MMP-12 von Chandler et al. (1996) untersucht. Im Folgenden sollten Spaltstellen innerhalb des MBPs bestimmt werden. Dafür wurde das *myelin basic protein* mit der Phe¹⁰⁰-KaDo der MMP-12 im molaren Verhältnis von 20:1 bei 37°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, mit Laemmli-Puffer aufgekocht und durch SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung analysiert (Abb. 25). N-terminale Sequenzen wurden nach *Blotting* und Edman-Abbau ermittelt.

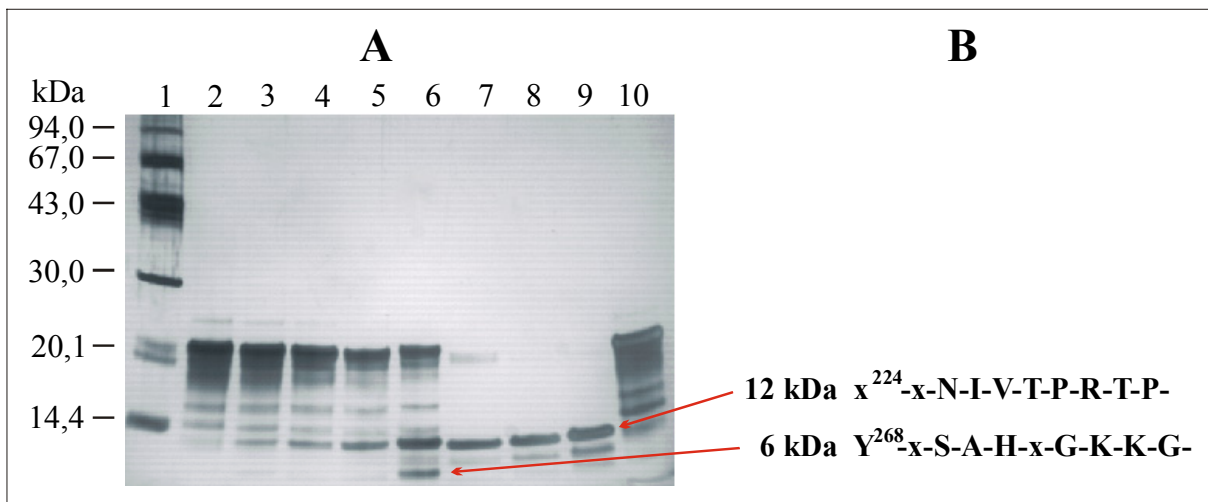


Abb. 25: Zeitlicher Verlauf der Spaltung des MBPs durch Phe¹⁰⁰-KaDo der MMP-12 (A); N-Termini ausgewählter Fragmente (B).

Bahn 1 : LMW-Marker;
 Bahn 2-9 : Proben nach 0, 2, 4, 8, 15, 30, 60, 90 min;
 Bahn 10 : Probe nach 90 min ohne Phe¹⁰⁰-KaDo der MMP-12.

In Abbildung 25 ist eine Fragmentierung des *myelin basic proteins* in der Ausgangslösung zu erkennen (Bahn 2 und 10). Trotzdem wird der Abbau des MBPs durch die Phe¹⁰⁰-KaDo der MMP-12 anhand der Intensitätsabnahme der Bande bei 20 kDa bereits nach 4 Minuten deutlich. Nach 30 Minuten sind nahezu alle Banden oberhalb eines 12 kDa Fragments degradiert, dessen N-Terminus bestimmt werden konnte. Weiterhin wurde der N-Terminus eines 6 kDa Fragments identifiziert (Abb. 25).

5.5 Entwicklung eines ELISAs für die MMP-12

Die Makrophagenelastase wird unter anderem mit pathologischen Prozessen wie dem Lungenemphysem oder der Angiogenese beim Tumorwachstum in Zusammenhang gebracht. Bislang wurde die MMP-12 im betroffenen Gewebe nur qualitativ nachgewiesen. Eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Erkrankung und der Konzentration wäre durch einen quantitativen Nachweis der Proteinase möglich. Ein Ziel dieser Arbeit war daher, einen ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) für die Makrophagenelastase aufzubauen.

Herstellung polyklonaler Antikörper gegen die KaDo der MMP-12

Zum einen wurde ein synthetisches Peptid mit der Sequenz TYKYVDINTFRLSA für die Immunisierung von Kaninchen eingesetzt (Pineda, Berlin). Diese für die humane MMP-12 spezifische Sequenz wurde nach Datenbankrecherche, Hydrophobizitäts- und Antigenizitätsbestimmung ausgewählt. Zum anderen wurden Kaninchen mit der rekombinant dargestellten, inaktiven Variante der KaDo der MMP-12 (Ala²¹⁹-KaDo) immunisiert. Die Serumgewinnung erfolgte nach 90 und 115 Tagen. Der Antikörpertiter wurde durch einen indirekten ELISA mit Ala²¹⁹-KaDo als Antigen bestimmt. Für den anti-Peptid Antikörper ergab sich ein Titer von 1:20000 und für die anti-Ala²¹⁹-KaDo IgGs wurde ein Titer von 1:320000 erhalten.

Die Reinigung der Antikörper erfolgte durch Affinitätschromatographie an Protein A-Sepharose. Der F_C-Teil der IgGs bindet spezifisch an Protein A. Die Antikörper wurden nach Waschen durch Erniedrigung des pH-Wertes auf 2,7 eluiert. Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung analysiert (Abb. 26).

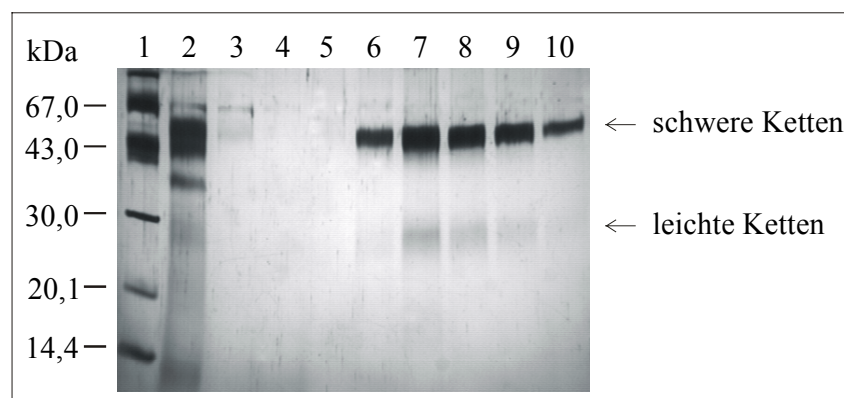


Abb. 26: Aufreinigung der Antikörper an Protein A-Sepharose.

Bahn 1 : LMW-Marker;
 Bahn 2-4 : Waschschritte;
 Bahn 5-10: Elution der Antikörper.

Aufgrund der reduzierenden Bedingungen sind die leichten (25 kDa) und schweren (50 kDa) Ketten der IgGs als einzelne Banden zu erkennen (Abb. 26). Da nach dieser Aufreinigung noch unspezifische IgGs in den Fraktionen enthalten waren, wurde eine weitere Affinitätschromatographie durchgeführt. Dafür wurden zum einen das Peptid und zum anderen die Ala²¹⁹-KaDo an CH-aktivierte-Sepharose gekoppelt. Mit Hilfe dieser Säulenmaterialien konnten die jeweiligen Antikörper immunoaffinitäts-gereinigt isoliert werden (Abb. 27).

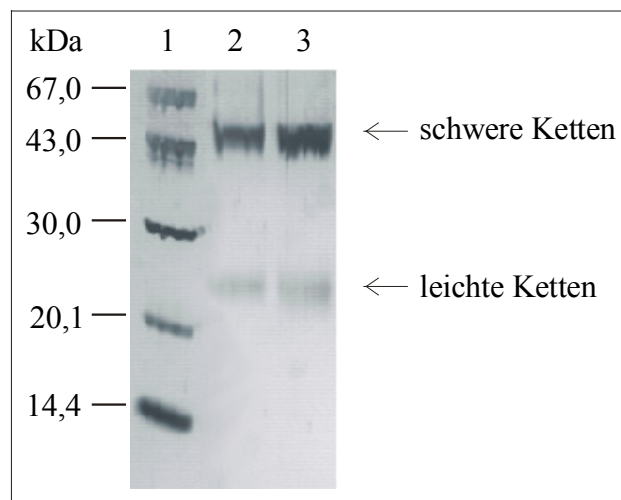


Abb. 27: Immunoaffinitäts-gereinigte Antikörper (SDS-PAGE, Silberfärbung).

Bahn 1: LMW-Marker;
 Bahn 2: anti-Peptid Antikörper;
 Bahn 3: anti-Ala²¹⁹-KaDo Antikörper.

Aus einem Milliliter anti-Peptid Serum wurden ca. 50 µg, aus einem Milliliter anti-Ala²¹⁹-KaDo Serum ca. 300 µg polyklonaler, immunoaffinitäts-gereinigter Antikörper isoliert. Die Antikörper zeigten im Western-Blot keine Kreuzreaktivität gegenüber MMP-2, -8, -9, -13 und MT1-MMP (hier nicht gezeigt). Es wurde spezifisch nur die MMP-12 erkannt. Somit standen diese Antikörper für die Detektion der MMP-12 im Western-Blot, den Aufbau eines ELISAs und immunhistochemische Untersuchungen zur Verfügung.

Sandwich-ELISA für MMP-12

Es wurde zunächst versucht, einen Sandwich-ELISA aufzubauen. Dieser besitzt im Allgemeinen eine höhere Sensitivität und ist einfacher durchzuführen. Wegen des höheren Titors und der größeren Verfügbarkeit wurde im Folgenden der anti-Ala²¹⁹-KaDo Antikörper eingesetzt. Somit erfolgte zum einen die Beschichtung der Mikrotiterplatte mit diesem Antikörper. Zum anderen wurde eine Charge mit Meerrettich-Peroxidase und eine weitere mit Biotin gekoppelt. Diese unterschiedlich konjugierten Antikörper wurden für die Detektion eingesetzt. Nach Variationen der Inkubationszeiten, der Menge der Primärantikörper für die Immobilisierung und der Menge der gekoppelten Detektionsantikörper konnten mit diesem Sandwich-ELISA 100 ng/mL der MMP-12 zuverlässig detektiert werden. Die Sensitivität wurde auch durch Verwendung der TMB-Färbung an Stelle der ABTS/H₂O₂-Färbung nicht gesteigert. Die Standardkurve ist in der folgenden Abbildung gezeigt (Abb. 28).

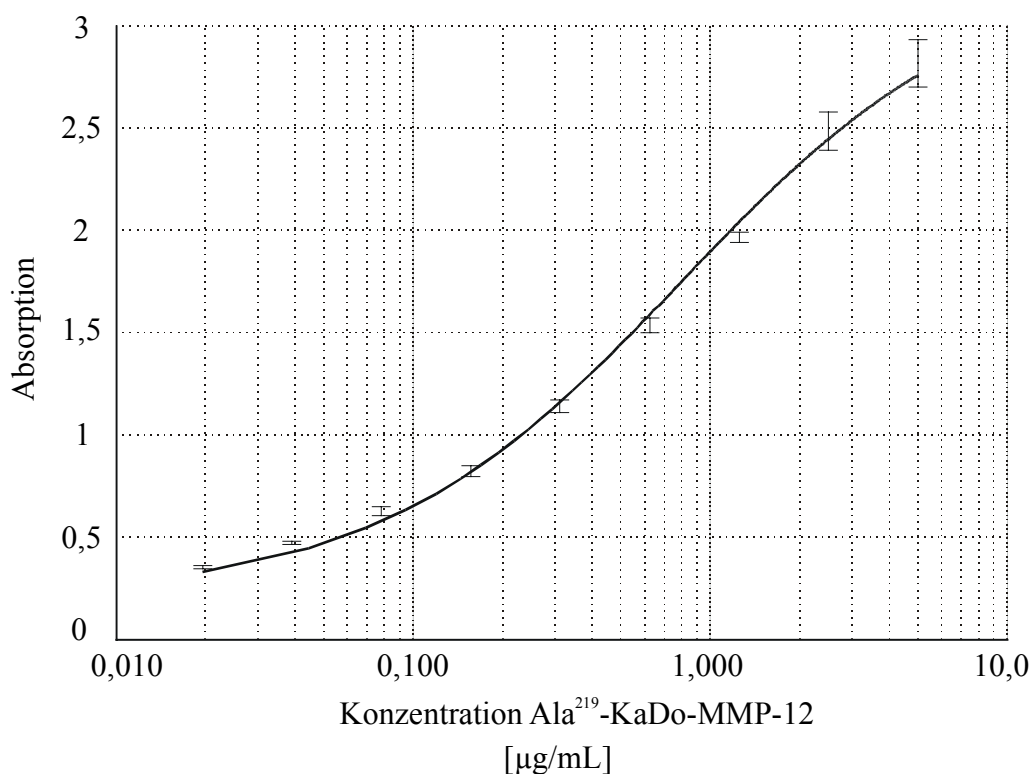


Abb. 28: Standardkurve des Sandwich-ELISA für die MMP-12.

1 µg/mL Primärantikörper zum Beschichten eingesetzt; Ala²¹⁹-KaDo von 0,020 bis 5 µg/mL verwendet; mit 2 µg/mL Meerrettich-Peroxidase gekoppeltem Detektionsantikörper für 1 h inkubiert; ABTS/H₂O₂-Färbung; die Messwerte sind mit den Standardabweichungen eingezeichnet.

Der Messbereich dieses ELISAs liegt zwischen 100 ng/mL und 3 µg/mL Ala²¹⁹-KaDo der MMP-12. Da sich die Sensitivität nicht weiter senken ließ, wurde zusätzlich ein kompetitiver ELISA etabliert.

Kompetitiver ELISA für MMP-12

Bei dem kompetitiven ELISA wird das gereinigte Antigen auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Anschließend wird die Probe mit einer konstanten Menge des Antikörpers auf diese Platte gegeben. Es entsteht eine Konkurrenzreaktion zwischen dem Antigen auf der Mikrotiterplatte und dem in der Probe. Je mehr Antigen in der Probe vorhanden ist, desto weniger Antikörper werden auf der Platte gebunden. Als Ergebnis wird eine inverse *dose-response* Kurve erhalten.

Optimierung der ELISA-Parameter

Die Konzentration des für die Beschichtung der Mikrotiterplatte eingesetzten Antigens beeinflusst den kompetitiven ELISA. Bei zu hoher Konzentration wird die Empfindlichkeit zu gering und bei zu geringer hat die Standardkurve eine zu kleine Steigung. Für die Optimierung wurden Standardkurven mit unterschiedlicher Beschichtungskonzentration der Ala²¹⁹-KaDo aufgenommen (Abb. 29).

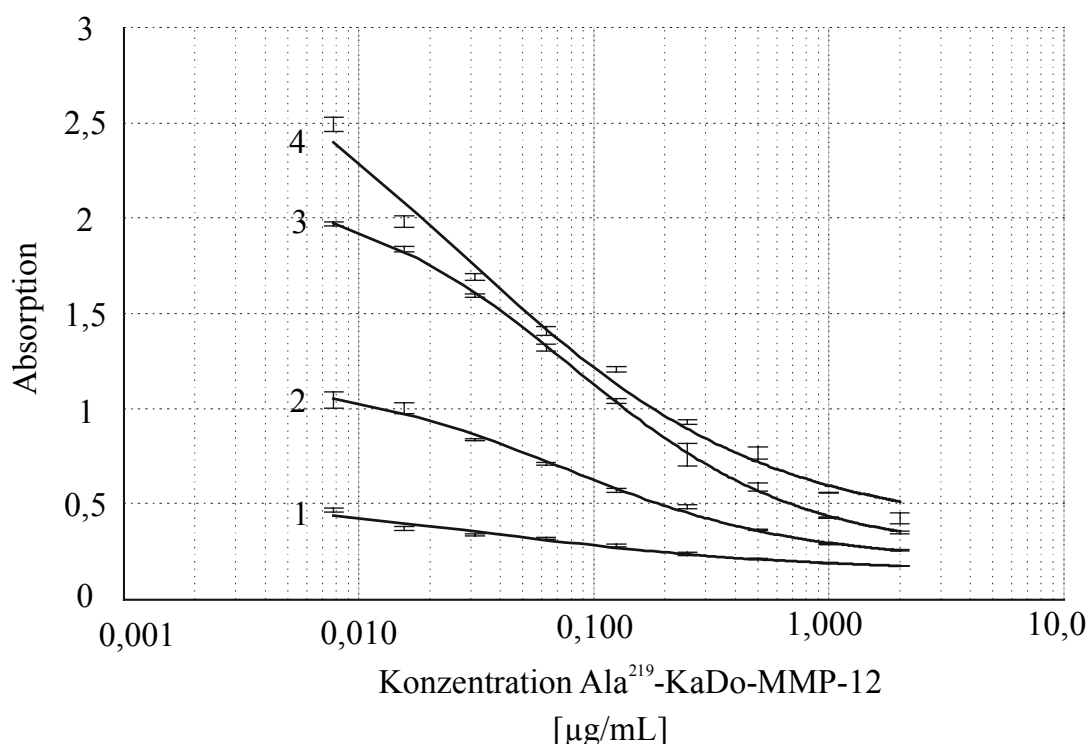


Abb. 29: Standardkurven des kompetitiven ELISA bei verschiedenen Konzentrationen der Ala²¹⁹-KaDo der MMP-12 für die Beschichtung der Mikrotiterplatte.

Kurve 1: 25 ng/mL, Kurve 2: 50 ng/mL, Kurve 3: 75 ng/mL, Kurve 4: 100 ng/mL Ala²¹⁹-KaDo für die Beschichtung eingesetzt; 0,008 bis 2 µg/mL Ala²¹⁹-KaDo mit 2 µg/mL anti-Ala²¹⁹-KaDo IgG für 1 h vorinkubiert; mit 2 µg/mL Meerrettich-Peroxidase konjugiertem Ziege-anti-Kaninchen-IgG Antikörper für 1 h inkubiert; ABTS/H₂O₂-Färbung; die Messwerte sind mit der Standardabweichung eingezeichnet.

Bei einer MMP-12 Konzentration von 75 ng/mL wurde die optimale inverse *dose-response* Kurve erhalten. Geringere Konzentrationen führten zu flacheren Standardkurven, und höhere Mengen resultierten nicht in einer gesteigerten Empfindlichkeit. Somit wurde bei der Beschichtung der Mikrotiterplatten beim kompetitiven ELISA die Ala²¹⁹-KaDo der MMP-12 mit einer Konzentration von 75 ng/mL eingesetzt.

Als weiterer Parameter wurde die Konzentration des verwendeten Antikörpers optimiert. Die besten Ergebnisse wurden mit einer Konzentration von 1 µg/mL erzielt. Die Proben wurden mit dem Antikörper eine Stunde vorinkubiert und anschließend auf die mit Ala²¹⁹-KaDo der MMP-12 beschichteten Platte gegeben. Bei direkter Zusammengabe aller Komponenten wurde eine deutlich flachere Standardkurve erhalten. Für die Detektion wurde ein mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-IgG Antikörper (dianova, Hamburg) eingesetzt, da der Primärantikörper unkonjugiert war. Mit einer Verdünnung von 1:2500 bei einer Stunde Inkubationszeit wurden sehr gute Ergebnisse erzielt. Die optimierte Standardkurve ist in der folgenden Abbildung dargestellt (Abb. 30).

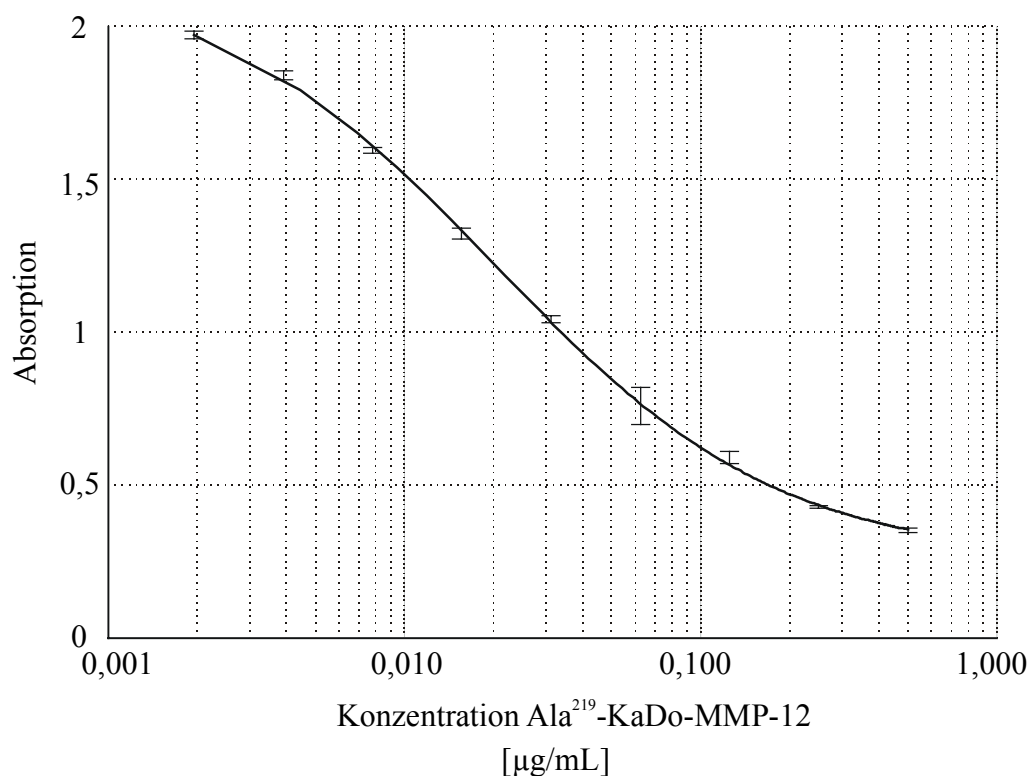


Abb. 30: Optimierte Standardkurve des kompetitiven ELISA für die MMP-12.

Platte mit 75 ng/mL Ala²¹⁹-KaDo beschichtet; 0,002 bis 0,5 µg/mL Ala²¹⁹-KaDo mit 1 µg/mL Primärantikörper für 1 h vorinkubiert; mit 2 µg/mL Meerrettich-Peroxidase konjugierter Ziege-anti-Kaninchen-IgG Antikörper für 1 h inkubiert; ABTS/H₂O₂-Färbung; die Messwerte sind mit der Standardabweichung eingezeichnet.

Anhand der Standardkurve ist zu erkennen, dass der ideale Messbereich des ELISAs bei 5-100 ng/mL liegt. Diese Messungen wurden in zeitlichen Abständen mit unterschiedlichen Antigen- bzw. Antikörperchargen durchgeführt, wobei die Ergebnisse bestätigt werden konnten. Dieser kompetitive ELISA wurde mit Hilfe von humaner MMP-12 aus Zellkulturüberständen von Makrophagen [Chemicon, 2001] getestet, wobei die MMP-12 erfolgreich detektiert werden konnte. Bei Untersuchungen von verschiedenen Proben UV-bestrahlter Fibroblasten, wurde die MMP-12 nicht nachgewiesen [Hantke et al., 2002]. Weiterhin zeigte der ELISA keine Kreuzreaktivität mit MMP-2, -8, -9, -13 und MT1-MMP sowie Bestandteilen von Liquor und Synovialflüssigkeit. In Tests mit Plasmaproben wurde eine geringe Kreuzreaktivität mit einem bislang unbekanntem Antigen festgestellt. Somit steht mit diesem kompetitiven ELISA ein System zur Detektion der MMP-12 in verschiedenen Proben zur Verfügung.

5.6 Immunhistochemische Untersuchungen

In bisherigen Untersuchungen war der Nachweis der MMP-12 Expression weitestgehend auf Makrophagen beschränkt. Erst wenige aktuelle Veröffentlichungen zeigen, dass weitere Zelltypen wie z.B. Osteoclasten oder fötale Chondrozyten in der Lage sind, die Makrophagenelastase zu exprimieren [Hou et al., 1997; Kerkelä et al., 2001]. Diese Ergebnisse dienen als Ausgangspunkt für die immunhistochemischen Untersuchungen an verschiedenen Geweben. In der folgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Gewebe aufgeführt (Tab. 10).

Tab. 10: Für immunhistologische Untersuchungen eingesetzte Gewebeproben.

Gewebe	Diagnose	Beschreibung	Anzahl
Haut	ohne Befund	-	2
	Ekzem	flächenhafte, entzündliche Hautveränderung	3
	Lupus erythematodes	scharf begrenzte Herde mit zentral gelegenen folliculären Hyperkeratosen, die am Rand entzündlich infiltriert sind	2
	Dermatitis herpetiformis	chronisch rezidiv, subepidermale Blasenbildung, Autoimmunerkrankung, Ablagerung von Antigen-Antikörper Komplexen an der Basalmembran, Komplementaktivierung und Spaltbildung mit eosinophilen Infiltraten	2
	Vaskulitis	entzündliche Reaktionen, die von der Wand der Blutgefäße ihren Ausgang nehmen	1
	Lepra lepromatosa	durch Bakterien (<i>Mycobacterium leprae</i>) verursachte Infektionskrankheit der Haut, bei lepromatöser Form massive Infiltration der Haut	1
Fett- und Bindegewebe	Rheumaknoten	bei Polyarthritiden auftretende, derbe, verschiebliche subkutane Knoten aus nekrotischem Gewebe	2
synoviales Bindegewebe	Rheumatismus nodosus	Bindegewebserkrankung durch nekrotische Ablagerungen, die von gewebetypischen Makrophagen (Histiozyten) gesäumt sind	2
Milz	ohne Befund	-	2
Arterie	ohne Befund	-	2
Lunge	ohne Befund	-	2
Dickdarm	ohne Befund	-	2
Myokard	ohne Befund	-	2
Niere	ohne Befund	-	1
Dünndarm	ohne Befund	-	1
Pankreas	ohne Befund	-	1
Rückenmark (Maus)	ohne Befund	-	2
Rückenmark (Maus)	wobbler Mutante	degenerierte Neuronen, aktivierte Gliazellen	2

Die Gewebeproben wurden mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Scheiben (4 µm dick) wurden auf Objektträgern entparaffiniert, rehydriert und durch Aufkochen in Citratpuffer demaskiert.

Für die Versuche wurden immunoaffinitäts-gereinigte, polyklonale Antikörper eingesetzt, die gegen die in *E. coli* rekombinant dargestellte Ala²¹⁹-KaDo der MMP-12 gerichtet waren. Nach Detektion mit Hilfe der LSAB-Methode wurde eine positive Immunreaktion durch rote Färbung deutlich. Die nach Gegenfärbung mit Hämatoxilin violett-blauen Zellkerne lassen die Gewebestruktur erkennen. In der folgenden Abbildung ist der Aufbau der Epidermis dargestellt (Abb. 31).

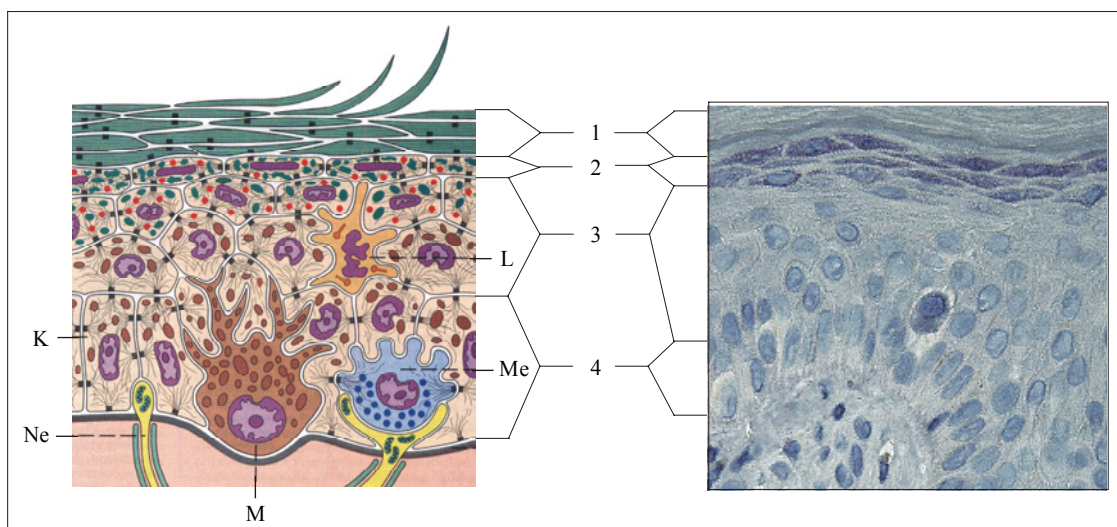
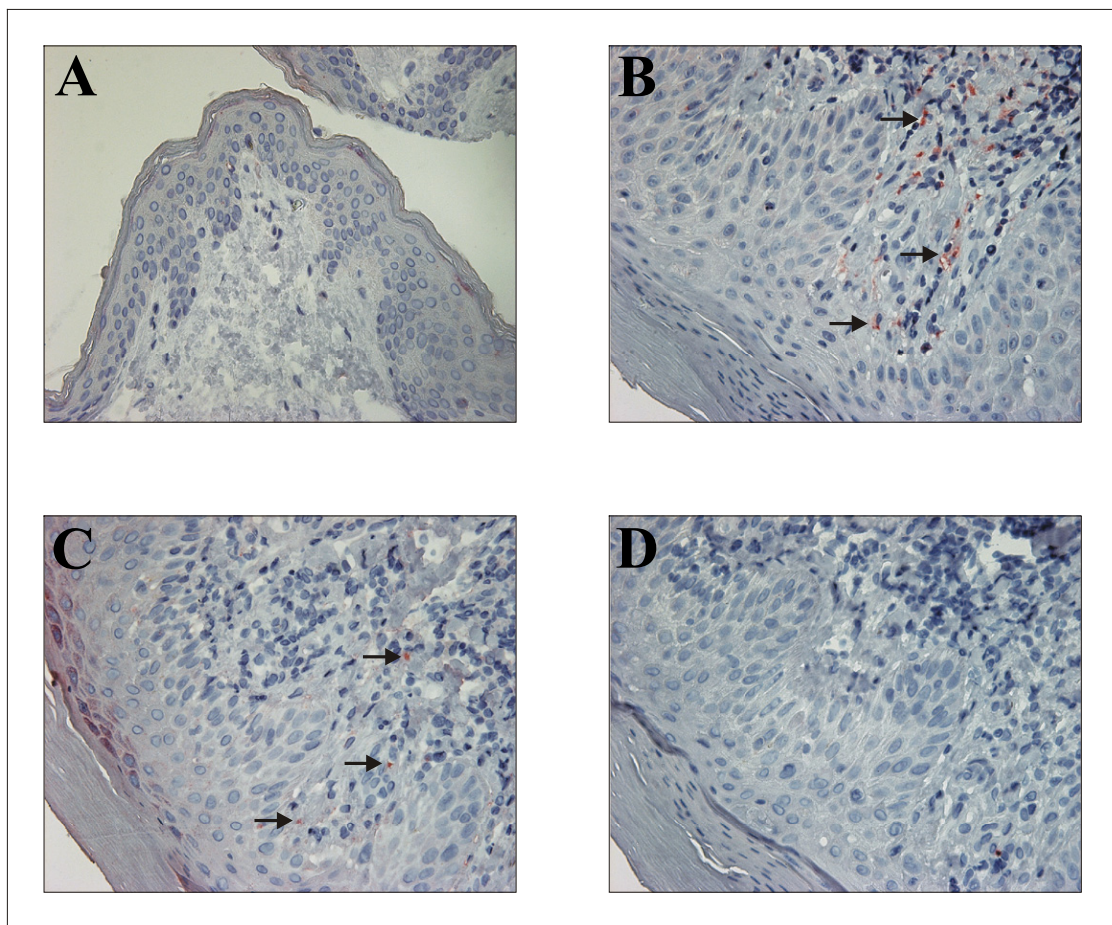


Abb. 31: Schematischer Aufbau und Hämatoxilin gefärbte Epidermis; Vergrößerung: 400-fach.

1: Stratum corneum; 2: Stratum granulosum; 3: Stratum spinosum; 4: Stratum basale;
 K: Keratinozyten; L: Langerhans Zellen; M: Melanozyten; Me: Merkel Zellen;
 Ne: freie Nervenenden.

Die Keratinozyten bilden die Masse der Epithelzellen und lassen von basal nach apikal eine charakteristische Umwandlung erkennen, die in der Schichtenbildung vom Stratum basale bis zum Stratum corneum zum Ausdruck kommt. Im Stratum granulosum treten die Keratohyalin granula als ein Faktor der Verhornung auf. Die Zellen produzieren weiterhin Lamellenkörper (rot), deren Lipide den Interzellularraum versiegeln.

Bei pathologisch verändertem Gewebe wurde gesundes Gewebe als Negativkontrolle der Färbung eingesetzt (Abb. 32A) . Wie erwartet wurde keine Anfärbung erhalten.



**Abb. 32: Negativ- und Positivkontrollen der Immunreaktion;
Vergrößerungen A: 200-fach; B-D: 400-fach.**

- A: gesunde Haut; Färbung mit Primärantikörper gegen MMP-12: keine Farbreaktion;
 B: Ekzem; Färbung mit Primärantikörper gegen CD68: → rötl. Färbung = Makrophagen;
 C: Ekzem; Färbung mit Primärantikörper gegen MMP-12: → rötl. Färbung = MMP-12;
 D: Ekzem; Färbung mit Präimmunserum: keine Farbreaktion.

Die abgebildeten Hautproben eines Ekzems in Ausschnitt **B**, **C** und **D** weisen eine Entzündung im Bereich der Papillen auf. Hier konnten mit anti-CD68-Antikörpern spezifisch die infiltrierten Makrophagen lokalisiert werden (**B**). CD68 ist ein für Makrophagen spezifisches Oberflächenprotein. In einem weiteren Ausschnitt dieser Probe, welcher im Folgenden als Positivkontrolle diente, wurde spezifisch die MMP-12 in Makrophagen angefärbt (Abb. 32C). Zusätzlich wurde eine unspezifische Immunreaktion durch Färbung mit Präimmunserum an Stelle des Primärantikörpers ausgeschlossen (Abb. 32D).

Immunohistochemische Untersuchungen an verschiedenen Hautgeweben

Für immunhistologische Untersuchungen standen verschiedene Hautproben zur Verfügung (Tab. 10). Bei den jeweiligen Negativkontrollen wurden wie erwartet keine Bereiche angefärbt (hier nicht gezeigt). In der folgenden Abbildung sind die Hautgewebe mit positiver Farbreaktion, welche die Expression der MMP-12 nachweist, zusammengestellt (Abb. 33).

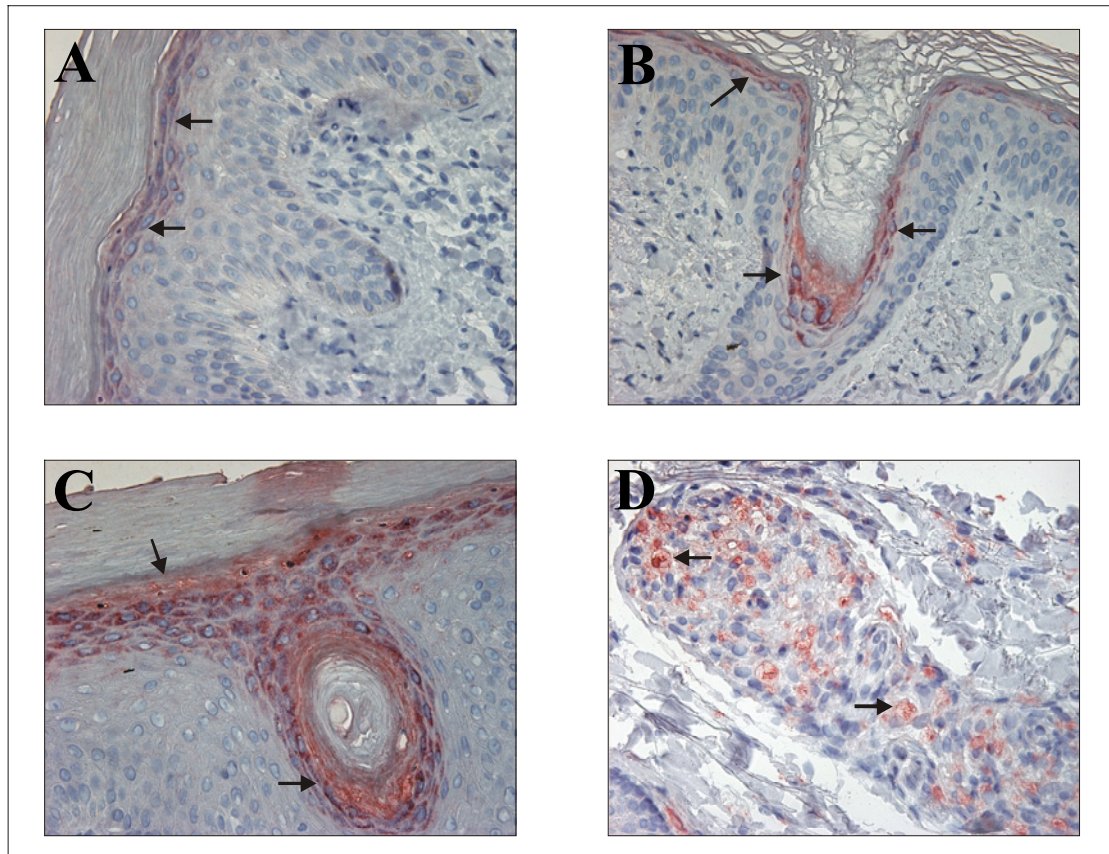


Abb. 33: Expression der MMP-12: Ekzem (A), Lupus erythematoses (B), Dermatitis herpetiformis (C) und Lepra lepromatosa (D); Vergrößerung: 400-fach.
 → rötliche Färbung = Expression der MMP-12.

Bei den Hautproben **A**, **B** und **C** wurde der Bereich des Stratum granulosum der Epidermis deutlich rot angefärbt. Es handelt sich hierbei um das Cytoplasma der Keratinozyten, aus denen sich die Hornzellen bilden (Keratose). Im Ausschnitt **A** ist eine Hyperkeratose zu erkennen, d.h. es liegt eine Verdickung der Hornschicht durch vermehrte Bildung von Hornzellen vor. Die Gewebeprobe **D** der Lepra lepromatosa zeigt eine intensive rote Färbung, so dass die Expression der MMP-12 eindeutig nachgewiesen wurde.

Immunohistochemische Untersuchungen an weiteren humanen Geweben

Eine deutliche Immunreaktion war bei der Gewebeprobe der Milz im Bereich einer Zentralarterie zu erkennen (Abb. 34).

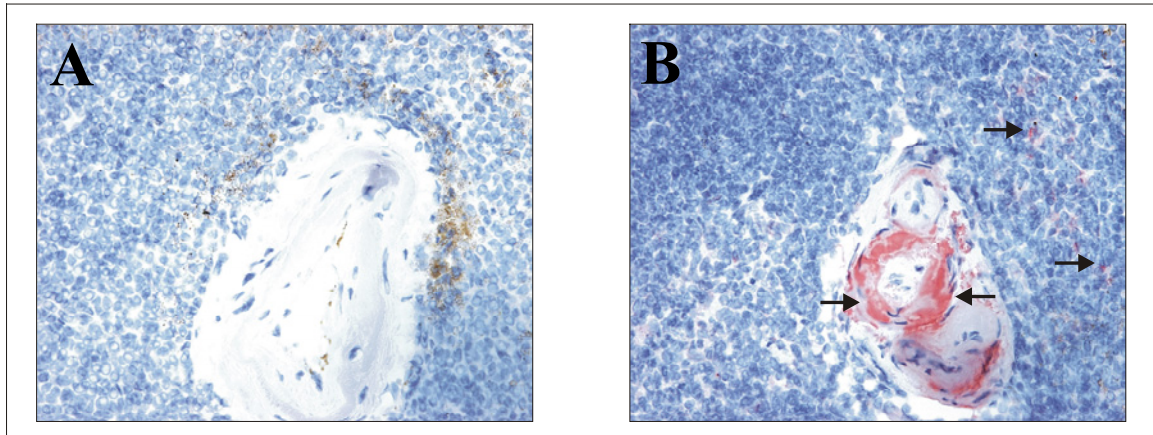


Abb. 34: Ausschnitt aus einem Milzfollikel: Negativkontrolle (A), Immunreaktion in der Arterienwand (B); Vergrößerung: 400-fach.

→ rötliche Färbung = Expression der MMP-12.

Bei den bräunlichen Anfärbungen in der Negativkontrolle (Abb. 34A) handelt es sich um Artefakte, die bei unvollständiger Entparaffinierung auftreten. In Abbildung 34B sind die Gefäßwände der Zentralarterie stark rot angefärbt. Dieses deutet auf eine Expression der MMP-12 in diesen Bereichen hin. Weiterhin sind im umliegenden Milzgewebe vereinzelt rote Anfärbungen zu erkennen, wobei es sich um MMP-12 Expression der vorhandenen Makrophagen handelt.

Die übrigen untersuchten humanen Gewebe zeigten keine Immunreaktion.

Immunhistochemische Untersuchungen an murinem Rückenmarksgewebe

Zusätzlich zu den Untersuchungen an humanen Gewebeproben wurde in Zusammenarbeit mit Dr. J.-W. Bartsch & U. Schlomann (Fakultät Biologie, Universität Bielefeld) die Expression der MMP-12 im Rückenmark von Wildtyp und sogenannten *wobbler* Mäusen studiert. Ein Gendefekt dieser Mäuse führt zu einer Degeneration von motorischen Neuronen, so dass sie als Tiermodell für humane Motoneuronenerkrankungen verwendet werden [Rathke-Hartlieb, 2000].

Die nötige Kreuzreaktivität des anti-Ala²¹⁹-KaDo Antikörpers mit der murinen MMP-12 wurde in Vortests bestätigt, bei denen dieser Antikörper die gleiche Reaktivität zeigte wie ein kommerziell erhältlicher anti-Maus-MMP-12 Antikörper (Santa Cruz, USA). Als Negativkontrolle wurde jeweils eine Färbung mit Präimmenserum durchgeführt, die wie erwartet bei allen Proben negativ war. In der folgenden Abbildung sind die deutlichen Unterschiede der Anfärbung bei einer Gewebeprobe aus dem Rückenmark von gesunden im Vergleich zu der *wobbler* Maus gezeigt (Abb. 35).

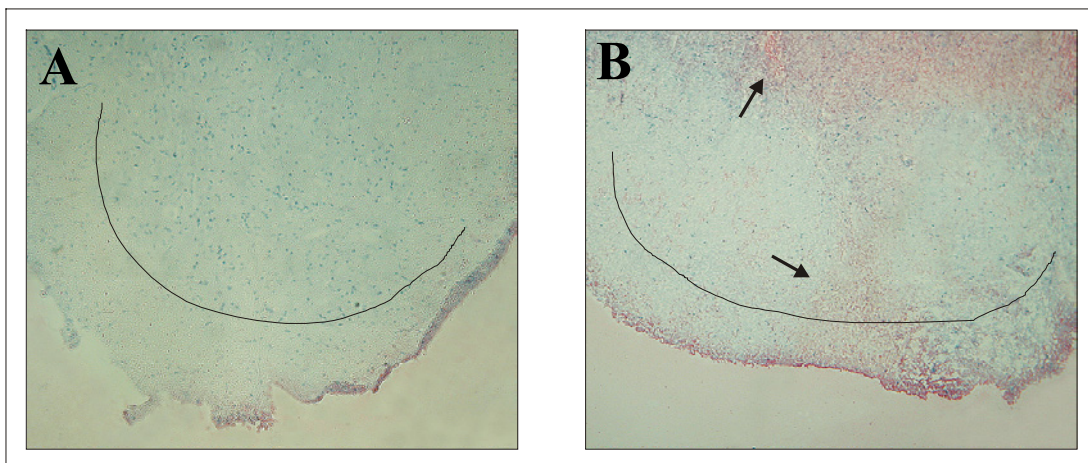


Abb. 35: Übersicht der immunhistochemischen Anfärbung des Rückenmarks der Wildtyp (A) und *wobbler* Maus (B); Vergrößerung: 50-fach.

Färbung mit anti-Ala²¹⁹-KaDo IgG und dem LSAB-System; Gegenfärbung mit Hämatoxylin; oberhalb der eingezeichneten Linie befindet sich die graue und unterhalb die weiße Substanz des Vorderhorns des Rückenmarks; blaue Färbung = Zellkerne und rote Färbung (→) = Expression der MMP-12; Färbung am Geweberand sind Artefakte.

Die blau gefärbten Zellkerne der Neuronen in der grauen Substanz sind bei der Probe der gesunden Maus gut zu erkennen (Abb. 35A). Eine wesentlich geringere Anzahl dieser Neuronen in Abbildung 35B verdeutlicht den pathologischen Befund der Neuronendegeneration bei der *wobbler* Maus. Zusätzlich treten bei dieser Probe rötlich gefärbte Bereiche auf, was auf die Expression der MMP-12 hindeutet.

Zur genaueren Betrachtung ist in der folgenden Abbildung einer dieser Bereiche der grauen Substanz des Rückenmarks der Wildtyp Maus einer Probe der *wobbler* Maus bei höherer Vergrößerung gegenübergestellt (Abb. 36).

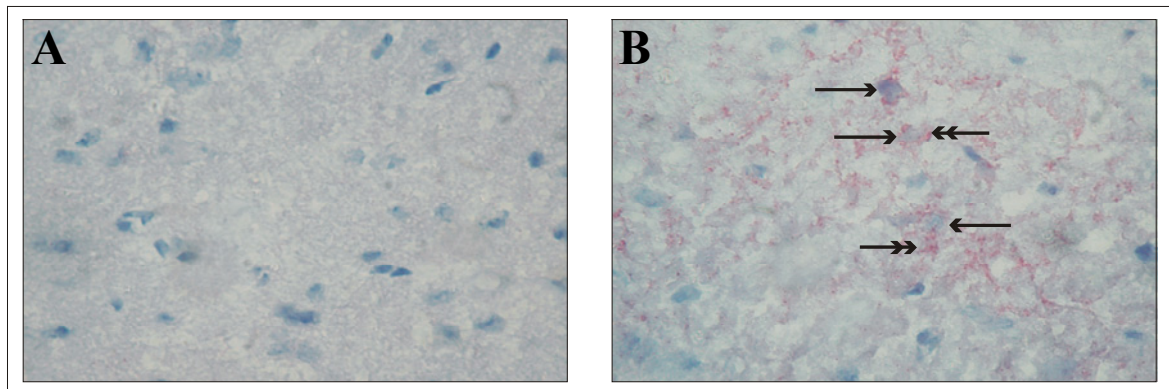


Abb. 36: Immunhistochemische Färbung der grauen Substanz des Rückenmarks der Wildtyp (A) und *wobbler* Maus (B); Vergrößerung: 400-fach.

Verwendung des anti-Ala²¹⁹-KaDo IgGs und des LSAB-Systems; Gegenfärbung mit Hämatoxylin; blaue Färbung = Zellkerne und rote Färbung = Expression der MMP-12; einfache Pfeilspitze = degeneriertes Neuron; doppelte Pfeilspitze = reaktive Gliazellen.

Die Gewebeprobe der gesunden Maus zeigt keine rötliche Färbung (Abb. 36A). Dagegen wurden bei der *wobbler* Mutanten reaktive Gliazellen angefärbt (Abb. 36B). Besonders intensiv ist diese rötliche Färbung direkt in der Umgebung von degenerierten Neuronen zu beobachten. Diese degenerierten Neuronen sind gut an den sich auflösenden und dadurch nur schwach blau angefärbten Zellkernen zu erkennen.

5.7 Bestimmung der Kristallstruktur der MMP-12

Kristallisierung des Komplexes aus Ala²¹⁹-KaDo der MMP-12 mit Batimastat

Die Makrophagenelastase wird beim Lungenemphysem mit den proteolytischen Abbauprozessen des Elastin-reichen Lungengewebes in Zusammenhang gebracht. Eine spezifische Hemmung der MMP-12 könnte diese pathologische Degradierung einschränken. Für die Entwicklung spezifischer Inhibitoren ist die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur von entscheidender Bedeutung. Um durch röntgenkristallographische Untersuchungen die Struktur der katalytischen Domäne der MMP-12 aufzuklären, sollte dieses Protein zunächst kristallisiert werden. Jedoch konnte trotz Anwendung verschiedener Strategien die aktive Variante der KaDo der MMP-12 nicht in für Kristallisationsexperimente ausreichend hoher Konzentration dargestellt werden. Zum einen präzipitierte das Protein beim Konzentrieren der Lösung und zum anderen wurden bei Analyse der Probe durch SDS-PAGE und Silberfärbung Abbaufragmente beobachtet (hier nicht gezeigt). Da die inaktive Variante der katalytischen Domäne der MMP-12 mit Ala²¹⁹ statt Glu²¹⁹ im katalytischen Zentrum problemlos konzentriert werden konnte, wurde sie für die folgenden Versuche eingesetzt. Der Ala²¹⁹-KaDo/Batimastat-Komplex konnte am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried mit Hilfe der Dampfdiffusionsmethode eines *sitting drops* erfolgreich kristallisiert werden. Nach wenigen Tagen wurden Kristalle mit einer Größe von 600 x 200 x 200 µm erhalten (Abb. 37).

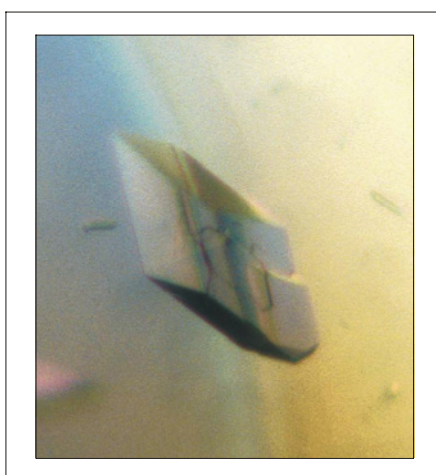


Abb. 37: Kristall von Ala²¹⁹-KaDo der MMP-12 komplexiert mit Batimastat.

Die Röntgenstrukturdaten wurden am Deutschen Elektronen Synchrotron (DESY) in Hamburg aufgenommen. Dieser Datensatz wurde mit Hilfe der Patterson-Suchmethode (*molecular replacement*) unter Verwendung der Kristallstrukturdaten der humanen MMP-3 (PDB Eintrag: 1uea; Gomis-Rüth et al., 1997) ausgewertet. Nach mehreren Verfeinerungen wurde ein in Abbildung 38 dargestelltes, endgültiges Atommodell der Reste Gly¹⁰⁶-Gly²⁶³ mit einer Auflösung von 1,09 Å erhalten. In dieser Abbildung ist die Ala²¹⁹-KaDo der MMP-12 in der „Standardorientierung“ gezeigt, bei der der Betrachter auf das katalytische Zentrum schaut und ein Peptidsubstrat horizontal von links (N-Terminus) nach rechts (C-Terminus) binden würde.

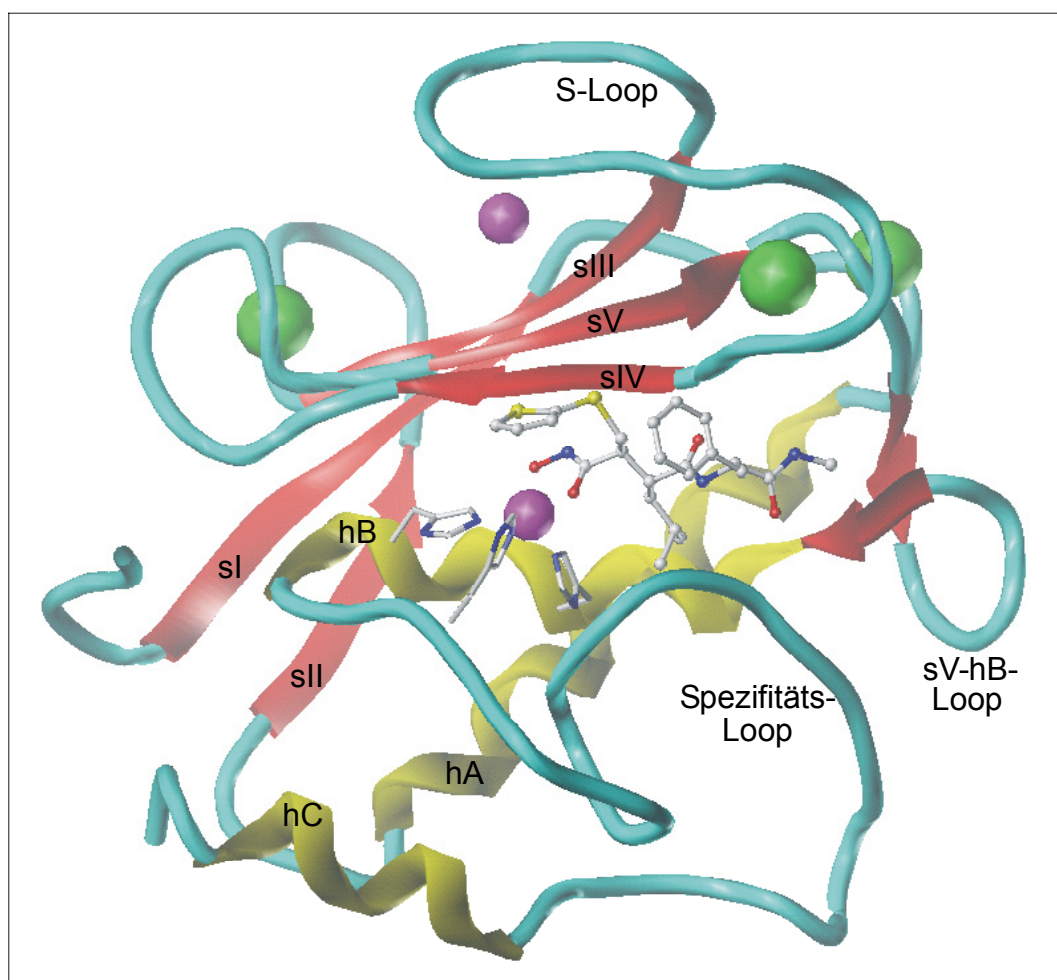


Abb. 38: Ribbon Darstellung der Ala²¹⁹-KaDo der MMP-12 inhibiert durch Batimastat.

Batimastat in *ball and stick* Darstellung; Liganden des katalytischen Zinks (His²¹⁸, His²²² und His²²⁸) als Stäbchenmodell; Zink- bzw. Calciumionen als magentafarbene bzw. grüne Kugeln.

Die Reste Met⁹⁹ bis Gly¹⁰⁵ konnten nicht aufgelöst werden. Dieses deutet auf ihre freie Beweglichkeit hin. Dieses Modell zeigt weiterhin den Inhibitor Batimastat, zwei Zink- und

drei Calciumionen. Die Calciumionen sind oktaedrisch bzw. verzerrt oktaedrisch koordiniert. Das strukturelle Zinkion ist tetraedrisch von Liganden umgeben, wohingegen für das Zinkion des aktiven Zentrums der Ala²¹⁹-KaDo der MMP-12 eine Koordination in der Form einer quadratischen Pyramide gefunden wurde. Die Stickstoffatome der Histidine 222 und 228 spannen zusammen mit dem Hydroxyl- und Carbonylsauerstoffatom der Hydroxamatgruppe des Batimastats die Grundfläche auf und das Stickstoffatom des Histidin 218 bildet die Spitze (Abb. 39).

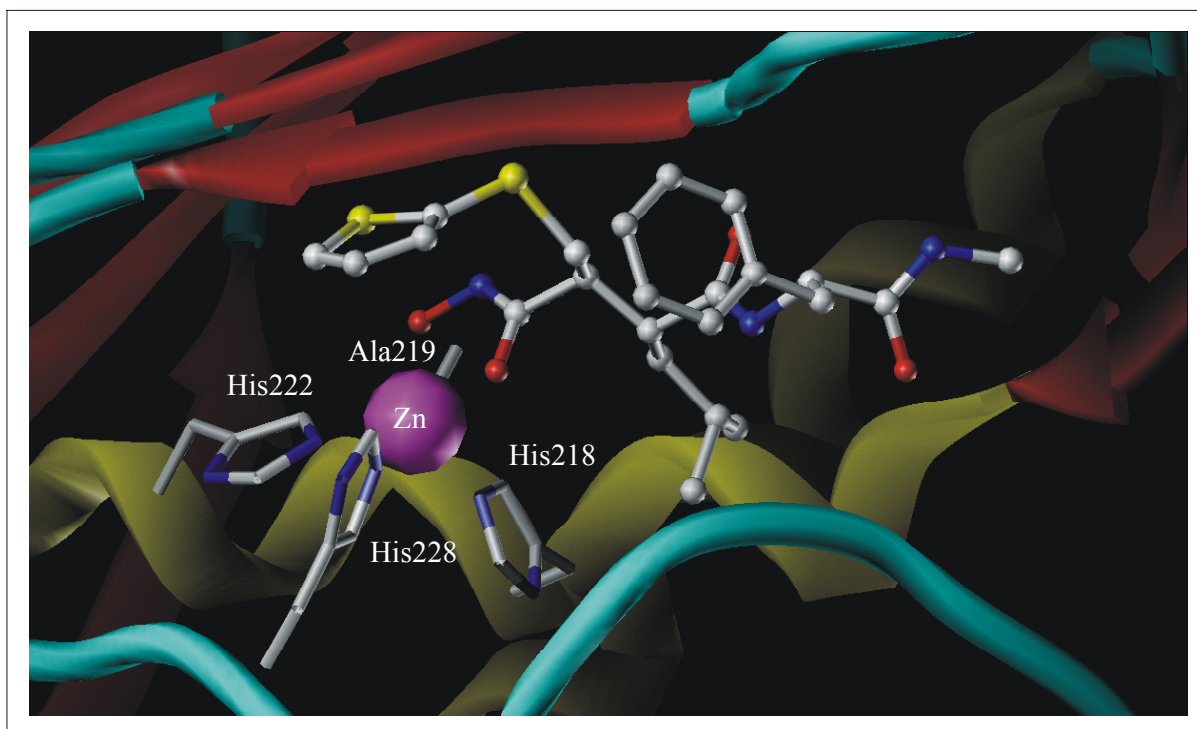


Abb. 39: Ribbon Darstellung des katalytischen Zentrums der Ala²¹⁹-KaDo der MMP-12.

Batimastat in *ball and stick* Darstellung; Liganden des katalytischen Zinks (His²¹⁸, His²²² und His²²⁸) und Ala²¹⁹ als Stäbchenmodell; Zinkion als magentafarbene Kugel.

In dieser Abbildung ist der vom Zinkion teilweise verdeckte Ala²¹⁹ Rest zu erkennen, der aus Stabilitätsgründen für die Aminosäure Glu²¹⁹ durch Mutation eingeführt wurde. Die Isobutylgruppe des Batimastat ist in die Richtung der S1'-Spezifitätstasche ausgerichtet (Abb. 39). Diese S1'-Spezifitätstasche zieht sich durch das gesamte Enzym hindurch. Der Thiophenring liegt direkt über dem katalytischen Zinkion, so dass diese Anordnung an eine Halbsandwichverbindung erinnert. Für den Thiophenring und die Phenylgruppe wurden zwei unterschiedliche Orientierungen gefunden (Abb. 40).

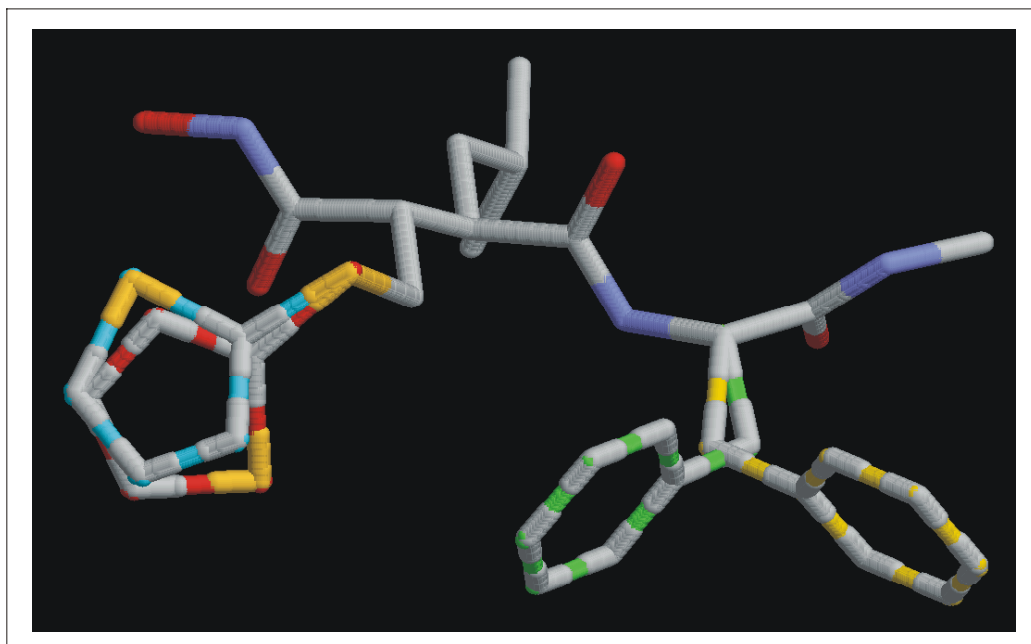


Abb. 40: Unterschiedliche Konformationen des Inhibitors Batimastat.

Batimastat als Stäbchenmodell; Sauerstoff in rot; Stickstoff in blau; Schwefel in gelb; zur besseren Unterscheidung der einzelnen Atome der verschiedenen ausgerichteten Thiophen- und Phenylreste sind die zugehörigen Bindungen der jeweiligen Orientierungen entsprechend farbig markiert.

Die beiden Konformationen des Thiophenringes liegen leicht versetzt in der gleichen Ebene. Der Ring ist dabei um nahezu 180° gedreht, so dass das Schwefelatom bei den verschiedenen Orientierungen in entgegengesetzte Richtungen zeigt. Für die Koordination des Zinkions im katalytischen Zentrum hat dies keine Auswirkung. Der Phenylring des Batimastat weist ebenfalls zwei mögliche Konformationen auf. Diese sind durch die Anordnung der Ala²¹⁹-KaDo der MMP-12 im Kristall bedingt. Dort sind zwei benachbarte Proteine so positioniert, dass die katalytischen Zentren einander zugewandt sind. Aus sterischen Gründen können die Phenylringe der beiden Inhibitoren nicht die gleiche Konformation besitzen. Es wird somit eine 50 %ige Besetzung jeder Orientierung angenommen. In der „normalen“ Konformation ist der Phenylring zum Thiophenring ausgerichtet. Bei der alternativen Konformation ist der Phenylring um ca. 120° in die entgegengesetzte Richtung geklappt.

Vergleich der MMP-12 Struktur mit anderen MMPs

Zum Vergleich der Strukturen verschiedener MMPs wurden die katalytischen Domänen der MMP-1, -2 (Mutante ohne Fibronectin-Typ II Domänen), -3, -7, -8, -12, -13 und MT1-MMP übereinander gelagert. Das Ergebnis ist in der folgenden Abbildung dargestellt (Abb. 41).

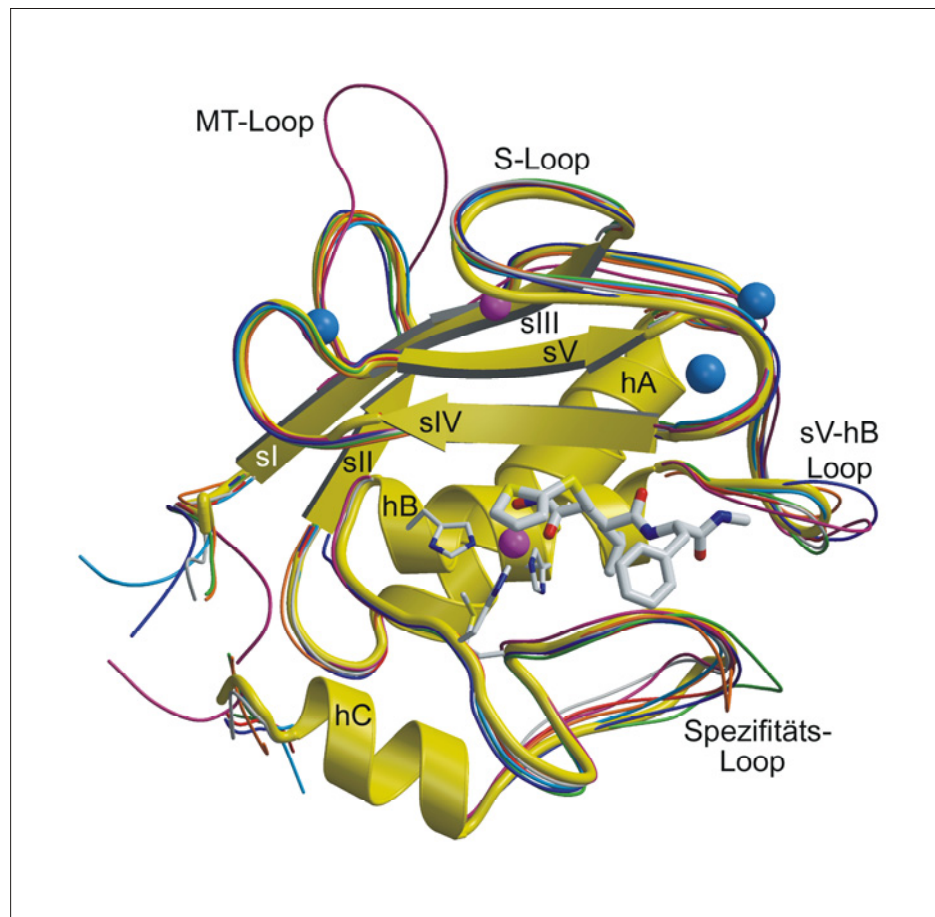


Abb. 41: Überlagerung der katalytischen Domänen.

MMP-1: rot; MMP-2: dunkelblau; MMP-3: grün; MMP-7: dunkelorange; MMP-8: silber; MMP-12: gold; MMP-13: hellblau; MMP-14: lila; Batimastat, die Seitenketten der drei Histidine des katalytischen Zentrums sowie das Methionin des Met-turns sind als Stäbchenmodell gezeigt. Zink- bzw. Calciumionen sind als magentafarbene bzw. grüne Kugeln dargestellt.

In der Abbildung 41 zeigt sich die starke Ähnlichkeit der bislang bekannten MMP-Strukturen. Der S-, sV-hB- und der Spezifitäts-Loop besitzen die größten Unterschiede in der Lage und bei der MT1-MMP ist der zusätzliche MT-Loop zu erkennen. Der S-Loop liegt bei der MMP-12 aufgrund des vorhandenen Alanin 173, an dessen Position sich bei anderen MMPs ein hoch konserviertes Prolin befindet, näher am β -Faltblatt. Einige Seitenketten erstrecken sich dadurch deutlich weiter in die reaktive Spalte des katalytischen Zentrums. Diese Anordnung beeinflusst die S3-Spezifitätstasche, die damit klein und hydrophob, sowie deutlich von der kanalförmigen hydrophoben S1-Tasche abgegrenzt ist. Die S2-Bindungsstelle hat die Form einer flachen hydrophoben Fläche. Durch das in der S1'-Tasche gelegene Threonin 215, an dessen Stelle sich bei fast allen anderen MMPs ein Valinrest befindet, besitzt diese lange Tasche eine schwächere Hydrophobizität. Weiterhin bildet die reaktive

Spalte des katalytischen Zentrums eine hydrophile S2'- und eine hydrophobe S3'-Bindungsstelle aus. Diese Ergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengefasst (Tab. 11).

Tab. 11: Spezifität der Substratbindungsregion der MMP-12.

Tasche	Eigenschaft	Bevorzugte Reste
S3	klein, hydrophob	Gly, Ala, Val, Leu, Ile
S2	flache hydrophobe Fläche	Phe, Tyr
S1	hydrophober Kanal	Phe
S1'	lang, schwach hydrophob	Leu, Lys, Phe, Tyr, Arg
S2'	hydrophil	Arg, Tyr
S3'	hydrophob	Ala, Val, Leu, Ile

Die Ladungsverteilung auf der Oberfläche der MMPs weist wesentlich größere Abweichungen auf. Die Oberflächen der katalytischen Domänen der MMP-1, -3, -7 und -12 sind in der folgenden Abbildung in ihrer Standardorientierung gezeigt (Abb. 42).

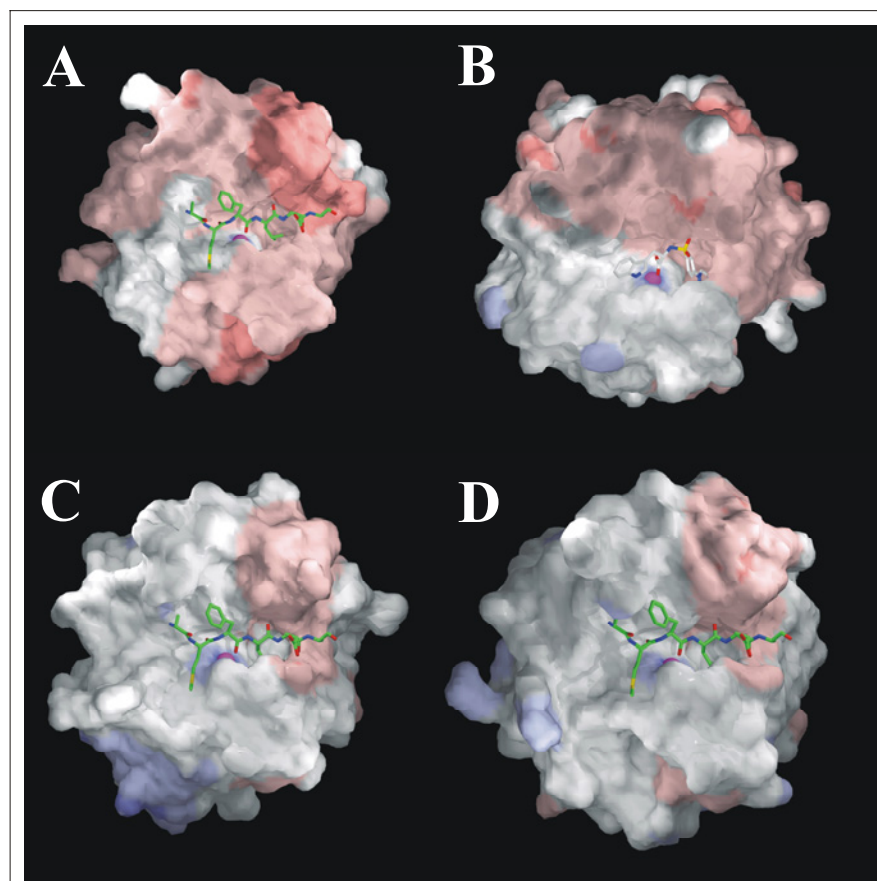


Abb. 42: Ladungsverteilung auf der Oberfläche der katalytischen Domänen der MMP-1 (A), MMP-3 (B), MMP-7 (C) und MMP-12 (D).

Hydrophobe Bereiche sind farblos, negative bzw. positive Ladungen rot bzw. blau gefärbt; in die aktiven Zentren der MMP-1, -7, -12 wurde das Hexapeptid (AMFLEA) modelliert, das aktive Zentrum der MMP-3 enthält einen Inhibitor und bei allen Modellen ist das teilweise verdeckte Zinkion (magenta) zu erkennen.

In dieser Abbildung ist deutlich die reaktive Spalte des katalytischen Zentrums zu erkennen, in der zum einen das Hexapeptid (Ala-Met-Phe-Leu-Glu-Ala) als potentielles Substrat modelliert wurde (**A**, **C** und **D**) und zum anderen ein Inhibitor enthalten ist (**B**). Diese Bereiche der reaktiven Zentren sind bei der MMP-1 und -3 im Vergleich zu den beiden anderen MMPs rötlich gefärbt, womit negativ geladene Bereiche gekennzeichnet sind. Ober- und unterhalb der reaktiven Spalte besitzen die Oberflächen sehr unterschiedliche Ladungsverteilungen. Bei der MMP-1 sind beide Bereiche rot eingefärbt. Die anderen abgebildeten MMPs besitzen oberhalb des katalytischen Zentrums einen negativ geladenen Bereich, wobei dieser bei der MMP-7 und -12 im Verhältnis zur MMP-3 eher klein ausfällt. Der untere Bereich der gezeigten Oberflächen der MMP-3, -7 und -12 sind bis auf wenige positiv geladene Stellen überwiegend hydrophob. Insgesamt besitzt die Oberfläche der katalytischen Domäne der MMP-12 ähnlich wie die der MMP-7 im Vergleich zu den anderen MMPs einen stärker ausgeprägten hydrophoben Charakter. Somit ist mit der Aufklärung der räumlichen Struktur der MMP-12 ein weiterer Ansatzpunkt für die Untersuchung der Substratspezifität dieser MMP geschaffen worden.

6 Diskussion und Ausblick

Die Matrix Metalloproteinasen katalysieren die Umstrukturierung der extrazellulären Matrix bei vielen physiologischen Prozessen. Eine Störung der Regulation dieser Proteinasen wird für viele pathologische Veränderungen wie rheumatoide Arthritis oder Tumordinvasion verantwortlich gemacht [Birkedal-Hansen et al., 1993; Liotta, 1992]. Beispielsweise ist eine Fehlregulation der von Makrophagen sezernierten Makrophagenelastase in Bezug auf das Lungenemphysem und auf Prozesse bei der Arteriosklerose von besonderer Bedeutung [Shapiro, 1994; Halpert et al., 1996]. *In vitro* Untersuchungen der jeweils beteiligten Matrix Metalloproteinasen spielen eine wichtige Rolle, um Hinweise auf mögliche Eigenschaften *in vivo* zu erhalten. Daher wurden in dieser Arbeit verschiedene Varianten der katalytischen Domäne der humanen Makrophagenelastase (HME, MMP-12) kloniert, in *E. coli* exprimiert, isoliert und ihre katalytische Aktivität bestimmt. Darüber hinaus konnte ein ELISA aufgebaut und durch immunhistochemische Untersuchungen die Expression der MMP-12 in verschiedenen Gewebeproben nachgewiesen werden. Die erfolgreiche Kristallisierung einer inaktiven Variante der katalytischen Domäne der Makrophagenelastase ermöglichte zudem die Aufklärung der räumlichen Proteinstruktur.

6.1 Klonierungen

Die cDNA der katalytischen Domäne der MMP-12 ohne (KaDo) und mit Propeptid (ProKaDo) konnte durch RT-PCR mit der Gesamt-RNA aus Plazentagewebe (Abb. 9) amplifiziert werden (Abb. 11). Nachfolgende Klonierungen in die Expressionssysteme verliefen erfolgreich (Abb. 11). Die Sequenzierung ergab im Vergleich zu der von Shapiro et al. (1993) veröffentlichten Sequenz drei ausgetauschte Basen: G114A, T714C und T741C, woraus jedoch keine Änderungen der Aminosäuresequenz resultierten.

Diese Ergebnisse bestätigen frühere Arbeiten, bei denen die cDNA der MMP-12 zum ersten Mal aus der Chondrosarkom-Zelllinie SW 1353 kloniert werden konnte [Kocourek, 1998]. Kerkelä et al. wiesen drei Jahre später ebenfalls die Expression der MMP-12 mRNA in den Chondrosarkomzellen SW 1353 nach. Zusätzlich konnten sie das Protein während der Embryonalentwicklung in Chondrozyten mit immunhistochemischen Methoden detektieren [Kerkelä et al., 2001].

Weiterhin wurde durch Mutagenese-PCR eine cDNA amplifiziert, die für den Aminosäureaustausch Glu219Ala innerhalb des katalytischen Zentrums der MMP-12 kodiert (Abb. 12). Nach Transformation von BL21 (DE3) *E. coli*-Zellen mit dem Plasmid pET11a-Ala²¹⁹-KaDo wurde ein Expressionssystem erhalten, welches erfolgreich für die Expression einer inaktiven KaDo der MMP-12 eingesetzt wurde.

6.2 Expression und Reinigung

Die Darstellung der rekombinanten Proteine erfolgte unter Verwendung der oben genannten Expressionssysteme. Die katalytische Domäne ohne (Met⁹⁹-KaDo) und mit Mutation (Ala²¹⁹-KaDo) konnten nach Expression durch Affinitätschromatographie an Pro-Leu-Gly-NHOH gekoppelter Sepharose bis zur Homogenität gereinigt werden (Abb. 13). Dieses Verfahren wurde erstmals für die MMP-8 beschrieben [Moore & Spilburg, 1986] und stellt nach den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten auch für die MMP-12 ein effizientes Reinigungsverfahren dar. Die Sequenzierung ergab bei beiden Proteinen einen Methioninrest als N-terminalen Klonierungsartefakt.

Die Expression der katalytischen Domäne mit Propeptid verlief erfolgreich (Abb. 14). Während der Reinigung dieses Proteins erfolgte die autokatalytische Abspaltung der Prodomäne, so dass nach der oben genannten Chromatographie die katalytische Domäne ohne Propeptid erfolgreich isoliert wurde (Abb. 14). Diese Form der KaDo besitzt, im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Varianten, mit Phenylalanin 100 den N-Terminus des aktiven Enzyms [Takino et al., 1995].

Diese Ergebnisse bestätigen vorausgegangene Arbeiten von Shapiro et al. (1993) und Chandler et al. (1996). Shapiro et al. verwendeten ein ähnliches Expressionssystem für das Gesamtzym der MMP-12. Sie erhielten nach Reinigung mit Hilfe der Chromatographie an Heparin-Agarose und Einstellung nichtdenaturierender Bedingungen die aktive Form der MMP-12 (22 kDa), aktiviertes Enzym (45 kDa) und ProHME (54 kDa). Durch einen Größenvergleich dieser aktiven Form aus *E. coli* mit der MMP-12 aus humanen Makrophagen zeigte sich, dass eine Glykosylierung trotz zweier potentieller Glykosylierungsstellen unwahrscheinlich ist [Shapiro et al., 1993].

Die von Chandler et al. (1996) beschriebene Expression aus Hamster Ovarienzellen (CHO-Zellen) stellt eine weitere Möglichkeit zur Isolierung der rekombinanten HME dar. Die Reinigung beinhaltete mehrere Reinigungsschritte über Affinitäts- und Ionenaustauschchromatographie und war deshalb wesentlich aufwändiger. Parallel zu der vorliegenden

Arbeit stellten Parkar et al. eine weitere Variante der KaDo der MMP-12 dar. Sie klonierten den Aminosäureabschnitt von Gly¹⁰⁶-Asn²⁶⁸. Die Aufreinigungsstrategie umfasste eine Gelfiltration und eine Chromatographie an SP-Sepharose [Parkar et al., 2000]. Im Gegensatz zu den bisher bekannten Methoden stellt die in dieser Arbeit beschriebene Isolierung der MMP-12 mit nur einem chromatographischen Schritt eine äußerst effiziente Strategie dar. Damit stehen die drei Varianten Met⁹⁹-, Phe¹⁰⁰- und Ala²¹⁹-KaDo der MMP-12 zur weiteren Charakterisierung zur Verfügung.

6.3 Aktivitätsuntersuchungen

Zunächst konnte die Aktivität der Met⁹⁹- und Phe¹⁰⁰-KaDo in Gelatin- und Casein-Zymogrammen nachgewiesen werden, wohingegen die Ala²¹⁹-Mutante keine Degradierung dieser Substrate zeigte (Abb. 15). Auch gegenüber dem Peptid für fluoreszenzkinetische Untersuchungen, Mca-P-L-G-L-Dpa-A-R-NH₂ [Knight et al., 1992], konnte mit dieser Variante keine Aktivität festgestellt werden. Die von Chandler et al. (1996) beschriebene Aktivität der MMP-12 gegenüber dem synthetischen Mca-Peptid wurde mit den im Zymogramm aktiven katalytischen Domänen der HME bestätigt. Durch weitergehende MALDI-TOF-MS Untersuchungen konnte zum ersten Mal die Spaltstelle der MMP-12 innerhalb des Peptids identifiziert werden. Zwei Signale des Spektrums (Abb. 16) konnten eindeutig den Fragmenten Mca-Pro-Leu-NH₂ und Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂ zugeordnet werden. Damit spaltet die KaDo der MMP-12 dieses Mca-Peptid an einer Position, die bisher für keine MMP beschrieben wurde. Die MMP-7 und MT1-MMP spalten das Mca-Peptid N-terminal zum Glycinrest [Knight et al., 1992; Lichte et al., 1996]. Dieses weist auf eine unterschiedliche Substratspezifität hin.

Mit fluoreszenzkinetischen Messungen und Auswertung nach Lineweaver-Burk (Abb. 17; Abb. 18) konnten die Spezifitätskonstanten k_{cat}/K_M für die Met⁹⁹- und Phe¹⁰⁰-KaDo bestimmt werden. In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse gegenüber dem oben erwähnten Mca-Peptid im Vergleich mit Werten für andere MMPs zusammengefasst (Tab. 12).

Tab. 12: Enzymkonstanten der MMP-12 Varianten sowie weiterer MMPs [Woessner & Nagase, 2000].

Enzym	MMP-12		MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-7	MT1-MMP	MT2-MMP
	Met ⁹⁹ -KaDo	Phe ¹⁰⁰ -KaDo						
k_{cat}/K_M [$\cdot 10^3 \text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$]	16,2	149	14,8	629	23	169	120	84

Aufgrund der teilweise unterschiedlichen Reaktionsbedingungen der $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Bestimmungen lassen sich diese Werte nur tendenziell einordnen. Die Phe¹⁰⁰-KaDo besitzt ähnliche Aktivität gegenüber dem Mca-Peptid wie die MMP-7 und MT1-MMP, wobei die Werte der Met⁹⁹-Variante, MMP-1 und MMP-3 vergleichbar sind. Es fällt auf, dass für die Phe¹⁰⁰-KaDo eine fast 10-fach größere Spezifitätskonstante im Vergleich zur Met⁹⁹-KaDo erhalten wurde. Dieser Zusammenhang der $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werte konnte bereits bei Varianten der MMP-8 beobachtet werden [Pieper, 1998]. Bei dieser MMP führte ein verkürzter N-Terminus der katalytischen Domäne (Met⁸⁰) im Vergleich zur nativen Form (Phe⁷⁹) zu einer Abnahme der Spezifitätskonstanten. Daher wird diese native Form auch als „superaktiviert“ bezeichnet. Der Grund dieser Aktivitätsunterschiede konnte durch Bestimmung der Kristallstrukturen aufgeklärt werden. Die „superaktivierte“ Phe⁷⁹-KaDo der MMP-8 besitzt im Gegensatz zu Met⁸⁰-KaDo durch Ausbildung einer Salzbrücke des N-Terminus zum Aspartat 232 eine geordnetere Struktur. Für die beiden Varianten der katalytischen Domäne der MMP-12 kann ein ähnlicher Zusammenhang angenommen werden. Der zusätzliche Methioninrest 99 verhindert dabei die Ausbildung einer Salzbrücke zwischen dem N-Terminus und dem Aspartatrest 253, was in dieser Arbeit im Kapitel 5.7 belegt werden konnte. Hingegen könnte die Aminogruppe des Phenylalanins der Phe¹⁰⁰-KaDo die Salzbrücke ausbilden und damit die Struktur soweit verändern, dass es zu der sogenannten „Superaktivierung“ kommt. Die Strukturaufklärung der Phe¹⁰⁰-KaDo stellt eine Möglichkeit dar, diese Hypothese zu bestätigen.

6.3.1 Inhibierung

Die Spaltung des Mca-Peptids ermöglichte Inhibierungsstudien der aktiven Varianten der katalytischen Domänen der MMP-12 mit ihren natürlichen Inhibitoren, den *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs). In dieser Arbeit konnten erstmalig die IC₅₀-Werte und die Hemmkonstanten K_i für die aktiven Varianten der MMP-12 mit TIMP-1, bTIMP-2 und idTIMP-4 erhalten werden (Tab. 6). Die IC₅₀- und K_i-Werte der MMP-12 Varianten mit den eingesetzten TIMPs lagen erwartungsgemäß im nanomolaren Bereich. Die K_i-Werte sind hierbei um einen Faktor 10 bis 100-fach höher als z.B. für MMP-1 mit TIMP-1 [Woessner & Nagase, 2000]. Dieser Unterschied wird auf die im Gegensatz zur MMP-1 nicht vorhandene Hämopexin-ähnliche Domäne bei der MMP-12 zurückzuführen sein. Diesen Zusammenhang belegten Untersuchungen der Hemmung von z.B. MMP-3 mit und ohne Hämopexin-ähnlicher

Domäne durch TIMP-1. In diesem Fall wurde für die katalytische Domäne ein ca. 10-fach höherer K_i -Wert bestimmt als für das Gesamtzym [Baragi et al., 1994].

Weiterhin ist eine zunehmende Inhibierung von TIMP-1 über bTIMP-2 zu idTIMP-4 zu beobachten. Dabei wurde die Met⁹⁹-KaDo durch TIMP-1 und bTIMP-2 stärker gehemmt als die Phe¹⁰⁰-Variante. Diese Ergebnisse bestätigen Untersuchungen der Hemmung von Varianten der MMP-8 durch bTIMP-2 [Farr et al., 1999]. Dort wurden, wie für die Phe¹⁰⁰-KaDo der MMP-12, höhere K_i -Werte für die „superaktivierte“ katalytische Domäne der MMP-8 erhalten. Für diese Unterschiede wird das für die Komplexbildung notwendige Aufbrechen der Salzbrücke zwischen Phe⁷⁹ und Asp²³² verantwortlich gemacht. Dieses konnte anhand der Kristallstruktur der MMP-3 KaDo komplexiert mit TIMP-1 belegt werden [Gomis-Rüth et al., 1997]. Da der N-Terminus der Met⁹⁹-KaDo der MMP-12 frei beweglich ist, kann hier der TIMP-Komplex leichter gebildet werden, was eine Erniedrigung des K_i -Wertes zur Folge hat. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurde die Phe¹⁰⁰-KaDo bei der Inhibierung durch idTIMP-4 minimal stärker gehemmt, wobei aufgrund der Fehlerbereiche kein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte.

Bislang wurde nur die Inhibierung der MMP-12 durch TIMP-1 qualitativ beschrieben [Shapiro et al., 1993]. In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals die Hemmkonstanten für TIMP-1, bTIMP-2 und idTIMP-4 gegenüber zwei Varianten der katalytischen Domäne der MMP-12 *in vitro* bestimmt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bTIMP-2 und idTIMP-4 eine stärkere Hemmwirkung gegenüber MMP-12 besitzen als TIMP-1. Für weiterführende Interpretationen der Ergebnisse sind *in vivo* Untersuchungen notwendig.

6.4 Substratspaltungen

Nachdem die Makrophagenelastase 1975 als Elastin spaltendes Enzym entdeckt worden war [Werb & Gordon, 1975], nahm die Anzahl der bekannt gewordenen Substrate in den letzten Jahren stark zu (Tab. 2). Unter anderem wurde die *in vitro* Aktivität der MMP-12 gegenüber Plasmaproteinen wie Plasminogen und Fibrinogen nachgewiesen [Cornelius et al., 1998]. Dieses war der Ausgangspunkt für die Untersuchung von Faktoren der Blutgerinnungskaskade als potentielle Substrate. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die Spaltstellen bei diesen neuen sowie bei bereits bekannten Substraten bestimmt werden. Bislang wurden in dieser Hinsicht nur der Inhibitor der neutrophilen Elastase, α 1-Proteinase Inhibitor, und Elastin untersucht [Gronski et al., 1997; Mecham et al., 1997].

6.4.1 Spaltung von Faktoren der Blutgerinnungskaskade

Faktor XII (Hagemann Faktor)

Der Hagemann Faktor wird während der Blutgerinnungskaskade beim intravaskulären System vom Kallikrein/Kinin-System oder durch Autokatalyse aktiviert [Shibayama et al., 1996]. In dieser Arbeit wurden nach Inkubation des Hagemann-Faktors mit der MMP-12 vier Fragmente erhalten (Abb. 20; Tab. 7). Die Fragmente mit N-terminalem Leucin 351 (32 kDa) und Histidin 29 (43 kDa) wurden bereits durch Inkubation des Hagemann Faktors mit der MMP-13 und MT1-MMP generiert [Tschesche et al., 2000]. Der durch Spaltung mit der KaDo der MMP-12 erhaltene Aminoterminus Tyrosin 31 am Anfang der Fibronectin-Typ II ähnlichen Domäne war als Spaltstelle für MMPs bisher unbekannt. Auch die Position Leucin 380 N-terminal der katalytischen Domäne des Faktors XII wurde zum ersten Mal ermittelt. Weiterhin zeigten diese Fragmente keine Aktivität gegenüber einem spezifischen Substrat für Faktor XIIa. Dieses Ergebnis ergänzt die Untersuchungen von Tschesche et al. (2000), bei denen nach Inkubation des Hagemann-Faktors mit der MMP-13 und MT1-MMP keine Aktivität beobachtet wurde. Durch diese *in vitro* Fragmentierung ist der Faktor XII ein potentielles Substrat der MMP-12 *in vivo*. Dabei ist ein genauerer Zusammenhang der proteolytischen Inaktivierung des Hagemann Faktors durch die Makrophagenelastase mit Prozessen *in vivo* von besonderem Interesse.

Prothrombin

Neben der Spaltung von Fibrinogen und Aktivierung von der MT1-MMP [Chiarugi et al., 2000] ist Thrombin in der Lage, die Migration von Endothelzellen bei der Angiogenese von Tumoren zu stimulieren. Dagegen hemmt die Makrophagenelastase durch Bildung von Angiostatin die Proliferation der Endothelzellen [Dong et al., 1997; Chiarugi et al., 2000]. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals die Aktivierung und weitergehende Degradierung von Prothrombin durch die Met⁹⁹-KaDo der MMP-12 untersucht. Es wurde nach Zugabe der MMP-12 ein sofortiger Abbau des Prothrombins beobachtet (Abb. 21A). Im Verlauf der Proteolyse entstanden drei Hauptfragmente und einige weitere Abbau-produkte, deren N-Termini teilweise bestimmt werden konnten (Abb. 21B).

Das 39 kDa große Fragment wurde zusätzlich C-terminal gespalten, da die Proteinkette Leu²¹⁰-Glu⁶²² eine Größe von über 45 kDa besitzt. Die Auswertung der Sequenzierung der Proteinbande bei 30 kDa ergab die Sequenzen für den N-Terminus des Prothrombins (Ala⁴⁴) und die N-terminalen Aminosäuren der β -Kette des Thrombins (Ile³⁶⁴), wobei diese eine

Größe von ca. 30 kDa besitzt. Das Fragment, beginnend mit Alanin 44, wurde durch eine C-terminale Spaltung generiert. Zusätzlich wurde ein 12 kDa Fragment des C-Terminus der β -Kette identifiziert, welches den Serinrest der katalytischen Triade enthält (Tab. 8).

Ein nach 15 minütiger Inkubationszeit durchgeführter Thrombin-Aktivitätstest belegt die Bildung von Thrombin oder einem Fragment mit Thrombinaktivität. Thrombin besitzt eine berechnete Größe von ca. 34 kDa, so dass im SDS-Gel unter nicht-reduzierenden Bedingungen die verbreiterte Bande bei ca. 36-40 kDa dieses aktive Fragment enthalten könnte. Um die Aktivität einem Protein zuzuordnen, ist eine weitere Trennung und Fraktionierung der Fragmente z.B. durch HPLC nötig. Anschließend können die einzelnen Fragmente auf proteolytische Eigenschaft gegenüber dem synthetischen Substrat S-2238 untersucht werden.

Somit wurde *in vitro* erstmalig die Aktivität der MMP-12 gegenüber Prothrombin gezeigt. Bislang ist die Spaltung des Prothrombins von keiner weiteren Matrix Metalloproteinase beschrieben worden. Zum einen entstand ein Fragment mit Thrombinaktivität, zum anderen wurde ein Fragment mit dem Serinrest der katalytischen Triade generiert, wodurch gleichzeitig inaktive Produkte entstanden. Ein grundsätzlicher Zusammenhang der Prothrombindegradierung durch die Makrophagenelastase könnte *in vivo* durch immun-histochemische Kollokalisierung dieser Proteine z.B. bei Angiogeneseprozessen von Tumoren untersucht werden.

Fibrinogen

Fibrinogen besteht aus einem Paar von drei verschiedenen Polypeptidketten $A\alpha$, $B\beta$ und γ , welche über insgesamt 29 Disulfidbrücken untereinander verknüpft sind. Die N-Termini bilden eine zentrale Domäne, die nach Spaltung durch Plasmin isoliert werden kann [Doolittle, 1984]. Innerhalb der Blutgerinnungskaskade spaltet Thrombin vom N-Terminus der Ketten $A\alpha$ und $B\beta$ die Fibrinopeptide A und B ab. Die entstehenden Fibrinmonomere aggregieren anschließend zu unlöslichem Fibrin. Die Auflösung der Fibrinaggregate (Fibrinolyse) wird durch Plasmin katalysiert. Damit ist Plasmin in der Lage, sowohl Fibrinogen als auch Fibrin zu degradieren [Fuss et al., 2001]. Weiterhin spielt Plasmin eine Rolle bei der Aktivierung der Matrix Metalloproteinasen, insbesondere auch der Makrophagenelastase [Carmeliet et al., 1997]. In dieser Arbeit wurde der proteolytische Einfluss der aktiven MMP-12 auf Fibrinogen untersucht. Die α -Kette des Fibrinogens ist bereits nach einer Minute vollständig degradiert (Abb. 22). Die ermittelten Spaltstellen innerhalb der α -Kette des Fibrinogens sind in der Abbildung 42 dargestellt.

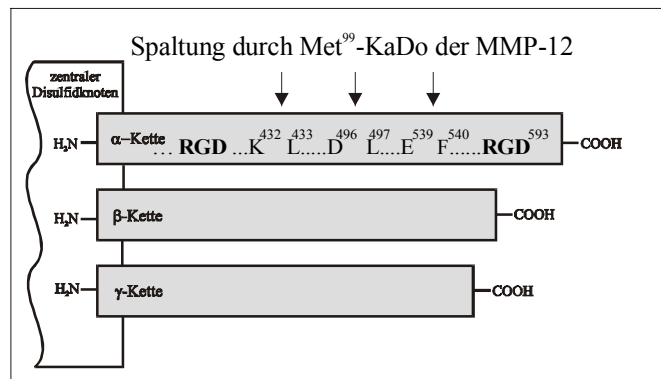


Abb. 42: Schematische Darstellung der durch Met⁹⁹-KaDo der MMP-12 generierten Spaltstellen innerhalb der α-Kette des Fibrinogens.

Durch die C-terminale Spaltung der α-Kette wird eine RGD-Sequenz (591-593) proteolytisch abgetrennt. Diese Sequenz ist für die Bindung an Zellen über den β₃-Integrin Rezeptor wichtig [Cheresh & Berliner, 1989]. Weiterhin kann die durch α_vβ₃-Integrin vermittelte Adhäsion humaner Melanomzellen an Fibrinogen durch die Abspaltung dieser RGD-Sequenz beeinträchtigt werden [Felding-Habermann et al., 1991].

In vitro Untersuchungen zur Bestimmung des funktionell aktiven Fibrinogens nach verschiedenen Inkubationszeiten mit der MMP-12 zeigten eine Abnahme der Koagulationsfähigkeit um über 50 % schon nach 15 Minuten (Abb. 23). Damit konnte erstmals der zu einem Funktionsverlust führende Abbau des Fibrinogens durch die MMP-12 gezeigt werden. Bis auf die Spaltstelle zwischen Lys⁴³²-Leu⁴³³ (MT1-MMP) waren die im Rahmen dieser Arbeit mit der MMP-12 identifizierten Spaltstellen innerhalb der α-Kette bislang für MMPs unbekannt [Tschesche et al., 2000; Hiller et al., 2000]. Die Auswirkung dieser Degradierung des Fibrinogens *in vivo* ist bisher noch unklar.

Von besonderem Interesse sind die in ihrer physiologischen Konsequenz gegensätzlichen Ergebnisse der einzelnen von der MMP-12 gespaltenen Faktoren der Blutgerinnungskaskade. Der Faktor XII wird degradiert und besitzt anschließend keine katalytische Aktivität. Die physiologische Funktion des Fibrinogens wird durch Inkubation mit der MMP-12 eingeschränkt. Damit wird die Blutgerinnung durch beide Prozesse gehemmt. Allerdings bildet die MMP-12 aus Prothrombin Fragmente, die *in vitro* Aktivität gegenüber einem Thrombin-spezifischen, synthetischen Substrat besitzen. Somit könnte Fibrinogen zu Fibrin umgewandelt werden und als Folge die Hemmung der Blutgerinnung wieder aufgehoben werden. Aufgrund der Komplexität dieser Prozesse *in vivo* bedarf es weiterer Untersuchungen, um die Zusammenhänge aufzuklären.

6.4.2 Spaltung von weiteren potentiellen Substraten

Substanz P

Die Substanz P gehört zur Gruppe der Neuropeptide und ist im Organismus im Wesentlichen für die Vermittlung der Schmerzwahrnehmung verantwortlich. Dabei überträgt dieses Undeca-peptid Nervenimpulse im peripheren und zentralen Nervensystem. Ebenfalls hohe Konzentrationen der Substanz P wurden in Organen wie Thymus, Milz und Darm gefunden. *In vivo* wird die Substanz P von der Endopeptidase 24.11 (Enkephalinase) und von dem *angiotensin converting enzyme* (ACE) gespalten. In vorausgehenden Arbeiten konnte eine Degradierung von Substanz P durch die MMP-8, -9, -13 und MT1-MMP gezeigt werden [Diekmann & Tschesche, 1994; Oberpichler, 1999; Lichte, 1997]. In der folgenden Abbildung 43 sind die durch die MMP-12 generierten Spaltstellen den bislang ermittelten gegenübergestellt.

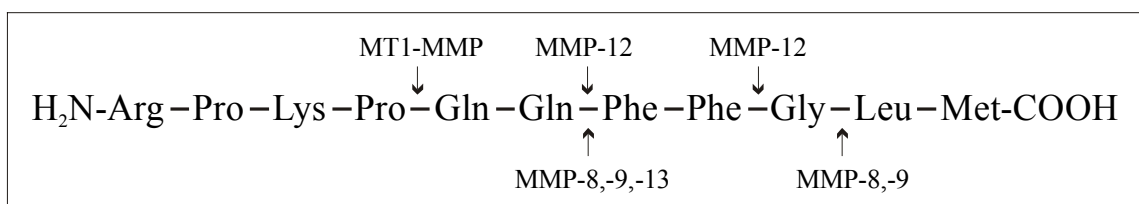


Abb. 43: Vergleich der Spaltstellen von MMP-8, -9, -12, -13 und MT1-MMP anhand der Substanz P.

Diese Abbildung zeigt deutlich die unterschiedliche Substratspezifität der einzelnen MMPs. Die Makrophagenelastase spaltet die Substanz P an einer für MMPs bereits bekannten und einer unbekannt Position. Inwieweit dieses Ergebnis auf *in vivo* Bedingungen übertragbar ist und welche physiologische Bedeutung es hat, kann nur vermutet werden. Analog zu den Spaltungen mit der MMP-8, -9, -13 und MT1-MMP lässt sich eine biologische Aktivität der Fragmente diskutieren [Diekmann & Tschesche, 1994; Oberpichler, 1999; Lichte, 1997]. Für das N-terminale Tetrapeptid wurde ein stimulatorischer Effekt auf die phagozytotische Aktivität von Makrophagen der Maus und humanen polymorphkernigen Leukozyten nachgewiesen [Bar-Shavit et al., 1980]. Weiterhin konnten Bergmann et al. (1974) am Meerschweinchendarm demonstrieren, dass die Kontraktion des Darms bei verringerter Kettenlänge der Substanz P zunimmt [Bergmann et al., 1974].

Myelin basic protein (MBP)

Die Myelinscheide der Axone besteht zum Großteil aus dem *myelin basic protein*. Dieses Protein wird bei pathologischen entzündlichen Prozessen wie dem Guillain-Barré Syndrom abgebaut. Im Tiermodell dieser Erkrankung, der sogenannten *experimental autoimmune neuritis* (EAN), konnte eine erhöhte Expression der Makrophagenelastase nachgewiesen werden [Hughes et al., 1998]. Zusätzlich wurde die MMP-12 im zentralen Nervensystem von Mäusen mit *experimental autoimmune encephalomyelitis*, einer Entzündung des Gehirns und Rückenmarks, immunhistochemisch detektiert [Pagenstecher et al., 1998]. Ausgehend von diesen Ergebnissen und den Untersuchungen des *myelin basic proteins* als potentiellm Substrat der MMP-12 [Chandler et al., 1996] wurden Spaltstellen innerhalb des MBPs identifiziert. Die Inkubation dieses Proteins mit der Met⁹⁹-KaDo der MMP-12 führte innerhalb von 30 Minuten zum vollständigen Abbau aller Proteinketten größer als ca. 12 kDa (Abb. 25A). Durch N-terminale Sequenzierung konnten zwei Spaltstellen der MMP-12 bestimmt werden (Abb. 25B). Aufgrund dieser *in vitro* Spaltung des *myelin basic proteins* und der immunhistochemischen Lokalisierung der MMP-12 bei entzündlichen Prozessen im zentralen Nervensystem ist eine Beteiligung der MMP-12 bei Demyelinisierungen von Neuronen anzunehmen. Zusätzlich könnte das gebildete Fragment Phe²²⁴-Asp²⁶⁷ (12 kDa) immunogene Wirkung besitzen, so dass diese Prozesse durch die MMP-12-Spaltung des MBPs verstärkt werden [Campagnoni & Skoff, 2001].

6.5 Entwicklung eines ELISAs für die Makrophagenelastase

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit bestand in der Entwicklung eines ELISAs für die MMP-12. Die Herstellung der polyklonalen Antikörper sowohl gegen das Peptid mit der Sequenz TYKYVDINTFRLSA als auch gegen die Ala²¹⁹-KaDo der MMP-12 verlief erfolgreich. Der Titer des anti-Peptid Serums war wesentlich niedriger als der des anti-Ala²¹⁹-KaDo Serums, so dass anti-Ala²¹⁹-KaDo Antikörper zum Aufbau eines ELISAs für die MMP-12 verwendet wurden. Die Isolierung der Antikörper mit Hilfe der Affinitätschromatographie an Protein A-Sepharose (Abb. 26) lieferte bis zu 10 mg IgG pro Milliliter Serum. Nach anschließender Chromatographie an einer weiteren Affinitätsmatrix konnte der Antikörper mit einer Ausbeute von ca. 300 µg/mL Serum immunoaffinitäts-gereinigt isoliert werden (Abb. 27). Nach Optimierung der Reaktionsbedingungen lag die Sensitivität des Sandwich-ELISAs bei ca. 100 ng/mL MMP-12 (Abb. 28), wobei Meerrettich-Peroxidase

konjugierte anti-Ala²¹⁹-KaDo-MMP-12 Detektionsantikörper eingesetzt wurden. Die Sensitivität eines kommerziellen Sandwich-ELISAs gegen die MMP-9 beträgt zum Vergleich 0,16 ng/mL [R & D Systems, 2001]. Die Ursache für die geringe Sensitivität des MMP-12-ELISAs ist vermutlich auf die unvollständig gekoppelten Detektionsantikörper zurückzuführen, so dass der überwiegende Teil der Antikörper nach der Kopplungsreaktion unkonjugiert vorlag. Dieses wurde durch eine Titerbestimmung der Detektionsantikörperlösungen belegt, wobei ein sehr niedriger Titer von ca. 1:20000 erhalten wurde. Dieser Sandwich-ELISA könnte durch den Einsatz eines monoklonalen Maus Antikörpers gegen die MMP-12 für die Immobilisierung optimiert werden. Zum einen würde die Spezifität erhöht und zum anderen durch ein Detektionssystem aus polyklonalem immunoaffinitäts-gereinigten anti-Ala²¹⁹-KaDo Kaninchenantikörpern mit konjugierten anti-Kaninchen IgGs die Sensitivität verbessert. Mit einem derartigen System wird z.B. die MMP-13 in einem Bereich von 0,5 bis 50 ng/mL nachgewiesen [Hantke et al., 2002].

Bei dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten kompetitiven ELISA wurden kommerziell erhältliche, mit Meerrettich-Peroxidase konjugierte anti-Kaninchen Antikörper zur Detektion verwendet. Nach Optimierung aller Parameter wurde eine Standardkurve erhalten (Abb. 30), die einen annähernd linearen Bereich von 5 bis 100 ng/mL Antigen besitzt und eine Sensitivität von 3 ng/mL aufweist. Mit diesem ELISA wurde keine Kreuzreaktivität gegenüber MMP-2, -8, -9, -13 und -14 festgestellt. Weiterhin konnte in einer Probe die rekombinante humane MMP-12 aus Makrophagen erfolgreich detektiert werden. Um eine unspezifische Reaktion auszuschließen, wurde der ELISA mit Plasma, Liquor und Synovialflüssigkeit durchgeführt. Bei den Plasmaproben zeigte sich eine schwache Reaktivität, die bislang keinem Protein zugeordnet werden konnte. Durch Immunpräzipitation und anschließende SDS-PAGE bzw. N-terminale Sequenzierung könnte dieses Protein identifiziert werden. Untersuchungen der Liquorproben und Synovialflüssigkeiten ergaben keinen Hinweis auf eine unspezifische Reaktion. Somit wurde in dieser Arbeit erstmals ein kompetitiver ELISA entwickelt, der bereits zur Detektion der MMP-12 in verschiedenen Proben verwendet wurde [Hantke et al., 2002]. Ein weiterer möglicher Einsatzbereich ist z.B. die Quantifizierung der MMP-12 in Tumorgewebe, um die MMP-12 Konzentration mit Angiogeneseprozessen zu korrelieren. Bislang sind nur qualitative Nachweise bekannt [Gorrin-Rivas et al., 1998].

6.6 Immunhistochemische Untersuchungen

Bereits in den neunziger Jahren wurde die Expression der Makrophagenelastase in Lungenmakrophagen von Rauchern [Shapiro et al., 1993] und in Stromazellen der Plazenta beschrieben [Belaouaj et al., 1995]. Nachfolgend wurde die MMP-12 in Makrophagen bei verschiedenen Krankheitsbildern wie z.B. Arteriosklerose und Aneurysma nachgewiesen [Halpert et al., 1996; Curci et al., 1999]. Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen, dass transformierte maligne Endothelzellen bei Hauttumoren [Kerkelä et al., 2000], Osteoclasten [Hou et al., 1997] und fötale Chondrozyten [Kerkelä et al., 2001] in der Lage sind, die Makrophagenelastase zu exprimieren. Mit Hilfe der immunoaffinitäts-gereinigten anti-Ala²¹⁹-KaDo-MMP-12 Antikörper sollten in dieser Arbeit immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt werden, um die mögliche Expression der MMP-12 bei verschiedenen pathologischen Hautveränderungen und in weiteren zur Verfügung stehenden Geweben nachzuweisen (Tab. 10).

Hautgewebe

Die Matrix Metalloproteinasen spielen im Hautgewebe eine wichtige Rolle bei Entzündungen, Gefäßneubildungen, Wundheilung und malignen Prozessen [Suomela et al., 2001]. Über das Vorkommen und die Funktion der MMP-12 bei physiologischen und pathologischen Prozessen in der Haut ist bisher relativ wenig bekannt. Mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungen wurde die MMP-12 mRNA in Makrophagen bei den mit entzündlichen Veränderungen einhergehenden Krankheiten Psoriasis und Dermatitis herpetiformis nachgewiesen [Suomela et al., 2001; Salmela et al., 2001]. Weiterhin belegten immunhistochemische Untersuchungen die Expression der MMP-12 in Makrophagen in Hautgeweben mit dem Befund „Granulorum anulare“ [Vaalamo et al., 1999] sowie in malignen Endothelzellen [Kerkelä et al., 2000].

Die Makrophagenelastase wurde in dieser Arbeit in Gewebeproben mit den Krankheitsbildern Ekzem, Lupus erythematoses und Dermatitis herpetiformis erstmals im Bereich des Stratum granulosum der Epidermis nachgewiesen (Abb. 33A-C). Dabei zeigte das Cytoplasma der Keratinozyten in dieser Schicht eine deutliche Rotfärbung. Inwiefern diese intrazelluläre Expression der MMP-12 mit der in diesen Zellen stattfindenden Verhornung im Zusammenhang steht, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Bei Lepra lepromatosa wurde eine starke Expression der MMP-12 unterhalb der Epidermisschichten detektiert. Dieser Hautbereich ist bei der lepromatösen Form massiv von Bakterien infiltriert. Somit könnte es sich bei der Sekretion von MMP-12 der Makrophagen in dem infektiösen

Hautgewebe um eine Abwehrreaktion gegen diese Bakterien handeln. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits von Hartzell et al. (1999) beschrieben. Bei diesen Untersuchungen konnten sich in Mäusen, die nicht in der Lage waren, die MMP-12 zu exprimieren, Bakterien ausbreiten, die in Wildtyp Mäusen nach ein bis zwei Wochen nicht mehr nachzuweisen waren. Diese potentielle Schutzfunktion der Makrophagen gegen Bakterien durch Expression der MMP-12 sollte in weiteren Studien untersucht werden.

Andere Gewebe

Gesundes Milzgewebe ist von Makrophagen infiltriert. In diesem Gewebe konnte die mRNA der MMP-12 bereits durch *in situ* Hybridisierung bei Ratten detektiert werden [Fu et al., 2001]. In dieser Arbeit wurde die Makrophagenelastase zum ersten Mal auf Proteinebene in den Makrophagen der humanen Milz nachgewiesen. Zusätzlich zeigte die Gefäßwand der Zentralarterie eine rote Anfärbung, was auf eine Expression der MMP-12 in diesem Bereich hindeutet. Über eine physiologische Bedeutung dieser Expression können derzeit jedoch noch keine Aussagen getroffen werden. Alle weiteren humanen Gewebe zeigten keine charakteristische Anfärbung, so dass eine Expression der MMP-12 in den untersuchten Proben ausgeschlossen werden kann.

Rückenmarksgewebe

Vor wenigen Jahren wurde die Expression der MMP-12 im Nervensystem bei dem Tiermodell für entzündliche Demyelinisierungserkrankungen, *experimental autoimmune neuritis*, beschrieben [Hughes et al., 1998]. Mit der sogenannten *wobbler* Maus stand für diese Arbeit ein ähnliches Tiermodell für humane degenerative Erkrankungen der Motoneuronen wie amyotrophe Lateralsklerose und spinale Muskelatrophien zur Verfügung. Diese Maus weist einen Gendefekt auf, der bei den Tieren zu einer Degeneration von motorischen Neuronen im Hirnstamm, Kleinhirn und Rückenmark führt. Als Folge besitzt diese Maus eine Atrophie der Muskulatur, die sich besonders bei den Vorderbeinen bemerkbar macht [Duchen & Strich, 1968]. In den von der Neuronendegeneration betroffenen Bereichen treten verstärkt reaktive Gliazellen auf, zu denen die Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikrogliazellen zählen. Weiterhin sind die Konzentrationen der Cytokine TNF- α und Interleukin-1 β erhöht. Beide Faktoren sind in der Lage, die Expression der MMP-12 zu induzieren. In Vorarbeiten von U. Schlomann (Arbeitsgruppe Dr. J.-W. Bartsch, Fakultät Biologie, Universität Bielefeld) konnte bereits die stark erhöhte Konzentration der MMP-12 mRNA im Rückenmarksgewebe der *wobbler* Maus im Vergleich zum Wildtyp gezeigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die stark exprimierte MMP-12 im Bereich der degenerierten Neuronen immunhistologisch detektiert (Abb. 36B). Für diese Expression sind die dort vorhandenen aktivierten Mikrogliazellen verantwortlich. In diesem Zusammenhang konnte für reaktive Astrozyten bereits die Expression der MT1-MMP bei *wobbler* Mäusen nachgewiesen werden [Rathke-Hartlieb et al., 2000]. Somit spielen die MMPs bei neurodegenerativen wie auch entzündlichen Prozessen im Nervengewebe eine entscheidende Rolle. Dabei kann die Fähigkeit der MMP-12 das *myelin basic protein* zu spalten zusätzlich von Bedeutung sein. Aufgrund dieser Untersuchungen am Mausmodell für humane Motoneuronenerkrankungen wird eine Beteiligung der MMP-12 bei pathologischen Prozessen, die zur Muskelatrophie führen, vermutet. Weitere Untersuchungen an humanem Gewebe mit amyotropher Lateralsklerose oder spinaler Muskelatrophie sollten folgen, um die mögliche Bedeutung der MMP-12 bei diesen Erkrankungen zu klären. Dieses könnte ein wichtiger Ansatzpunkt für die Entwicklung therapeutischer Maßnahmen darstellen.

6.7 Bestimmung der Kristallstruktur der MMP-12

Seit den Arbeiten von Lovejoy et al. (1994), in denen die Kristallstruktur der katalytischen Domäne der MMP-1 beschrieben wurde, konnten bereits einige weitere MMP-Strukturen aufgeklärt werden [Woessner & Nagase, 2000]. Die Matrix Metalloproteinasen besitzen danach einerseits ein sehr ähnliches Faltungsmotiv, weisen jedoch andererseits zum Teil recht unterschiedliche Substratspezifitäten auf. Wegen der hohen Effizienz der Makrophagenelastase bei der Spaltung von Elastin im Vergleich zu anderen MMPs, war es von besonderem Interesse, diese Proteinase zu kristallisieren und die dreidimensionale Struktur aufzuklären. Nachdem eine für die Kristallisierung ausreichende Menge der inaktiven Mutante der MMP-12 dargestellt worden war, konnte diese im Komplex mit dem spezifischen Inhibitor Batimastat am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried erfolgreich kristallisiert werden. Die Auswertung der Röntgenstrukturdaten lieferte ein räumliches Atommodell mit einer Auflösung von 1,09 Ångström. Hierbei konnten im Bereich der Aminosäurereste von Gly¹⁰⁶-Gly²⁶³ fast alle Atome eindeutig lokalisiert werden. Die Elektronendichte der N-terminalen Aminosäuren Met⁹⁹-Gly¹⁰⁵ war nicht definiert, da diese im Kristall flexibel vorlagen. Ein ähnliches Phänomen wurde bereits für eine N-terminal verkürzte katalytische Domäne (Met⁸⁰-KaDo) der MMP-8 beschrieben [Bode et al., 1994]. Im Gegensatz dazu war der N-Terminus bei der sogenannten „superaktivierten“ MMP-8 (Phe⁷⁹-KaDo) vollständig

lokalisiert [Reinemer et al., 1994]. Dafür war die Ausbildung einer Salzbrücke zwischen der N-terminalen Aminogruppe des Phenylalanins 79 mit der Carboxylatgruppe des in der α -Helix hC konservierten Aspartat 232 verantwortlich. Bei der katalytischen Domäne der MMP-12 mit dem Klonierungsartefakt Met⁹⁹ ist die Ausbildung der stabilisierenden Salzbrücke zwischen Phe¹⁰⁰ und Asp²⁵³ im Vergleich zur „superaktivierten“ Phe¹⁰⁰-KaDo unterbunden. Eine Variante der katalytischen Domäne der MMP-12 mit Glycin 99 als N-terminale Aminosäure, für die Nar et al. (2001) die Struktur bestimmten, zeigte durch Bindung der N-H Gruppe des Phe¹⁰⁰ an die Carboxylatgruppe des Asp²⁵³ einen definierten N-Terminus. Die sterisch weniger anspruchsvolle Aminosäure Glycin besitzt somit keinen Einfluss auf die Ausbildung der Salzbrücke. Die Auswirkung dieser „geordneteren“ Struktur auf die Aktivität gegenüber einem synthetischen Substrat konnte in dieser Arbeit im Kapitel 4.3 gezeigt werden. Ob sich weitere Unterschiede in der Substratspezifität für die verschiedenen Varianten ergeben, ist bislang unklar.

Die größte Abweichung der Konformation weist die MMP-12 gegenüber anderen MMPs in der Lage des *S-Loops* auf (Abb. 41), wodurch die Substratbindungsregion beeinflusst wird. Die Ergebnisse der Struktur des reaktiven Zentrums (Tab. 11) stehen im Einklang mit bislang aufgrund von Inhibitions- und Aktivitätsstudien angestellten Vermutungen. Burchardt et al. (2000) und Schøidt et al. (2001) führten Messungen der inhibitorischen Wirkung von Peptiden auf die katalytische Aktivität der MMP-12 durch. Die Peptide waren aus einer inhibitorischen Gruppe an den Positionen P1, P1' und variablen Resten an den Positionen P4-P4' aufgebaut. Die besten Inhibitoren besitzen kleine hydrophobe Aminosäuren (Leu, Ile) an P3 und lange hydrophobe Reste (Tyr, Phe) an P2-Position, was durch die Struktur- aufklärung der S3 und S2-Tasche belegt werden konnte (Tab. 11). Bei den Resten in P2' und P3'-Stellung konnte keine hohe Selektivität festgestellt werden. Inhibitoren mit Tyr, Leu, Ile Arg, Val in P2' und Ala, Leu, Ile in P3'-Position zeigten gute inhibitorische Eigenschaften.

Weiterhin konnte mit Hilfe von kinetischen Messungen der Spaltung synthetischer Peptide mit unterschiedlichen Aminosäuren in P1'-Position durch die MMP-12 eine Spezifitätsreihe aufgestellt werden: Leu >> Ala > Lys > Phe > Tyr > Trp > Arg > Ser > Glu [Gronski et al., 1997]. Damit deuten diese Aktivitätsmessungen auf eine tiefe S1'-Tasche hin, die im Gegensatz zu anderen MMPs Arginin binden kann. Dieses wird durch das Threonin 215 an Stelle eines Valinrestes bei anderen MMPs ermöglicht. Eine Argininseitenkette des Substrats kann durch Wasserstoffbrückenbindungen zu Threonin stabilisiert werden.

Weitere *in vitro* Studien der Substratspezifität von MMP-12 im Vergleich mit MMP-9 wurden an unlöslichem Elastin durchgeführt [Mecham et al., 1997]. Die freien Aminogruppen des

Elastins wurden vor Inkubation mit den Proteinasen blockiert. Anschließend konnten durch Enzymeinwirkung Fragmente abgespalten werden. Diese löslichen Fragmente wurden isoliert und ihre N-Termini durch Aminosäuresequenzierung bestimmt. Die Makrophagenelastase zeigte auch hier die größte Affinität zu Leucin in P1'-Position, wohingegen MMP-9 Alanin bevorzugte.

Neben Unterschieden in der Ausprägung der Bindungstaschen der reaktiven Spalte besitzen die MMPs untereinander sehr abweichende Ladungsverteilung auf ihren Oberflächen (Abb. 42). Die MMP-12 ist durch ein sehr hydrophobes und teilweise leicht basisches Oberflächenpotential charakterisiert. Diese Eigenschaft könnte für die hohe Effizienz beim Abbau des Elastins durch die MMP-12 verantwortlich sein. Elastin ist ein unlösliches, in hohem Maß quervernetztes Protein, das sehr hydrophobe Glycin-reiche Regionen mit zusätzlichen Alanin-, Prolin-, Valin- und Leucinresten enthält. Durch die hydrophobe Oberfläche könnte sich die MMP-12 sehr gut an diese Regionen anlagern, um im Anschluss einzelne Ketten zu spalten. Dabei ist die Anlagerung nicht auf die reaktive Spalte begrenzt. Dieses folgt aus dem Nachweis, dass die Inhibierung der aktiven MMP-12 durch TIMP-1 die Bindung von MMP-12 an Elastin kaum beeinträchtigt [Curci et al., 1998]. Nachdem TIMP-1 bei der Bindung an MMP-12 den größten Teil der „Frontoberfläche“ der Elastase bedeckt, kann auf eine weitere Elastinbindungsstelle geschlossen werden. Diese befindet sich im Bereich der katalytischen Domäne, da die aktive MMP-12 ohne Hämopexin-ähnliche Domäne vorliegt.

Die Makrophagenelastase besitzt ein ähnliches Oberflächenpotential verglichen mit Matrilysin (MMP-7). Die Substratbindungstaschen im katalytischen Zentrum weisen dagegen geringe Unterschiede auf. Die S1'-Spezifitätstasche und die S2-Bindungsstelle sind bei der MMP-7 stärker begrenzt als bei der MMP-12. Trotzdem besitzen beide Enzyme eine vergleichbare Aktivität, die sich z.B. bei dem Abbau von Elastin [Mecham et al., 1997], in der Deaktivierung von α 1-Proteinase Inhibitor [Sires et al., 1994] und in der Freisetzung von Angiostatin [Cornelius et al., 1998; Dong et al., 1997] äußert. Vermutlich spielt dabei auch die Größe dieser MMPs eine Rolle, da beide in ihrer aktiven Form *in vivo* nur als katalytische Domänen ohne Hämopexin-ähnliche Domäne vorliegen.

Im Vergleich zur MMP-1 und MMP-3 besitzt die MMP-12 sehr unterschiedliche Substratbindungstaschen und Oberflächeneigenschaften. Die Oberflächen der MMP-1 und MMP-3 weisen wesentlich größere negative Bereiche in der Substratbindungsregion auf (Abb. 42). Diese detaillierten Strukturinformationen der einzelnen MMPs könnten in Zukunft

als Ausgangspunkt für die Entwicklung spezifischer Inhibitoren dienen. Aufgrund der hier beschriebenen Eigenschaften der Bindungsstellen S2 und S3 der MMP-12 und der von Burchardt et al. (2000) festgestellten hohen Spezifität dieser Taschen sollten selektivere Peptid-Inhibitoren für MMPs durch Variationen der entsprechenden Aminosäuren in P2 und P3-Stellung der Substrat-ähnlichen Inhibitoren hergestellt werden. Bislang steht die S1'-Tasche und damit der P1'-Rest im Mittelpunkt bei der Entwicklung von Inhibitoren. Die Bedeutung der hohen Selektivität wird z.B. beim Einsatz von MMP-Inhibitoren bei Krebserkrankungen deutlich. Dort unterstützen insbesondere die MMP-9 und MT1-MMP durch Abbau der extrazellulären Matrix die Invasivität der Tumorzellen, weswegen eine Hemmung dieser MMPs angestrebt wird. Hingegen inhibiert die MMP-12 die Angiogenese eines Tumors durch Abspaltung von Angiostatin aus Plasminogen. Diese sich auf den Krankheitsverlauf positiv auswirkende Eigenschaft der Makrophagenelastase würde durch unspezifische MMP-Inhibitoren unterdrückt werden.

Somit wurden im Rahmen dieser Arbeit basierend auf der Klonierung und effizienter, rekombinanter Darstellung der katalytischen Domäne der humanen Makrophagenelastase zum einen Hinweise auf die physiologische Bedeutung des Enzyms bei der Blutgerinnung erhalten. Des Weiteren wurde die Detektion und Quantifizierung der MMP-12 in Geweben durch immunhistochemische Untersuchungen und die erfolgreiche Entwicklung eines ELISAs möglich. Außerdem stellt die Strukturaufklärung der MMP-12 eine wichtige Grundlage für die Synthese potenter und selektiver Inhibitoren dar, die in Zukunft zur Therapie verschiedener Krankheitsbilder, z.B. des Lungenemphysems, eingesetzt werden könnten.

7 Literatur

- Ayad S.E., Boot-Handford R.P., Humphries M.J. (1998), The extracellular matrix factsbook, 2nd Edition, Academic Press.
- Banda M.J., Werb Z. (1981), Mouse macrophage elastase: purification and characterization as a metalloproteinase, *Biochem. J.* **193**, 589-605.
- Baragi V.M., Fliszar C.J., Conroy M.C., Ye Q.Z., Shipley J.M., Welgus H.G. (1994), Contribution of the C-terminal domain of metalloproteinases to binding by tissue inhibitor of metalloproteinases. C-terminal truncated stromelysin and matrilysin exhibit equally compromised binding affinities as compared to full-length stromelysin, *J. Biol. Chem.* **269**, 12692-12697.
- Bar-Shavit Z., Goldmann R., Stabinski Bar-Shavit Z., Goldmann R., Stabinski Y., Gottlieb P., Fridkin M., Teichberg V.I., Blumberg S. (1980), Enhancement of phagocytosis - A newly found activity of substance P residing in its N-terminal Tetrapeptide sequence, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **94**, 1445-1451.
- 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., Lefebvre O., Noël A., Chenard M.-P., Wolf C., Anglard P., Rio M.-C. (1997), Stromelysin-3: a paradigm for stroma-derived factors implicated in carcinoma progression, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **26**, 43-53.
- Bauer E.A., Eisen A.Z., Jeffrey J.J. (1970), Immunologic relationship of a purified human skin collagenase to other human and animal collagenases, *Biochem. Biophys. Acta* **206**, 152-160.
- Belaouaj A., Shipley J.M., Kobayashi D.K., Zimonjic D.B., Popescu N., Silverman G.A., Shapiro S.D. (1995), Human macrophage metalloelastase: genomic organization, chromosomal location, gene linkage, and tissue-specific expression, *J. Biol. Chem.* **270** (24), 14568-14575.
- Belaouaj A.A., Li A., Wun T.C., Welgus H.G., Shapiro S.D. (2000), Matrix metalloproteinases cleave tissue factor pathway inhibitor. Effects on coagulation, *J. Biol. Chem.* **275** (35), 27123-27128.
- Benbow U., Brinckerhoff C.E. (1997), The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about?, *Matrix Biology* **15**, 519-526.
- Bergmann J., Bienert M., Niedrich H., Mehli B., Oehme P. (1974), Über den Einfluss der Kettenlänge bei C-terminalen Sequenzen der Substanz P - in Vergleich mit analogen Physalaemin- & Eledosin-Peptiden - auf die Wirksamkeit am Meerschweinchen-Ileum, *Experientia* **30**, 401-403.
- Birkedal-Hansen H. (1995), Proteolytic remodeling of extracellular matrix, *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 728-735.
- 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. in Oral Bio. and Med.* **4** (2), 197-231.
- Bläser J. (1994), Zur klinischen Relevanz leukozytärer Proteine und Beeinflussung von Leukozyten, Dissertation, Universität Bielefeld.
- Bode W., Grams F., Reinemer P., Gomis-Rüth F.-X., Baumann U., McKay D.B., Stöcker W. (1996), The metzincin-superfamily of zinc-peptidases, *Adv. Exp. Med. Biol.* **389**, 1-11.

- Bode W., Reinemer P., Huber R., Kleine T., Schnierer S., Tschesche H. (1994), The X-ray crystal structure of the catalytic domain of human neutrophil collagenase inhibited by a substrate analogue reveals the essentials for catalysis and specificity, *EMBO J.* **13**, 1263-1269.
- Breslow J.L. (1996), Mouse models of atherosclerosis, *Science* **272**, 685-688.
- Brew K., Dinakarandian D., Nagase H. (2000), Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function, *Biochim. Biophys. Acta* **1477**, 267-283.
- Buchardt J., Schiødt C.B., Krog-Jensen C., Delaissé J.M., Foged N.T., Meldal M. (2000), Solid phase combinatorial library of phosphinic peptides for discovery of matrix metalloproteinase inhibitors, *J. Comb. Chem.* **2** (6), 624-638.
- Campagnoni A.T., Skoff R.P. (2001), The pathobiology of myelin mutants reveal novel biological functions of the MBP and PLP genes, *Brain Pathology* **11**, 74-91.
- Carmeliet P., Moons L., Lijnen R., Baes M., Lemaître V., Tipping P., Drew A., Eeckhout Y., Shapiro S., Lupu F., Collen D. (1997), Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation, *Nat. Genet.* **17**, 439-444.
- Cawston T.E. (1996), Metalloproteinase inhibitors and the prevention of connective tissue breakdown, *Pharmacol. Ther.* **70** (3), 163-182.
- Chandler S., Cossins J., Lury J., Wells G. (1996), Macrophage metalloelastase degrades matrix and myelin proteins and processes a tumour necrosis factor- α fusion protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **228** (2), 421-429.
- Chandler S., Miller K.M., Clements J.M., Lury J., Corkill D., Anthony D.C.C., Adams S.E., Gearing A.J.H. (1997), Matrix metalloproteinases, tumor necrosis factor and multiple sclerosis: an overview, *J. Neuroimmunology* **72**, 155-161.
- Chemicon (2001), Laborkatalog, Hofheim.
- Cheresh D.A., Berliner S.A., Vincente V., Ruggeri Z.M. (1989), Procognition of distinct adhesive sites on fibrinogen by related integrins on platelet and endothelial cells, *Cell* **58**, 945-953.
- Chiarugi V., Magnelli L., Sbarba P.D., Ruggiero M. (2000), Tumor angiogenesis: Thrombin and metalloproteinases in focus, *Exp. Mol. Pathol.* **69**, 63-66.
- Clauss A. (1957), Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens, *Acta Haematologica* **17**, 237-246.
- Copeland R.A., Lombardo D., Giannaras J., Decicci C.P. (1995), Estimating K_i values for tight binding inhibitors from dose-response plots, *Bioorg. Med. Chem. Letters* **5** (17), 1947-1952.
- Cornelius L.A., Nehring L.C., Harding E., Bolanowski M., Welgus H.G., Kobayashi D.K., Pierce R.A., Shapiro S.D. (1998), Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization, *J. Immunology* **161** (12), 6845-6852.
- Crawford H.C., Matrisian L.M. (1995), Tumor and stromal expression of matrix metallo-proteinases and their role in tumor progression, *Invasion Metastasis* **14**, 234-245.
- Curci J.A., Liao S., Huffman M.D., Shapiro S.D., Thompson R.W. (1998), Expression and localization of macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) in abdominal aortic aneurysms, *J. Clin. Invest.* **102** (11), 1900-1910.
- De Coignac A.B., Elson G., Delneste Y., Magistrelli G., Jeannin P., Aubry J.-P., Berthier O., Schmitt D., Bonefoy J.-Y., Gauchat J.-F. (2000), Cloning of MMP-26: a novel matrilysin-like proteinase, *Eur. J. Biochem.* **267**, 3323-3329.

- Di Cera E., Dang Q.D., Ayala Y.M. (1997), Molecular mechanisms of thrombin function, *Cell. Mol. Life Sci.* **53**, 701-730.
- Diekmann O., Tschesche H. (1994), Degradation of kinins, angiotensins and substance P by polymorphonuclear matrix metalloproteinases MMP 8 and MMP 9, *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **27**, 1865-1876.
- Docherty A.J.P., O'Connell J., Crabbe T., Angal S., Murphy G. (1992), The matrix metalloproteinases and their natural inhibitors: prospects for treating degenerative tissue diseases, *Tibtech* **10**, 200-207.
- Dong Z., Kumar R., Yang X., Fidler I.J. (1997), Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma, *Cell* **88** (6), 801-810.
- Doolittle R.F. (1984), Fibrinogen and fibrin, *Annu. Rev. Biochem.* **53**, 195-229.
- Duchen L.W., Strich S.J. (1968), A hereditary motor neuron disease with progressive denervation of muscle in the mouse: the mutant 'wobbler', *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* **31**, 535-542.
- Edelstein C., Shapiro S.D., Klezovitch O., Scanu A.M. (1999), Macrophage metalloelastase, MMP-12, cleaves human apolipoprotein(a) in the linker region between kringles IV-4 and IV-5. Potential relevance to lipoprotein(a) biology, *J. Biol. Chem.* **274** (15), 10019-10023.
- Edman P., Begg G. (1967), A protein sequenator, *Eur. J. Biochem.* **1**, 80-91.
- English W.R., Velasco G., Stracke J.O., Knäuper V., Murphy G. (2001), Catalytic activities of membran-type 6 Matrix metalloproteinase (MMP25), *FEBS Lett.* **491** (1-2), 137-142.
- Farr M., Pieper M., Calvete J., Tschesche H. (1999), The N-terminus of collagenase MMP-8 determines superactivity and inhibition: A relation of structure and function analyzes by biomolecular interaction analysis, *Biochemistry* **38**, 7332-7338.
- Fassina G., Ferrari N., Brigati C., Benelli R., Santi L., Noonan D.M., Albini A. (2000), Tissue inhibitors of metalloproteases: Regulation and biological activities, *Clinical & Experimental Metastasis* **18**, 111-120.
- Feinberg M.W., Jain M.K., Werner F., Sibinga N.E.S., Wiesel P., Wang H., Topper J.N., Perrella M.A., Lee M.-E. (2000) Transforming growth factor- β 1 inhibits cytokine-mediated induction of human metalloelastase in macrophages, *J. Biol. Chem.* **275** (15), 25766-25773.
- Felding-Habermann B., Ruggeri Z.M., Cheresch D.A. (1991), Distinct biological consequences of integrin $\alpha_v\beta_3$ -mediated melanoma cell adhesion to fibrinogen and its plasmic fragments, *J. Biol. Chem.* **267**, 5070-5077.
- Fernandez-Catalan C., Bode W., Huber R., Turk D., Calvete J.J., Lichte A., Tschesche H., Maskos K. (1998), Crystal structure of the complex formed by the membrane type 1-matrix metalloproteinase with the tissue inhibitor of metalloproteinases-2, the soluble progelatinase A receptor. *EMBO J.* **17** (17), 5238-5248.
- Finlay G.A., O'Driscoll L.R., Russell K.J., D'arcy E.M., Masterson J.B., FitzGerald M.X., O'Connor C.M. (1997a), Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **156**, 240-247.
- Finlay G.A., Russell K.J., McMahon K.J., D'arcy E.M., Masterson J.B., FitzGerald M.X., O'Connor C.M. (1997b), Elevated levels of matrix metalloproteinases in bronchoalveolar lavage fluid of emphysematous patients, *Thorax* **52** (6), 502-506.
- Freije J.M.P., Díez-Itza I., Balbín M., Sánchez L.M., Blasco R., Tolivia J., López-Otín C. (1994), Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas, *J. Biol. Chem.* **269** (24), 16766-16773.

- Fu J.-Y., Lyga A., Shi H., Blue M.-L., Dixon B., Chen D. (2001), Cloning, expression, purification, and characterization of rat MMP-12, *Protein Expr. Purif.* **21**, 268-274.
- Fuss C., Palmaz J.C., Sprague E.A. (2001), Fibrinogen: Structure, function, and surface interactions, *J. Vasc. Interv. Radiol.* **12**, 677-682.
- Giambernardi T.A., Grant G.M., Taylor G.P., Hay R.J., Maher V.M., McCormick J.J., Klebe R.J. (1998), Overview of matrix metalloproteinase expression in cultured human cells, *Matrix Biology* **16**, 483-496.
- Goldberg G.I., Wilhelm S.M., Kronberger A., Bauer E.A., Grant G.A., Eisen A.Z. (1986), Human fibroblast collagenase: complete primary structure and homology to an oncogene transformation-induced rat protein, *J. Biol. Chem.* **261** (14), 6600-6605.
- Goldsack N.R., Chambers R.C., Dabbagh K., Laurent G.J. (1998), Molecules in focus Thrombin, *Intern. J. Biochem. Cell Biol.* **30**, 641-646.
- Gomez D.E., Alonso D.F., Yoshiji H., Thorgeirsson U.P. (1997), Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions, *Eur. J. Cell Biol.* **74**, 111-122.
- Gomis-Rüth F.X., Maskos K., Betz M., Bergner A., Huber R., Suzuki K., Yoshida N., Nagase H., Brew K., Bourenkov G.P., Bartunik H., Bode W. (1997), Mechanism of inhibition of human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1, *Nature* **389**, 77-81.
- Gorrin-Rivas M.J., Aarii S., Furutani M., Harada T., Mizumoto M., Nishiyama H., Fujita J., Imamura M. (1998), Expression of human macrophage metalloelastase gene in hepatocellular carcinoma: correlation with angiostatin generation and its clinical significance, *Hepatology* **28** (4), 986-993.
- Gorrin-Rivas M.J., Aarii S., Furutani M., Mizumoto M., Mori A., Hanaki K., Maeda M., Furuyama H., Konodo Y., Imamura M. (2000a), Mouse macrophage metalloelastase gene transfer into a murine melanoma suppresses primary tumor growth by halting angiogenesis, *Clin. Cancer Res.* **6**, 1647-1654.
- Gorrin-Rivas M.J., Aarii S., Mori A., Kaneda Y., Imamura M. (2001), Mouse macrophage metalloelastase gene delivery by HVJ-cationic liposomes in experimental antiangiogenic gene therapy for murine CT-26 colon cancer, *Int. J. Cancer* **93**, 731-735.
- Gorrin-Rivas M.J., Aarii S., Mori A., Takeda Y., Mizumoto M., Furutani M., Imamura M. (2000b), Implications of human macrophage metalloelastase and vascular endothelial growth factor gene expression in angiogenesis of hepatocellular carcinoma, *Ann. Surg.* **231** (1), 67-73.
- Grams F., Reinemer P., Powers J.C., Kleine T., Pieper M., Tschesche H., Huber R., Bode W. (1995), X-ray structures of human neutrophil collagenase complexed with peptide hydroxamate and peptide thiol inhibitors, *Eur. J. Biochem.* **228**, 830-841.
- Gronski T.J., Jr., Martin R.L., Kobayashi D.K., Walsh B.C., Holman M.C., Huber M., Van Wart H.E., Shapiro S.D. (1997), Hydrolysis of a broad spectrum of extracellular matrix proteins by human macrophage elastase, *J. Biol. Chem.* **272** (18), 12189-12194.
- Gross J., Lapière C.M. (1962), Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 1014-1022.
- Gustafsson E., Fässler R. (2000), Insights into extracellular matrix functions from mutant mouse models, *Exp. Cell Res.* **261**, 52-68.
- Halpert I., Sires U.I., Roby J.D., Potter-Perigo S., Wigitt T.N., Shapiro S.D., Welgus H.G., Wickline S.A., Parks W.C. (1996), Matrilysin is expressed by lipid-laden macrophages at sites of potential rupture in atherosclerotic lesions and localizes to areas of versican deposition, a proteoglycan substrate for the enzyme, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9748-9753.

- 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, *J. Photochem. Photobiol. B* (eingereicht).
- Hartzell W., Shapiro S.D. (1999), Macrophage elastase prevents *Gemella morbillorum* infection and improves outcome following murine bone marrow transplantation, *Chest* **116**, 31S-32S.
- Heppner K.J., Matrisian L.M., Jensen R.A., Rodgers W.H. (1996), Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response, *Am. J. Pathol.* **149** (1), 273-282.
- Heukeshoven J., Dernick R. (1988), Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels, *Electrophoresis* **9**, 28-32.
- Heussen C., Dowdle E.B. (1980), Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates, *Anal. Biochem.* **102**, 196-202.
- Hiller O., Lichte A., Oberpichler A., Kocourek A., Tschesche H. (2000), Matrix metalloproteinases collagenase-2, macrophage elastase, collagenase-3, and membrane type 1-matrix metalloproteinase impair clotting by degradation of fibrinogen and factor XII, *J. Biol. Chem.* **275** (42), 33008-33013.
- Hindson V.J., Ashworth J.L., Rock M.J., Cunliffe S., Shuttleworth C.A., Kielty C.M. (1999), Fibrillin degradation by matrix metalloproteinases: identification of amino- and carboxy-terminal cleavage sites, *FEBS Letters* **452**, 195-198.
- Hökfelt T., Pernow B., Wahren J. (2001), Substance P: a pioneer amongst neuropeptides, *J. Intern. Med.* **249**, 27-40.
- Horton M.R., Shapiro S., Bao C., Lowenstein C.J., Noble P.W. (1999), Induction and regulation of macrophage metalloelastase by hyaluronan fragments in mouse macrophages, *J. Immunology* **162** (7), 4171-4176.
- Hou P., Ovejero M.C., Sato T., Kumegawa M., Foged N.T., Delaissé J.-M. (1997), MMP-12, a proteinase that is indispensable for macrophage invasion, is highly expressed in osteoclasts, *J. Bone Miner. Res.* **12** (Suppl. 1), S417.
- Hughes P.M., Wells G.M.A., Clements J.M., Gearing A.J.H., Redford E.J., Davies M., Smith K.J., Hughes R.A.C., Brown M.C., Miller K.M. (1998), Matrix metalloproteinase expression during experimental autoimmune neuritis, *Brain* **121**, 481-494.
- Kähäri V.-M., Saarialho-Kere U. (1997), Matrix metalloproteinases in skin, *Exp. Dermatol.* **6**, 199-213.
- Kawane T., Hou J.Q., Sato H., Sugita Y., Bannai S., Ishii T. (1999), Induction of metalloelastase mRNA in murine peritoneal macrophages by diethylmaleate, *Biochim. Biophys. Acta* **1427** (2), 155-160.
- Kerkelä E., Ala-Aho R., Jeskanen L., Rechardt O., Grénman R., Shapiro S.D., Kähäri V.M., Saarialho-Kere U. (2000), Expression of human macrophage metalloelastase (MMP-12) by tumor cells in skin cancer, *J. Invest. Dermatol.* **114** (6), 1113-1119.
- Kerkelä E., Böhling T., Herva R., Uria J.A., Saarialho-Kere U. (2001), Human macrophage metalloelastase (MMP-12) expression is induced in chondrocytes during fetal development and malignant transformation, *Bone* **29** (5), 487-493.
- Kettner C., Shaw E., White R., Janoff A. (1981), The specificity of macrophage elastase on the insulin B-chain, *Biochem. J.* **195**, 369-372.
- Knäuper V., López-Otín C., Smith B., Knight G., Murphy G. (1996), Biochemical characterization of human collagenase-3, *J. Biol. Chem.* **271** (3), 1544-1550.

- Knight C.G., Willenbrock F., Murphy G. (1992), A novel coumarin-labelled peptide for sensitive continuous assays of the matrix metalloproteinases, *FEBS Letters* **296** (3), 263-266.
- Kocourek A. (1998), Klonierung und Expression einzelner Domänen der humanen Makrophagenelastase (MMP-12), Diplomarbeit, Universität Bielefeld.
- Kolkenbrock H., Hecker-Kia A., Orgel D., Ulbrich N., Will H. (1997), Activation of progelatinase A and progelatinase A/TIMP-2 complex by membrane type 2-matrix metalloproteinase, *Biol. Chem.* **378**, 71-76.
- Kolkenbrock H., Orgel D., Hecker-Kia A., Zimmermann J., Ulbrich N. (1995), Generation and activity of the ternary gelatinase B/TIMP-1/LMW-stromelysin-1 complex, *Biol. Chem.* **376** (8), 495-500.
- Kröger M. (1998), Rekombinante Darstellung, Charakterisierung und Stabilisierung einzelner Gelatinase-Varianten, Dissertation, Universität Bielefeld.
- Kumar R., Xie K., Eue I., Dong Z., Killion J.J., Fidler I.J. (2000), Differential regulation of type IV collagenases and metalloelastase in murine macrophages by the synthetic bacterial lipopeptide JBT 3002, *Int. J. Immunopharmacol.* **22** (6), 431-443.
- Laemmli U.K. (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**, 680-685.
- Lang R., Kocourek A., Braun M., Tschesche H., Huber R., Bode W., Maskos K. (2001), Substrate specificity determinants of human macrophage elastase (MMP-12) based on the 1.1 Å crystal structure, *J. Mol. Biol.* **312**, 731-742.
- Lehrach H., Diamond D., Wozney J.M., Boedtke H. (1977), RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination, *Biochemistry* **16** (21), 4743-4751.
- Lichte A. (1997), Klonierung, Expression und biochemische Charakterisierung verschiedener Varianten der MT1-MMP, Dissertation, Universität Bielefeld.
- Lichte A., Kolkenbrock H., Tschesche H. (1996), The recombinant catalytic domain of membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) induces activation of progelatinase A and progelatinase A complexed with TIMP-2, *FEBS Letters* **397**, 277-282.
- Liotta L.A. (1992), Zellinvasion und Metastasierung bei Krebs, *Spektrum der Wissenschaft* **1**, 50-58.
- Liotta L.A., Steeg P.S., Stetler-Stevenson W.G. (1991), Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation, *Cell* **64**, 327-336.
- Llano E., Pendás A.M., Knäuper V., Sorsa T., Salo T., Salido E., Murphy G., Simmer J.P. Bartlett J.D., López-Otín C. (1997), Identification and structural and functional characterization of human enamelysin (MMP-20), *Biochemistry* **36**, 15101-15108.
- Lohi J., Wilson C.L., Roby J.D., Parks W.C. (2001), Epilysin, a novel human matrix metalloproteinase (MMP-28) expressed in testis and keratinocytes and in response to injury, *J. Biol. Chem.* **276** (13), 10134-10144.
- Lovejoy B., Cleasby A., Hassell A.M., Longley K., Luther M.A., Weigl D., McGeehan G., McElroy A.B., Drewry D., Lambert M.H. et al. (1994), Structure of the catalytic domain of fibroblast collagenase complexed with an inhibitor, *Science* **263**, 375-377.
- 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.
- Matrisian L.M. (1990), Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling, *TIG* **6** (4), 121-125.

- Matsumoto S.-I., Kobayashi T., Katoh M., Saito S., Ikeda Y., Kobori M., Masuho Y., Watanabe T. (1998), Expression and localization of matrix metalloproteinase-12 in the aorta of cholesterol-fed rabbits, *Am. J. Pathol.* **153** (1), 109-119.
- McDonnell S., Fingleton B. (1993), Role of matrix metalloproteinases in invasion and metastasis: biology, diagnosis and inhibitors, *Cytotechnology* **12**, 367-384.
- McMullen B.A., Fujikawa K. (1985), Amino acid sequence of the heavy chain of human α -factor XIIIa (activated hageman factor), *J. Biol. Chem.* **260** (9), 5328-5341.
- Mecham R.P., Broekelmann T.J., Fliszar C.J., Shapiro S.D., Welgus H.G., Senior R.M. (1997), Elastin degradation by matrix metalloproteinases, *J. Biol. Chem.* **272** (29), 18071-18076.
- Millipore (1995), Immobilon-P transfer membrane user guide.
- Monet-Kuntz C., Cuvelier A., Sarafan N., Martin J.-P. (1997), Metalloelastase expression in a mouse macrophage cell line: regulation by 4 β -phorbol 12-myristate 13-acetate, lipopolysaccharide and dexamethasone, *Eur. J. Biochem.* **247**, 588-595.
- Moore W.M., Spilburg C.A. (1986), Purification of human collagenases with a hydroxamic acid affinity column, *Biochemistry* **25** (18), 5189-5195.
- Morrison C.J., Butler G.S., Bigg H.F., Roberts C.R., Soloway P.D., Overall C.M. (2001), Cellular activation of MMP-2 (gelatinase A) by MT2-MMP occurs via a TIMP-2-independent pathway, *J. Biol. Chem.* **276** (50), 47402-47410.
- Murphy G., Knäuper V. (1997), Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the „hemopexin“ domain ?, *Matrix Biology* **15**, 511-518.
- Nagase H. (1997), Activation mechanisms of matrix metalloproteinases, *Biol. Chem.* **378**, 151-160.
- Nar H., Werle K., Bauer M.M.T., Dollinger H., Jung B. (2001), Crystal structure of human macrophage elastase (MMP-12) in complex with a hydroxamic acid inhibitor, *J. Mol. Biol.* **312**, 743-751.
- Newton C.R., Graham A. (1994), PCR, 2. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- O'Reilly M.S., Holmgren L., Shing Y., Chen C., Rosenthal R.A., Moses Lane W.S., Cao Y., Sage E.H., Folkman J. (1994), Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma, *Cell* **79** (2), 315-328.
- Oberpichler A. (1999), Klonierung, Expression und Charakterisierung verschiedener Varianten der Kollagenase-3 und Untersuchung des Einflusses der Hämodialyse auf Plasmaproteine, Dissertation, Universität Bielefeld.
- Okada Y., Morodomi T., Enghild J.J., Suzuki K., Yasui A., Nakanishi I., Salvesen G., Nagase H. (1990), Matrix metalloproteinase 2 from human rheumatoid synovial fibroblasts: purification and activation of the precursor and enzymic properties, *Eur. J. Biochem.* **194**, 721-730.
- Overall C.M., Tam E., McQuibban G.A., Morrison C., Wallon U.M., Bigg H.F., King A.E., Roberts C.R. (2000), Domain interactions in the gelatinase-A/TIMP-2/MT1-MMP activation complex, *J. Biol. Chem.* **275** (50), 39497-39506.
- Pace C.N., Vajdos F., Fee L., Grimsley G., Gray T. (1995), How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein, *Prot. Sci.* **4**, 2411-2424.
- Pagenstecher A., Stalder A.K., Kincaid C.L., Shapiro S.D., Campbell I.L. (1998), Differential expression of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase genes in the mouse central nervous system in normal and inflammatory states, *Am. J. Pathol.* **152** (3), 729-741.

- Park H.I., Ni J., Gerkema F.E., Liu D., Belozero V.E., Sang Q.X. (2000), Identification and characterization of human endometase (matrix metalloproteinase-26) from endometrial tumor, *J. Biol. Chem.* **275** (27), 20540-20544.
- Parkar A.A., Stow M.D., Smith K., Panicker A.K., Guilloteau J.P., Jupp R., Crowe S.J. (2000), Large-scale expression, refolding, and purification of the catalytic domain of human macrophage metalloelastase (MMP-12) in *Escherichia coli*, *Protein Expr. Purif.* **20** (2), 152-161.
- Pei D., Weiss S.J. (1995), Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen, *Nature* **375**, 244-247.
- Pei D., Weiss S.J. (1996), Transmembrane-deletion mutants of the membrane-type matrix metalloproteinase-1 process progelatinase A and express intrinsic matrix-degrading activity, *J. Biol. Chem.* **271** (15), 9135-9140.
- Pieper M. (1998), Darstellung und Charakterisierung rekombinanter Varianten der neutrophilen Kollagenase, Dissertation, Universität Bielefeld.
- Puente X.S., Pendás A.M., Llano E., Velasco G., López-Otín C. (1996), Molecular cloning of a novel membrane-type matrix metalloproteinase from a human breast carcinoma, *Cancer Research* **56**, 944-949.
- QIAGEN (1997), RNeasy Midi Handbook, QIAGEN, Hilden.
- R & D Systems (2001), Laborkatalog, Wiesbaden.
- Rathke-Hartlieb S. (1999), Mechanismen des neuronalen Zelltodes und der Neuron-Glia-Interaktion bei Mausmodellen mit erblichen Erkrankungen des motorischen Systems, Dissertation, Universität Bielefeld.
- Rathke-Hartlieb S., Budde P., Ewert S., Schlomann U., Staeger M.S., Jockusch H., Bartsch J.W., Frey J. (2000), Elevated expression of membrane type 1 metalloproteinase (MT1-MMP) in reactive astrocytes following neurodegeneration in mouse central nervous system, *FEBS Lett.* **481**, 227-234.
- Ravanti L., Kähäri V.-M. (2000), Matrix metalloproteinases in wound repair (review), *International Journal of molecular medicine* **6**, 391-407.
- Raza S.L., Nehring L.C., Shapiro S.D., Cornelius L.A. (2000), Proteinase-activated receptor-1 regulation of macrophage elastase (MMP-12) secretion by serine proteinases, *J. Biol. Chem.* **275** (275), 41243-41250.
- Readhead C., Takasashi N., Shine H.D., Saavedra R., Sidman R., Hood L. (1990), Role of myelin basic protein in the formation of central nervous system myelin, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **605**, 280-285.
- Reddigari S.R., Shibayama Y., Brunnée T., Kaplan A.P. (1993), Human hageman factor (factor XII) and high molecular weight kininogen compete for the same binding site on human umbilical vein endothelial cells, *J. Biol. Chem.* **268** (16), 11982-11987.
- Reinemer P., Grams F., Huber R., Kleine T., Schnierer S., Piper M., Tschesche H., Bode W. (1994), Structural implications for the role of the N terminus in the 'superactivation' of collagenases - a crystallographic study, *FEBS Letters* **338**, 227-233.
- Ries C., Petrides P.E. (1995), Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease, *Biol. Chem. Hoppe Ingles* **376**, 345-355.
- Rosing J., Tans G., Govers-Riemslog J.W.P., Zwaal R.F.A., Hemker H.C. (1980), The role of phospholipids and factor V_a in the prothrombinase complex, *J. Biol. Chem.* **255** (1), 274-283.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1988), Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science* **239** (1), 487-491.

- Salmela M.T., Pender S.L.F., Reunala T., MacDonald T., Saarialho-Kere U. (2001), Parallel expression of macrophage metalloelastase (MMP-12) in duodenal and skin lesions of patients with dermatitis herpetiformis, *Gut* **48**, 496-502.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989), *Molecular cloning - a laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sammons D.W., Adams L.D., Nishizawa Y. (1981), Ultrasensitive silverbased color staining of polypeptides in polyacrylamide gels, *Electrophoresis* **2**, 135.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977), DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 5463-5467.
- Sato H., Seiki M. (1996), Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in tumor metastasis, *J. Biochem.* **119**, 209-215.
- 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.
- Schiødt C.B., Buchardt J., Terp G.E., Christensen U., Brink M., Berger Larsen Y., Meldal M., Foged N.T. (2001), Phosphinic peptide inhibitors of macrophage metalloelastase (MMP-12). Selectivity and mechanism of binding, *Current Medical Chemistry* **8**, 967-976.
- Shapiro S.D. (1994), Elastolytic metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes: potential roles in destructive lung disease, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **150**, 160-164.
- 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** (7), 4664-4671.
- Shapiro S.D., Kobayashi D.K., Ley T.J. (1993), Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages, *J. Biol. Chem.* **268** (32), 23824-23829.
- Shapiro S.D., Senior R.M. (1998), Macrophage elastase (MMP-12), W.C. Parks & R.P. Mecham (eds.), Academic Press, San Diego, pp. 185-197.
- Shibayama Y., Reddigari S., Kaplan A.P. (1996), Interactions of factor XII with platelets and endothelial cells, *Immunopharmacology* **32**, 24-27.
- Silverberg M., Dunn J.T., Garen L., Kaplan A.P. (1980), Autoactivation of human hageman factor, *J. Biol. Chem.* **255** (15), 7281-7286.
- Sires U.I., Murphy G., Baragi V.M., Fliszar C.J., Welgus H.G., Senior R.M. (1994), Matrilysin is much more efficient than other matrix metalloproteinases in the proteolytic inactivation of alpha 1-antitrypsin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204** (2), 613-620.
- Snijdelaar D.G., Dirksen R., Slappendel R., Crul B.J.P. (2000), *European J. Pain* **4**, 121-135.
- Springman E.B., Angleton E.L., Birkedal-Hansen H., Van Wart H.E. (1990), Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of Cys⁷³ active-site zinc complex in latency and a 'cystein switch' mechanism for activation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 364-368.
- Spurlino J.C., Smallwood A.M., Carlton D.D., Banks T.M., Vavra K.J., Johnson J.S., Cook E.R., Falvo J., Wahl R.C., Pulvino T.A., Wendolski J.J., Smith D.L. (1994), 1.56 Å structure of mature truncated human fibroblast collagenase, *Proteins* **19**, 98-109.
- Stamenkovic I. (2000), Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis, *Cancer Biology* **10**, 415-433.

- Sternlicht M.D., Werb. Z (2001), How matrix metalloproteinases regulate cell behavior, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**, 463-516.
- Stetler-Stevenson W.G., Liotta L.A., Kleiner D.E., Jr. (1993), Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis, *FASEB J.* **7**, 1434-1441.
- Stöcker W., Grams F., Baumann U., Reinemer P., Gomis-Rüth F.-X., McKay D.B., Bode W. (1995), The metzincins - Topological and sequential relations between astacins, adamalysins, serralysins, and martrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases, *Protein Science* **4**, 823-840.
- Stratmann B. (2000), Klonierung, Expression und Charakterisierung des „human tissue inhibitor of metalloproteinases-4“, Dissertation, Universität Bielefeld.
- Strongin A.Y., Collier I.E., Bannikov G., Marmer B.L., Grant G.A., Goldberg G.I. (1995), Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase: isolation of the activated form of the membrane metalloprotease, *J. Biol. Chem.* **270** (10), 5331-5338.
- Suomela S., Kariniemi A.-L., Snellman E., Saarialho-Kere U. (2001), Metalloelastase (MMP-12) and 92-kDa gelatinase (MMP-9) as well as their inhibitors TIMP-1 and -3, are expressed in psoriatic lesions, *Exp. Dermatol.* **10**, 175-183.
- Takino T., Sato H., Shinagawa A., Seiki M. (1995), Identification of the second membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP-2) gene from human placenta cDNA library, *J. Biol. Chem.* **270** (39), 23013-23020.
- Tang B.L. (2001), ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases, *Intern. J. Biochem. Cell Biol.* **33**, 33-44.
- Tijssen P., Kurstak E. (1984), Highly efficient and simple methods for the preparation of peroxidase and active peroxidase-antibody conjugates for enzyme immunoassays, *Analyt. Biochem.* **136**, 451-457.
- Towbin H., Staehlin T., Gordon J. (1979), Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, 4350.
- Trask B.C., Malone M.J., Lum E.H., Welgus H.G., Crouch E.C., Shapiro S.D. (2001), Induction of macrophage matrix metalloproteinase biosynthesis by surfactant protein-D (SP-D), *J. Biol. Chem.* Papers in press, July 31, Manuscript M102524200.
- Tschesche H., Lichte A., Hiller O., Oberpichler A., Buttner F.H., Bartnik E. (2000), Matrix metalloproteinases (MMP-8, -13, and -14) interact with the clotting system and degrade fibrinogen and factor XII (Hagemann factor), *Adv. Exp. Med. Biol.* **477**, 217-228.
- Ugwu F., Lemmens G., Collen D., Lijnen H.R. (2001), Matrix metalloproteinase deficiencies do not impair cell-associated fibrinolytic activity, *Thrombosis Research* **102**, 61-69.
- Ullmann A., Jacob F., Monod J. (1967), Characterization by *in vitro* complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the β -galactosidase structural gene of *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.* **24**, 339-343.
- Vaalamo M., Kariniemi A.L., Shapiro S.D., Saarialho-Kere U. (1999), Enhanced expression of human metalloelastase (MMP-12) in cutaneous granulomas and macrophage migration, *J. Invest. Dermatol.* **112** (4), 499-505.
- 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.

- Velasco G., Pendás A.M., Fueyo A., Knäuper V., Murphy G., López-Otín 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** (8), 4570-4576.
- Weiss B., Jacquemin-Sablon A., Live T.R., Fareed G.C., Richardson C.C. (1968), Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4, *J. Biol. Chem.* **243**, 4543-4555.
- Werb Z., Gordon S. (1975), Elastase secretion by stimulated macrophages: characterization and regulation, *J. Exp. Med.* **142**, 361-377.
- Wilhelm S.C., Shao Z.-H., Housley T.J., Seperack P.K., Baumann A.P., Gunja-Smith Z., Woessner J.F., Jr. (1993), Matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1), *J. Biol. Chem.* **2**, 21906-21913.
- Woessner J.F. (1998), The matrix metalloproteinase family, Matrix metalloproteinases, W.C. Parks and R.P. Mecham (eds.), Academic Press, San Diego, pp. 1-14.
- Woessner J.F., Nagase H. (2000), Matrix metalloproteinases and TIMPs, Oxford University Press, Oxford.
- Wojtowicz-Praga S.M., Dickson R.B., Hawkins M.J. (1997), Matrix metalloproteinase inhibitors, *Investigational New Drugs* **15**, 61-75.
- Wolfsberg T.G., Primakoff P., Myles D.G., White J.M. (1995), ADAM, a novel family of membrane proteins containing a disintegrin and metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions, *J. Cell Biol.* **131** (2), 275-278.
- Wu L., Fan J., Matsumoto Si., Watanabe T. (2000), Induction and regulation of matrix metalloproteinase-12 by cytokines and CD40 signaling in monocyte/macrophages, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **269** (3), 808-815.
- Wu L., Tanimoto A., Murata Y., Fan J., Sasaguri Y., Watanabe T. (2001), Induction of human matrix metalloproteinase-12 gene transcriptional activity by GM-CSF requires the AP-1 binding site in human U937 monocytic cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**, 300-307.
- Yang W., Arai S., Gorrin-Rivas M.J., Mori A., Onodera H., Imamura M. (2001), Human macrophage metalloelastase gene expression in colorectal carcinoma and its clinicopathologic significance, *Cancer* **91** (7), 1277-1283.
- Yu A.E., Murphy A.N., Stetler-Stevenson W.G. (1998), 72-kDa Gelatinase (gelatinase A): structure, activation, regulation, and substratespecificity, Matrix metalloproteinases, W.C. Parks & R.P. Mecham (eds.), Academic Press, San Diego, pp. 85-113.
- Zhou A., Webb G., Zhu X., Steiner D.F. (1999), Proteolytic processing in the secretory pathway, *J. Biol. Chem.* **274** (30), 20745-20748.
- Zhou Z., Apte S.S., Soininen R., Cao R., Baaklini G.Y., Rauser R.W., Wang J., Cao Y., Tryggvason K. (2000), Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase I, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 4052-4057.
- Zubrzycka M., Janecka A. (2000), Substance P: Transmitter of nociception (minireview), *Endocrine Regul.* **34**, 195-201.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Andreas Kocourek
 Anschrift: Ellerstr. 27, 33615 Bielefeld
 Telefon: 0521 / 121708
 eMail: andreas.kocourek@uni-bielefeld.de
 Geburtsdatum, Ort: 18. April 1972 in Lübeck
 Familienstand: ledig

Schulbildung und Zivildienst

08 / 1978 – 08 / 1982 Grundschole Eutin
 08 / 1982 – 06 / 1991 Gymnasium in Eutin, Abschluss: Abitur
 08 / 1991 – 10 / 1992 Rettungssanitäter im Rahmen des Zivildienstes
 DRK-Rettungswache, Eutin

Wissenschaftliche Ausbildung

10 / 1992 – 08 / 1998 Chemiestudium an der Universität Bielefeld
 10 / 1994 Vordiplom (sehr gut)
 04 / 1996 – 07 / 1996 Praktikum bei Prof. J.H.P. Utley,
 Queen Mary and Westfield College, London (England)
 08 / 1998 Diplom (sehr gut)
 Diplomarbeit im Fachbereich Biochemie unter Leitung von Prof. Dr. H. Tschesche, Titel: Klonierung und Expression einzelner Domänen der humanen Makrophagenelastase
 09 / 1998 Beginn der Promotion im Fachbereich Biochemie an der Universität Bielefeld unter Leitung von Prof. Dr. H. Tschesche
 Thema: Darstellung und Charakterisierung der katalytischen Domäne der humanen Makrophagenelastase (MMP-12)
 10 / 1998 – 09 / 1999 Teilnahme an dem Programm „Studierende und Wirtschaft“ der Universität Bielefeld
 02 / 2002 Anstellung als Junior Scientist bei der Firma VivaScience AG, Hannover

Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Bielefeld, März 2002

Andreas Kocourek