

# **Spaltung und Aktivierung von Blutplasma­proteinen durch Matrix Metalloproteinasen**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
der Universität Bielefeld

vorgelegt von  
**Oliver Hiller**  
aus Gütersloh

Bielefeld 2003

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Leitung von Prof. Dr. Harald Tschesche in der Zeit von September 1998 bis Dezember 2002 an der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld.

Herrn Prof. Dr. Harald Tschesche danke ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

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

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Dr. Martin Roderfeld für sein Interesse an dieser Arbeit in zahlreichen und wertvollen Diskussionen sowie für die Bereitstellung der MT1-MMP. Ich danke außerdem Herrn Dr. Andreas Kocourek, Herrn Dr. André Oberpichler und Herrn Dipl. Chem. Andreas Henke für die freundliche Bereitstellung der verschiedenen Matrix Metalloproteinasen, sowie Herrn Dr. Jörg Stute für die Durchsicht dieser Arbeit.

Frau Sabine Grabolle, Herrn Marc-Oliver Luther, Frau Dipl. Ing. Kerstin Böker und Frau Ella Cederlund danke ich für die zahlreichen Proteinsequenzierungen.

Herrn Dr. Wolfgang Prohaska danke ich für die Einweisung in die Durchführung von Gerinnungstests.

Ferner danke ich Frau Renate Baumann und Herrn Dr. Rudlowski für die Anfertigung und Dokumentation von Gewebeschnitten.

Dem gesamten Arbeitskreis danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit und das freundliche Arbeitsklima. In diesem Sinne bedanke ich mich bei Frau Margot Müller, Frau Anette Schmidt und Herrn Dr. Herbert Wenzel ganz besonders. Herrn Dipl. Ing. Rainer Beckmann danke ich für seine lustigen Einwürfe zum Thema „füreinander miteinander“.

Mein ganz besonderer Dank gilt außerdem meinen Eltern, meiner Oma und meiner Freundin Anke, die mich während der Entstehung dieser Arbeit begleitet und nach Kräften unterstützt haben.

Teile der vorliegenden Arbeit sind in den folgenden Fachzeitschriften veröffentlicht worden:

Tschesche,H., Lichte,A., Hiller,O., Oberpichler,A., Büttner,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.

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. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 33008-33013.

Hantke,B., Harbeck,N., Schmalfeldt,B., Claes,I., Hiller,O., Luther,M.O., Welk,A., Kuhn,W., Schmitt,M., Tschesche,H., Muehlenweg,B. (2003): Isolation of matrix metalloproteinase-13 from ascitic fluid of advanced ovarian carcinoma patients and determination of its possible clinical relevance. *Biological Chemistry* (eingereicht).

Hiller,O., LichteA., Oberpichler,A., Kocourek,A. & Tschesche,H. (2003): Activation of prothrombin by membrane type 1-matrix metalloproteinase and macrophage elastase. *Thrombosis and Haemostasis* (in Vorbereitung).

---

<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1 ABKÜRZUNGEN.....</b>	<b>6</b>
1.1 Allgemein .....	6
1.2 Aminosäuren.....	8
1.3 Faktoren der Blutgerinnungskaskade.....	9
<b>2 EINLEITUNG .....</b>	<b>10</b>
2.1 Die Hämostase.....	10
2.2 Die Fibrinolyse.....	17
2.3 Die Regulation von Blutgerinnung und Fibrinolyse .....	18
2.4 Serinproteinasen .....	19
2.5 Prothrombin / Thrombin .....	20
2.5.1 Aktivierung .....	22
2.5.2 Regulation der Blutgerinnung .....	23
2.5.3 Thrombin Rezeptoren .....	24
2.5.4 Einfluß auf die Angiogenese .....	25
2.6 Plasminogen/Plasmin .....	27
2.7 Hagemann-Faktor (Faktor XII).....	28
2.8 Fibrinogen / Fibrin .....	29
2.9 Die Extrazelluläre Matrix.....	31
2.10 Matrix Metalloproteinasen .....	32
2.11 Koagulopathien und Krebsgeschehen .....	36
<b>3 ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT.....</b>	<b>38</b>

---

<b>4</b>	<b>MATERIALIEN UND GERÄTE</b>	<b>40</b>
<b>4.1</b>	<b>Materialien</b>	<b>40</b>
4.1.1	Chemikalien	40
4.1.2	Enzyme	40
4.1.3	Antikörper	40
4.1.4	Substrate	41
4.1.5	Reagenzien für Gerinnungstests	41
4.1.6	Standards	41
4.1.7	Verbrauchsmaterialien	41
<b>4.2</b>	<b>Geräte</b>	<b>41</b>
<b>5</b>	<b>METHODEN</b>	<b>43</b>
<b>5.1</b>	<b>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)</b>	<b>43</b>
5.1.1	Herstellung der PAA-Gele	43
5.1.2	Probenvorbereitung und Elektrophorese	44
5.1.3	Nachweis von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen	45
5.1.4	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (DISK-Gel)	47
<b>5.2</b>	<b>Elektroblotting</b>	<b>47</b>
<b>5.3</b>	<b>Western Blot</b>	<b>48</b>
5.3.1	NBT/BCIP-Färbung	48
5.3.2	ECL-Färbung	49
<b>5.4</b>	<b>Automatisierte Aminosäure-Sequenzierung nach Edman</b>	<b>50</b>
<b>5.5</b>	<b>Blockierung von Disulfidbrücken</b>	<b>50</b>
<b>5.6</b>	<b>HPLC</b>	<b>50</b>
5.6.1	„reversed-phase“-HPLC (RP-HPLC)	51
5.6.2	Ionenaustausch-HPLC	52
<b>5.7</b>	<b>Renaturierung von prozessiertem und aufgereinigtem Prothrombin</b>	<b>52</b>
<b>5.8</b>	<b>Reaktionsansätze zur Spaltung von potentiellen Substraten der MMPs</b>	<b>53</b>
<b>5.9</b>	<b>Bestimmung der MMP-Aktivität durch den DNP-Peptid-Test</b>	<b>53</b>
<b>5.10</b>	<b>Bestimmung der Thrombin-Aktivität durch das chromogene Substrat S-2238</b>	<b>54</b>
<b>5.11</b>	<b>Funktionelle Fibrinogen-Bestimmung nach Clauss</b>	<b>54</b>

---

<b>6</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>56</b>
<b>6.1</b>	<b>Spaltung von Blutplasmae Proteinen durch Matrix Metalloproteinasen</b> .....	<b>56</b>
6.1.1	Spaltung von Faktor XII (Hagemann-Faktor).....	56
6.1.2	Spaltung von Faktor II (Prothrombin) durch die MT1-MMP.....	60
6.1.3	Spaltung von Faktor II (Prothrombin) durch die MMP-12 .....	63
6.1.4	Spaltung von Fibrinogen durch MMPs.....	65
<b>6.2</b>	<b>Aktivierung von Prothrombin</b> .....	<b>67</b>
<b>6.3</b>	<b>Auftrennung der Prothrombin-Fragmente</b> .....	<b>69</b>
<b>6.4</b>	<b>Renaturierung von prozessiertem und aufgereinigtem Prothrombin</b> .....	<b>73</b>
<b>6.5</b>	<b>Ermittlung des zeitlichen Verlaufs der Prothrombin-Aktivierung</b> .....	<b>73</b>
<b>6.6</b>	<b>Weitergehende Charakterisierung des aktiven Prothrombin-Fragments</b> .....	<b>74</b>
6.6.1	Spaltung von Fibrinogen durch MMP-aktiviertes Prothrombin .....	74
6.6.2	Nachweis der Prothrombin-Aktivierung mittels Western Blot .....	75
<b>6.7</b>	<b>Nachweis der physiologischen Relevanz der Prothrombin-Aktivierung durch MMPs</b> . 76	
<b>6.8</b>	<b>Spaltungsversuche von weiteren Blutplasmae Proteinen durch MMPs</b> .....	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>79</b>
<b>7.1</b>	<b>Inaktivierung von Faktor XII (Hagemann-Faktor)</b> .....	<b>80</b>
<b>7.2</b>	<b>Aktivierung von Prothrombin</b> .....	<b>83</b>
7.2.1	Prothrombin-Prozessierung durch die MT1-MMP .....	85
7.2.2	Prothrombin-Prozessierung durch die MMP-12 .....	88
<b>7.3</b>	<b>Spaltung von Fibrinogen</b> .....	<b>89</b>
7.3.1	Fibrin(ogen)-Abbau und Tumorwachstum .....	90
<b>7.4</b>	<b>Ausblick</b> .....	<b>93</b>
<b>8</b>	<b>LITERATUR</b> .....	<b>96</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>114</b>

# 1 Abkürzungen

## 1.1 Allgemein

$\alpha_1$ -PI	$\alpha_1$ -Proteinase-Inhibitor
$\alpha_2$ -MG	$\alpha_2$ -Makroglobulin
AcOH	Essigsäure
ADP	Adenosindiphosphat
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
bFGF	„basic fibroblast growth factor“
BM	Knochenmark („bone marrow“)
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumin“)
c	Konzentration („concentration“)
cdMMP-8	katalytische Domäne der MMP-8
cdMMP-12	katalytische Domäne der MMP-12
cdMMP-13	katalytische Domäne der MMP-13
cdMT1-MMP	katalytische Domäne der MT1-MMP
Da	Dalton
DNP	2,4-Dinitrophenyl
DNP-Peptid	DNP-G-Q-G-I-A-G-Q- <sup>D</sup> R-NH <sub>2</sub>
DP	Degradationsprodukte
$\varepsilon$	Molarer Extinktionskoeffizient
E	Extinktion
EC	Endothelzellen („endothelial cells“)
ECM	Extrazelluläre Matrix („extracellular matrix“)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermis-Wachstumsfaktor („epidermal growth factor“)
EtOH	Ethanol
F(Ziffer)	Faktor der Blutgerinnungskaskade
F(Ziffer)a	aktivierter Faktor der Blutgerinnungskaskade
Fb	Fibrin
Fg	Fibrinogen

---

FGF	Fötaler Wachstumsfaktor („fetal growth factor“)
HMW	„high molecular weight“
HMWK	„high molecular weight kininogen“
HPLC	„high performance liquid chromatography“
kDa	Kilodalton
KaDo	katalytische Domäne
LMW	„low molecular weight“
M	molar; mol/L
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MT-MMP	„membrane-type“-MMP
M <sub>r</sub>	Molekulargewicht
MW	Mittelwert
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	„phosphate buffered saline“
Pefabloc SC	4(2-Aminoethyl-)phenylsulfonylchlorid-Hydrochlorid
PF	Plättchenfaktor
PL	Phospholipidmembran
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RP-HPLC	„reversed phase“ HPLC
rpm	„revolutions per minute“
SDS	„sodium dodecyl sulphate“
SP-	Sulfopropyl-
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TGF	Tumor-Wachstums-Faktor („tumor growth factor“)
TIMP	„tissue inhibitor of metalloproteinases“
t-PA	„tissue-type“-Plasminogenaktivator
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u-PA	Urokinase-Plasimogenaktivator
v	„volume“
VEGF	„vascular endothelial growth factor“
w	„weight“



**1.2 Aminosäuren**

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

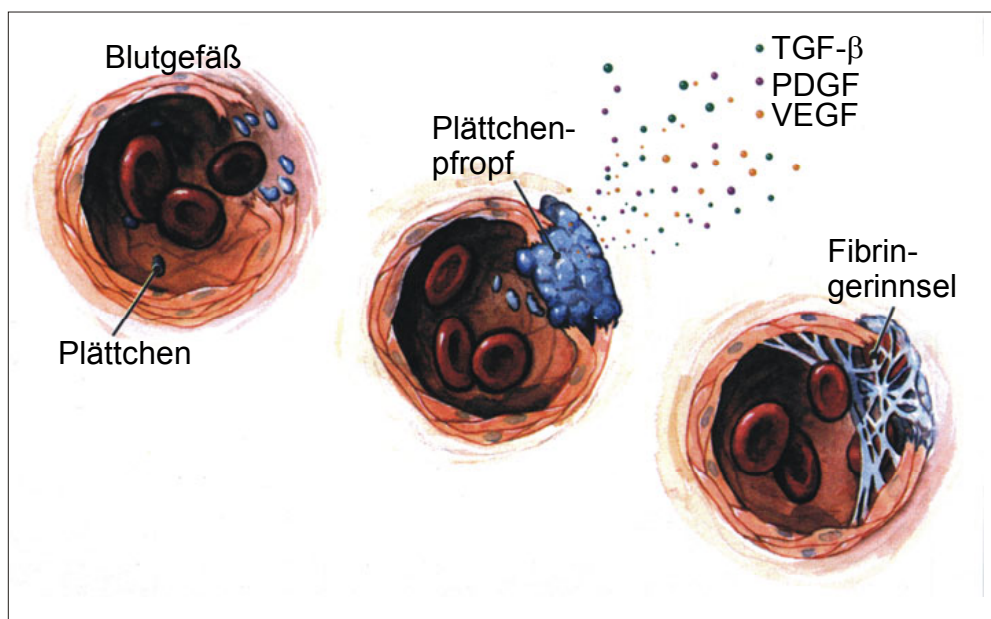
### 1.3 Faktoren der Blutgerinnungskaskade

I	Fibrinogen
II	Prothrombin
III	Gewebsthromboplastin („tissue factor“, TF)
IV	Ca <sup>2+</sup> -Ionen
V	Proaccelerin
VI	(nicht bekannt)
VII	Prokonvertin
VIII	Antihämophiler Faktor
IX	Christmas-Faktor
X	Stuart-Prower-Faktor
XI	Plasmathromboplastin antecedent (PTA)
XII	Hagemann-Faktor
XIII	Fibrinstabilisierender Faktor (FSF)
Prokallikrein	Fletcher-Faktor
HMW-Kininogen	Fitzgerald-Faktor

## 2 Einleitung

### 2.1 Die Hämostase

Das Gefäßsystem ist in der Lage, bei Verletzung eines Blutgefäßes die Leckage schnell zu verschließen und so durch Minimierung des Blutverlustes die Funktionen des Blutkreislaufs aufrecht zu erhalten (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Blutungsstillung an einem verletzten Gefäß.** Die Plättchen lagern sich an der Verletzungsstelle ab und geben verschiedene Substanzen ins Blut ab, die die plasmatische Gerinnung beschleunigen. Schließlich führt dies zum provisorischen Verschluss der Leckage. TGF-β = „tumor growth factor“-β; PDGF = „platelet derived growth factor“; VEGF = „vascular endothelial growth factor“.

Die Hämostase beinhaltet das Zusammenspiel von Blutgefäßen, Thrombozyten und dem plasmatischen Gerinnungssystem. Diese drei Komponenten sind für deren ungestörten Ablauf essentiell [1].

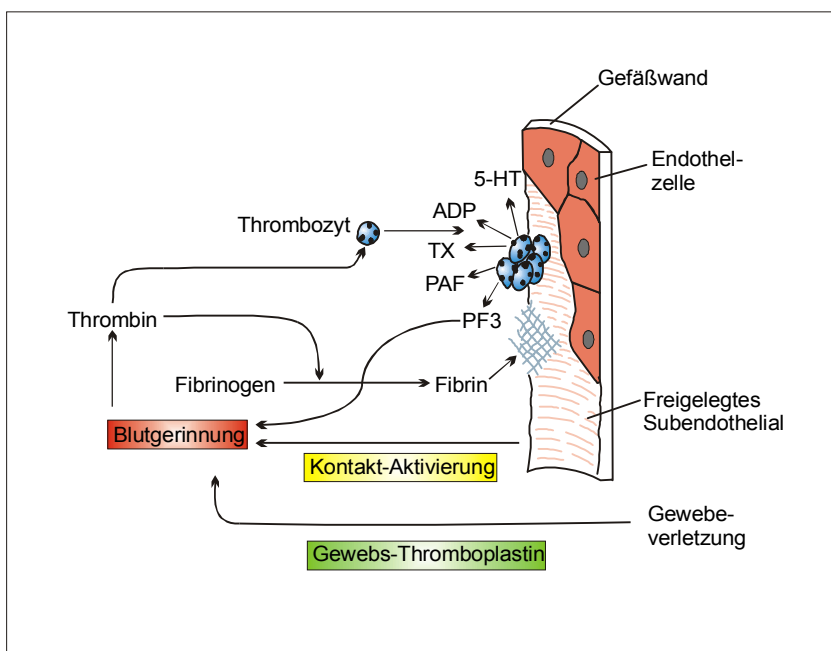
Die Hämostase wird im Allgemeinen durch ein beschädigtes Blutgefäß ausgelöst, dessen Endothel zerrissen ist. Nur in diesem Fall kann eine Anheftung von Plasmaproteinen und Blutplättchen an die Oberfläche des subendothelialen Bindegewebes erfolgen.

Bei der vaskulären Blutungsstillung kommt es, als Folge der Verletzung, zur Reizung der glatten Muskelzellen. Dies führt zu einer Kontraktion der Blutgefäße, die durch

Abgabe von vasokonstriktorisches Substanzen aus Thrombozyten und verletzter Gefäßwand verstärkt wird. Die hierdurch erreichte Verringerung des Blutstromes erleichtert sowohl die zelluläre als auch die plasmatische Blutungsstillung.

Bei der zellulären Hämostase erfolgt zunächst eine durch den von-Willebrandt-Faktor (vWF) vermittelte Anheftung von Blutplättchen an die durch die Verletzung freigelegten Bestandteile der Extrazellulären Matrix (ECM). Durch diese Adhäsion werden die Thrombozyten aktiviert, worauf sie ihre äußere Gestalt ändern und aggregieren. Weiterhin wird durch diesen Zustand die Ausschüttung einer Reihe verschiedener Substanzen induziert, die gefäßkontrahierend wirken [2]. Der in Folge der lokalen Plättchenaggregation ausgebildete thrombozytäre Gefäßpfropf ist erst dann in der Lage, für einen dauerhaften Wundverschluss zu sorgen, wenn ihm durch den Einbau von Fibrin in der anschließenden plasmatischen Gerinnung größere Stabilität verliehen wird. Auch diese Prozesse werden durch Substanzen beschleunigt, die von den aktivierten Plättchen selbst ausgeschüttet werden. Unter diesen ist auch der Faktor Va der Blutgerinnungskaskade. Zudem ist das Fibrinogen für eine weitere, Integrin vermittelte Aggregation der aktivierten Plättchen verantwortlich. Die Initiierung des plasmatischen Gerinnungsweges erfolgt zeitgleich durch die Freisetzung des „tissue factor“ (Gewealthromboplastin, Faktor III) aus dem verletzten Gewebe und durch die Kontaktaktivierung am Kollagen. Im Verlauf der plasmatischen Gerinnung wird aus einzelnen Fibrinmolekülen (Fb) ein dreidimensionales Fibrin-Netzwerk erzeugt. Somit wird die Wundstelle für die Dauer des Heilungsprozesses verschlossen. Nach der Reparatur des verletzten Gewebes erfolgt schließlich die Auflösung des Gerinnsels, ein Prozeß, der als Fibrinolyse bezeichnet wird. Das komplexe Zusammenspiel von thrombozytärer und plasmatischer Hämostase wird durch das Schema in Abbildung 2 zusammenfassend und vereinfacht dargestellt.

Die plasmatische Gerinnung wird durch eine Kaskade von Zymogenaktivierungen in Gang gesetzt. Dieses Aktivierungsprinzip ermöglicht nicht nur eine sehr rasche Antwort auf die Verletzung, sondern führt auch zu einer großen Verstärkung des ursprünglichen Auslösers [3].



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Interaktion von thrombozytärer und plasmatischer Blutungsstillung.**  
 ADP = Adenosindiphosphat; PF3 = Plättchenfaktor 3; 5-HT = 5-Hydroxytryptamin (Serotonin)  
 TX = Thromboxan; PAF = plättchenaktivierender Faktor. (Modifiziert nach [4]).

Die bisher bekannten Gerinnungsfaktoren und ihre physiologischen Konzentrationen sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Bei den Gerinnungsfaktoren handelt es sich mit Ausnahme des Fibrinogens (Fg) und des Faktors XIII entweder um Kofaktoren oder um Proenzyme von Serinproteinasen [5].

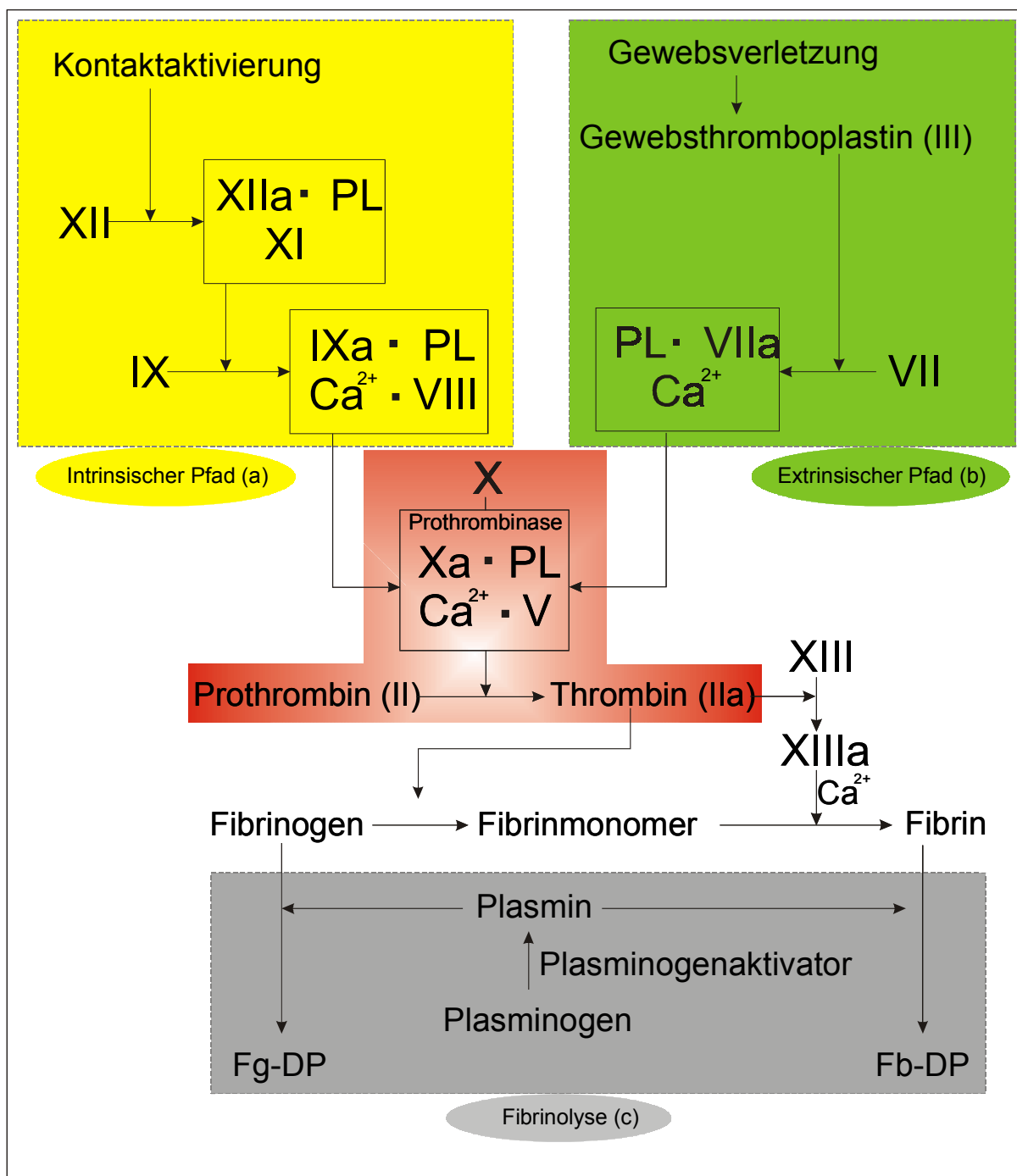
Im Verlauf der Gerinnung katalysiert die aktive Form des einen Gerinnungsfaktors („Fa“) die Aktivierung des jeweils nächsten noch inaktiven Faktors („F“) [6]. Dies geschieht bei den Serinproteinasen durch spezifische Abspaltung eines Aktivierungspeptids mittels hochspezifischer Spaltung einer Arg-X-Bindung und in einigen Fällen durch weitere Autoprocessing des Enzyms. Für den Ablauf der Gerinnung ist außer den Aktivierungsschritten das Vorhandensein von Calcium-Ionen essentiell. Aus diesem Grund werden entnommenen Blutproben zur Unterdrückung einer unerwünschten Gerinnung EDTA oder Natriumcitrat als Calcium-Chelator zugesetzt.

PROTEIN	MITTLERE PLASMA-KONZ. [ $\mu\text{g/mL}$ ]	$M_r$ [Da]	VORKOMMEN	FUNKTION
Prothrombin	100,000	72.000	Plasma	Zymogen
Faktor X	10,000	58.500	Plasma	Zymogen
Faktor IX	5,100	57.000	Plasma	Zymogen
Faktor XI	1,400	160.000	Plasma	Zymogen
Faktor XIII	30,000	320.000	Plasma	Zymogen
Faktor VII	0,500	50.000	Plasma	Zymogen
Protein C	3,700	62.000	Plasma	Zymogen
Faktor V	6,600	330.000	Plasma	Prokofaktor
Faktor VIII	0,200	285.000	Plasma	Prokofaktor
Tissue Factor	-	44.000	Endothel	Kofaktor
Thrombomodulin	-	100.000	Endothel	Kofaktor
Antithrombin III	200,000	58.000	Plasma	Inhibitor
Protein S	21,000	69.000	Plasma	Inhibitor/Kofaktor
TFPI	0,100	40.000	Plasma	Inhibitor
Fibrinogen	2.600,000	340.000	Plasma	Vorläufer

**Tabelle 1:** Auflistung bisher bekannter Gerinnungsfaktoren /-inhibitoren und ihrer physiologischen Konzentrationen. (verändert nach [7]).

Klassisch werden bei der Blutgerinnung zwei Reaktionsfolgen unterschieden, die als extrinsischer bzw. intrinsischer Pfad bezeichnet werden. Beide münden letztlich in der Aktivierung des Prothrombins zum Thrombin. Die Regulation von Gerinnung und Fibrinolyse wird in Abbildung 3 schematisch zusammengefasst.

Essentiell für den verstärkten Ablauf der Blutgerinnung ist die Gegenwart von verletztem Gewebe, durch das sowohl intrinsischer (Kontaktaktivierung, Abbildung 3a) wie auch extrinsischer Pfad (Gewebsthromboplastin-Aktivierung, Abbildung 3b) initiiert werden können. Hierdurch wird die Hämostase auf den Ort der Verletzung begrenzt, die restliche Blutbahn bleibt davon im wesentlichen unbeeinflusst [5].



**Abbildung 3: Die Regulation der Blutgerinnung und der Fibrinolyse.**  
 (PL = Phospholipidmembran, DP = Degradationsprodukte)  
 a: intrinsischer Pfad der Gerinnung  
 b: extrinsischer Pfad der Gerinnung  
 c: Fibrinolyse

Bei der sogenannten Oberflächenaktivierung (siehe Abbildung 3a) kommt es zu einer lokalen Konzentrationserhöhung an Faktor XII (Hagemann-Faktor), Prokallikrein und Faktor XI. Die beiden letztgenannten Proteine treten dabei zu einem Komplex mit hochmolekularem Kininogen (HMW-Kininogen, HMWK) zusammen, einem Kofaktor, der zu ihrer Verankerung auf der Oberfläche führt. Durch die Bindung von Faktor XII

an die Oberfläche des subendothelialen Bindegewebes wird in diesem Faktor eine Konformationsänderung induziert, die ihn in die Lage versetzt, Prokallikrein spezifisch zu aktivieren [8]. Das auf diese Weise erzeugte Kallikrein wiederum ist nun in der Lage, Faktor XII zum Faktor XIIa zu aktivieren, der seinerseits in einer positiven Rückkopplungsreaktion weiteres Prokallikrein zu Kallikrein prozessieren kann [5]. Der aktivierte Hagemann-Faktor spaltet außerdem Faktor XI zu XIa und ermöglicht hierdurch das Voranschreiten der Blutgerinnung. Diese Initiierung des intrinsischen Pfades wird in Abbildung 4 noch einmal graphisch dargestellt.

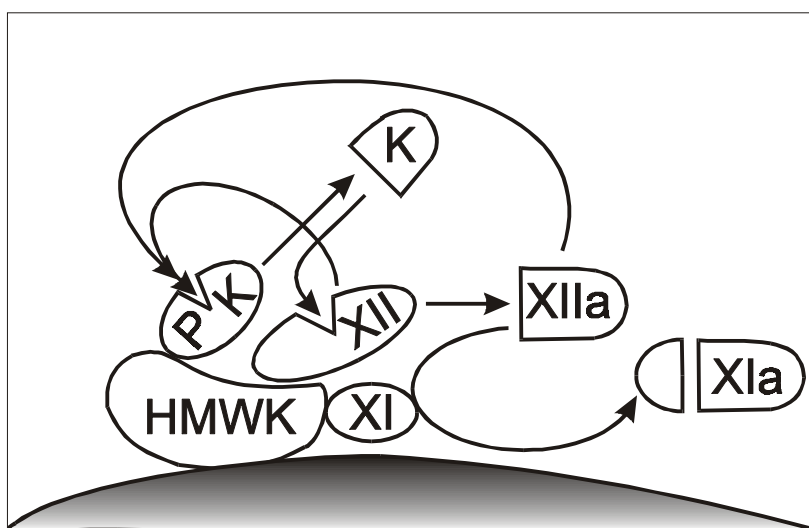


Abbildung 4: Darstellung der Oberflächen-Aktivierung.

Zusätzlich wird durch Kallikrein das vasoaktive Peptid Bradykinin aus HMW-Kininogen freigesetzt, das für eine Senkung des Blutdrucks sorgt.

Im weiteren Verlauf der Blutgerinnung wird Faktor IX von Faktor XIa zu Faktor IXa prozessiert. Der so entstandene Faktor IXa bildet mit Phospholipiden, Calciumionen und Faktor VIII einen quarternären Komplex. Dieser ist in der Lage, Faktor X zu Xa zu spalten und ermöglicht dadurch die Entstehung des sogenannten Prothrombinase-Komplexes, der dann seinerseits in der Lage ist, Prothrombin zu aktivieren. Gleichzeitig wird in einer weiteren Rückkopplungsreaktion auch Faktor X durch den Prothrombinase-Komplex zu seiner aktiven Form Xa umgesetzt.

Der intrinsische Weg der Blutgerinnung kann durch den extrinsischen Weg umgangen werden. Dieser alternative Weg der Blutgerinnung (siehe Abbildung 3b)



wird initiiert, wenn das Blut mit einem Zelloberflächen-Protein, dem Gewebsthromboplastin in Kontakt kommt. Das Gewebsthromboplastin, das nicht auf Endothelzellen vorhanden ist und das auch als Gewebsfaktor („tissue factor“) bezeichnet wird, kann in Gegenwart von Calciumionen eine Konformationsänderung des Faktors VII bewirken, so daß diese Serinproteinase direkt Faktor X zu Xa aktiviert.

Intrinsischer und extrinsischer Weg stellen zwar alternative Wege zur Erzeugung von Faktor Xa dar, jedoch sind sie nicht streng voneinander getrennt. Es erfolgt vielmehr eine gegenseitige Beeinflussung beider Systeme.

In einem neueren Ansatz zur Schematisierung der Hämostase ist der aus der klassischen Sichtweise als extrinsische Pfad bekannte Aktivierungsweg maßgeblich für eine ordnungsgemäße Gerinnung, wohingegen der als intrinsisch bekannte Weg eine untergeordnete Rolle spielt. Diese Sichtweise gründet auf der Auswertung der heute bekannten vererbaren Störungen des hämostatischen Gleichgewichtes. Dabei hat sich gezeigt, daß der vom Gewebsthromboplastin abhängige extrinsische Pfad („tissue factor pathway“) beziehungsweise dessen Komponenten essentiell sind. Bei Fehlen oder Defekt nur eines dieser dort auftretenden Faktoren sind in jedem Fall schwerwiegende Defekte der Hämostase festzustellen, wohingegen ein fehlendes Element des klassischen intrinsischen Pfades nicht notwendigerweise zu Komplikationen führen muß, beziehungsweise phänomenologisch überhaupt keine Defekte erkennbar sind. Aufgrund der Komplexität der bei der Hämostase herrschenden Zusammenhänge und der Etablierung dieser Begriffe ist zumindest die formale Differenzierung in extrinsisches und intrinsisches System auch weiterhin sinnvoll.

Die Serinproteinase Faktor X stellt den Konvergenzpunkt von intrinsischem und extrinsischem Pfad der Blutgerinnungskaskade dar. Es bestehen mehrere Möglichkeiten der Aktivierung, die durch Proteolyse der Bindung Arg<sup>234</sup>-Ile<sup>235</sup> zum Faktor Xa realisiert wird. Dies geschieht zum Einen durch den Faktor VIIa-TF Komplex (extrinsischer Pfad) und zum Anderen durch den Faktor IXa-Faktor VIIIa Komplex (intrinsischer Pfad).

Nach der Generierung des Faktors Xa durch die beiden beschriebenen Aktivierungspfade kann dieser Prothrombin in das katalytisch aktive Thrombin umwandeln. Diese Umwandlung wird durch die Bildung eines enzymatisch wirksamen Komplexes mit Calciumionen, Faktor V und Phospholipiden (Oberfläche von Thrombozyten) außerordentlich, d. h. um bis zu fünf Größenordnungen, beschleunigt. Aus diesem Grund ist nicht allein die Gegenwart von Faktor Xa für den weiteren Ablauf der Gerinnung nötig, sondern vielmehr die Präsenz des gesamten Prothrombinase-Komplexes [9, 10].

Thrombin ist nun in der Lage, das Adhäsionsprotein Fibrinogen zu prozessieren und dabei die sogenannten Fibrinopeptide A und B abzuspalten. Durch Entfernung dieser hoch negativ geladenen Peptide werden Polymerisationsstellen freigelegt, die eine ladungskontrollierte Assoziation der Fibrinmonomere ermöglichen. Ferner kann Thrombin auch sein eigenes Zymogen Prothrombin in die aktive Form überführen und Faktor XIII in XIIIa umwandeln. Dieser Faktor hat die Aufgabe, das durch die Assoziation von Fibrin-Monomeren entstandene gelartige Gerinnsel mittels seiner Transglutaminaseaktivität quervernetzen und dadurch in ein mechanisch widerstandsfähigeres hartes Gerinnsel umzuwandeln.

## **2.2 Die Fibrinolyse**

Nach Reparatur des verletzten Gefäßes muß schließlich die Auflösung des zuvor gebildeten Gerinnsels erfolgen. Die Aufgaben des fibrinolytischen Systems bestehen somit in der Auflösung von Thromben, aber auch in der Verhinderung einer übersteigerten Gerinnselbildung.

Zwingend erforderlich für die Fibrinolyse ist das Vorhandensein von Plasmin bzw. von Plasminogen. Letzteres wird entweder durch den in der Leber produzierten Gewebetyp-Plasminogenaktivator („tissue type plasminogen activator“, t-PA), oder durch die in der Niere produzierte Urokinase zum Plasmin aktiviert [11]. Eine dritte Möglichkeit zur Aktivierung von Plasminogen besteht in der Prozessierung durch den aktivierten Faktor XII, der damit sowohl eine Rolle bei der Bildung als auch bei der Auflösung von Blutgerinnseln spielt.

Insgesamt weist der Ablauf der Fibrinolyse eine auffallende Ähnlichkeit mit dem Blutgerinnungssystem auf (siehe Abbildung 3c), weil es auch in diesem System eine Kaskade von Zymogenaktivierungen gibt.

### 2.3 Die Regulation von Blutgerinnung und Fibrinolyse

Im Blut läuft die Blutgerinnung permanent in geringem Ausmaß ab, auch wenn das Gewebe keine Verletzung erlitten hat. Hierdurch kommt es ständig zu Fibrinablagerungen im Blut, die durch das fibrinolytische System aufgelöst werden müssen, damit es nicht zu einer Beeinträchtigung des Blutflusses kommt. Blutgerinnung und Fibrinolyse stehen folglich miteinander in einem dynamischen Gleichgewicht, dessen Einstellung durch die jeweiligen Konzentrationen an Aktivatoren und Inhibitoren reguliert wird.

So können die Plasminogen-Aktivatoren, die die Fibrinolyse fördern, einerseits durch spezifische Inhibitoren (PAI-1, PAI-2) gehemmt werden, andererseits kann jedoch auch eine unspezifische Inaktivierung durch das  $\alpha_2$ -Makroglobulin oder durch Serinproteinase-Inhibitoren, wie z. B. dem  $\alpha_1$ -Proteinase-Inhibitor, erfolgen. Diese unspezifischen Inhibitoren können darüber hinaus auch auf die Blutgerinnung einen hemmenden Einfluß ausüben [1]. Ein weiterer wichtiger Beitrag zur Inhibierung der Fibrinolyse wird vom  $\alpha_2$ -Antiplasmin geleistet, dessen wesentliche Aufgabe darin besteht, den Plasminspiegel im Blut gering zu halten. Allgemein machen die Inhibitoren etwa zehn Prozent der Blutplasmaproteine aus [12].

Die Spaltprodukte von Fibrin und Fibrinogen haben ihrerseits einen starken Einfluß auf die Gerinnung. Sie sind in der Lage, sowohl die proteolytische Aktivität des Thrombins zu hemmen, als auch die Polymerisation von Fibrinmonomeren zu stören, indem sie durch Kettenabbruch deren Assoziation behindern. Auf diese Weise wird der Gerinnungsablauf negativ beeinträchtigt.

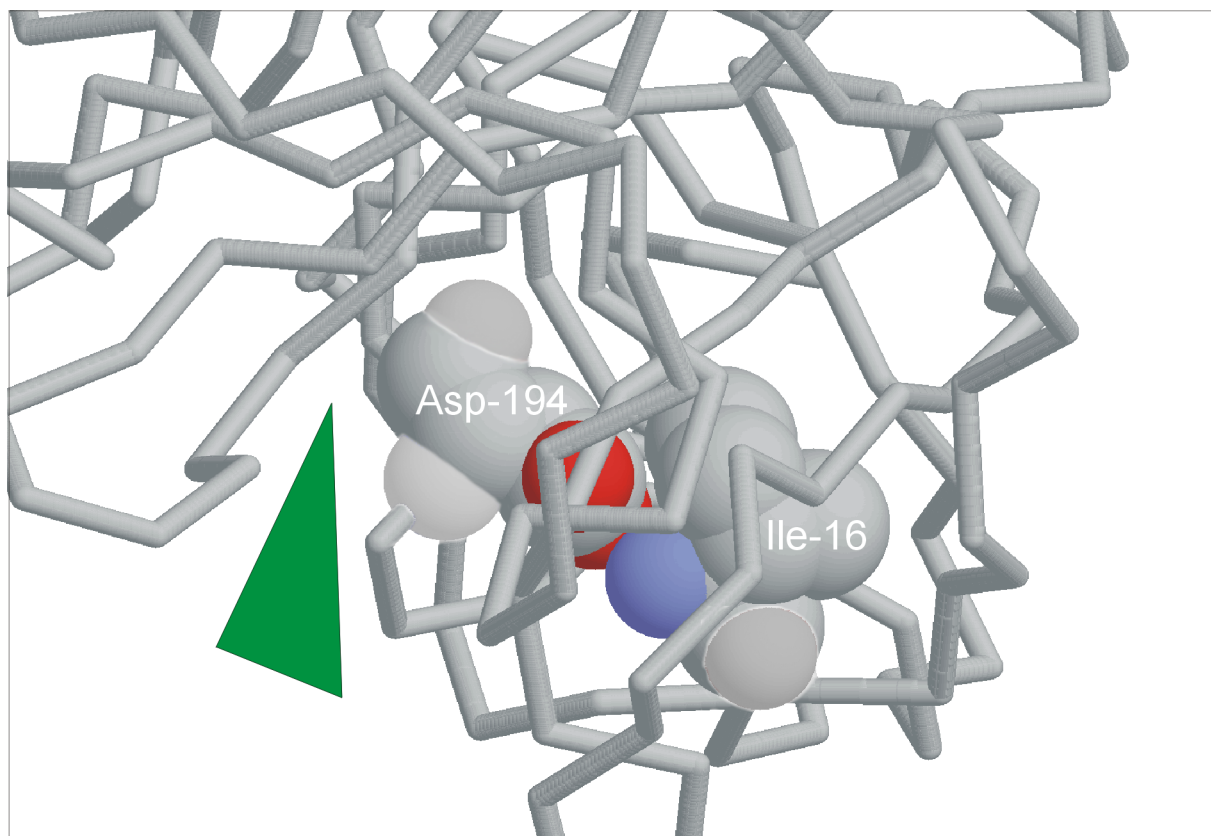
Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß es sich bei der Blutgerinnung um ein kompliziertes Netzwerk von Reaktionen handelt, bei dem eine Protease nicht nur eine, sondern mehrere Reaktionen katalysiert, die mitunter sogar für gegenläufige Effekte verantwortlich sind. Ein gutes Beispiel hierfür ist das Thrombin, das sowohl pro-, als auch antikoagulatorische Wirkung entfalten kann. Außerdem scheint der

intrinsische Pfad der Gerinnungskaskade weniger als Auslöser der Gerinnung, sondern viel mehr als Verstärkungspfad angesehen zu werden. Das heißt, daß die Unterteilung in extrinsischen und intrinsischen Pfad *in vivo* nicht erfolgt und daher vielmehr als ein Formalismus angesehen werden muß, der in erster Linie zum Verständnis dieser komplexen Abläufe beitragen kann [13].

## 2.4 Serinproteinasen

Die Serinproteinasen bilden eine der fünf Hauptklassen von Proteasen. Die katalytische Aktivität dieser Enzymfamilie beruht auf einem reaktiven Serinrest im aktiven Zentrum, der zusammen mit einem Aspartat- und einem Histidinrest eine sogenannte katalytische Triade bildet. Durch diese spezielle Aminosäureanordnung wird ein Ladungsübertragungssystem erzeugt, das die Hydrolyse einer Peptidbindung durch einfache Acylierung bzw. anschließende Deacylierung des Serinrestes ermöglicht [14]. Alle Faktoren der Blutgerinnungskaskade mit proteolytischer Aktivität sind Serinproteinasen.

Ein wesentliches Merkmal dieser Enzyme sind die strukturell relevanten Veränderungen, die sich durch eine oder mehrere Spaltungen im Zuge der Aktivierung ergeben: Während die katalytische Triade bereits im Proenzym dieselbe funktionelle Anordnung besitzt wie in der aktiven Protease, lassen sich in direkter Nachbarschaft dieser aktiven Reste signifikante Unterschiede feststellen [15, 16]. Eine Schlüsselrolle kommt hierbei dem bei der Aktivierung freigesetzten N-Terminus zu, einem hochkonservierten Isoleucin (Ile-16, Trypsin-Numerierung), das eine Salzbrücke mit der dem Serin des aktiven Zentrums benachbarten Aminosäure ausbilden kann (Asp-194). Hierdurch entsteht eine Bindungstasche für das neue Aminoende, zum andern erfolgt hierdurch die Stabilisierung der Spezifitätstasche. Erst in dieser nun nicht mehr flexiblen Spezifitätstasche kann eine korrekte und präzise Orientierung der zu spaltenden Peptidbindung erfolgen, und zwar durch starre Fixierung der zumeist basischen Seitenkette des Substrates [17].



**Abbildung 5: Backbone Darstellung des Trypsin Moleküls (Ausschnitt).** Die beiden Aminosäuren Ile-16 und Asp-194 sind als Kugelmodelle dargestellt. Die Salzbrücke zwischen der Aminogruppe des Ile-16 (blau) und der Carboxylgruppe des Asp-194 (rot) stabilisiert das aktive Zentrum. Der grüne Keil deutet die Spezifitätstasche an.

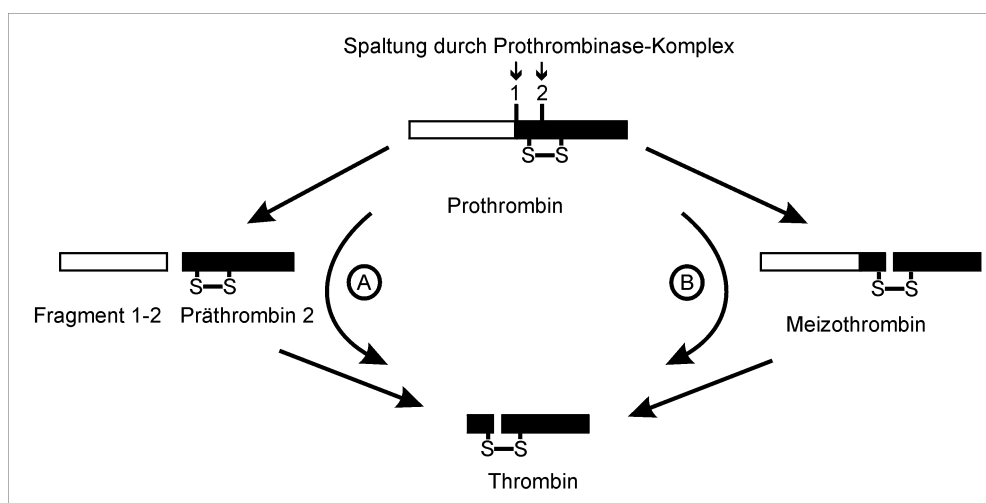
## 2.5 Prothrombin / Thrombin

Das Zymogen des Thrombins, das Prothrombin, wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert und in das Blutplasma sezerniert. Weiterhin wird es auch lokal im zentralen Nervensystem (ZNS) exprimiert und ist, ebenso wie die entsprechende Protease Thrombin, in der Zerebrospinalflüssigkeit nachweisbar [18].

Analog zu den Vertretern der Enzymklasse der MMPs (siehe 2.10), besitzt auch das Thrombin als Vertreter der Klasse der Serinproteinasen einen modularen Aufbau. Wesentliche Merkmale hierbei sind die sogenannte Gla-Box, hierbei handelt es sich um eine N-terminal liegende  $\gamma$ -carboxyglutamatreiche Sequenz, zwei Kringel-Domänen, gefolgt von der katalytischen Domäne.

Im Falle einer Gefäßverletzung wird aufgrund der durch Calcium-Ionen vermittelten Anheftung der Gla-Box an das freigelegte Subendothelium eine lokale Konzentrationserhöhung des Prothrombins bewirkt. Dort kann es durch den

Prothrombinase-Komplex aktiviert werden. Die Umwandlung des Faktors II zu IIa erfolgt durch Spaltungen des latenten 66 kDa Proteins, die das Vorläuferprotein vom N-Terminus her durch Abtrennung verschiedener Fragmente um ca. 32 kDa verkürzen [19]. Essentiell für die Bildung des sogenannten  $\alpha$ -Thrombins sind dabei die Spaltungen an den Stellen  $R^{314}-T^{315}$  und  $R^{363}-I^{364}$ . Abhängig von der Reihenfolge dieser Spaltungen unterscheidet man zwei Aktivierungspfade. Die beiden durch diese alternativen Pfade entstehenden Intermediate Präthrombin 2 [20] und Meizothrombin [21] sind bei einer Aktivierung des Prothrombins nachweisbar.



**Abbildung 6:** Darstellung der beiden möglichen Pfade der Prothrombin-Aktivierung. Abhängig von der Reihenfolge der Spaltungen entstehen unterschiedliche Intermediate. Erfolgt eine Spaltung zunächst an der mit „1“ bezeichneten Stelle ( $R^{314}-T^{315}$ ), so verläuft die Aktivierung über Pfad A, d. h. mit den Intermediaten Fragment 1-2 und Präthrombin 2. Bei Aktivierungspfad B wird zunächst an Stelle „2“ proteolytisiert ( $R^{363}-I^{364}$ ), und es entsteht Meizothrombin als Zwischenprodukt.

Beim Thrombin handelt es sich, wie bei allen anderen Blutgerinnungsfaktoren mit proteolytischer Aktivität auch, um eine vom Trypsin abstammende Serin-Proteinase. Obwohl das Thrombin strukturell eng mit dem Trypsin verwandt ist, zeigt es eine sehr viel höhere Substratspezifität. Diese veränderte Substratspezifität des Thrombins beruht auf zwei insertierten Proteindomänen, nämlich der 60-AS- und der 148-AS-Insertionsschleife. Diese Domänen verdecken zum Teil die Spezifitätstasche des Thrombins und erhöhen dadurch die Selektivität gegenüber potentiellen Substraten [17, 22]. Dieses Plasmaprotein besitzt ein Molekulargewicht von 34000 und stellt einen der wesentlichen Faktoren der Blutgerinnung dar. Das aktive  $\alpha$ -Thrombin besteht aus einer A- und B-Kette, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind (siehe Abbildung 7). Die B-Kette trägt das katalytische Zentrum.



Das Isoleucin 364, durch das die B-Kette generiert wird, entspricht strukturell dem Isoleucin 16 beim Trypsin [22]. Eine proteolytische Aktivität kann demnach nur dann vom Thrombin ausgehen, wenn genau dieser N-Terminus entsteht. Nur dann wird durch Ausbildung einer spezifischen Salzbrücke zwischen dem terminalen Stickstoff und der Carboxylgruppe des der katalytischen Triade benachbarten Aspartats eine Stabilisierung des aktiven Zentrums in seiner dreidimensionalen Struktur erfolgen (siehe auch Abschnitt 2.4).

Durch schrittweise autolytische Auslösung kleinerer Peptide aus der B-Kette des  $\alpha$ -Thrombins entstehen zunächst das  $\beta$ - und im weiteren Verlauf das  $\gamma$ -Thrombin [26]. Dies führt zu einem praktisch vollständigen Verlust der proteolytischen Aktivität gegenüber makromolekularen Substraten, während das amidolytische Potential gegenüber kleinen Substraten zumindest teilweise erhalten bleibt [27, 28].

### 2.5.2 Regulation der Blutgerinnung

$\alpha$ -Thrombin ist in der Lage, die Fibrinopeptide A und B des Fibrinogens abzuspalten. Dadurch werden die Polymerisationsstellen des Fibrins freigelegt, und die Ausbildung eines Gerinnsels kann erfolgen.

Darüber hinaus kann diese Serinproteinase eine antikoagulatorische Kaskade auszulösen, indem es durch die Bindung an seinen Endothelzellrezeptor Thrombomodulin sein ursprüngliches Zielsubstrat Fibrinogen verliert und statt dessen das antikoagulatorisch wirksame Protein C aktiviert [29]. Protein C, ebenfalls eine Serinproteinase, ist nach Bildung eines Komplexes mit seinem Kofaktor Protein S in der Lage, selektiv die Faktoren Va und VIIIa zu inhibieren [30].

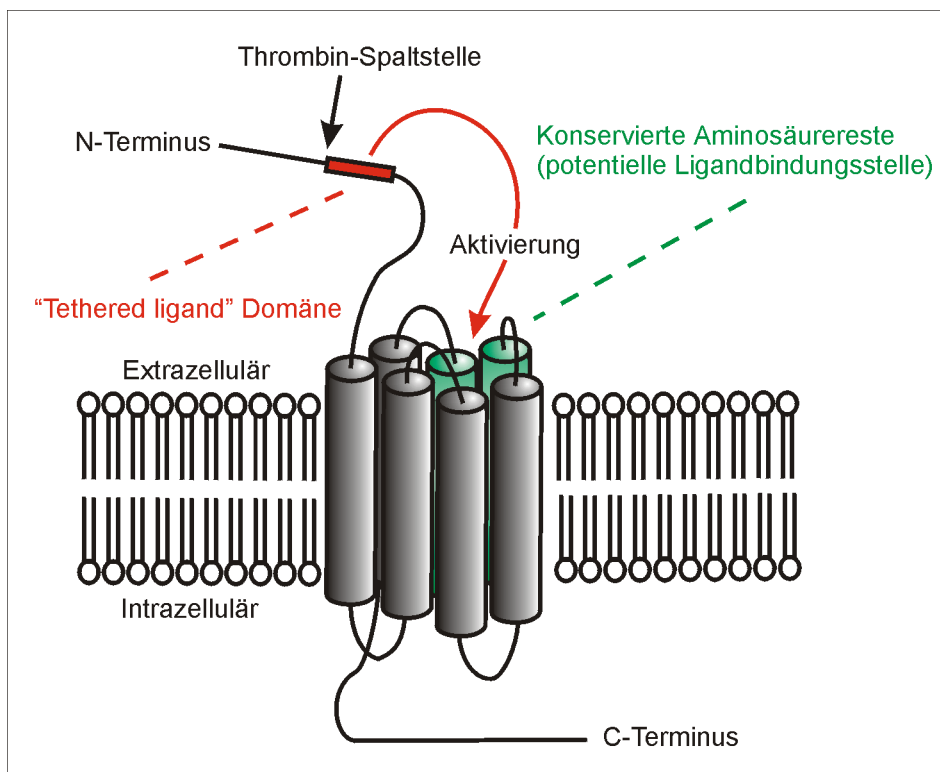
Die natürlichen Inhibitoren des Thrombins sind das Antithrombin III, die Protease Nexin-I, der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-I und Heparin-Kofaktor-II, die in Gegenwart von Heparin aktiviert werden können [29], sowie das  $\alpha_2$ -Makroglobulin. Neuere Untersuchungen weisen auf eine möglicherweise noch größere Vielseitigkeit des Thrombins hin. Dabei geht das Wirkungsspektrum dieses Enzyms weit über die Regulation der Blutgerinnung hinaus.



### 2.5.3 Thrombin Rezeptoren

Thrombin ist an einer Vielzahl von Signalwegen beteiligt. Es vermag die Plättchenaggregation auszulösen oder proinflammatorische Cytokine freizusetzen [31, 32]. Weitere Antworten auf Thrombin-Signale sind unter anderem die Endothel-abhängige Relaxation der Coronar-Arterien [33], die Kollagen-Synthese durch glatte Muskelzellen und Fibroblasten [34, 35], Beeinflussung des Calcium-Haushalts [36], Induktion von Apoptose in Nervenzellen [37] und Proliferation von HUVEC- und von glatten Muskelzellen [38, 39].

Diese Antworten werden allesamt durch Thrombin-Rezeptoren vermittelt. Diese sind Mitglieder einer Familie von mindestens vier auch als Protease-aktivierte Rezeptoren bezeichneten Proteinen (PAR-1 bis PAR-4), von denen das Thrombin bis auf PAR-2 alle aktivieren kann [40, 41]. PAR-1 wurde schon deutlich vor den anderen Mitgliedern dieser Familie entdeckt und ist dementsprechend am besten charakterisiert [42]. PAR-3 und PAR-4 wurden bisher nur auf Plättchen ausreichend charakterisiert. Die Expression von PAR-1 konnte bislang auf Plättchen [43], Endothelzellen [43, 44], glatten Muskelzellen [34], gingivalen Fibroblasten [45], Monocyten [46], T-Zellen [47], Neuronen [48] und verschiedenen Tumor-Zellen [49] nachgewiesen werden. Bei der Erforschung der Wirkung von PAR-1 auf diese Zellen hat sich herausgestellt, daß er eine wesentliche Rolle bei Entzündungsprozessen, Wundheilung und Reparatur von Gewebe spielt [50, 51]. PAR-1 wird durch Thrombin an der Stelle R<sup>41</sup>– S<sup>42</sup> gespalten, wodurch N-terminal ein Peptid freigesetzt wird. Der neu generierte N-Terminus SFFLRN- fungiert nun als sogenannter angebundener Ligand („tethered ligand“). Durch die Wechselwirkung dieses Liganden mit der zweiten extrazellulären Schleife des G-Protein-gekoppelten Thrombin-Rezeptors wird dieser aktiviert. Die Besonderheit dieser Rezeptoren liegt im Vergleich zu anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren darin, daß der Aktivierung eine Spaltung vorausgehen muß und der proteolytisierte Rest nach Internalisierung in Lysosomen abgebaut wird.



**Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Proteinase-aktivierten Rezeptors und seiner Aktivierung.** Die Mitglieder dieser Rezeptorfamilie besitzen alle ein Sieben-Helix Motiv. Bei spezifischer Abspaltung eines N-terminalen Peptids des PAR kann der neu generierte Aminoterminus (rot) mit einer komplementären Sequenz der zweiten Helix des Rezeptors wechselwirken und sich dadurch zwischen zweiter und dritter Helix (grün) in das Motiv integrieren. Hierdurch wird letztlich das Signal durch die Zellmembran hindurch übertragen. (Modifiziert nach [42]).

#### 2.5.4 Einfluß auf die Angiogenese

Das Thrombin besitzt die Fähigkeit, verschiedene Prozesse zu induzieren, die bei der Gefäßneubildung (Angiogenese) eine Rolle spielen [52-57]. So ist es beispielsweise in der Lage, die Gefäßdurchlässigkeit zu induzieren [58]. Im Testsystem mit der Chorioallantoischen Membran des Huhns zeigte Thrombin eine Förderung der Angiogenese *in vivo* [55, 56]. Darüber hinaus besitzt Thrombin eine mitogene Wirkung auf Endothelzellen [59-61], die sowohl auf proteolytische, d. h. PAR-vermittelte, als auch auf nicht-proteolytische (mittels B-Schleife der Thrombin B-Kette) Signalwege zurückzuführen ist [61].

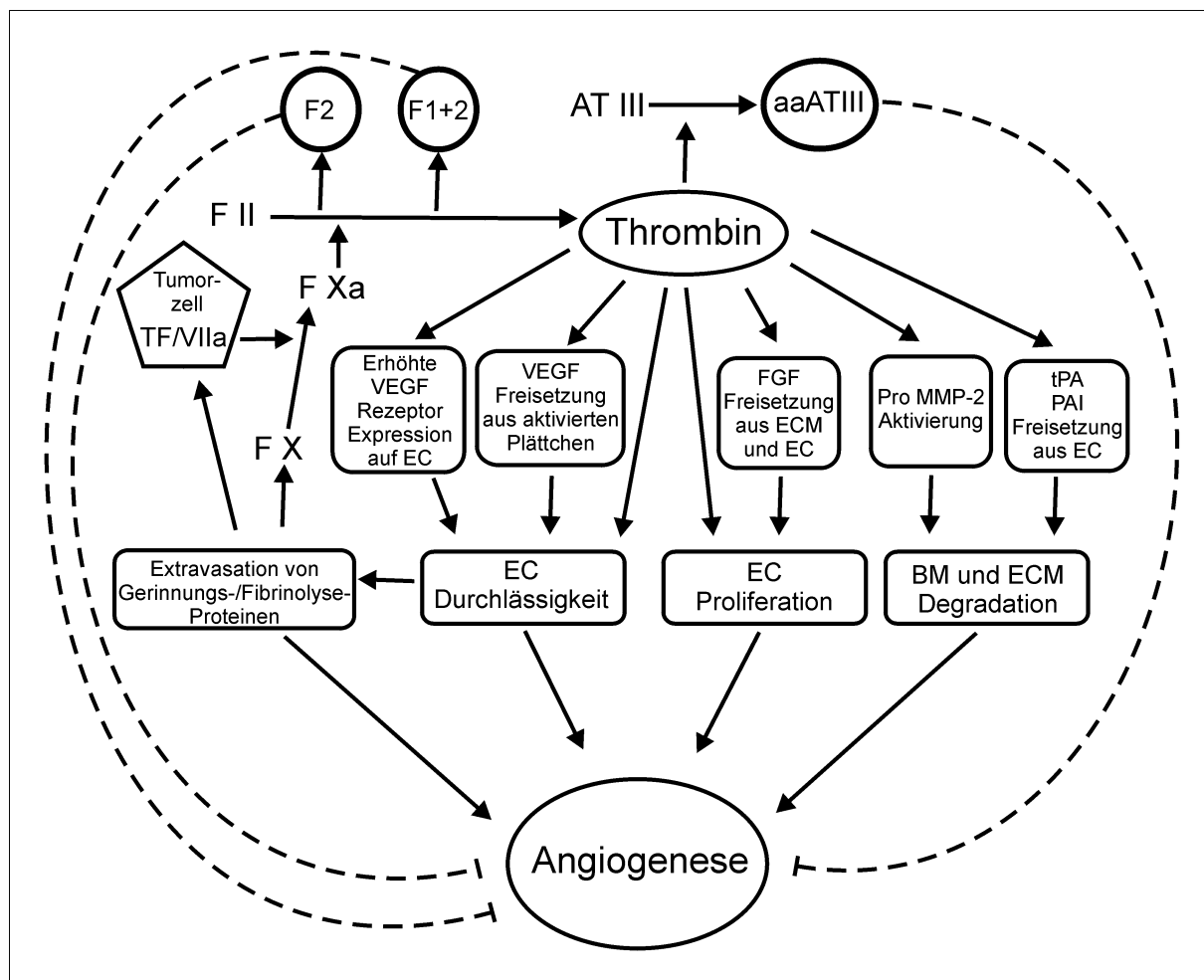
Des Weiteren werden durch Thrombin auch indirekt pro-angiogene Effekte vermittelt, sowohl durch die Hochregulation von VEGF in Fibroblasten [62], als auch durch eine Erhöhung der Zahl von VEGF Rezeptoren auf dem Gefäß-Endothel [55]. Außerdem soll durch eine Erhöhung der VEGF-Ausschüttung der Plättchen [63], die Expression des pro-angiogenen bFGF durch Endothelzellen [60] und Ausschüttung von bFGF

aus ECM-Speichern [64] eine indirekte Induktion der Angiogenese durch das Thrombin erfolgen.

Neben dem Thrombin, das in der Regel pro-angiogenetische Effekte vermittelt, wird durch Fragmente mit kryptischer Aktivität, die aus dem Prothrombin herausgeschnitten werden können, eine Inhibierung der Angiogenese beobachtet [65, 66]. Es handelt sich hierbei um die Aktivierungspeptide Fragment 1 (F1), Fragment 2 (F2) und Fragment 1-2 (F1+2). Thrombin vermag, ebenso wie die neutrophile Elastase, die Thrombin-Bindungsstelle des Antithrombin III abzuspalten und hierdurch das Angiogenese-inhibierende Potential dieses Biomoleküls freizusetzen [67], d. h. seine Umwandlung zum anti-angiogenetischen Antithrombin III (aaATIII) zu katalysieren.

Thrombin ist außerdem in der Lage, die Aktivierung der Gelatinase A (MMP-2) in Gefäß-Endothelzellen zu induzieren [68, 69]. Auch hier liegt ein enormes Potential, die Angiogenese voranzutreiben: Essentiell für eine solche Erweiterung des Gefäßsystems ist die Degradation der Basalmembran, die erst durch das Vorhandensein von aktiver MMP-2 geschehen kann. Diese direkten und indirekten Auswirkungen des Thrombins auf die Gefäßneubildung sind in Abbildung 9 zusammengefaßt.

Die Thrombin-Rezeptor vermittelte Gefäßdurchlässigkeit [58] ermöglicht die Extravasation von Fibrinogen, das dann außerhalb der Gefäße zu Fibrin umgesetzt werden kann. Das Ergebnis ist eine Fibrin-Matrix, wie sie häufig um Tumore herum gefunden wird und die diesen z. B. vor einem Angriff von Zellen der Immunabwehr schützt (siehe auch 2.8). Von quervernetztem Fibrin wird weiterhin angenommen, daß es eine provisorische Matrix darstellt, die die Angiogenese fördert. Dies geschieht durch Initiierung der Endothelzell-Migration, -Adhäsion und Übermittlung von Überlebenssignalen an die Endothelzellen [70-72].



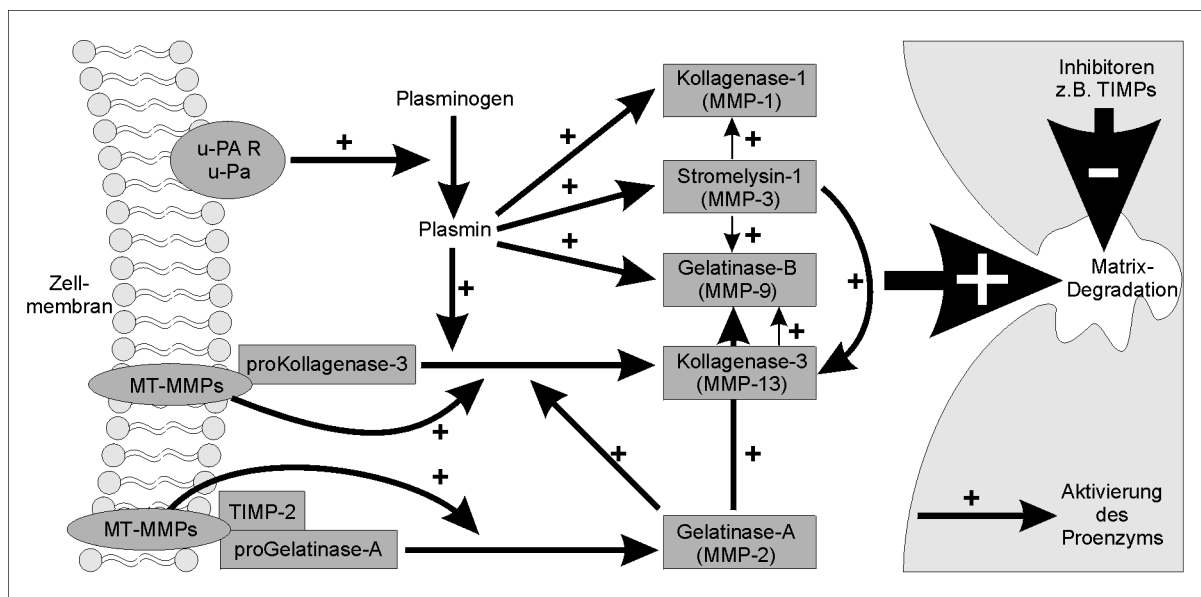
**Abbildung 9: Einfluß von Thrombin auf die Angiogenese.** Verschiedene Aspekte der Gefäßneubildung können durch Thrombin direkt oder indirekt beeinflusst werden, z. B. durch Ausbildung einer provisorischen Fibrin-Matrix. Proteolyse von Prothrombin oder Antithrombin III führt zur Freisetzung von Angiogenese-Inhibitoren (unterbrochene Linien). Durch Thrombin aktivierte Plättchen werden zahlreiche Effektoren der Angiogenese freigesetzt, u. a. VEGF, PF4, FGF, TGF $\alpha$  und  $\beta$ . Direkte Effekte des Thrombins auf Zellen werden häufig durch PARs vermittelt [73].

## 2.6 Plasminogen/Plasmin

Plasmin ist eine Serinproteinase, die durch partielle Proteolyse aus Plasminogen entsteht und für die Aufrechterhaltung der Funktionen des Blutes essentiell ist. Plasminogen ist das Schlüsselproenzym der Fibrinolyse [11] und wird direkt nach seiner Synthese in der Niere in das Blutplasma abgegeben. Die Aktivierung von Plasminogen kann durch den Gewebe-Plasminogenaktivator in Gegenwart eines Fibrin-Thrombus oder durch die Urokinase erfolgen [11].

Dem Plasmin kommt durch seine schon erwähnte Fähigkeit zur Fibrin-Spaltung eine zentrale Rolle in der Fibrinolyse zu (siehe Abbildung 3c). Inzwischen sind andere Prozesse bekannt, bei deren Ablauf das Plasmin ebenfalls wesentlichen Anteil hat:

Dies geht auf die proteolytische Aktivität des Plasmins zurück, durch die es in der Lage ist, verschiedene MMPs zu aktivieren (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Aktivierung von MMPs durch Plasmin.** Durch seine Fähigkeit, verschiedene Matrix Metalloproteinasen zu aktivieren, hat das Schlüsselenzym der Fibrinolyse auch eine erhebliche Bedeutung beim Abbau der ECM (modifiziert nach [74]).

Andererseits verfügt sein Vorläufer, das Plasminogen, über versteckte, sogenannte kryptische Aktivitäten. Hierbei handelt es sich um Fragmente, die völlig andere Eigenschaften besitzen als das Gesamtprotein. Diese können bei Proteolyse des Plasminogens durch andere Enzyme freigesetzt werden. Es handelt sich hierbei z. B. um das Angiostatin. Unter diesem Namen versteht man das Plasminogen-Fragment, das als Hemmstoff der Angiogenese entdeckt wurde, und das die Kringel-Domänen K1-4 umfaßt [75]. Die hemmende Wirkung auf die Gefäßneubildung konnte jedoch inzwischen bei allen fünf Kringeldomänen des Plasminogens nachgewiesen werden, sowohl in den einzelnen Fragmenten, als auch in komplexeren Spaltstücken [76]. Die höchste Wirksamkeit wird dem Fragment K1-3 zugesprochen.

### 2.7 Hagemann-Faktor (Faktor XII)

Der Hagemann-Faktor zirkuliert als glykosyliertes 80 kDa Proenzym in der Blutbahn und ist nach Aktivierung in der Lage, die Blutgerinnungskaskade zu initiieren oder auf das Fibrinolyse-System Einfluß zu nehmen. Das Enzym besitzt Domänen, die auch in anderen Serinproteasen gefunden wurden, nämlich eine Kringel-Domäne, eine EGF-artige Region und die Fibronectin-Typ-I- und -Typ-II-artigen Regionen. Da die

Fibronektin-Typ-II-Domäne eine Bindungsstelle für das Kollagen besitzt, wird die homologe Region im Faktor XII für die Anheftung an das Subendothel verantwortlich gemacht [8]. Faktor XII bindet leicht an anionische Oberflächen (Kollagen und Plättchen-Membranen). Nach erfolgter Bindung kann durch den *in vivo* wirksamen Aktivator des Hagemann-Faktors, das Kallikrein, die Prozessierung zur aktiven Form erfolgen. Das Zymogen wird hierbei zunächst durch eine einzige Spaltung zum  $\alpha$ -Faktor XIIa aktiviert. Dieser besteht dann aus zwei Ketten, die durch eine Disulfidbrücke verbundenen sind [77]. Durch weitere zweifache Proteolyse erfolgt die Umwandlung in den  $\beta$ -Faktor XIIa ( $M_r = 30$  kDa). Die aminotermine Region, in der sich fibronectinartige, EGF-artige und eine Kringel-Domäne befinden, geht hierbei verloren [78]. Die Domänenstruktur des Hagemann-Faktors ist schematisch in Abbildung 11 dargestellt.

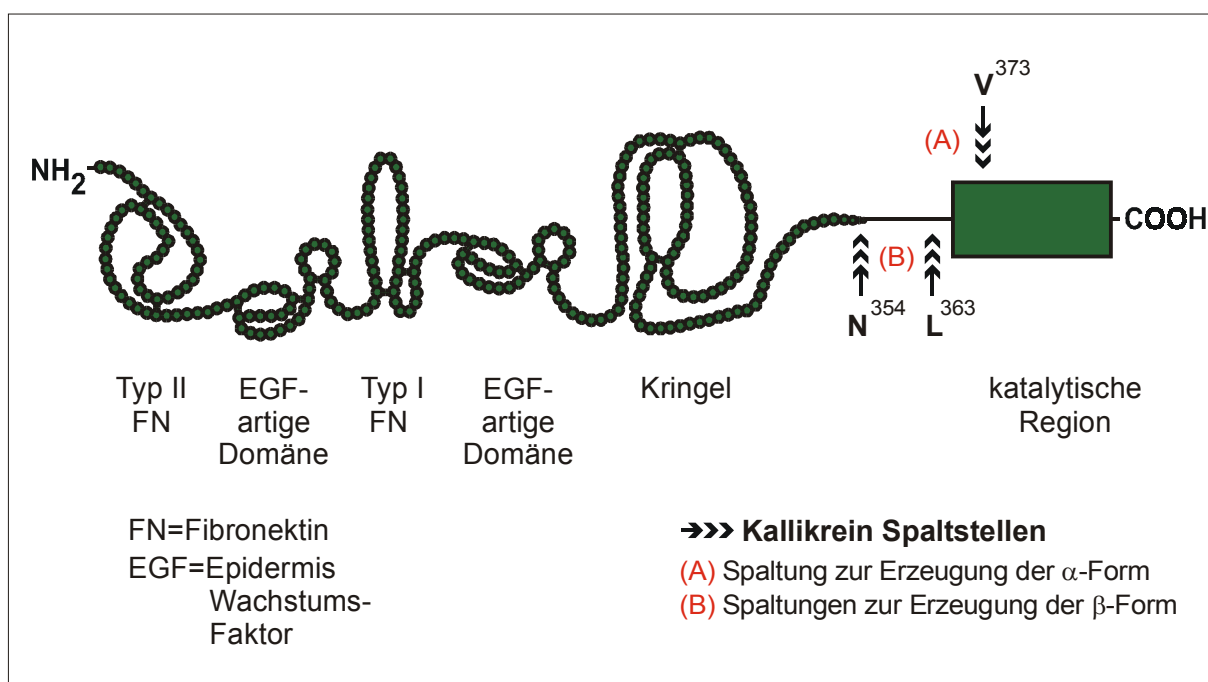
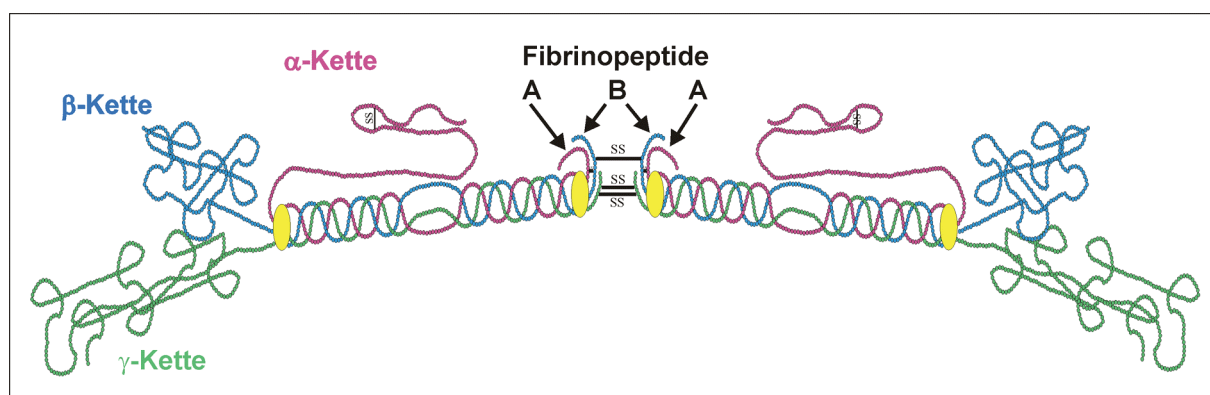


Abbildung 11: Domänenstruktur des Hagemann-Faktors.

## 2.8 Fibrinogen / Fibrin

Beim Fibrinogen handelt es sich um ein fibrilläres Protein ( $M_r = 340$  kDa), das eine erhebliche Rolle bei der Blutgerinnung und der Wundheilung spielt.

Fibrinogen ist aus drei Paaren nichtidentischer Ketten aufgebaut. Es besteht aus je zwei Ketten des Typs  $A\alpha$  ( $M_r = 68$  kDa),  $B\beta$  ( $M_r = 56$  kDa) und  $\gamma$  ( $M_r = 47$  kDa), die über Disulfidbrücken verbunden sind. Die N-Termini aller Ketten werden in einem zentralen Disulfidknoten zusammengehalten. Ausgehend von diesem zentralen Knoten führen zwei stabförmige Bereiche, in denen die drei Ketten superspiralisiert sind („coiled coils“), zu den C-terminalen Regionen, die wiederum eine globuläre Domänenstruktur aufweisen. Von den drei unterschiedlichen Peptidketten verfügt die  $\alpha$ -Kette über die größte räumliche Ausdehnung. Sie ist aufgrund ihrer schwachen Wechselwirkungen mit dem verbleibenden Fibrinogen-Gerüst sehr beweglich [79].



**Abbildung 12: Schematische Darstellung des Fibrinogens.** Die  $\alpha$ -(rot),  $\beta$ -(blau) und  $\gamma$ -(grün) Ketten sind über Disulfidbrücken (gelb) miteinander verbunden. Am zentralen Disulfidknoten sind die Fibrinopeptide lokalisiert, die durch Thrombin abgespalten werden können.

Fibrinogen wird durch Thrombin, welches vier Arg-Gly-Bindungen im Bereich der zentralen globulären Domäne spaltet, in monomeres Fibrin übergeführt. Durch die sequentielle Abspaltung der stark negativ geladenen Fibrinopeptide A und B wird die Assoziation der Fibrinmonomere zum Fibrin ermöglicht, da es hierdurch lokal zu einer Ladungsumkehr kommt. In der Konsequenz erfolgt eine ladungskontrollierte Assoziation der Fibrinmonomere [80]. Diese Polymerisation ist ein zweistufiger Prozeß, bei dem zunächst doppelsträngige Protofibrillen ausgebildet werden, die sich dann zu Fasern zusammenlagern.

Die Prozessierung von Fibrinogen durch Plasmin liefert einen charakteristischen Satz an Fibrinogenfragmenten, die sich mittels Ionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Sepharose trennen lassen. Die Benennung dieser Fragmente (A bis E) ergibt sich aus der Reihenfolge, in der sie von der Chromatographie-Säule eluieren [81].

Bei nur kurzfristigem Einwirken von Plasmin lassen sich Übergangsfragmente nachweisen, die mit X und Y bezeichnet werden.

Es konnte gezeigt werden [82], daß Tumore ab einer bestimmten Größe häufig von einer Fibrinogen-Matrix umgeben sind. Das hierzu notwendige Fibrinogen stammt einerseits aus dem extravasierten Fibrinogen des Gefäßsystems und wurde andererseits vom Tumor selbst synthetisiert [83]. Die Fibrinogen-Matrix stellt eine provisorische Stroma-Umgebung dar, durch die eine Abschirmung des Tumors vor dem Zugriff des Immunsystems, sowie vor Proteasen und anderen Plasmaproteinen ermöglicht wird. Darüber hinaus kann das Fibrinogen direkt über seine RGD-Sequenzen an das Integrin  $\alpha_v\beta_3$  auf Endothelzellen binden. Diese Wechselwirkung bedeutet für die Endothelzellen ein Überlebenssignal, das sie letztlich zur Ausbildung neuer Gefäße veranlaßt [72].

## 2.9 Die Extrazelluläre Matrix

Die Extrazelluläre Matrix (ECM) ist ein makromolekulares Netzwerk, in das die Bindegewebszellen eingebettet sind. Es besteht hauptsächlich aus fibrillären Proteinen wie Kollagenen, Fibronectin, Laminin und verschiedenen Glykoproteinen. Die Strukturproteine und die Glykoproteine verleihen dem Bindegewebe ihre stützende Funktion, sind aber auch für verschiedene physiologische und pathologische Prozesse von Bedeutung.

Bindegewebszellen können das Wachstum der sie umgebenden Matrix beeinflussen, was unter anderem bei Wundheilungsprozessen, bei der Embryonalentwicklung, beim Knochenwachstum, bei parodontösen Krankheiten oder der rheumatoiden Arthritis sowie bei der Ausbreitung von Krebsmetastasen eine wichtige Rolle spielt [84].

Die vier Hauptklassen proteolytisch wirkender Enzyme, die an der Degradation der Extrazellulären Matrix beteiligt sind, bilden die Serinproteasen, die Cysteinproteasen, die Aspartatproteasen und die Metalloproteinasen. Dabei kommt den Metalloproteinasen eine besondere Bedeutung zu, da sie in der Lage sind, die meisten Komponenten der ECM abzubauen. In Abhängigkeit von Vorkommen und



Substratspezifität besitzen die meisten MMPs neben ihrer Numerierung einen oder mehrere Trivialnamen, die in Tabelle 2 zusammengefaßt sind.

<b>MMP</b>	<b>Trivialname(n)</b>
MMP-1	Kollagenase-1, Fibroblasten-Kollagenase
MMP-2	Gelatinase A
MMP-3	Stromelysin-1
MMP-7	Matrilysin, PUMP
MMP-8	Kollagenase-2, Neutrophile Kollagenase
MMP-9	Gelatinase B
MMP-10	Stromelysin-2
MMP-11	Stromelysin-3
MMP-12	Makrophagen-Elastase, Metalloelastase
MMP-13	Kollagenase-3
MMP-14	MT1-MMP
MMP-15	MT2-MMP
MMP-16	MT3-MMP
MMP-17	MT4-MMP
MMP-19	RASI-1
MMP-20	Enamelysin
MMP-23	
MMP-24	MT5-MMP
MMP-25	MT6-MMP
MMP-26	Endometase, Matrilysin-2
MMP-27	
MMP-28	Epilysin

Tabelle 2: Übersicht über die humanen MMPs.

## 2.10 Matrix Metalloproteinasen

Bei den Matrix Metalloproteinasen (MMPs) handelt es sich um eine Familie von  $Zn^{2+}$ - und  $Ca^{2+}$ -abhängigen Endopeptidasen, die von verschiedenen Zelltypen (zum

Beispiel polymorphkernigen neutrophilen Leukozyten, Makrophagen, Osteoblasten und Fibroblasten) sezerniert werden. MMPs werden häufig auch als Matrixine bezeichnet. Das pH-Optimum dieser Proteasen liegt im neutralen Bereich. Ihre Substrate sind die verschiedenen Bestandteile der Extrazellulären Matrix. Eine Übersicht über die Domänenstruktur einzelner Matrixine wird in Abbildung 13 gezeigt.

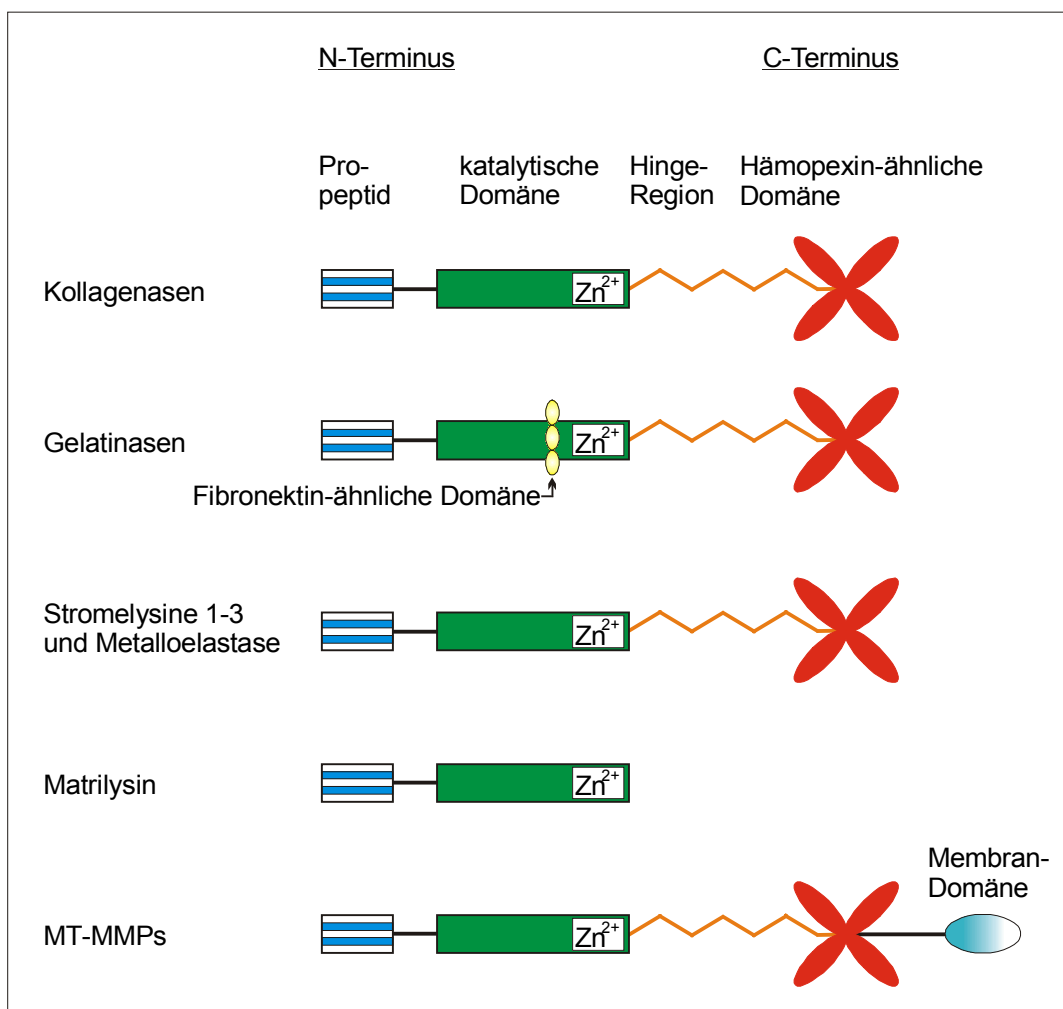
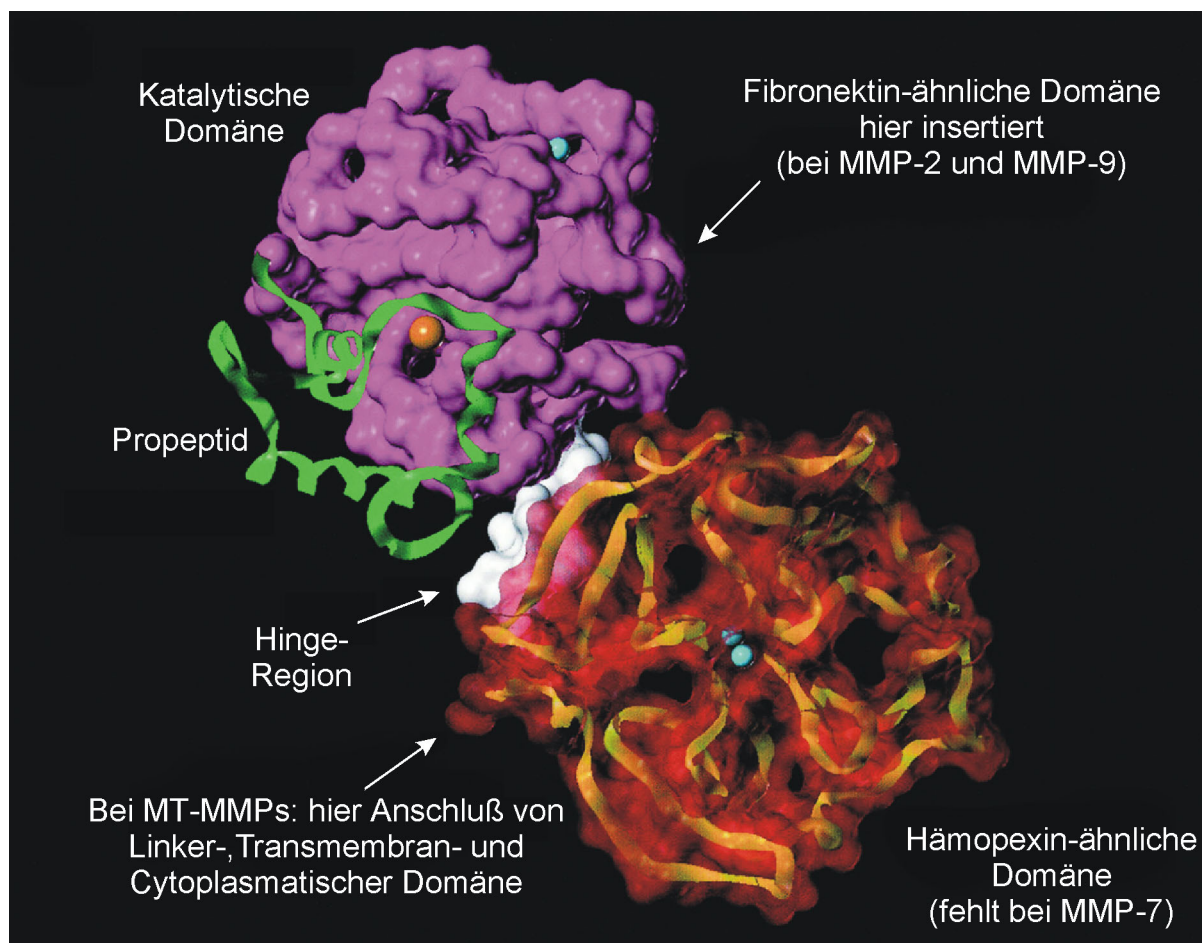


Abbildung 13: Übersicht über die Domänenstruktur der MMPs und die Unterteilung in Subfamilien.

Sämtliche Mitglieder der MMP-Familie verfügen über ein Propeptid und eine katalytische Domäne am N-Terminus. Je nach Substratspezifität und Vorkommen von Fibronektin-ähnlicher, Hämopexin-ähnlicher und Transmembran-Domäne lassen sich die einzelnen Proteasen den Kollagenase-, Gelatinase-, Stromelysin- und membranständigen Subfamilien zuordnen. So spalten die Kollagenasen bevorzugt fibrilläres Kollagen, die Gelatinasen denaturiertes Kollagen (Gelatin) und die Stromelysine auch Fibronektin und Laminin.



**Abbildung 14: Typischer Aufbau der Matrix Metalloproteinasen.** Das katalytische Zink-Ion ist als orange Kugel dargestellt, Calcium-Ionen in der Hämopexin-ähnlichen und der katalytischen Domäne als blaue Kugeln (modifiziert nach [85]).

Eine Unterfamilie der Matrix Metalloproteinasen stellen die membranständigen Matrixine dar. Diese verfügen im Gegensatz zu den löslichen MMPs über eine zusätzliche Domäne, durch die eine Verankerung der Enzyme in Membranen ermöglicht wird. Diese Enzyme werden daher allgemein als MT-MMPs bezeichnet („membrane-type“-MMP).

Den MMPs kommt bei physiologischen Prozessen, wie z. B. dem embryonalen Wachstum, der Wundheilung, dem Knochenwachstum und der Wiederherstellung von Gewebe (Wundheilung) eine bedeutende Rolle zu. Die Fähigkeit der MMPs, nahezu alle Komponenten der ECM abzubauen zu können, macht es erforderlich, daß ihre Regulation sehr strikt verläuft. Sie kann auf der Ebene der Genexpression erfolgen, auf der Ebene der Sezernierung, oder auch extrazellulär durch spezifische Inhibitoren, den sogenannten TIMPs („tissue inhibitors of metalloproteinases“) [86].

Gerät die Regulation der Matrixine ins Ungleichgewicht, so kann dieses schwerwiegende pathologische Folgen haben, wie z. B. im Falle des Tumorgeschehens, der Arthritis und der Arteriosklerose.

Das Spektrum potentieller Substrate der MMPs ist derzeit noch nicht vollständig bekannt. Zwar wurden grundlegende Zusammenhänge erkannt und bereits zahlreiche Substrate identifiziert, doch existieren naturgemäß Schwierigkeiten, *in vivo*, also z. B. am Tumor, die verschiedenen nachweisbaren Degradationsprodukte den einzelnen Proteinase zuzuordnen. Eine besondere Problematik bei der Untersuchung der MMP-Spezifitäten ergibt sich hierbei durch die Vielzahl der gleichzeitig im Gewebe nachweisbaren Proteinase und der entsprechenden Anzahl an potentiellen Substraten. Eindeutige Nachweise lassen sich daher zunächst nur *in vitro* erbringen, da nur hier eine genau definierte Beschränkung auf zuvor definierte Proteasen und Substrate erfolgen kann.

Eine besondere Rolle kommt den Matrix Metalloproteinasen beim Krebsgeschehen zu. Sie sind hierbei für den Abbau des Stromas verantwortlich, das den Tumor umgibt und das aus den verschiedenen Komponenten der ECM besteht, hauptsächlich aus Kollagen, Laminin und Fibronectin. Bei weiterem Tumorstadium, das die Invasion in letztlich lebenswichtige Gewebe beinhaltet, ist ebenfalls eine entsprechend hohe MMP-Aktivität nachweisbar [87]. Darüber hinaus ermöglichen erst die Matrixine durch ihre Fähigkeit, die Basalmembran abzubauen, eine Metastasenbildung durch Tumorzellen, die dann eine erfolgreiche Behandlung des Patienten extrem erschwert [73, 88].

Bei der Betrachtung des Tumorgeschehens und der Relevanz der Matrixine erscheint besonders interessant, daß die MMPs häufig nicht vom bösartigen Gewebe selbst, sondern von den umliegenden Stromazellen produziert werden. Tumore sind also in der Lage, die Expression solcher Gewebe-abbauenden Enzyme in anderen Zellen zu induzieren [89, 90]. Eine solche Induktion kann sowohl durch lösliche Faktoren, als auch durch direkte Zell-Zell-Kontakte vermittelt werden [87].

Neben dem Gewebeabbau lassen sich die pathologischen Prozesse, bei denen die MMPs eine wichtige Rolle spielen, in zwei weitere Erscheinungsbilder einordnen, der

Fibrosebildung und der Matrixschwächung [91]. Eine entsprechende Fibrosierung läßt sich beim Herzinfarkt [92], bei der Arteriosklerose [93] und bei der Leberfibrosierung [94] beobachten. Eine pathologische Schwächung der Matrix wird bei Aneurismen der Aorta [95] und auch bei Herzversagen [96] diagnostiziert.

In neueren Untersuchungen wurden MMPs auch bei pathologischen Prozessen gefunden, die sich in diese Aufteilung nicht einreihen lassen: Die physiologische Bedeutung dieser Klasse von Proteasen scheint größer zu sein, als bisher angenommen. So kommen als Substrate möglicherweise nicht nur die Bestandteile der ECM in Frage, sondern z. B. auch Blutplasmaproteine. Die Ausschüttung der Matrixine MMP-8 und MMP-9 aus den neutrophilen Granulozyten und ihre Wechselwirkungen mit Blutplasmaproteinen sind schon seit längerer Zeit bekannt [97]. Nach neueren Erkenntnissen kommen auch für die MMP-3 [98] Blutplasmaproteine als Substrate in Betracht. Ferner wird auch ein wesentlicher Einfluß der MMPs bei Erkrankungen des Zentralen Nervensystems [99] und der Multiplen Sklerose [100] diskutiert.

Zusammenfassend muß festgestellt werden, daß neben den klassischen ECM-Substraten wie Gelatin, Kollagen usw. zunehmend neue Substrate der Matrixine gefunden werden, die andere Bereiche des Organismus betreffen.

## **2.11 Koagulopathien und Krebsgeschehen**

Das vermehrte Auftreten von Blutgerinnungsanomalien bei Krebspatienten ist bereits seit 1865 in der Literatur bekannt [101]. Da jede Krebserkrankung ihre eigene Ausprägung dieser Symptome mit sich bringt, sind auch heute die Auslöser einer solchen Aktivierung, seltener einer Inhibierung, noch nicht vollständig bekannt. [102-104]. In der Folge ergeben sich zusätzlich zu den eigentlichen Symptomen der Krebserkrankung schwere Thrombosen oder auch Blutungen, die die Lebensqualität der Patienten weiter beeinträchtigen [58]. Es wird vermutet, daß dies zumindest zum Teil auf Effekte zurückzuführen ist, die rezeptorvermittelt durch das Thrombin hervorgerufen werden, in diesem Fall sind Thrombin-Konzentrationen ausreichend, die weit unterhalb derer liegen, die zur Gerinnung von Fibrinogen notwendig sind [57].

Die derzeitige Behandlung beschränkt sich wegen der Komplexität der Zusammenhänge auf die Bekämpfung der Symptome, d. h. auf entsprechende Gaben an Antikoagulantien bzw. Fibrinolyse-Hemmern [105]. Dabei hat sich gezeigt, daß diese Beziehung zwischen Thrombose und Krebs zum Teil einen symbiotischen Charakter hat, da einige Tumore auf Therapien mit Gerinnungsinhibitoren ansprechen [57]. Diese Erfahrungen lassen sich teilweise therapeutisch nutzen, indem sich das Tumorwachstum durch gerinnungshemmende Medikamente eindämmen läßt. Teilweise führt eine solche Medikation jedoch zu Komplikationen [106], was die Therapierung derart betroffener Patienten noch schwieriger macht.

### 3 Zusammenfassung der Arbeit

Neben den „klassischen“ Substraten der Matrix Metalloproteinasen, also den Bestandteilen der Extrazellulären Matrix, kommen seit einiger Zeit auch Blutplasmaproteine in Frage. Inzwischen konnten MMPs auch in der Blutbahn bzw. in unmittelbarem Kontakt zu dieser nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollten verschiedene, durch MMPs induzierte Spaltungen von Blutplasmaproteinen näher untersucht werden, um letztlich ihre physiologische Relevanz abschätzen zu können.

Die Aktivierung des Prothrombins durch die MT1-MMP (MMP-14) konnte bereits durch anschließende Spaltung des synthetischen Thrombin-Substrates S-2238 von mir gezeigt werden [107]. Spaltung und Aktivierung sollten nun näher charakterisiert werden. Es ergab sich die Frage, ob bei dieser Aktivierung ähnliche oder sogar die gleichen Intermediate wie bei der *in vivo* Aktivierung durch den Prothrombinase-Komplex gebildet werden und ob diese auch eine entsprechende Aktivität gegen makromolekulare Substrate aufweisen. Bei der Suche nach dem aktiven Fragment zeigte das durch die MT1-MMP und auch MMP-12 *in vitro* generierte Thrombin eine proteolytische Aktivität nicht nur gegen das chromogene Substrat S-2238, sondern auch gegen makromolekulare Substrate.

Im Verlauf der Arbeit konnten mehrere Spezies mit einer amidolytischen Aktivität gegenüber dem synthetischen Substrat identifiziert werden. Zum größten Teil handelt es sich hierbei um Intermediate, wie sie auch bei der Aktivierung *in vivo* auftreten. Die Separierung der einzelnen Fragmente gelang mittels HPLC-Ionenaustausch-Chromatographie (TSK-SP), gefolgt von „Reversed Phase“-HPLC an einer C<sub>18</sub>-Säule mit polarem „Endcapping“.

Durch N-terminale Aminosäure-Sequenzierung konnte festgestellt werden, daß die Spaltung des Prothrombins durch die MT1-MMP und die sich daraus ergebende Aktivierung letztlich das  $\alpha$ -Thrombin generiert, also dieselbe Spezies, die *in vivo* durch den Faktor X bzw. den Prothrombinase-Komplex gebildet wird. Weiterhin wurde auch die Aktivierung des Prothrombins durch die MMP-12 näher untersucht,

hierbei konnten mittels N-terminaler Aminosäure-Sequenzierung weitere Aktivierungsprodukte identifiziert werden.

Weiterhin konnte die Degradierung des Hagemann Faktors durch die MMP-12, die MMP-13 und die MT1-MMP charakterisiert werden. Anders als bei der MMP-induzierten Aktivierung des Prothrombins handelt es sich hierbei um einen Abbau, also eine irreversible Inaktivierung. Die N-terminale Aminosäure-Sequenzierung der entstehenden Fragmente ergab, daß der normale Aminoterminus der B-Kette des Faktors XIIa ( $V^{373}$ -V-G-G-) durch jede der untersuchten MMPs entfernt wird. Da dessen Vorhandensein erst die Ausbildung einer spezifischen Salzbrücke unter Aktivierung ermöglicht und somit für die katalytische Aktivität essentiell ist, wurde nach seiner Abspaltung keine Aktivität mehr nachgewiesen. Eine Aktivierung des latenten Hagemann Faktors durch seinen natürlichen Aktivator Kallikrein ist damit ebenfalls nicht mehr möglich.

Zum Nachweis der physiologischen Relevanz der gezeigten Aktivierung von Prothrombin durch MMPs wurden immunhistologische Untersuchungen an Gewebeschnitten von Krebspatienten durchgeführt. Mit Hilfe einer Immun-Doppelfärbung von MT1-MMP und Fibrin konnte eine deutliche Korrelation zwischen der Präsenz der MT1-MMP an der Oberfläche von Tumorzellen und der Ausbildung von Fibrin-Ablagerungen um Tumornester herum gezeigt werden.

Basierend auf der Proteolyse von Fibrinogen durch die MMP-8, die MMP-12, die MMP-13 und MT1-MMP wurde die Gerinnbarkeit von MMP-degradiertem Fibrinogen nach der Methode von Clauss untersucht. Es zeigte sich, daß durch die Abspaltung von Fibrinpolymerisationsstellen eine erhebliche Beeinträchtigung der Gerinnung erfolgt, und zwar bei allen untersuchten MMPs in vergleichbarem Ausmaß.



## 4 Materialien und Geräte

### 4.1 Materialien

#### 4.1.1 Chemikalien

Acrylamid	Roth, Heidelberg
APS	Serva, Heidelberg
BPB	Merck, Darmstadt
BSA	Sigma, München
EDTA	Sigma, München
Glycin	Serva, Heidelberg
Harnstoff	Merck, Darmstadt
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
SDS	Serva, Heidelberg
TEMED	Serva, Heidelberg
Tris	Waldeck, Münster

Bei allen anderen verwendeten Chemikalien handelt es sich um Produkte der Firma Merck (Darmstadt) in p. a. Qualität.

#### 4.1.2 Enzyme

cdMMP-8	Dipl. Chem. A. Henke, Universität Bielefeld
cdMT1-MMP	Dr. M. Roderfeld, Universität Bielefeld
cdMMP-12	Dr. A. Kocourek, Universität Bielefeld
cdMMP-13	Dr. A. Oberpichler, Universität Bielefeld

In der Arbeit wurden ausschließlich die katalytischen Domänen der oben genannten MMPs verwendet. Zur besseren Übersicht wurde im Text nicht zwischen katalytischer Domäne und Gesamtzym differenziert.

#### 4.1.3 Antikörper

Kaninchen-anti-MT1-MMP (polyklonal)	Dr. Q. X. A. Sang, Tallahassee, Florida
Kaninchen-anti-Fibrin (polyklonal)	DAKO GmbH, Hamburg
Maus-Anti- $\alpha$ -Thrombin (monoklonal)	Green Mountain Antibodies, Vermont

Ziege-Anti-Kaninchen IgG (AP-Konjugat)	Sigma, München
Ziege-Anti-Maus IgG (Peroxidase-Konjugat)	Sigma, München
Ziege-Anti-Maus IgG (AP-Konjugat)	Sigma, München

#### 4.1.4 Substrate

$\alpha_1$ -Proteinase-Inhibitor	Sigma, München
Fibrinogen (95 % gerinnbar)	Sigma, München
Hagemann-Faktor	ICN Biochemicals GmbH, Eschwege
Kallikrein	Sigma, München
Prothrombin	ICN Biochemicals GmbH, Eschwege
Thrombin	Sigma, München
DNP-Peptid	Bachem, Heidelberg
S-2238	Hämochrom Diagnostika, Essen

#### 4.1.5 Reagenzien für Gerinnungstests

Thrombin (90 NIH/mL)	Dade <sup>®</sup> , Florida (USA)
Owren's Buffer (pH 7,35)	Dade <sup>®</sup> , Florida (USA)

#### 4.1.6 Standards

HMW-Marker	Amersham Biosciences GmbH, Freiburg
LMW-Marker	Amersham Biosciences GmbH, Freiburg
"Prestained" Marker	Sigma, München

#### 4.1.7 Verbrauchsmaterialien

Blotpapier	Schleicher & Schüll, Dassel
PVDF-Membran	Millipore, Bedford (USA)

#### 4.2 Geräte

Blotapparat	Biometra Fast Blot, Biometra, Göttingen
Elektrophorese-Apparatur	Eigenbau, Universität Bielefeld

---

HPLC-Anlage	Merck Hitachi LaChrome UV-Detektor L-7400 Pumpe L-7100 Fraktionseinheit Marathon
HPLC-Schreiber	Chrom Jet Integrator Spectra Physics Analytical
Imaging System	Biophotonics Bp-MX/ITI7x2 MWG-Biotech, Ebersberg
Kamera	Nikon F-801 Nikon CoolPix 995
Kugelkoagulometer	Amelung Modul 17 KC 10 Kugelkoagulometer CR 10 Rechner und Drucker Amelung GmbH, Lemgo
Netzgerät	LKB 3371 B LKB AG, Bromma (Schweden)
pH-Meter	PHM 62 Standard pH-Meter Radiometer, Kopenhagen
Photometer	Pharmacia UltroSpec 4000 Pharmacia, Freiburg
Proteinsequenzer	modularer Gasphasensequenzer mit PTH-online Identifizierung, Knauer, Berlin
Röntgenfilm Entwicklungsmaschine	Optimax Typ TR, MS Laborgeräte, Wiesloch
Ultraschallbad	Bransonic 221 Branson Ultraschall GmbH, Heusenstamm
Vortex	Vortex Genie Bender & Hobein GmbH, München
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore-Q Filtrationsanlage Millipore, Neu Isenburg
Zentrifuge	Biofuge A Heraeus, Hanau

## 5 Methoden

Sofern nicht anders angegeben, wird als Lösungsmittel bidestilliertes Wasser verwendet.

### 5.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Gelelektrophoresen werden in einer festen, elektrisch neutralen Gelmatrix (meist Polyacrylamid) durchgeführt, die aufgrund ihrer Kapillarstruktur wie ein den Trennprozeß unterstützendes Molekularsieb wirkt. Die Wanderung von Makromolekülen wird daher verlangsamt oder sogar völlig blockiert, während niedermolekulare Substanzen schneller durch die Gelmatrix wandern können.

Im Fall der SDS-PAGE wird die individuelle Proteinladung durch einen Überschuß an Natriumdodecylsulfat (SDS) nahezu völlig maskiert. Das negativ geladene Detergenz lagert sich mit seiner aliphatischen Seitenkette in einem konstanten Gewichtsverhältnis an die hydrophoben Regionen der Proteine an. Die elektrophoretische Beweglichkeit der erhaltenen Polyanionen, die beim Anlegen eines elektrischen Feldes zur Anode wandern, hängt nun allein von der Größe des Moleküls und der Porengröße der dreidimensionalen Gelmatrix ab und ist in erster Näherung eine logarithmische Funktion des Molekulargewichts [108].

#### 5.1.1 Herstellung der PAA-Gele

Die Gelmatrix wird durch die radikalische Polymerisation des monomeren Acrylamids und N,N'-Methylen-Bisacrylamid, einem Quervernetzer, aufgebaut. Die Porengröße ist über einen weiten Bereich variabel und kann über die Acrylamidkonzentration und den Vernetzungsgrad gesteuert werden. Ammoniumpersulfat (APS) dient als Radikalstarter und initiiert die Acrylamidpolymerisation.

Zur Herstellung einer 10 %igen Polyacrylamidmischung werden 6,0 mL Gelpuffer und 3,0 mL einer 30 %igen Acrylamidlösung gemischt und die Polymerisation durch Zugabe von 150 µL einer einer 30 %igen APS-Lösung initiiert.

Acrylamidlösung: 30 % (w/v) Acrylamid  
0,8% (w/v) N,N'-Methylen-Bisacrylamid  
Gelpuffer: 0,5 M Tris/HCl, pH 9,4  
0,4 % (w/v) SDS  
0,23 % (w/v) TEMED

Elektrodenpuffer: 25 mM Tris/Glycin, pH 8,6  
0,1 % (w/v) SDS

Die Polymerisationsmischung wird zwischen die dafür vorbereiteten Glasplatten gegeben und mit einer Schablone für die Probenaschen versehen [109]. Nach dem Aushärten des Gels können die Proben aufgegeben werden [110].

### 5.1.2 Probenvorbereitung und Elektrophorese

15  $\mu\text{L}$  einer flüssigen, proteinhaltigen Probe werden mit 3  $\mu\text{L}$  Lämmli-Puffer versetzt. Jeweils 15  $\mu\text{L}$  der so erhaltenen Probelösung werden in die einzelnen Geltaschen pipettiert.

Zusätzlich zu den Proben wird ein Proteinstandard aufgetragen (10  $\mu\text{L}$  bei vorgesehener „Coomassie-Blue“-Färbung, 1,5  $\mu\text{L}$  bei anschließender Silberfärbung), um die Molekulargewichte der verwendeten Proteine bestimmen zu können. In Tabelle 3 und Tabelle 4 sind die verschiedenen Komponenten der beiden gebräuchlichsten Proteinstandards in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht dargestellt.

<b><math>M_r</math> [kDa]</b>	<b>Protein</b>
94	Phosphorylase B
67	Rinderserumalbumin
43	Ovalbumin
30	Carboanhydrase
20.1	Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor
14.4	$\alpha$ -Lactalbumin

Tabelle 3: LMW-Standard.

Für die Western Blot-Analyse empfiehlt sich die Verwendung eines Markers mit bereits gefärbten Proteinen. Dieser bietet den Vorteil, daß die Blotmembran nicht zerschnitten werden muß und die separate Färbung mit „Coomassie-Blue“ entfällt. Da jedoch die Protein-Farbstoff Konjugate ein anderes Laufverhalten als die nativen Proteine zeigen, müssen zur Zuordnung der Molekulargewichte die scheinbaren, mit einem normalen Marker ermittelten Molekulargewichte der jeweiligen Proteine verwendet werden. Diese finden sich auf der jeweiligen Chargenverpackung.

<b>M<sub>r</sub> [kDa]</b>	<b>Protein (nativ)</b>
180	α <sub>2</sub> -Makroglobulin
116	β-Galaktosidase
84	Fructose-6-Phosphat Kinase
58	Pyruvat-Kinase
48,5	Fumarase
36,5	Laktat-Dehydrogenase
26,6	Triosephosphat-Isomerase

**Tabelle 4:** Komponenten des vorgefärbten Standards MWM-105A. Die angegebenen Massen stellen die tatsächlichen Molekulargewichte dar. Aufgrund eines durch die Färbung bedingten anderen Laufverhaltens sind die scheinbaren Molekulargewichte auf der jeweiligen Chargenpackung vermerkt.

Die Elektrophorese wird durch Anlegen einer konstanten Stromstärke von 35 mA durchgeführt. Sie ist beendet, wenn die Bromphenolblaufront den unteren Gelrand erreicht hat.

Lämmli-Puffer:      25 mM Tris/HCl, pH 6,8  
                             1 % (w/v) SDS  
                             8 M Harnstoff  
                             25 mM NaCl  
                             1 % (v/v) β-Mercaptoethanol  
                             0,5 % (w/v) BPB

### 5.1.3 Nachweis von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

Nach der Elektrophorese ist die Detektion der Proteine im Gel notwendig. Der Nachweis erfolgt entweder *in situ* im Gel mit histochemischen Färbetechniken („Coomassie-Blue“-, Zink- oder Silberfärbung) oder nach Transfer auf eine PVDF-Membran mit Hilfe immunologischer Methoden [109].

Mit Hilfe des Färbereagenzes „Coomassie-Blue“ sind Proteinmengen von 0,3 bis 2,0 µg Protein pro Bande nachweisbar. Die Silber- und die Zinkfärbung sind deutlich empfindlicher (5 bis 30 ng Protein pro Bande) und eignen sich daher zur Analyse von Proteinen, die in hoher Verdünnung vorliegen.

### **Coomassiefärbung**

Das Polyacrylamidgel wird für die Dauer von 30 Minuten in „Coomassie-Blue“-Lösung gegeben und anschließend in Fixierlösung entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich zu erkennen sind.

Coomassie-Blue: 0,1 % „Coomassie-Blue“ in Fixierlösung

### **Zinkfärbung**

Bei der Detektion der aufgetrennten Proteinmischungen mit Hilfe der Imidazol-SDS-Zink-Färbung handelt es sich um ein sogenanntes „reversed staining“ [111]. Hierbei erfolgt eine Ausfällung von Zink-Salzen in der gesamten Gel-Matrix mit Ausnahme der Stellen, an denen sich Protein befindet.

Hierzu wird das Gel nach der SDS-PAGE zunächst für 30 bis 60 Sekunden mit Wasser gespült und anschließend in Imidazol-Lösung für 10 Minuten inkubiert. Nach Verwerfen der Lösung und Spülen mit Zinksulfat-Lösung für 30 bis 40 Sekunden wird der Hintergrund des Gels weiß, so daß die Protein-Banden transparent bleiben und dadurch sichtbar werden.

Imidazol-Lösung 200 mM Imidazol  
0,1 % (w/v) SDS

Zinksulfat-Lösung 200 mM  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

### **Silberfärbung**

Das Polyacrylamidgel wird zunächst 20 Minuten lang in Fixierlösung inkubiert, bevor man es in Bidest mit einer Spatelspitze Farmer's Reducer schüttelt. Nach einer Minute wird das auf diese Weise reduzierte Gel bis zur völligen Entfärbung in bidestilliertem Wasser gewaschen (3 x 10 min) und anschließend 25 Minuten in Silbernitratlösung inkubiert. Nicht komplexierte  $\text{Ag}^+$ -Ionen werden durch Waschen mit bidestilliertem Wasser entfernt. Zur pH-Wert-Änderung wird noch zweimal 30 s mit wäßriger Natriumcarbonatlösung behandelt. Nach Zugabe von 75  $\mu\text{L}$  37 %iger Formaldehydlösung erfolgt die Reduktion der Silberionen. Die Reaktion wird nach dem Entwickeln der Proteinbanden mit 10 %iger Essigsäure abgestoppt. Das Gel kann dann in 10 %iger Essigsäure gelagert werden [112, 113].

Fixierlösung:	Wasser/EtOH/AcOH (5/5/1 v/v/v)
Farmer's Reducer:	100 mM Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ·5 H <sub>2</sub> O 30 mM K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]
Silbernitratlösung:	1,0 % (w/v) AgNO <sub>3</sub>
Natriumcarbonatlösung:	2,5 % (w/v) Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>

#### 5.1.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (DISK-Gel)

Dieses Verfahren zur Probenauffrennung bietet den Vorteil einer schärferen Auflösung. Durch ein diskontinuierliches Gelsystem werden die Probenbestandteile vor der eigentlichen Separierung in einem Gel mit niedrigerer Dichte („Sammelgel“, 5 % Acrylamid) und niedrigerem pH (pH = 6,8) gesammelt [114].

Die entsprechende Trenngellösung (pH = 9,4) wird hergestellt und bis etwa zwei Zentimeter unterhalb des oberen Randes der zusammengesetzten Gelplatten eingefüllt und während der Aushärtungsphase mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Aushärten wird das Isopropanol entfernt. Das Trenngel wird mit der Sammelgellösung überschichtet, und die Schablone für die Probenaschen wird eingesetzt. Nach dem Aushärten erfolgt die unter 5.1.2 und nachfolgend beschriebene Handhabung der Proben bzw. des Gels.

#### 5.2 Elektroblotting

Bei dieser Methode werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf eine spezielle Trägermembran (PVDF-Membran) übertragen, um dort mit Hilfe einer spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion immunologisch nachgewiesen oder durch Edman-Aminosäure-Sequenzierung analysiert zu werden [115].

Zunächst werden die Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt. Danach erfolgt die elektrophoretische Elution im Semi-Dry-Verfahren. Hierzu wird zunächst die PVDF-Membran 5 min in Ethanol, beziehungsweise die Filterpapiere in Blotpuffer, inkubiert und dann ein Sandwich aus Gel, immobilisierender Trägermembran und Filterpapieren zwischen zwei Graphitelektroden angeordnet.

Bei einer Stromstärke von 150 mA werden die Proteine in 45 Minuten auf die Membran übertragen.

Nach Beendigung des Transfers kann die Membran dann entweder einer immunochemischen Färbung unterworfen werden (Western Blot), oder die einzelnen



Banden werden nach „Coomassie-Blue“-Färbung aus der Membran ausgeschnitten und nach dem Edman-Verfahren sequenziert.

Blotpuffer:                    50 mM Borsäure/NaOH, pH 9,0  
                                      20 % (v/v) Ethanol

### **5.3 Western Blot**

Der spezifische Protein-Nachweis per Erkennung durch Antikörper wird unmittelbar nach Abschluß des ElektrobloTTings (siehe 5.2) durchgeführt [116].

Hierzu wird die Membran zunächst mit dem „Primärantikörper“ inkubiert, der das nachzuweisende Protein erkennt. Im Anschluß erfolgt der immunochemische Nachweis. Der hier verwendete Antikörper erkennt zum einen den eingesetzten „Primärantikörper“ und ist zum anderen an ein Enzym für den chemischen Nachweis gekoppelt.

#### **5.3.1 NBT/BCIP-Färbung**

Die Detektion wird mittels enzymkatalysierter Farbreaktion zwischen 5-Brom-4-chlor-3-indoyl-phosphat (BCIP) und Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) durchgeführt.

Zur Absättigung der Membran wird 30 Minuten bei RT mit 40 mL Blockierlösung inkubiert. Anschließend werden 10 µL der Antikörperlösung zugegeben und zwei Stunden inkubiert. Nichtgebundener Antikörper wird durch dreimaliges Waschen mit je 40 mL TBST-Puffer entfernt. Dann wird die PVDF-Membran eine Stunde mit 40 mL Blockierlösung inkubiert, der 2 µL „Sekundärantikörper“-Alkalische Phosphatase-Konjugat zugesetzt wurden. Anschließend wird dreimal mit je 40 mL AP-Puffer gewaschen. Für die enzymatische Nachweisreaktion wird die BCIP/NBT-Färbelösung zugegeben und die Farbe unter Lichtausschluß bis zur gewünschten Intensität entwickelt. Die Membran wird abschließend kurz mit bidestilliertem Wasser abgespült und auf Filterpapier getrocknet. Danach kann die Membran unter Lichtausschluß aufbewahrt werden.

TBST-Puffer:                20 mM Tris/HCl, pH 7,5  
                                      500mM NaCl  
                                      5 % (w/v) Tween 20

Blockierlösung:	2 % (w/v) BSA in TBST-Puffer
AP-Puffer:	100 mM Tris/HCl, pH 9,5 100 mM NaCl 0,1 % (w/v) MgCl <sub>2</sub>
NBT-Lösung:	5 % (w/v) in 70 % (v/v) DMF
BCIP-Lösung:	2,5 % (w/v) in DMF
Färbelösung:	100 µL NBT-Lösung 100 µL BCIP-Lösung in 40 mL AP-Puffer

### 5.3.2 ECL-Färbung

Nachdem die Proteine mittels ElektrobloTTing auf die Membran transferiert wurden, erfolgt die Inkubation der Membran in Blockierlösung für 2 h bei RT. Im Anschluß an eine Verdünnung um den Faktor 1000 in PBST-Puffer (1:1000) kann der „Primärantikörper“ direkt zugegeben werden. Nach einstündiger Inkubation wird drei mal mit PBST-Puffer gewaschen (4, 5 und 6 min.). Dann wird 2 h bei RT mit „Sekundärantikörper“ (Peroxidase-konjugiert) inkubiert und im Anschluß 5 mal (6, 8, 10, 12 und 14 min.) mit PBST-Puffer gewaschen. Zur enzymatischen Detektion wird zunächst 90 s mit ECL-Lösung im Dunkeln inkubiert und die Membran nach Abstreifen der Lösung in einer Belichtungskassette fixiert. Nach der Belichtung des Films folgt die maschinelle Entwicklung und die Übertragung der Markerbanden auf den Film mit Hilfe eines Faserschreibers.

Blot-Puffer:	25 mM Tris / Glycin, pH 9,3 0,0375 % (w/v) SDS 0,01 % (w/v) NaN <sub>3</sub> 20 % (v/v) MeOH
PBST-Puffer:	75 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O, pH 7,0 150 mM NaCl 0,02 % (w/v) KCl 0,02 % (w/v) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1 % (w/v) Tween 20
Blockierlösung:	20 g/L BSA in PBST-Puffer
ECL-Lösung:	Amersham Biosciences 2-Komponenten ECL System

#### 5.4 Automatisierte Aminosäure-Sequenzierung nach Edman

Bei dieser Methode handelt es sich um ein automatisiertes Verfahren zur Ermittlung von aminoterminalen Sequenzen in Proteinen. Im Sequenziergerät erfolgt ein schrittweiser Abbau der Aminosäurekette vom N-Terminus her [117, 118]. Anschließend erfolgt eine Abtrennung des Restes durch RP-HPLC und Identifizierung durch photometrische Untersuchung des Eluates. Mit dem Verfahren können abhängig von Probenmenge und -reinheit Teilsequenzen von bis zu 50 Aminosäureresten bestimmt werden.

Die Numerierung der Aminosäuren erfolgt gemäß der SWISS-PROT Datenbank.

#### 5.5 Blockierung von Disulfidbrücken

Zur Reduktion der Cysteine wird die entsprechende Probe zunächst mit Tris-Puffer 1:1 verdünnt und dann für eine Stunde mit Dithioerythrol (DTE) bei Raumtemperatur inkubiert (1:20). Anschließend versetzt man mit Jodacetamid (1:20), um die reduzierten Cysteine durch Inkubation bei Raumtemperatur innerhalb von einer Stunde zu acetylieren. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm können die Proben direkt auf die HPLC aufgegeben werden [119, 120].

Tris-Puffer:	2 M Tris
DTE-Lösung:	10 % (w/v) DTE
Jodacetamid-Lösung:	6 % (w/v) Jodacetamid

#### 5.6 HPLC

Der Begriff „HPLC“ als Abkürzung für „high pressure liquid chromatography“ wurde in den ersten Jahren dieser Methode geprägt, um auf die hohen angelegten Drücke zu verweisen, die von anderen Flüssigkeits-Chromatographien nicht bekannt waren. Inzwischen bezeichnet die Abkürzung „HPLC“ jedoch den Ausdruck „high performance liquid chromatography“, um der hohen Trennleistung dieser Flüssigkeits-Chromatographie Rechnung zu tragen [121]. Die überlegene Effizienz gegenüber anderen Flüssigkeits-Chromatographiearten ergibt sich durch die engen Querschnitte der Apparatur und die außerordentlich kleinen Partikel des Säulenmaterials. Bei der HPLC kommen alle Kombinationen von mobiler und stationärer Phase in Frage, die von anderen Chromatographien mit flüssiger mobiler

Phase bereits bekannt sind, so gibt es auch hier Ionenaustausch-Chromatographie, Gelfiltration, usw. Eine besondere Bedeutung kommt dabei der „reversed-phase“-Methode zu, die in ihrer Effizienz unübertroffen ist und kein Gegenstück bei den klassischen Chromatographien besitzt.

### 5.6.1 „reversed-phase“-HPLC (RP-HPLC)

Diese chromatographische Methode ist in der Lage, Proteine und deren Fragmente mit außerordentlich hoher Effizienz aufzutrennen. Die Auftrennung erfolgt hierbei durch Phasen, die in ihrer Polarität vertauscht sind („reversed phase“). Das heißt, daß die stationäre Phase einen unpolaren Charakter besitzt, die mobile dagegen einen polaren [122]. Als Säule kamen eine WP-RP-C<sub>18</sub>-, eine WP-RP-C<sub>8</sub>- und eine Phenomenex *aqua*-RP-C<sub>18</sub>-Säule zum Einsatz.

Das Probengemisch wird im wäßrigen (polaren) Puffer A auf die Säule injiziert und zunächst an die stationäre (unpolare) Phase gebunden. Durch fortwährendes Zumischen von Puffer B wird der Charakter der mobilen Phase zunehmend unpolarer, so daß die einzelnen Probenbestandteile in Abhängigkeit von ihrer Polarität nacheinander von der Säule eluieren (Gradientenelution). Da die Elutionsrate der einzelnen Komponenten von ihrer Hydrophobizität abhängt, müssen die Elutionsbedingungen (Gradient, Dauer) bei jeder Anwendung optimiert werden. Die Fraktionierung der jeweiligen Peptidfragmente erfolgt automatisch.

Puffer A: 0,1 % (v/v) TFA in tridestilliertem Wasser

Puffer B: 0,1 % (v/v) TFA

80 % CH<sub>3</sub>CN (v/v) in tridestilliertem Wasser

Gradient:

Zeit [min]	% B
0,0	0
5,0	0
55,0	100
60,0	100
65,0	0

Zur Überprüfung der Auftrennung werden die Fraktionen im SDS-Polyacrylamidgel analysiert (Silberfärbung, siehe 5.1.3).

### 5.6.2 Ionenaustausch-HPLC

Bei dieser Anwendung kam die Sulfopropyl-Gruppe als starker Kationenaustauscher zum Einsatz, immobilisiert auf einer TSK-Gel-Matrix. Nach Aufbringen der Probe in einem sauren Phosphat-Puffer (Puffer A) wird in einer Gradientenelution mittels pH-Wert-Erhöhung bei gleichzeitiger Erhöhung der Salzkonzentration (Zugabe von Puffer B) eine schrittweise Ablösung der einzelnen Komponenten von der Säule erreicht.

Puffer A: 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 1 \text{ H}_2\text{O}$   
pH 3,0

Puffer B: 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ ,  
250 mM NaCl  
pH 8,8

Gradient:

Zeit [min]	% B
0,0	0
5,0	0
25,0	15
30,0	15
30,1	100
37,0	100
38,0	0

### 5.7 Renaturierung von prozessiertem und aufgereinigtem Prothrombin

Nach Aufreinigung der Proteinprobe über RP-HPLC wird zunächst das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in einem schwach sauren Phosphat-Puffer wieder aufgenommen. Nach 30- bis 60-minütiger Inkubation bei RT steht das native Protein zur Verfügung.

Phosphat-Puffer:        70 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,  
                              30 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·1 H<sub>2</sub>O,  
                              150 mM NaCl,  
                              0,05 % (w/v) NaN<sub>3</sub>  
                              pH 6,3

### 5.8 Reaktionsansätze zur Spaltung von potentiellen Substraten der MMPs

Die jeweiligen Proben werden in einem Tris-Puffer mit Hilfe eines Wasserbades bei 37 °C inkubiert. Soweit nicht anders angegeben, erfolgt der Abbruch der Proteolyse-reaktion durch Zugabe eines EDTA/Lämmli-Puffergemisches (1:1).

Tris-Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7,5  
              100 mM NaCl  
              5 mM CaCl<sub>2</sub>  
              0,001 % (w/v) ZnCl<sub>2</sub>

EDTA/Lämmli-Puffer: 2 Teile Lämmli-Puffer (siehe 5.1.2)  
                              1 Teil EDTA-Lösung, (200 mM)

Das Ergebnis der Spaltreaktion wird im SDS-Gel oder durch Elektroblo-tting überprüft (siehe 5.1).

Die Identifizierung von Degradationsprodukten erfolgt durch automatisierten Edman-Abbau (siehe 5.4).

Entstandene Fragmente werden durch RP-HPLC (siehe 5.5) getrennt.

### 5.9 Bestimmung der MMP-Aktivität durch den DNP-Peptid-Test

Bei dem DNP-Peptid handelt es sich um ein synthetisches Oktapeptid, das am N-Terminus einen Dinitrophenylrest besitzt: DNP-P-Q-G-I-A-G-Q-<sup>D</sup>R-COOH. Infolge der durch Matrixine katalysierten Spaltung der G-I Bindung wird ein Tripeptid generiert, das aufgrund seines unpolaren Charakters mit organischen Lösungsmitteln extrahiert werden kann. Aus der photometrisch bei 366 nm ermittelten Menge des extrahierten Tripeptids kann auf die Enzymaktivität rückgeschlossen werden [123].

Hierzu wird ein entsprechendes Volumen an Enzymlösung mit Tris-Puffer auf 100  $\mu\text{L}$  aufgefüllt und mit 100  $\mu\text{L}$  DNP-Peptidlösung bei 37 °C für 30 min inkubiert und dann mit 500  $\mu\text{L}$  1 N HCl abgestoppt. Der Ansatz wird anschließend mit 1,6 mL Ethylacetat/n-Butanol extrahiert und für zwei Minuten bei 1800 g zentrifugiert.

DNP-Peptid-Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7,5

150 mM NaCl

5 mM  $\text{CaCl}_2$

0,02 % (w/v) BSA

0,02 % (w/v)  $\text{NaN}_3$

DNP-Peptid-Substrat: 0,5 mM in DNP-Peptid-Puffer

Extraktionsmittel: 1 Teil Ethylacetat

0,15 Teile n-Butanol

### **5.10 Bestimmung der Thrombin-Aktivität durch das chromogene Substrat S-2238**

Zu 40  $\mu\text{L}$  eines Reaktionsansatzes nach Abschnitt 5.8 werden 240  $\mu\text{L}$  einer S-2238 Lösung (250  $\mu\text{M}$ ) in Tris-Puffer gegeben [21]. Die Umwandlung des Substrats kann durch Messung der Extinktionsänderung bei 405 nm verfolgt werden.

Tris-Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 8

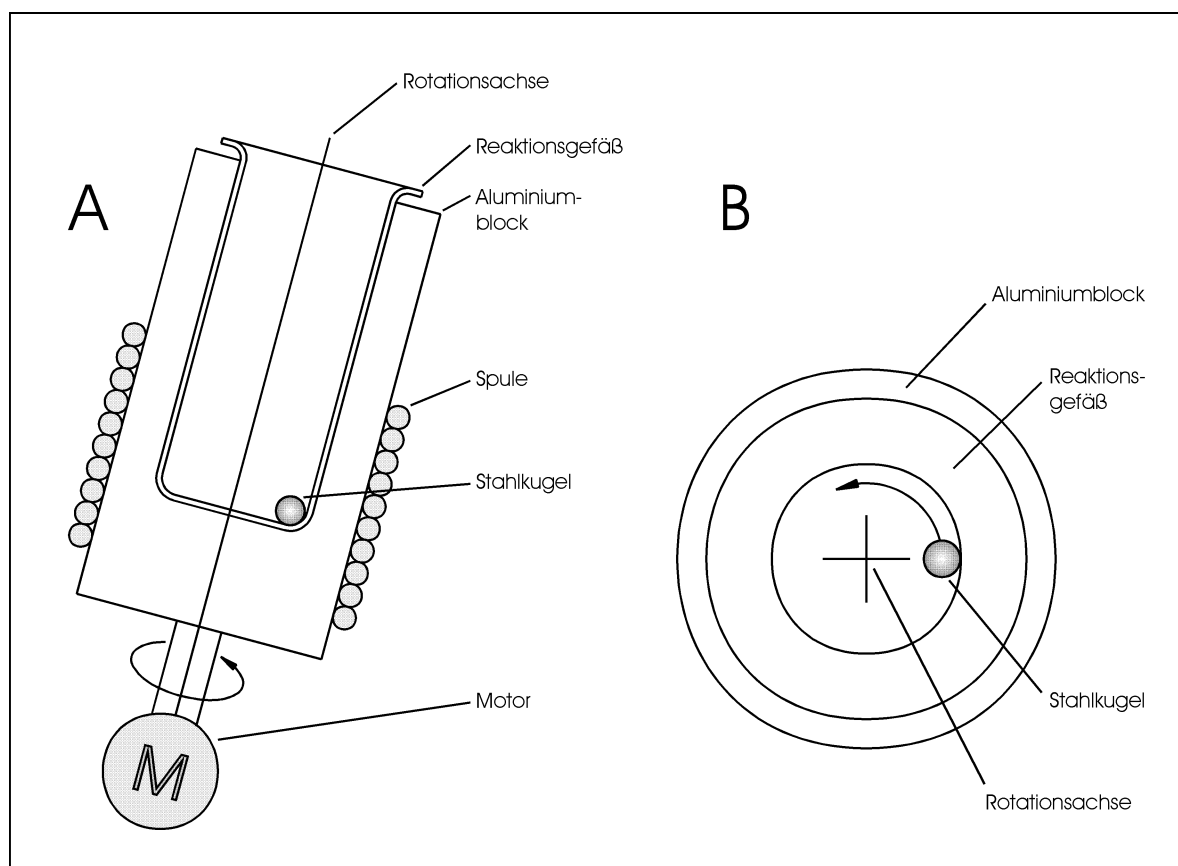
150 mM NaCl

20 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$

### **5.11 Funktionelle Fibrinogen-Bestimmung nach Clauss**

Die zu untersuchende Fibrinogen-Probe wird durch einen großen Überschuss an Thrombin zur Gerinnung gebracht. 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 [124]. Die Berechnung des Fibrinogengehaltes erfolgt auf Basis einer zuvor erstellten Eichkurve. Alle Ergebnisse werden durch Doppelbestimmung ermittelt.

Der prinzipielle Aufbau einer Meßeinheit des verwendeten Kugelkoagulometers ist in Abbildung 15 dargestellt.



**Abbildung 15: Prinzipieller Aufbau einer Meßeinheit des Kugelkoagulometers.**

- A: Querschnitt durch die Meßeinheit
- B: Blick entlang der Rotationsachse

Zur Durchführung eines Gerinnungstests werden 200  $\mu\text{L}$  der Probenlösung (Verdünnung 1:9 mit Owren's Buffer) in das rotierende Reaktionsgefäß des Kugelkoagulometers pipettiert und dort für 3 Minuten bei 37 °C vorinkubiert. Durch anschließende Zugabe von 200  $\mu\text{L}$  Thrombinlösung (90 NIH-Units/mL) wird die Gerinnung initiiert. Beim Einsetzen der Gerinnung wird eine sich im Reaktionsgefäß befindliche Stahlkugel vom entstehenden Thrombus fixiert. Um das rotierende Reaktionsgefäß ist eine stromdurchflossene Spule angeordnet. Aufgrund der Lageänderung der Stahlkugel wird eine magnetische Induktion in der Spule meßbar und dadurch der Zeitpunkt der Gerinnung bestimmt.



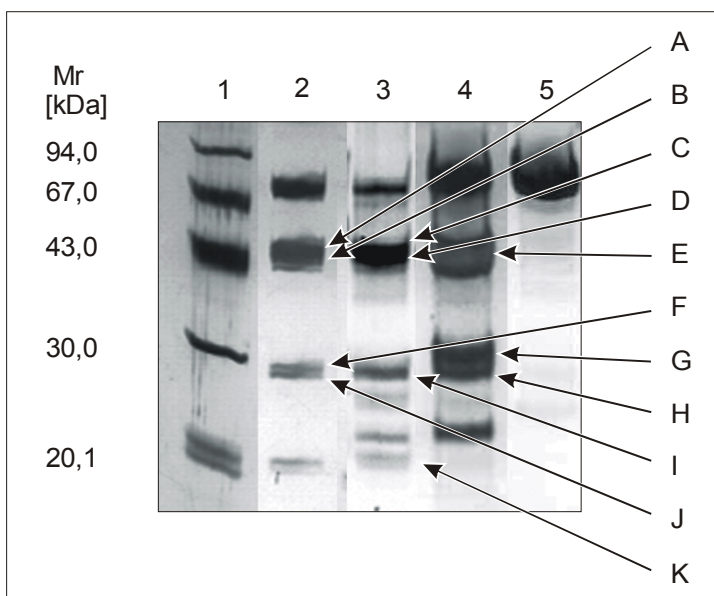
## 6 Ergebnisse

### 6.1 Spaltung von Blutplasmae Proteinen durch Matrix Metalloproteinasen

In der letzten Zeit sind einige Plasmaproteine als nicht-klassische Substrate der MMPs beschrieben worden [98-100, 125]. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Spaltungen von verschiedenen Proteinen aus dem Blutplasma näher charakterisiert werden.

#### 6.1.1 Spaltung von Faktor XII (Hagemann-Faktor)

Bei der Kontaktaktivierung wird der Hagemann-Faktor durch seinen natürlichen Aktivator, das Kallikrein, an bis zu drei Stellen proteolytisch gespalten (siehe 2.7). Zur Überprüfung, ob es sich beim Faktor XII der Blutgerinnungskaskade um ein Substrat für die zur Verfügung stehenden Matrixine handelt, wurden jeweils 0,21 nmol Faktor XII mit einer entsprechenden Menge an Enzym (siehe Legende Abbildung 16) für die Dauer von 90 Minuten bei 37 °C inkubiert (Enzym/Substrat-Verhältnis 1:20). Nach Beendigung der Spaltungsreaktionen durch Zugabe von EDTA/Lämmli-Puffer wurden die Proben mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und die einzelnen Proteinfragmente durch Silberfärbung sichtbar gemacht.



**Abbildung 16: SDS-PAGE-Gel zur Spaltung von Faktor XII.**

Bahn 1: LMW-Proteinstandard

Bahn 2: Reaktionsansatz Faktor XII mit 0,23 µg cdMMP-12 nach 2h bei 37 °C

Bahn 3: Reaktionsansatz Faktor XII mit 0,21 µg cdMMP-13 nach 2h bei 37 °C

Bahn 4: Reaktionsansatz Faktor XII mit 0,22 µg cdMT1-MMP nach 2h bei 37 °C

Bahn 5: Faktor XII, unprozessiert, nach 2 h Inkubation bei 37 °C

Die Analyse der mit Buchstaben gekennzeichneten Banden ist in Tabelle 5 gezeigt.

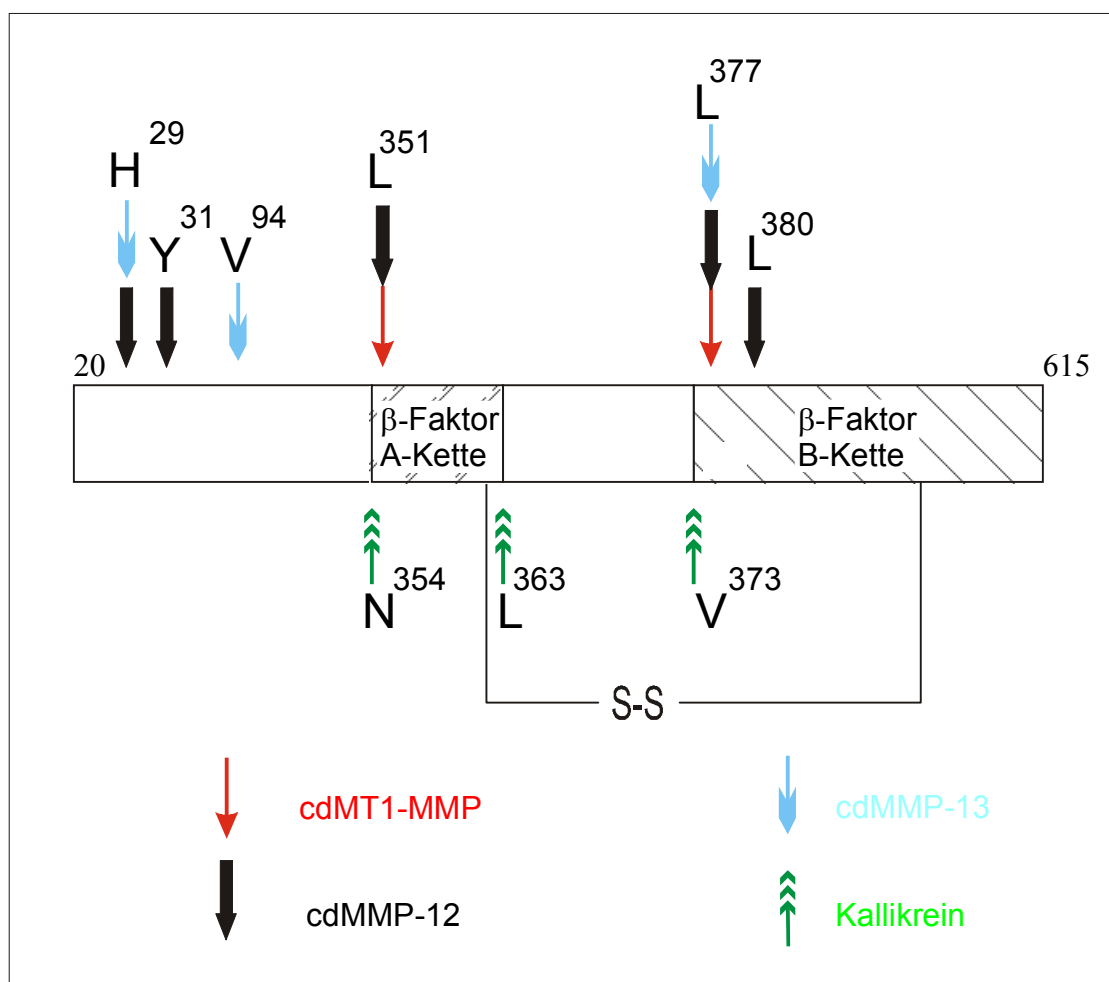
Das Gel in Abbildung 16 zeigt den Abbau von Faktor XII durch die katalytischen Domänen der MMP-12, der MMP-13 und der MT1-MMP. Dabei werden in allen drei Fällen Bruchstücke mit einer Größe von 45 kDa generiert. Darüber hinaus fallen bei allen Matrixinen unterschiedliche Bruchstücke im Bereich von 20 bis 33 kDa an. Ferner wird mit Hilfe der Kontrollen einwandfrei dargestellt, daß während einer 90-minütigen Inkubation des Substrates keine Autoprocessing erfolgt, und die Degradation von Faktor XII daher nur durch die proteolytische Aktivität der entsprechenden MMP erfolgt. Im Falle der MT1-MMP induzierten Degradation konnte der N-Terminus der 30 kDa Bande (H, Abbildung 16) als L<sup>377</sup>-V-A-L-R-G- identifiziert werden, die 33 kDa Bande (G) besitzt die aminoternale Sequenz L<sup>351</sup>-T-R-N-G-P-.

BANDE	MASSE [kDa]	ERMITTELTEN N-TERMINUS	SPALTUNG DURCH
A	45	H <sup>29</sup> -K-Y-K-A-E-E-H-T-	MMP-12
B	44	Y <sup>31</sup> -K-A-E-E-H-T-V-	MMP-12
C	45	H <sup>29</sup> -K-Y-K-A-E-E-H-T-	MMP-13
D	43	V <sup>94</sup> -K-D-H-C-S-K-	MMP-13
E	45	-	MT1-MMP
F	30	L <sup>351</sup> -T-R-N-G-P-L-	MMP-12
G	33	L <sup>351</sup> -T-R-N-G-P-L-	MT1-MMP
H	30	L <sup>377</sup> -V-A-L-R-G-	MT1-MMP
I	30	L <sup>377</sup> -V-A-L-R-G-	MMP-13
J	30	L <sup>377</sup> -V-A-L-R-G-	MMP-12
K	20	L <sup>380</sup> -R-G-A-H-P-Y-	MMP-13

Tabelle 5: Auflistung der bei der MMP-induzierten Degradation des Hagemann Faktors entstehenden Fragmente.

Eine Spaltung des Hagemann Faktors durch die MMP-12 und MMP-13 konnte darüber hinaus in Zusammenarbeit mit Kocourek und Oberpichler gezeigt werden

[126-128]. Bei der MMP-12 induzierten Spaltung konnten der 45 kDa großen Bande (A) der N-Terminus H<sup>29</sup>-K-Y-K-A-E-E-H-T- und der 44 kDa Bande (B) Y<sup>31</sup>-K-A-E-E-H-T-V zugeordnet werden. Zusätzlich konnten die Anfangssequenzen der 30 kDa Banden „E“ und „J“ (L<sup>351</sup>-T-R-N-G-P-L- und L<sup>377</sup>-V-A-L-R-G-), sowie der 20 kDa Bande „K“ (L<sup>380</sup>-R-G-A-H-P-Y-) identifiziert werden. Eine Sequenzanalyse der durch die MMP-13 generierten Fragmente des Faktor XII ergab ebenfalls den Rest L<sup>377</sup> als N-Terminus des 30 kDa großen Fragments (I). Ferner konnten die Spaltstellen E<sup>28</sup>-H<sup>29</sup> (C) und K<sup>93</sup>-V<sup>94</sup> (D) für die MMP-13 identifiziert werden. Aus den sich ergebenden Spaltungsmustern der Prozessierungen von Faktor XII (Abbildung 17) und Prothrombin (Abbildung 21, Seite 65) durch die MT1-MMP und die MMP-12 lässt sich eine bevorzugte Spaltung vor Leucin- bzw. Isoleucin-Resten erkennen.



**Abbildung 17: Vergleich der Faktor XII Spaltstellen.**

Dargestellt ist die Ähnlichkeit der durch durch Kallikrein bzw. durch die bezeichneten MMPs hervorgerufenen Degradation von Faktor XII. Die Spaltung von Faktor XII durch Kallikrein führt zur Aktivierung des Hagemann Faktors, wohingegen der Abbau durch MMPs zu einem Verlust des katalytischen Potentials führt.

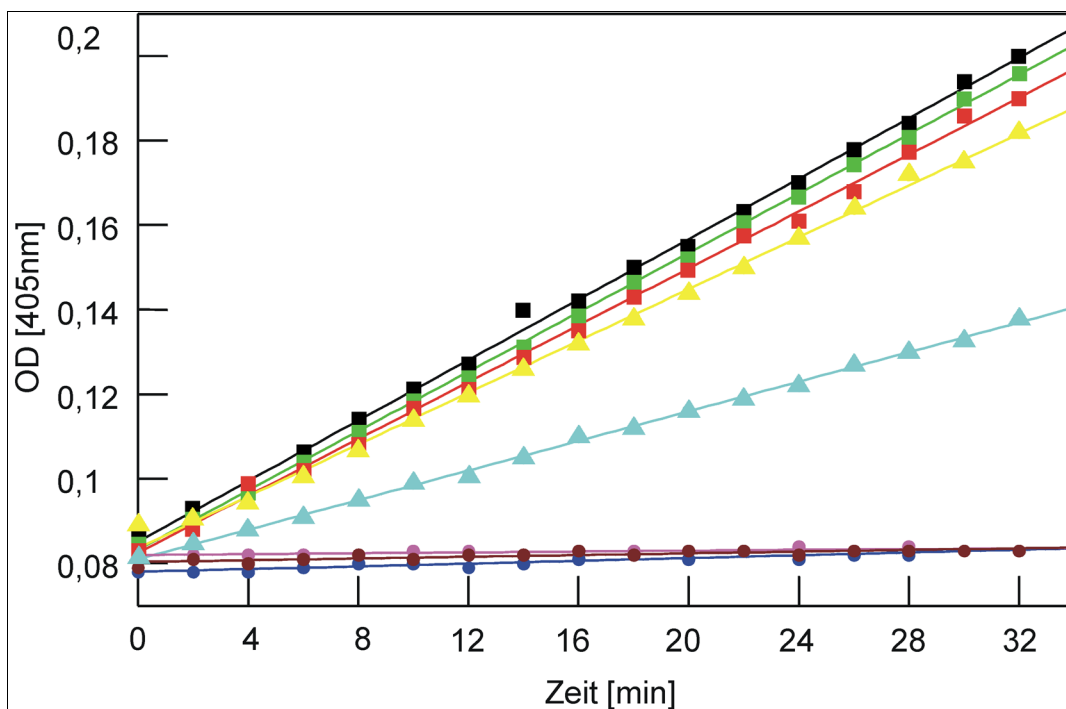
Ein Vergleich der durch die verschiedenen Proteasen erzeugten Spaltstellen ergab, daß eine große Ähnlichkeit im Bereich der N-Termini von leichter und schwerer Kette besteht. Speziell die durch alle drei MMPs hervorgerufene Spaltstelle vor L<sup>377</sup>, die nur vier Aminosäure-Reste nach der nativen, durch das Kallikrein erzeugten Spaltstelle liegt, ließ eine mögliche Aktivierung des Hagemann Faktors durch diese MMPs vermuten. Aufgrund dieser Beobachtung wurden die verschiedenen Reaktionsansätze einem Aktivitätstest unterzogen.

Hierzu wurde das chromogene Substrat S-2302 eingesetzt, welches in diesem Test spezifisch nur durch den aktiven Hagemann Faktor gespalten werden kann. Durch die Spaltung wird p-Nitroanilin freigesetzt, welches photometrisch bei 405 nm nachweisbar ist. Zur Messung der Aktivität wurden zunächst 50 µL Faktor XII-Lösung (285 nmol) und 5 µL MMP-Lösung (40 nmol) vermischt und die Reaktion nach einer Inkubationsdauer von 45 bzw. 90 Minuten durch Zugabe von 1 µL Batimastat-Lösung (2 mmol) abgestopt. Nach fünfminütiger Inkubationsdauer wurden 50 µL eines jeden Ansatzes mit 100 µL S-2302-Lösung (2 mM) vermischt und im ELISA-Reader analysiert. Die Extinktionsmessungen wurden im 2-Minuten Takt als Doppelbestimmung bei 405 nm (Referenz: 490 nm) durchgeführt (Abbildung 18).

Neben den eigentlichen Test-Ansätzen mit jeweiliger MMP, Hagemann Faktor und chromogenem Substrat in Test-Puffer (Vorinkubation von Faktor XII mit MMP über 45 (▲) und 90 (▲) Minuten bei 37 °C) wurden entsprechende Kontrollansätze hergestellt, um falsch positive Ergebnisse ausschließen zu können. Diese beinhalteten zeitabhängige Extinktionsmessungen der Substratlösung mit Assay Puffer allein (●), mit Batimastat (●) und dem entsprechenden Matrixin (●). Darüber hinaus wurde die Probe des Hagemann Faktors selbst nach 0 (■), 45 (■) und 90 (■) Minuten Inkubation bei 37 °C auf eine mögliche Aktivität gegen das synthetische Substrat getestet.

Wie aus Abbildung 18 klar zu erkennen ist, weist bereits die eingesetzte Lösung des Hagemann Faktors selbst eine geringe Aktivität gegenüber dem chromogenen Substrat auf, d. h. die Lösung enthielt bereits geringe Mengen an aktivem Faktor XII. Vorversuche haben gezeigt, daß der verwendete Hagemann-Faktor durch seinen *in vivo* Aktivator, das Kallikrein, aktiviert werden konnte.

Die schon vorher in der Lösung vorhandene Aktivität bleibt über die Gesamtdauer des Tests konstant und ist unabhängig von einer vorhergehenden Inkubation der Faktor XII Lösung bei 37 °C. Wird mit einer der betrachteten MMPs vorinkubiert, so fällt die meßbare Aktivität gegenüber S-2302 deutlich geringer aus, und zwar in direkter Abhängigkeit von der Dauer der Vorinkubation mit der MMP.



**Abbildung 18: Aktivitätstest zur Ermittlung einer potentiellen Aktivierung des Hagemann Faktors durch MMPs.**

Alle Punkte wurden durch Doppelbestimmung ermittelt.

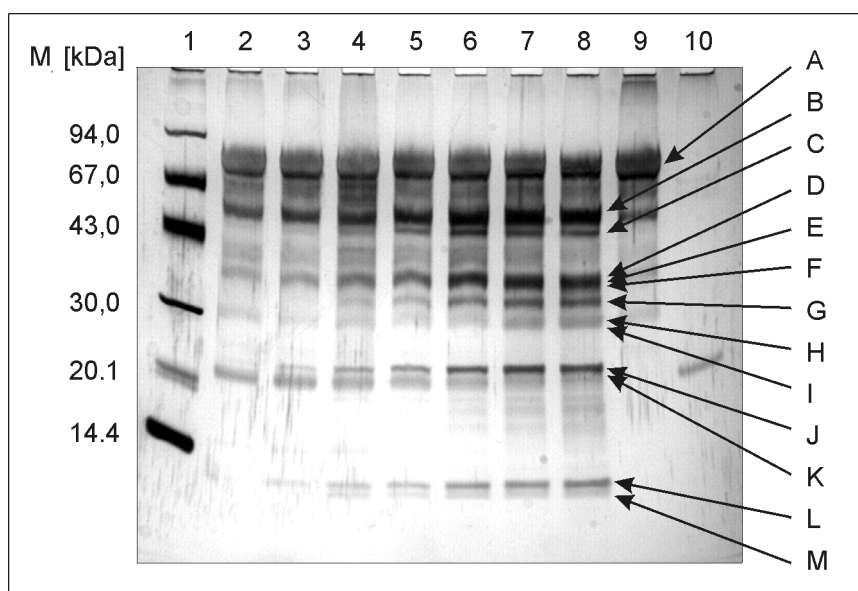
Legende: Aktivität des Faktor XII nach Inkubation mit MMPs für 45 (▲) und 90 (△) Minuten bei 37 °C. Kontrollen: Faktor XII nach 0 (■), 45 (■) und 90 (■) Minuten Inkubation bei 37 °C; Test-Puffer (●); Batimastat (●) und MMP (●)

Die Messungen ergaben eindeutig, daß eine Aktivierung des Faktor XII durch die hier untersuchten MMPs nicht möglich ist, vielmehr wird aktiver Faktor XIIa durch diese MMPs inaktiviert. Weiterführende Untersuchungen haben gezeigt, daß die durch MMPs gespaltene latente Form des Hagemann-Faktors nicht mehr durch seinen natürlichen Aktivator, das Kallikrein, aktiviert werden kann.

### 6.1.2 Spaltung von Faktor II (Prothrombin) durch die MT1-MMP

Im Rahmen dieser Arbeit konnte das Prothrombin als Substrat der MT1-MMP identifiziert werden. Zur Darstellung der Prozessierung des Prothrombins durch die katalytische Domäne der MT1-MMP wurde ein Reaktionsansatz von 1,5 nmol Prothrombin und 0,24 nmol cdMT1-MMP bei 37 °C inkubiert (Enzym/Substrat-Verhältnis 1:7). Nach dem Beenden der Proteolyse-reaktion durch Zugabe von

EDTA/Lämmli-Puffer zu den entnommenen Proben wurden die Fragmente mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Wie in Abbildung 19 gezeigt, ist schon bei der ersten Probenentnahme nach zwei Minuten eine Bande mit einer Größe von etwa 50 kDa deutlich sichtbar. Im Verlauf der Inkubation entwickeln sich weitere Banden bei 10, 11, 22, 32, 34, 36 und 45 kDa.



**Abbildung 19: PAA-Gel des zeitabhängigen Abbaus von Prothrombin durch die cdMT1-MMP.**

Bahn 1: LMW-Proteinstandard

Bahn 2-8: Reaktionsansatz nach 2, 4, 8, 15, 30, 60 und 120 min Inkubation bei 37 °C

Bahn 9: Prothrombin nach 120 min bei 37 °C (Kontrolle)

Bahn 10: cdMT1-MMP nach 120 min Inkubation bei 37 °C (Kontrolle)

Durch N-terminale Sequenzierung nach Edman wurden die verschiedenen Fragmente des Prothrombin-Abbaus identifiziert. Die Ergebnisse der Sequenz-Analysen sind in Tabelle 6 zusammengestellt. Aus der Analyse der generierten Banden ließ sich keine bevorzugte Reihenfolge der Spaltungen erkennen.

Für die Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von 70 (Abbildung 19, Bande A), 45 (C) und 32 kDa (I) wurde der bekannte Aminoterminus des Prothrombins identifiziert. Die 70 kDa Bande entspricht dabei dem unprozessierten Prothrombin. Die Banden bei 32 und 45 kDa zeigen Fragmente an, die durch Abspaltung eines C-terminalen Bruchstückes vom Prothrombin entstanden sind. Die Sequenz S<sup>199</sup>-E-G-S-S-V-N-L- konnte bei insgesamt vier verschiedenen Banden (B, D, H, K) ermittelt werden. Die kleineren könnten somit durch sukzessive Abspaltung C-terminaler Fragmente von dem 50 kDa großen Bruchstück (B) entstehen.

BANDE	MASSE [kDa]	ERMITTELT N-TERMINUS	ORT DER SPALTUNG
A	70	A <sup>44</sup> -N-T-F-L-E-E-V-R-	(N-Terminus Faktor II)
B	50	S <sup>199</sup> -E-G-S-S-V-N-L-	Aktivierungspeptid, „Thrombin-Spaltstelle“
C	45	A <sup>44</sup> -N-T-F-L-E-E-V-R-	(N-Terminus Faktor II)
D	36	S <sup>199</sup> -E-G-S-S-V-N-L-	Aktivierungspeptid, „Thrombin-Spaltstelle“
E	36	G <sup>313</sup> -R-T-A-T-S-E-Y-	Aktivierungspeptid (Fragment 2)
F	36	T <sup>315</sup> -A-T-S-E-Y-Q-T	„Prothrombinase-Spaltstelle“
G	34	T <sup>328</sup> -F-G-S-G-E-A-D-	„Thrombin-Spaltstelle“
H	32	S <sup>199</sup> -E-G-S-S-V-N-L-	Aktivierungspeptid, „Thrombin-Spaltstelle“
I	32	A <sup>44</sup> -N-T-F-L-E-E-V-R-	(N-Terminus Faktor II)
J	22	I <sup>438</sup> -E-K-I-S-M-L-E-	B-Kette
K	22	S <sup>199</sup> -E-G-S-S-V-	Aktivierungspeptid, „Thrombin-Spaltstelle“
L	11	N <sup>514</sup> -V-G-K-G-Q-P-S-V-L-	B-Kette, „Autolyseschleife“ [142]
M	10	I <sup>530</sup> -V-E-R-P-V-C-K-	B-Kette

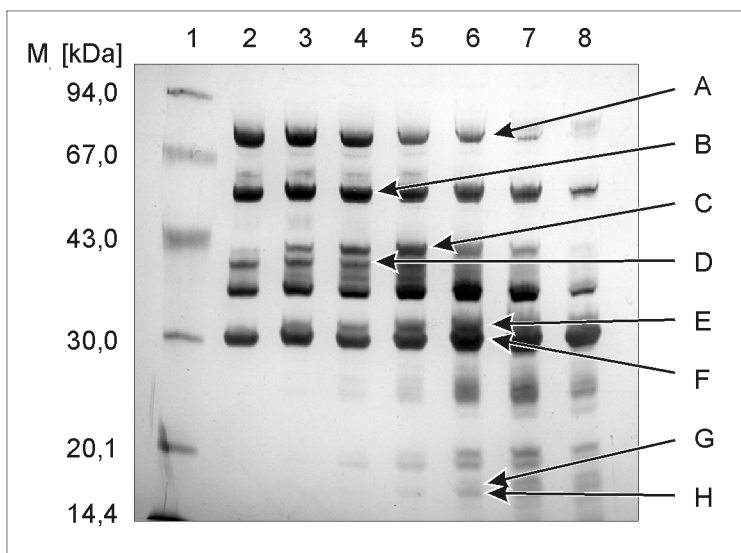
Tabelle 6: Die ermittelten aminoterminalen Sequenzen der Fragmente des Prothrombin-Abbaus durch MT1-MMP.

Die Sequenz T<sup>328</sup>-F-G-S- (G) ist bereits von der Aktivierung des Prothrombins *in vivo* bekannt, dort kann durch das generierte  $\alpha$ -Thrombin eine Spaltung an genau dieser Stelle hervorgerufen werden. Ebenso ist die Sequenz T<sup>315</sup>-A-T-S-E-Y- (E) schon bei der *in vivo* Aktivierung von Faktor II durch den Prothrombinase-Komplex beschrieben worden. Dort wird sie spezifisch durch Faktor Xa beziehungsweise durch den Prothrombinase-Komplex generiert. Die Analyse der 36 kDa Bande ergab ferner die Sequenz G<sup>313</sup>-R-T-A-T-S-E-Y (E), eine um zwei Aminosäurereste längere Kette als

die spezifisch durch Faktor Xa erzeugte. Im Bereich von 10 (M) bzw. 11 kDa (L) konnten zwei Sequenzen ermittelt werden, die eine Degradation im Bereich der B-Kette des  $\alpha$ -Thrombins anzeigen, eine dieser Spaltstellen liegt direkt in der sogenannten Autolyseschleife, die andere in unmittelbarer Nachbarschaft dazu. Auch die Sequenzierung der 22 kDa großen Bande ( $I^{438}$ -E-K-I-S-M-L-E-, K) weist auf eine Proteolyse innerhalb der B-Kette des Moleküls hin.

### 6.1.3 Spaltung von Faktor II (Prothrombin) durch die MMP-12

Es konnte gezeigt werden, daß neben der MT1-MMP auch die MMP-12 in der Lage ist, das Prothrombin durch Prozessierung zu aktivieren (siehe 6.2, Seite 67). Zum Nachweis einer möglichen Prozessierung wurde zunächst ein Reaktionsansatz aus 1,5 nmol Prothrombin und 0,14 nmol MMP-12 hergestellt (Enzym/Substrat-Verhältnis 1:11), aus dem zu bestimmten Zeitpunkten Proben entnommen und durch EDTA/Lämmli-Puffer die Reaktionen abgestoppt wurden. Anschließend konnte die MMP-12 induzierte Prothrombin-Fragmentierung im PAA-Gel durch Silberfärbung analysiert werden (siehe Abbildung 20).



**Abbildung 20: PAA-Gel des zeitabhängigen Abbaus von Prothrombin durch die MMP-12.**

Bahn 1: LMW-Proteinstandard

Bahnen 2-8: Reaktionsansatz nach 0, 5, 15, 30, 60, 120 und 240 min Inkubation bei 37 °C

In Abbildung 20 erkennt man deutlich den Abbau von Faktor II unter schneller Bildung kleinerer Fragmente mit einer Größe von 50, 42, 39, 36, 32 und 30 kDa. Im Laufe der Inkubation treten zusätzlich weitere kleinere Banden auf, während die



Prothrombin-Bande völlig verschwindet. Ebenso wie beim Prothrombin-Abbau durch die MT1-MMP lässt sich auch bei der entsprechenden Degradierung durch die MMP-12 keine zeitliche Bevorzugung einzelner Spaltungen erkennen.

Nach SDS-Gelelektrophorese wurden durch Elektroblothing und anschließende N-terminale Aminosäure-Sequenzierung nach Edman verschiedene Fragmente des Prothrombins identifiziert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengestellt.

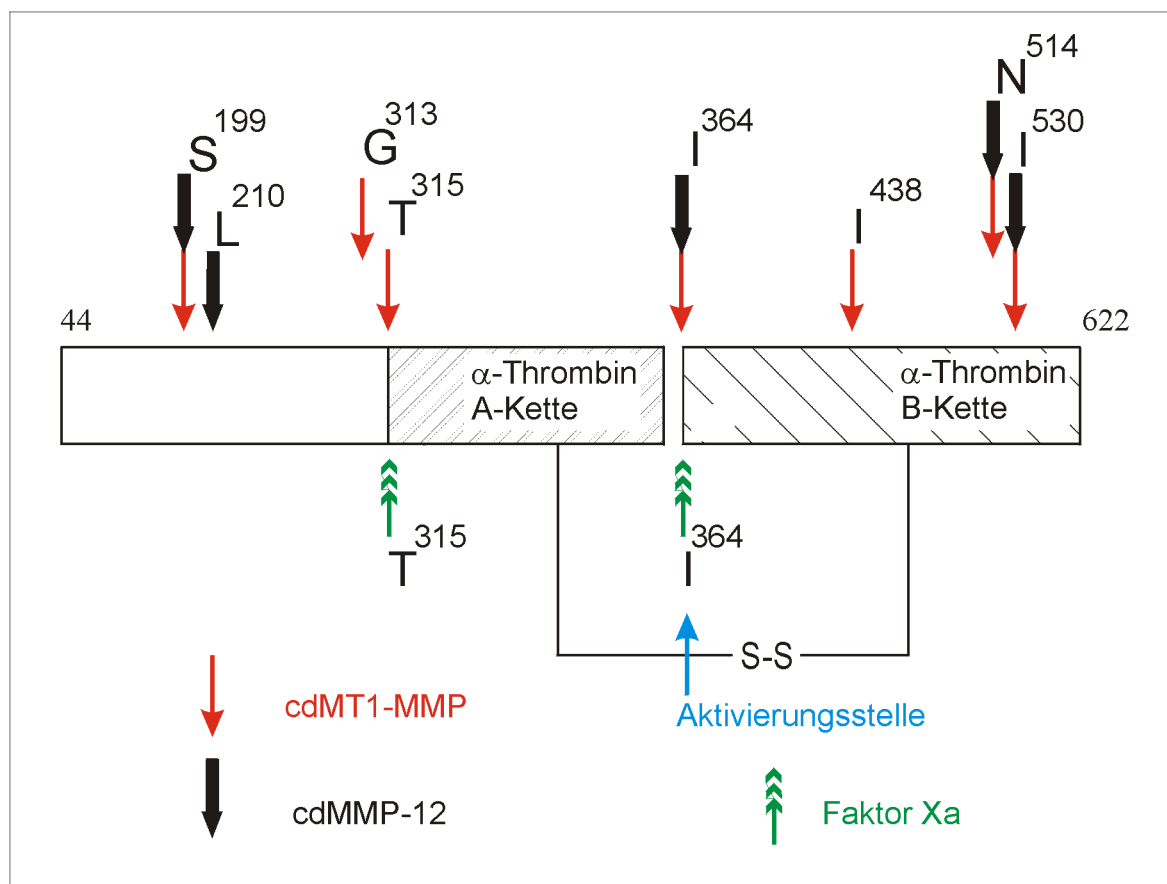
BANDE	MASSE [kDa]	ERMITTELT N-TERMINUS	ORT DER SPALTUNG
A	70	A <sup>44</sup> -N-T-F-L-E-E-V-R-	(N-Terminus Faktor II)
B	50	S <sup>199</sup> -E-G-S-S-V-N-L-	Aktivierungspeptid, „Thrombin-Spaltstelle“
C	42	A <sup>44</sup> -N-T-F-L-E-E-V-R-	(N-Terminus Faktor II)
D	39	L <sup>210</sup> -E-Q-A-V-P-	Aktivierungspeptid
E	32	A <sup>44</sup> -N-T-F-L-E-E-V-R-	(N-Terminus Faktor II)
F	30	I <sup>364</sup> -V-E-G-S-D-A-	N-Terminus B-Kette
G	11	N <sup>514</sup> -V-G-K-G-Q-P-S-V-L-	B-Kette, „Autolyseschleife“ [142]
H	10	I <sup>530</sup> -V-E-R-P-V-C-K-	B-Kette

Tabelle 7: Die ermittelten aminoterminalen Sequenzen der Fragmente des Prothrombin-Abbaus durch die MMP-12.

Die aminoterminalen Sequenzen der Banden mit einem Molekulargewicht von 70 (Abbildung 20, Bande A), 42 (C) und 32 kDa (E) entsprechen der des N-Terminus des unprozessierten Prothrombins. Die Sequenz S<sup>199</sup>-E-G-S-S-V-N-L- der 50 kDa Bande (B) konnte ebenso wie bei der MT1-MMP induzierten Aktivierung ermittelt werden. Die Sequenzierung der 39 kDa Bande (D) ergab die Sequenz L<sup>210</sup>-E-Q-A-V-. Dies zeigt eine um elf Aminosäurereste zum C-Terminus verschobene Spaltung bezüglich der „Thrombin-Spaltstelle“. Im Bereich von 10 (H) bzw. 11 kDa (G) konnten wiederum zwei Sequenzen ermittelt werden, die eine Degradation im Bereich der B-Kette des  $\alpha$ -Thrombins anzeigen, wie sie schon bei der Degradierung durch die MT1-

MMP gefunden wurde (siehe 6.1.2). Die Sequenzierung der 30 kDa großen Bande (E) ergab den für die Aktivität des Thrombins essentiellen N-Terminus (I<sup>364</sup>-V-E-G-S-D-A-) der B-Kette.

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen von MMP-12 und MT1-MMP induzierter Aktivierung des Prothrombins sind in Abbildung 21 schematisch zusammengefasst.



**Abbildung 21: Schematische Darstellung der Prozessierung von Prothrombin durch die MT1-MMP und die MMP-12.** Der mit „Aktivierungsstelle“ bezeichnete Rest markiert den für die katalytische Aktivität essentiellen Aminoterminus.

#### 6.1.4 Spaltung von Fibrinogen durch MMPs

Die Katabolisierung von Fibrinogen durch die MT1-MMP und die MMP-8 konnte bereits früher von mir gezeigt werden [107], in Zusammenarbeit mit Oberpichler [128] und Kocourek [127] konnte die Degradation von Fibrinogen auch durch die MMP-13 und die MMP-12 festgestellt werden. Eine Sequenzanalyse der entstandenen Peptidfragmente wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgenommen, da diese bereits bekannt waren [107, 127, 128].

Um die Degradation des Fibrinogens durch diese Matrixine näher zu charakterisieren, wurde zur Ermittlung der Gerinnbarkeit des prozessierten Fibrinogens eine Funktionsbestimmung nach Clauss durchgeführt. Hierzu wurden in Abhängigkeit von der Zeit aus einem bei 37 °C inkubierten Reaktionsansatz (Enzym/Substrat-Verhältnis 1:40) Proben von 204 µL Volumen entnommen und die Spaltung des Substrates mittels Zugabe von 1,0 µg (4,8 nmol) Batimastat abgestoppt. Diese Proben enthielten jeweils 1.03 mg,  $\cong$  3,97 nmol Fibrinogen und 2,0 bis 2,2 µg,  $\cong$  0,1 nmol MMP. Durch die Bestimmung des Endpunktes der Gerinnung konnte die Menge an funktionellem Fibrinogen in Abhängigkeit von der Reaktionszeit ermittelt werden. Die graphische Darstellung der gemessenen Fibrinogen-Konzentrationen ist in Abbildung 22 zu sehen.

Die Ergebnisse weisen auf eine deutliche Abnahme des gerinnbaren Fibrinogens mit der Zeit hin. Dies wird durch die erhebliche Beeinträchtigung der Gerinnung verdeutlicht.

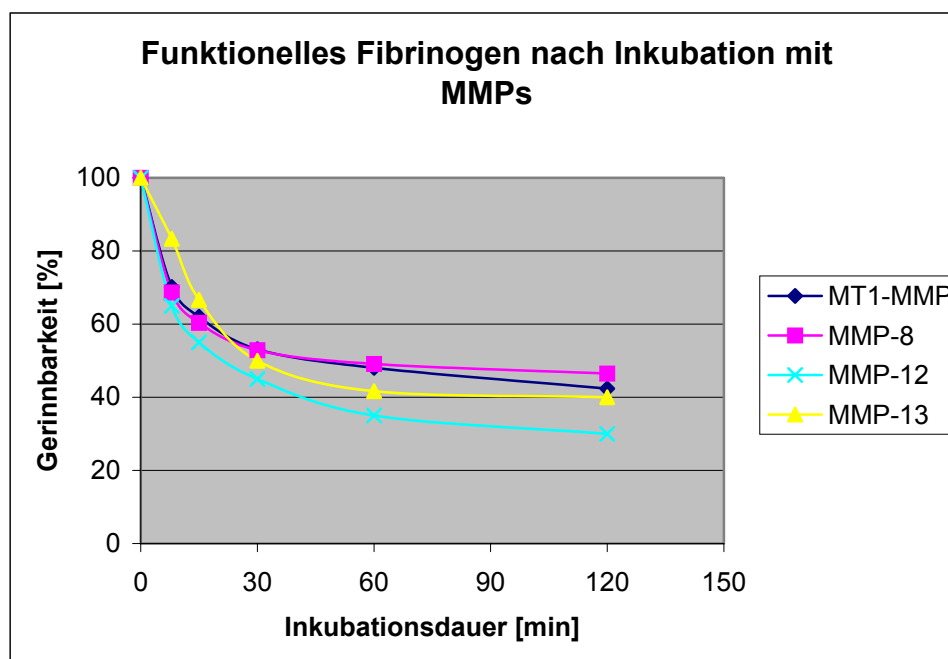
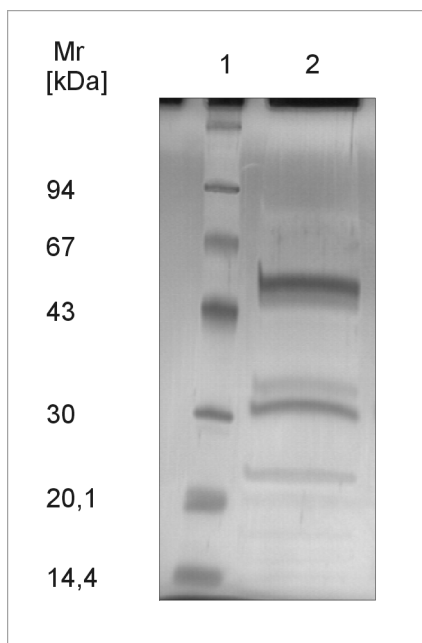


Abbildung 22: Zeitliche Abnahme der Gerinnbarkeit von Fibrinogen nach vorheriger Inkubation mit MMP-8, MMP-12, MMP-13 und MT1-MMP. Die Meßpunkte wurden durch Doppelbestimmung ermittelt.

Die Abbildung 22 zeigt eindeutig, daß bereits nach wenigen Minuten eine Abnahme der Gerinnbarkeit und damit der Konzentration an funktionellem Fibrinogen auf zwei Drittel des ursprünglichen Wertes erfolgt ist.

## 6.2 Aktivierung von Prothrombin

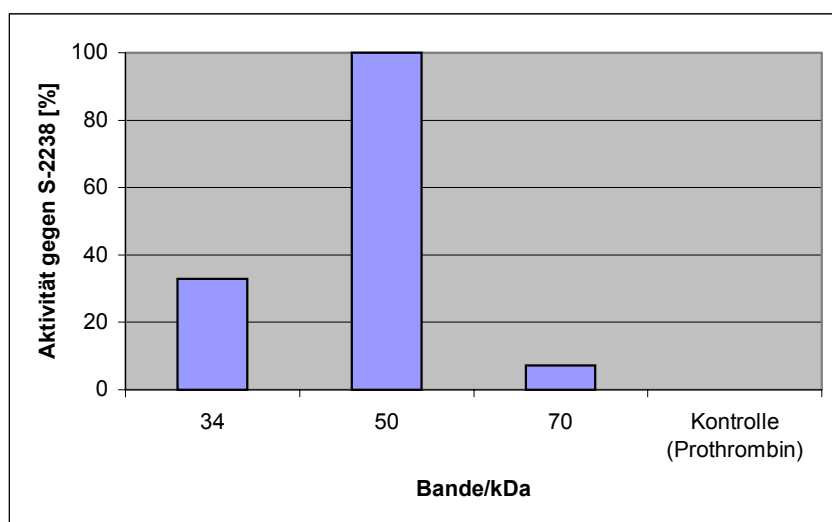
Aus den dargestellten Ergebnissen ergab sich die Frage, welches der bei der Verdauung von Prothrombin durch die MT1-MMP bzw MMP-12 entstandenen Degradationsprodukte für die Thrombin-spezifische Aktivität verantwortlich ist. Um eine potentielle Aktivität der einzelnen Abbauprodukte einer solchen Spaltung zu bestimmen, wurde zunächst nicht für jeden einzelnen Bestandteil eine eigene Aufreinigungsstrategie entwickelt. Vielmehr wurden die einzelnen Komponenten mittels SDS-Page aufgetrennt und dann die einzelnen Banden durch Zink-Färbung entwickelt (siehe Abbildung 23). Dieses analytische Verfahren bietet den Vorteil einer schnellen und unkomplizierten größenabhängigen Auftrennung eines Stoffgemisches, bei der die Proteine nicht in der Gelmatrix fixiert werden. Bei der inversen Zink-Färbung, bei der die Proteinbanden klar bleiben und die restliche Gelmatrix eine Trübung erfährt, werden die Banden bei Seitenlicht gegen einen dunklen Hintergrund sichtbar.



**Abbildung 23: SDS-PAGE der Proteolyse von Faktor II durch die MT1-MMP (Zinkfärbung).** Der Reaktionsansatz enthielt 1,5 nmol Prothrombin und 0,24 nmol cdMT1-MMP und wurde 60 min bei 37 °C inkubiert (siehe auch 6.1.2).  
Bahn 1: LMW-Proteinstandard  
Bahn 2: Reaktionsansatz nach 60 min bei 37 °C.

Die Banden wurden ausgeschnitten und einem Aktivitätstest gegen das synthetische Substrat S-2238 unterzogen. Dieser Messung der proteolytischen Aktivität ging eine Aufbereitung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine in Anlehnung an die Methode von Hardy und Santana voraus [111].

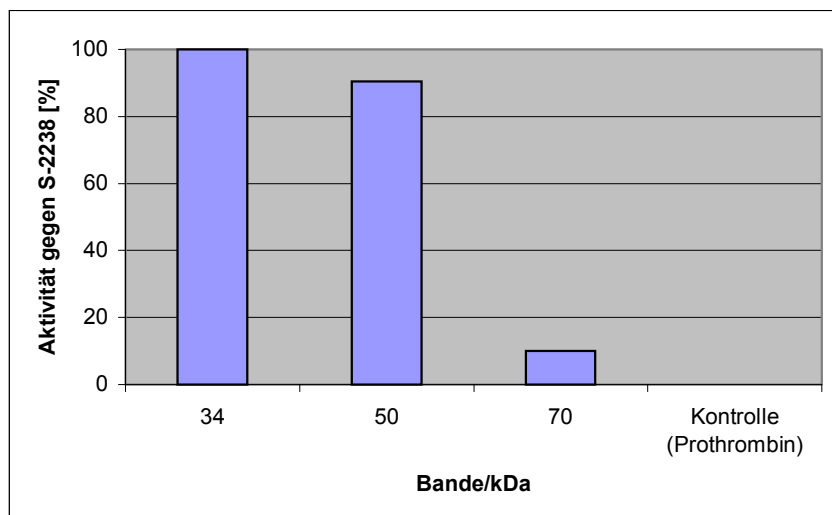
Hierzu wurde zunächst das SDS durch Waschen mit Triton X-100 haltigem Phosphatpuffer aus dem jeweils untersuchten Gelstück entfernt. Anschließend erfolgte eine Renaturierung des Proteins im Gel durch Inkubation mit Phosphatpuffer. Die Messung der Aktivität gegenüber S-2238 konnte nach einstündiger Inkubation bei 37 °C durchgeführt werden (siehe Abbildung 24).



**Abbildung 24: Untersuchung der Aktivität der durch die MT1-MMP generierten Prothrombin Fragmente gegen S-2238.** Aufgetragen sind die durch Doppelbestimmung ermittelten OD-Werte, die nach der Inkubation der einzelnen Banden mit dem Substrat in der entnommenen Reaktionslösung gemessen werden konnten. Der höchste in der Meßreihe ermittelte OD-Wert wurde gleich 100% gesetzt.

Bei dem durch die MT1-MMP aktivierten Prothrombin zeigte sich, daß die schon in der Mischung beobachtete Aktivität maßgeblich auf das 50 kDa große Fragment zurückzuführen ist (vergleiche Abbildung 24). Prothrombin, das ohne Zugabe von MT1-MMP über diesen Zeitraum inkubiert wird, zeigt hingegen keine Aktivität gegenüber dem chromogenen Substrat S-2238.

Bei gleicher Versuchsdurchführung mit durch die MMP-12 aktiviertem Prothrombin (siehe Abbildung 25) geht die in der Inkubationsmischung beobachtbare Aktivität gegen das synthetische Substrat zwar zum größeren Teil auf das 34 kDa große Fragment zurück, aber auch die 50 kDa große Bande verfügt über ein großes Potential, das S-2238 zu spalten. Ebenso wie bei der Aktivierung durch die MT1-MMP zeigte sich auch hier eine geringe Aktivität bei 70 kDa, die beim unbehandelten Prothrombin nicht nachgewiesen werden konnte.

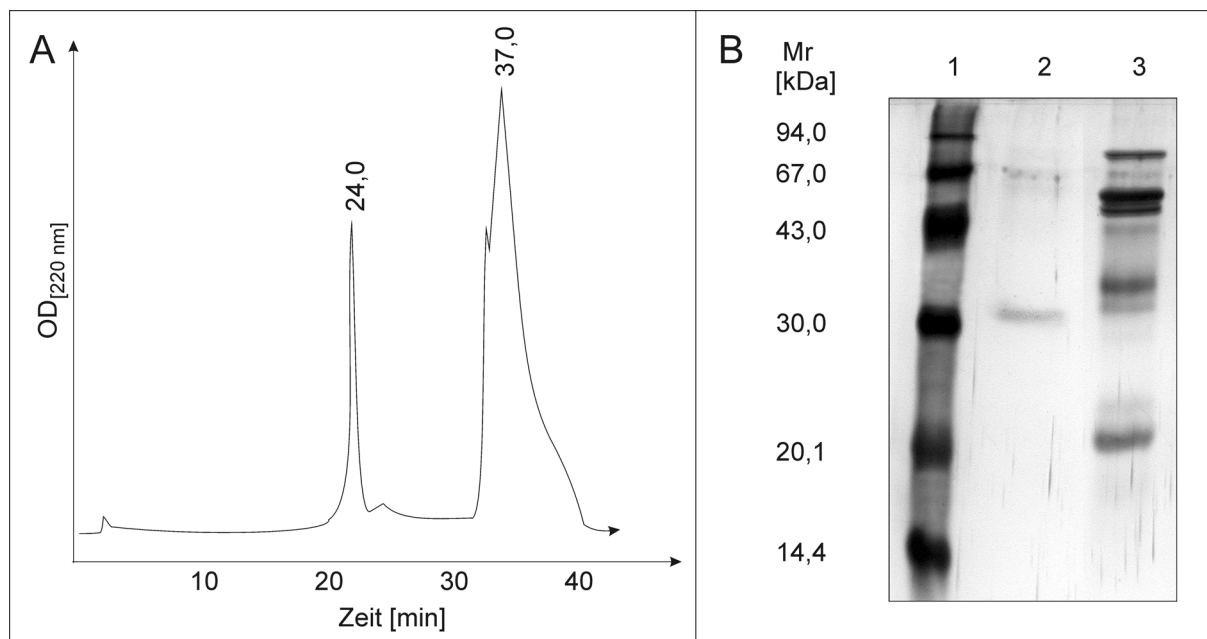


**Abbildung 25: Untersuchung der Aktivität der durch die MMP-12 generierten Prothrombin Fragmente gegen S-2238.** Aufgetragen sind die durch Doppelbestimmung ermittelten OD-Werte, die nach der Inkubation der einzelnen Banden mit dem Substrat in der entnommenen Reaktionslösung gemessen werden konnten. Der höchste in der Meßreihe ermittelte OD-Wert wurde gleich 100% gesetzt.

### 6.3 Auftrennung der Prothrombin-Fragmente

Das durch MT1-MMP bzw. MMP-12 aktivierte Prothrombin sollte zur weiteren Charakterisierung aufgereinigt werden.

Zur Trennung der bei einer Aktivierung durch die MT1-MMP entstehenden Fragmente wurde eine Zwei-Schritt-Aufreinigungsstrategie entwickelt. Im ersten Schritt wurde das Reaktionsgemisch nach Ende der Inkubationsdauer direkt auf eine HPLC-Säule mit starkem Ionentauscher aufgebracht. Abbildung 26 A zeigt das Elutionsprofil dieser Auftrennung an einer TSK-SP-Säule, bei der N-terminale Fragmente des Prothrombins aus der Mischung entfernt werden konnten (Signal bei 24 Minuten). N-terminale Aminosäure-Sequenzierungen der Fraktionsbestandteile ergaben, daß nur die Elemente des Signals bei 37 Minuten eine amidolytische Aktivität gegenüber dem Thrombin-spezifischen Substrat S-2238 aufweisen können, da nur sie den für die Aktivität erforderlichen N-Terminus I<sup>364</sup>-V-E-G-S-D-A enthalten. Entsprechende Aktivitätstests bestätigten dies (nicht gezeigt).



**Abbildung 26: A: HPLC-Chromatogramm zur Trennung von Prothrombin-Fragmenten an TSK-SP.** Nach dem Ende der Spaltung durch MT1-MMP wurde die Probe direkt auf die Säule aufgetragen und die Elution mittels Gradienten gestartet (siehe auch 5.6.2).

**B: SDS-PAGE zur Analyse der HPLC-Signale.**

Bahn 1: LMW-Marker

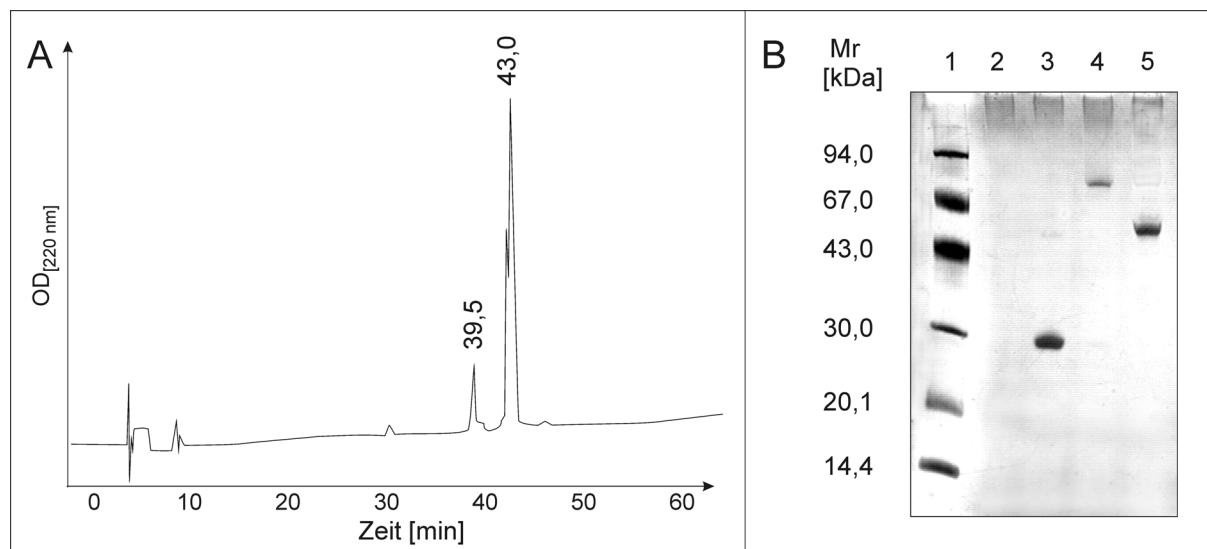
Bahn 2: Fraktion nach 24,0 Minuten

Bahn 3: Fraktion nach 37,0 Minuten

Der N-Terminus des Hauptbestandteils des Signals bei 24 Minuten (Abbildung 26 B: Bahn 2) konnte als A<sup>44</sup>-N-T-F-L-E-E- identifiziert werden. Da es sich hierbei um den Aminoterminus des unprozessierten Prothrombins handelt, ist in diesem 30 kDa Fragment der das aktive Zentrum tragende Teil nicht mehr vorhanden.

Nach Vereinigen und Lyophilisieren wurden die relevanten Fraktionen aus der Ionenaustausch-Chromatographie (Abbildung 26 A: Signal bei 37 Minuten, B: Bahn 3) zur weiteren Aufarbeitung per RP-HPLC aufgetrennt. Die gesammelten Fraktionen konnten nach Trocknen im Vakuum (Speedvac) salzfrei erhalten werden. Abbildung 27 zeigt das entsprechende Chromatogramm.

Bei dieser „reversed phase“-Aufreinigung an einer C<sub>18</sub>-aquaSäule (Abbildung 27 A) konnte mit einer Retentionszeit von 43 Minuten ein 50 kDa großes Fragment erhalten werden (Abbildung 27 B: Bahn 5), das ebenso wie das Thrombin eine Aktivität gegen das chromogene Substrat S-2238 besitzt (siehe Abbildung 25). Die N-terminale Aminosäure-Sequenzierung dieses Fragments ergab die Thrombin-Spaltstelle mit der Sequenz S<sup>199</sup>-E-G-S-S-V- (siehe Abbildung 7, Seite 22).



**Abbildung 27: A: HPLC Chromatogramm der Auftrennung von Prothrombin-Fragmenten nach Spaltung durch MT1-MMP-an C<sub>18</sub>-aqua.** Die vereinigten Fraktionen aus der Ionenaustausch-Chromatographie wurden nach Lyophilisierung und Rekonstitution in Puffer A aufgetrennt.

**B: SDS-PAGE zur Analyse der HPLC-Signale.**

Bahn 1: LMW-Marker

Bahn 2: Fraktion nach 9,5 Minuten

Bahn 3: Fraktion nach 39,5 Minuten

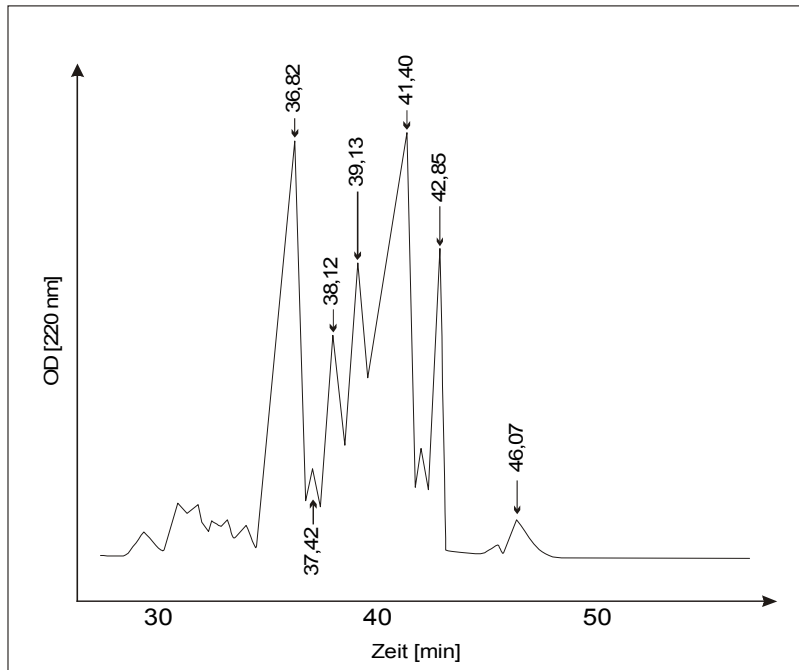
Bahn 4: Fraktion nach 42 Minuten

Bahn 5: Fraktion nach 43 Minuten.

Die Aufreinigungsstrategie wurde gezielt in dieser Reihenfolge (HPLC an TSK-SP vor C<sub>18</sub>-aqua) angelegt, da das Fehlen von Salz in der durch RP-HPLC aufgearbeiteten Probe eine wesentliche Erleichterung bei den Renaturierungsversuchen darstellte. Die Probe kann direkt im Puffer der Wahl aufgenommen werden, eine Dialyse zur Umpufferung entfällt, zudem kann die Konzentration der zu erstellenden Lösung direkt durch die zugegebene Puffermenge eingestellt werden.

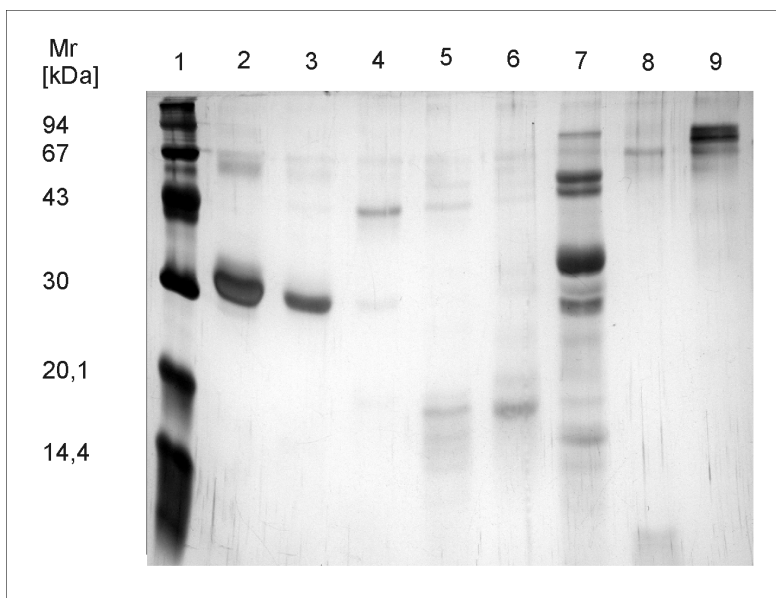
Sowohl die MMP-12 als auch die MT1-MMP sind in der Lage, das Prothrombin zu aktivieren, jedoch gibt es offensichtlich Unterschiede in der Effizienz. Das Spektrum der in Mischung vorhandenen Bestandteile unterscheidet sich deshalb derart, daß im Falle der MMP-12 induzierten Aktivierung auf eine erste Trennung an TSK-SP verzichtet werden kann. Nach direktem Aufbringen der Probe auf die „reversed phase“-Säule kann eine Auftrennung gemäß dem Chromatogramm in Abbildung 28 erhalten werden.





**Abbildung 28:** HPLC-Chromatogramm zur Auftrennung von Prothrombin-Fragmenten nach Spaltung durch MMP-12 an C<sub>18</sub>aqua. Die markierten Peaks zeigen die im SDS-Gel analysierten Fraktionen an.

Nach Lyophilisierung der Fraktionen wurden diese in Lämmli-Puffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 29).



**Abbildung 29:** SDS-Gel zur Analyse der HPLC-Signale aus Abbildung 28.

Bahn 1: LMW-Marker  
 Bahn 2: Fraktion nach 36,82 Minuten  
 Bahn 3: Fraktion nach 36,82 Minuten  
 Bahn 4: Fraktion nach 37,42 Minuten  
 Bahn 5: Fraktion nach 38,12 Minuten  
 Bahn 6: Fraktion nach 39,13 Minuten  
 Bahn 7: Fraktion nach 41,40 Minuten  
 Bahn 8: Fraktion nach 42,85 Minuten  
 Bahn 9: Fraktion nach 46,07 Minuten

#### 6.4 Renaturierung von prozessiertem und aufgereinigtem Prothrombin

Da bei der RP-HPLC Methode unter stark denaturierenden Bedingungen gearbeitet wird, ist zur Charakterisierung der Prothrombin-Fragmente eine Renaturierung des Proteins erforderlich. Zur erfolgreichen Wiederherstellung der Aktivität von Fragmenten des MMP-prozessiertem Prothrombins hat sich nach entsprechenden Testreihen ein schwach saurer Phosphatpuffer (pH 6,3) als bestes Medium herausgestellt.

#### 6.5 Ermittlung des zeitlichen Verlaufs der Prothrombin-Aktivierung

Die kinetische Untersuchung der Prothrombin-Aktivierung ergab, daß diese direkt von der Menge an vorhandener MT1-MMP abhängt. Somit kann eine Aktivierung des Prothrombins durch eventuelle Verunreinigungen in der aus humanem Blutplasma isolierten Faktor II-Probe ausgeschlossen werden. Abbildung 30 verdeutlicht diesen Zusammenhang. Es läßt sich deutlich erkennen, daß eine größere Menge MT1-MMP in der vorgegebenen Inkubationszeit in der Lage ist, entsprechend mehr Moleküle Prothrombin proteolytisch zu aktivieren. Dieses Ergebnis bestätigt noch einmal die direkte Aktivierung des Prothrombins durch die MT1-MMP.

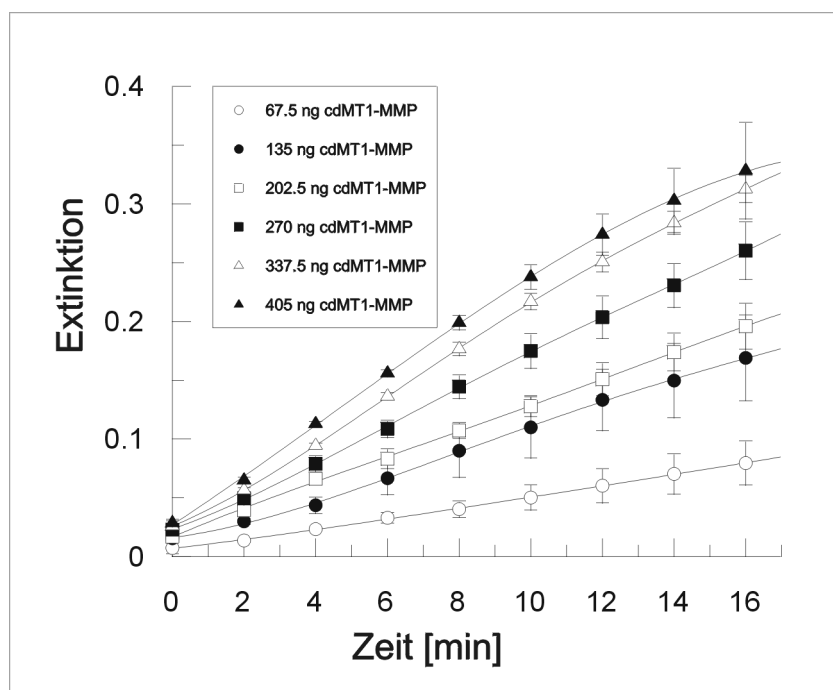


Abbildung 30: Zeitlicher Verlauf der S-2238 Spaltung durch aktiviertes Prothrombin in Abhängigkeit von der MT1-MMP-Konzentration. Prothrombin (9,0 µg) wurde dosisabhängig durch verschiedene Mengen an MT1-MMP bei 37°C für 1 h aktiviert. Die Aktivierung wurde mit Hilfe des Thrombin-spezifischen Substrats S-2238 bei Raumtemperatur beobachtet (Dreifachbestimmung).

## 6.6 Weitergehende Charakterisierung des aktiven Prothrombin-Fragments

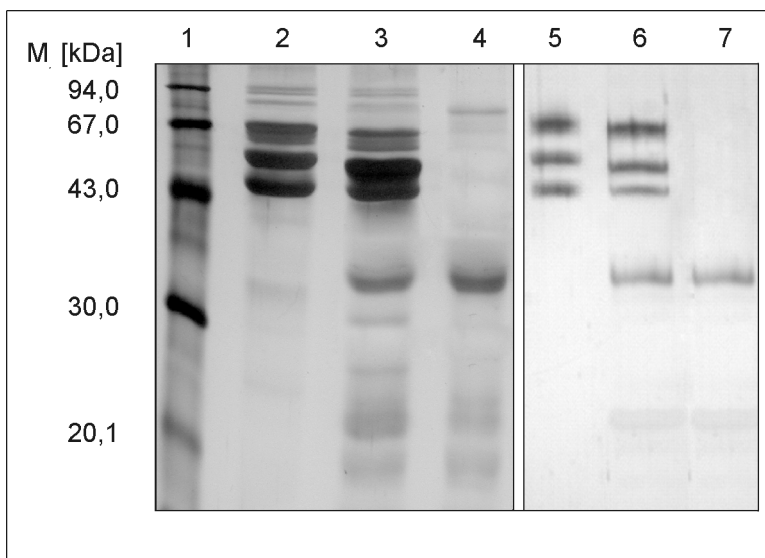
Frühere Arbeiten konnten eine Aktivierung von Prothrombin zeigen, bei der nur eine partielle Degradierung durch Proteinasen, zum Beispiel durch verschiedene Schlangengifte, erfolgte [21, 129]. Die *in vitro* generierte amidolytische Aktivität von derart prozessiertem Prothrombin richtet sich jedoch nur gegen niedermolekulare Substrate, da die Spezifitätstasche bei einer solchen unvollständigen Aktivierung teilweise noch verdeckt bleibt [22]. Daraus ergibt sich die Frage, ob die Aktivierung durch Matrix Metalloproteinasen vollständig abläuft, also auch makromolekulare Substrate des  $\alpha$ -Thrombins durch ein MMP-aktiviertes Fragment des Prothrombins gespalten werden.

### 6.6.1 Spaltung von Fibrinogen durch MMP-aktiviertes Prothrombin

Bei den im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Aktivierungen durch die MMP-12 bzw. die MT1-MMP ist neben der Spaltung von chromogenen, niedermolekularen Substanzen durch einige Prothrombin-Fragmente auch eine proteolytische Aktivität gegenüber makromolekularen Substraten nachgewiesen worden: Es konnte gezeigt werden, daß die  $A\alpha$ - und die  $B\beta$ -Kette des Fibrinogens durch Einwirkung von MMP-aktiviertem Prothrombin verkürzt werden.

In Abbildung 31 ist der Abbau des Fibrinogens durch MMP-12- bzw. MT1-MMP-aktiviertes Prothrombin gezeigt. Die entsprechende Größenreduktion der Banden für  $A\alpha$ - und  $B\beta$ -Kette ist deutlich erkennbar, die  $\gamma$ -Kette bleibt in ihrer Größe konstant.

Eine aminoterminaler Aminosäure-Sequenzierung zur Ermittlung der N-Termini der verkürzten  $A\alpha$ - und  $B\beta$ - Ketten ist Gegenstand derzeitiger Untersuchungen.

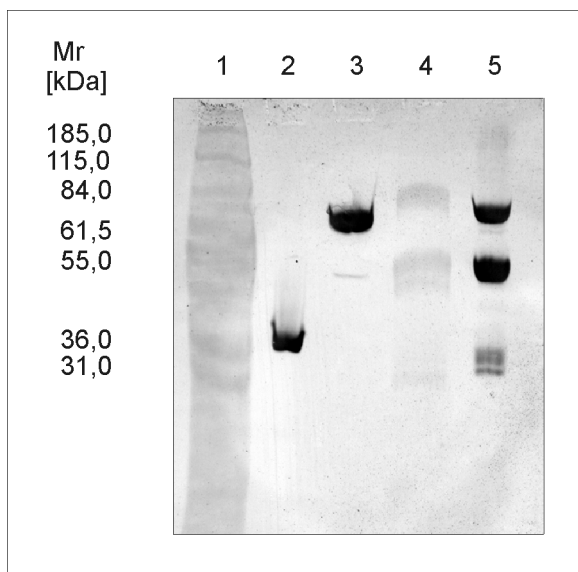


**Abbildung 31: Darstellung des Fibrinogen-Abbaus durch MMP-12- und MT1-MMP- aktiviertes Prothrombin.**  
 Bahn 1: LMW-Proteinstandard  
 Bahn 2: Unprozessiertes Fibrinogen nach 2 Stunden Inkubation bei 37 °C  
 Bahn 3: MMP-12 aktiviertes Prothrombin und Fibrinogen nach 30 Minuten Inkubation bei 37 °C  
 Bahn 4: MMP-12 aktiviertes Prothrombin nach 30 Minuten Inkubation bei 37 °C  
 Bahn 5: Unprozessiertes Fibrinogen nach 30 Minuten Inkubation bei 37 °C  
 Bahn 6: MT1-MMP aktiviertes Prothrombin und Fibrinogen nach 30 Minuten Inkubation bei 37 °C  
 Bahn 7: MT1-MMP-aktiviertes Prothrombin nach 30 Minuten Inkubation bei 37 °C

### 6.6.2 Nachweis der Prothrombin-Aktivierung mittels Western Blot

Zur Zeit gibt es genau einen kommerziell verfügbaren Antikörper (gma-020), dessen Epitop in der B-Kette des  $\alpha$ -Thrombins liegen soll. Dieser soll laut Hersteller nur das aktive Thrombin erkennen, nicht jedoch dessen Vorläufer, das Prothrombin. Da genau dieser Bereich des Enzyms für seine Aktivität verantwortlich ist, könnte ein Nachweis der B-Kette im Westernblot mit diesem spezifischen Antikörper als weiterer Nachweis für eine vollständigen Aktivierung des Prothrombins angesehen werden.

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß dieser Antikörper nicht die Angaben des Herstellers erfüllt, sondern auch das Prothrombin und Fragmente davon erkennt. Im Western Blot ist eine gleichermaßen starke Anfärbung von Prothrombin und von  $\alpha$ -Thrombin erkennbar (siehe Abbildung 32).



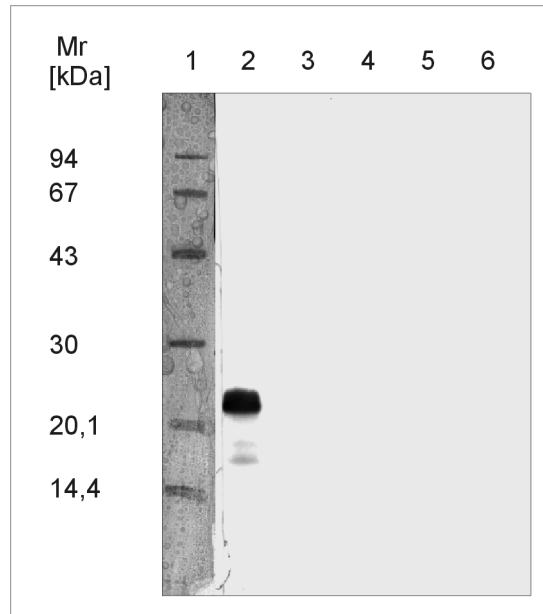
**Abbildung 32: Western Blot zum Nachweis einer vollständigen Aktivierung des Prothrombins.**

- Bahn 1: Sigma Molekulargewichtsmarker MWM-105A
- Bahn 2: Thrombin (Kontrolle, nicht-reduzierende Bedingungen)
- Bahn 3: Prothrombin (Kontrolle, nicht-reduzierende Bedingungen)
- Bahn 4: aktiviertes Prothrombin (reduzierende Bedingungen)
- Bahn 5: aktiviertes Prothrombin (nicht-reduzierende Bedingungen)

## 6.7 Nachweis der physiologischen Relevanz der Prothrombin-Aktivierung durch MMPs

Eine Aktivierung des Prothrombins durch MMPs ist bisher nicht bekannt gewesen. Aufgrund der wesentlichen Rolle, die die Matrixine beim Krebsgeschehen, insbesondere bei Tumorwachstum und Metastasierung spielen, erschienen histologische Untersuchungen an Tumorgewebe besonders interessant. Um direkte Implikationen der MMPs bei der Ausbildung eines Fibringerüsts um den Tumor herum nachzuweisen, wurde eine Hybridfärbung durchgeführt, bei der ein Gewebeschnitt mit zwei verschiedenen Antikörpern untersucht wird. In diesem Fall kamen ein Antikörper gegen die katalytische Domäne der MT1-MMP und ein weiterer gegen Fibrin zum Einsatz. Um eventuelle Kreuzreaktivitäten des anti-MT1-MMP-Antikörpers gegen die katalytischen Domänen der anderen, strukturell eng verwandten Matrix Metalloproteinasen ausschließen zu können, wurden alle verfügbaren MMPs im Western Blot analysiert (siehe Abbildung 33).

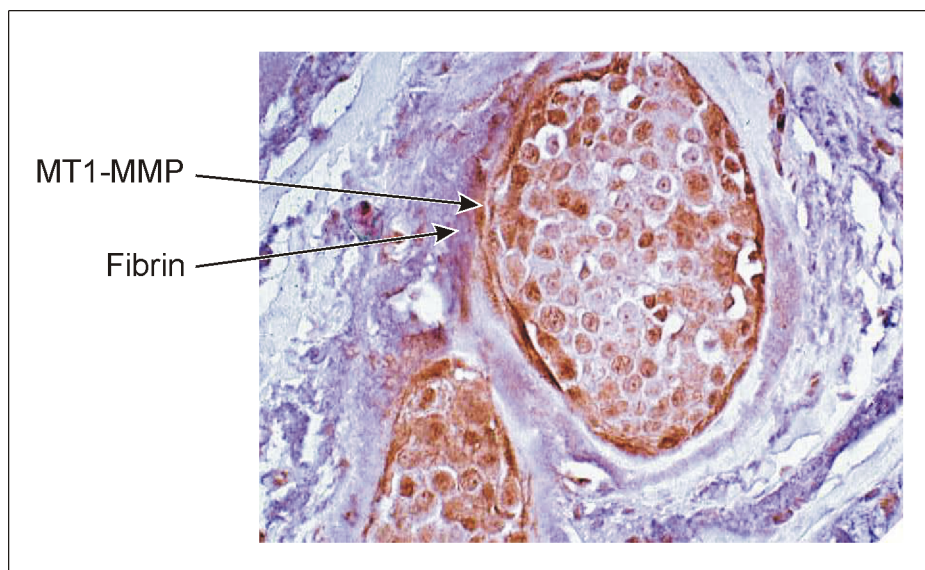
Auf dem Blot ist die deutliche Anfärbung der cdMT1-MMP erkennbar, die anderen Matrixine, cdMMP-8, MMP-9, cdMMP-12 und cdMMP-13, werden nicht detektiert.



**Abbildung 33: Western Blot zum Nachweis der Selektivität des Antikörpers gegen die MT1-MMP.**

Bahn 1: LMW-Marker  
Bahn 2: cdMT1-MMP (500 ng).  
Bahn 3: MMP-9 (1,4 µg).  
Bahn 4: cdMMP-8 (500 ng).  
Bahn 5: cdMMP-12 (500 ng).  
Bahn 6: cdMMP-13 (500 ng).

Die immunhistochemische Untersuchung des Gewebeschnittes zeigt eine deutliche Anfärbung der Oberfläche der Tumorzellen mit Hilfe des Antikörpers gegen die MT1-MMP, sowie eine stark damit korrelierte Anfärbung des Fibrin-Gels um die Tumornester herum (siehe Abbildung 34).



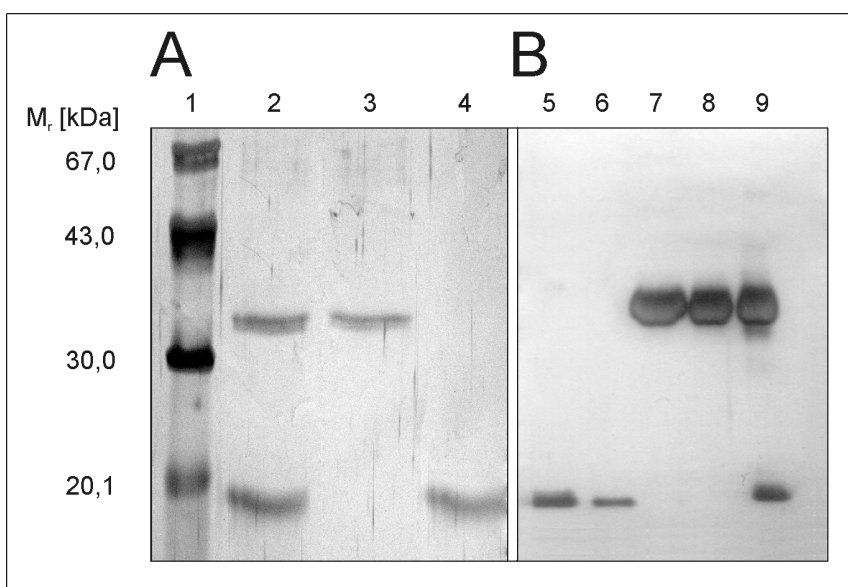
**Abbildung 34: Immunhistochemischer Nachweis von MT1-MMP (braune Färbung) auf der Oberfläche von Tumorzellen und von Fibrin (bläuliche Färbung) im Stroma entlang der Nester von Tumorzellen.**

Die stärkste Anfärbung zeigt sich dabei an der Grenzfläche zwischen Tumor und Wirt. Aufgrund des Fehlens eines Antikörpers gegen Thrombin, der ausschließlich die aktivierte Form erkennt, wurde auf eine entsprechende Kombinationsfärbung verzichtet.

### 6.8 Spaltungsversuche von weiteren Blutplasmaproteinen durch MMPs

Es wurden weiterhin Spaltungsversuche mit Kallikrein (Fletcher-Faktor) und  $\alpha$ -Thrombin (Faktor IIa) als Substrat durchgeführt. Eine proteolytische Aktivität konnte jedoch bei keiner der eingesetzten MMPs, d. h. MMP-8, MMP-12, MMP-13 und MT1-MMP, nachgewiesen werden.

Hierbei ist als besonders interessant zu bewerten, daß weder die MMP-12 (siehe Abbildung 35 A), noch die MT1-MMP (siehe Abbildung 35 B) in der Lage waren, das  $\alpha$ -Thrombin zu proteolysieren, während die Proteolyse des  $\alpha$ -Thrombin-Vorläufers, also des Prothrombins, durch diese beiden Matrix Metalloproteinasen in dieser Arbeit einwandfrei gezeigt werden konnte.



**Abbildung 35: SDS-PAGE-Analyse nach Einwirkung von A) MMP-12 bzw. B) MT1-MMP auf  $\alpha$ -Thrombin.**

Bahn 1: LMW-Proteinstandard

Bahn 2: MMP-12 und  $\alpha$ -Thrombin nach 2 Stunden Inkubation bei 37 °C (Enzym/Substrat-Verhältnis 1:2)

Bahn 3: Unprozessiertes  $\alpha$ -Thrombin (0,2 nmol) nach 2 Stunden Inkubation bei 37 °C

Bahn 4: MMP-12 (0,1 nmol) nach 2 Stunden Inkubation bei 37 °C

Bahn 5: MT1-MMP (0,1 nmol) ohne Inkubation bei 37 °C

Bahn 6: MT1-MMP (0,1 nmol) nach 2 Stunden Inkubation bei 37 °C

Bahn 7: Unprozessiertes  $\alpha$ -Thrombin (0,6 nmol) ohne Inkubation bei 37 °C

Bahn 8: Unprozessiertes  $\alpha$ -Thrombin (0,6 nmol) nach 2 Stunden Inkubation bei 37 °C

Bahn 9: MT1-MMP und  $\alpha$ -Thrombin nach 2 Stunden Inkubation bei 37 °C (Enzym/Substrat-Verhältnis 1:6)

## 7 Diskussion

Die Matrix Metalloproteinasen sind die klassischen Abbauenzyme der Extrazellulären Matrix. Eben diese Eigenschaft hat dieser Enzymfamilie ihren Namen eingebracht [88, 130]. Inzwischen mehren sich jedoch Erkenntnisse, daß den MMPs auch andere Proteine neben den ECM-Komponenten als Substrate zur Verfügung stehen [85, 131, 132].

Die Blutgerinnung wird bereits seit Jahrzehnten intensiv erforscht. Trotzdem lassen sich auch heute immer wieder neue Erkenntnisse über diesen Prozeß gewinnen. Speziell im Bereich der Regulation ist auch weiterhin mit der Aufdeckung neuer Zusammenhänge zu rechnen [13].

Den Matrix Metalloproteinasen, die in dem bisher bekannten Kaskadenmodell der Blutgerinnung keine Funktion haben, könnte dabei zukünftig eine besondere Rolle zukommen. Die MMPs konnten zum Einen in der Blutbahn selbst [125, 133], zum Anderen auch im unmittelbaren Kontakt zur Blutbahn nachgewiesen werden [98, 134]. Außerdem wurde bereits bei einigen Matrixinen gezeigt, daß sie in der Lage sind, Blutplasmaproteine zu spalten [125, 135-137].

In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob die MMPs einen signifikanten Einfluß auf die Blutgerinnung haben könnten. Dieser Einfluß könnte sowohl bei der Aktivierung von Zymogenen, als auch bei einer Inaktivierung von Proteinen, beziehungsweise von proteolytischen Enzymen der Gerinnungskaskade eine Rolle spielen. Darüber hinaus ist auch eine Proteolyse von Blutplasmaproteinen außerhalb der Blutbahn denkbar, da viele dieser Proteine nach Extravasation auch außerhalb des Blutkreislaufes gefunden werden. Hierbei sei auf die Fibrin-Matrix um Tumore herum verwiesen, die extravasal durch Thrombin-katalysierte Prozessierung von Fibrinogen entsteht [83, 138].

In der hier vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Blutplasmaproteine, die an der Blutgerinnung beteiligt sind, daraufhin untersucht, ob sie durch Matrixine prozessiert werden. Im Falle einer nachweisbaren Spaltung als Substrate wurde eine Identifizierung der Spaltstellen durch Edman-Abbau angestrebt.



### 7.1 Inaktivierung von Faktor XII (Hagemann-Faktor)

Die Prozessierung des Hagemann-Faktors (Faktor XII der Blutgerinnungskaskade) durch ein Mitglied der Matrixin-Familie war bisher nicht in der Literatur bekannt. Erst im Rahmen dieser Arbeit konnte in Zusammenarbeit mit Oberpichler und Kocourek eine Degradierung von Faktor XII durch die MMP-12, MMP-13 und MT1-MMP festgestellt werden [107, 127, 128]. Die Peptidbindung G<sup>376</sup>-L<sup>377</sup> konnte für alle drei untersuchten MMPs als gemeinsame Spaltstelle identifiziert werden.

Ein Vergleich zwischen der durch Kallikrein *in vivo* und den untersuchten MMPs *in vitro* erzeugten Spaltungen ist in Abbildung 36 schematisch dargestellt. Dabei fällt auf, daß alle drei MMPs eine erhebliche Selektivität in Bezug auf die Spaltung von Faktor XII aufweisen. So spalten alle drei Enzyme an der Stelle G<sup>376</sup>-L<sup>377</sup>, außerdem spalten MMP-12 und MT1-MMP an der Stelle S<sup>350</sup>-L<sup>351</sup>.

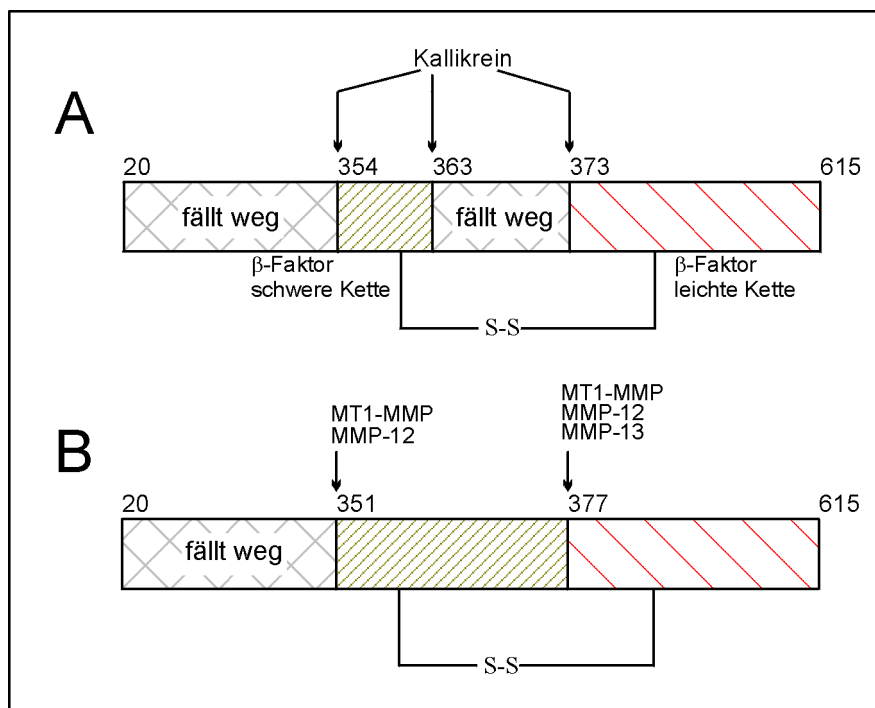


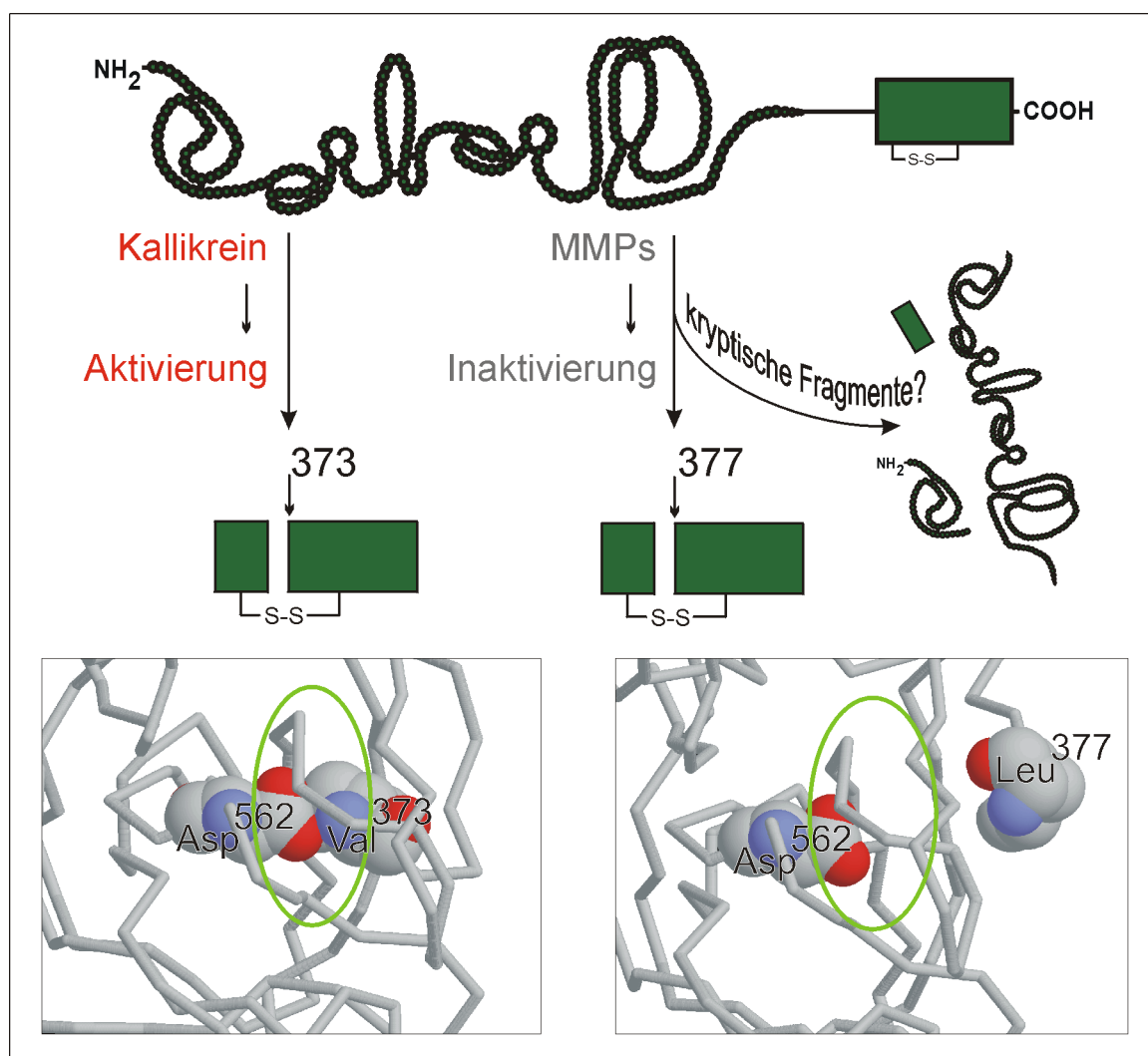
Abbildung 36: Schematische Darstellung der Spaltung von Faktor XII, A) durch Kallikrein und B) durch MMPs. Die Spaltstellen sind durch Pfeile angedeutet.

Der Vergleich der N-terminalen Sequenzen zwischen mit der *in vivo* erzeugten Protease (β-Faktor XIIa) und dem bei der Proteolyse der G<sup>376</sup>-L<sup>377</sup>-Peptidbindung entstehenden 30 kDa großen Proteinfragment ließ zunächst vermuten, daß hier möglicherweise eine dem β-Faktor XIIa vergleichbare enzymatische Aktivität

auftreten könnte. Die das katalytisch aktive Zentrum tragende B-Kette des  $\beta$ -Faktor XIIa stimmte annähernd mit dem durch die verschiedenen Matrixine erzeugten Fragment (L<sup>377</sup> bis S<sup>615</sup>) überein ( $\beta$ -Faktor-B-Kette: V<sup>373</sup> bis S<sup>615</sup>, siehe Abbildung 36). Das *in vitro* erzeugte 30 kDa Proteinfragment war im Vergleich zum *in vivo* erzeugten lediglich am N-Terminus um vier Aminosäuren verkürzt. Das durch MMP-12 beziehungsweise MT1-MMP induzierte Spaltung der Peptidbindung S<sup>350</sup>-L<sup>351</sup> generierte Proteinfragment (33 kDa) besaß am N-Terminus große Ähnlichkeit mit der A-Kette des  $\beta$ -Faktors (N<sup>354</sup> bis L<sup>363</sup>). Die durch die MT1-MMP generierte 45 kDa Bande (siehe Abbildung 16) konnte zwar nicht durch N-terminale Aminosäure-Sequenzierung charakterisiert werden, allerdings legte ein Vergleich der Fragmentierungsmuster nahe, daß es sich um den Aminoterminus des unprozessierten Hagemann Faktors handeln muß.

Die Frage nach einer möglichen Aktivierung von Faktor XII durch Matrix Metalloproteinasen ist insofern von besonderem Interesse, als es sich beim Hagemann-Faktor um das Schlüsselenzym des intrinsischen Pfades der plasmatischen Blutgerinnung handelt. Die Folge einer solchen potentiellen Aktivierung wäre in der Gerinnungskaskade aufgrund der kaskadenartigen Verstärkung von Zymogenaktivierungen eine erhöhte Neigung zur Thrombose. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde in einem Assay untersucht, ob durch die betrachteten MMPs eine Aktivierung des Hagemann-Faktors induziert werden kann. Eine Amidolyse des synthetischen Substrates S-2302 kann in diesem Assay nur spezifisch durch Faktor XIIa erfolgen. Die Untersuchungen ergaben, daß die latente Form des Hagemann-Faktors durch keine dieser MMPs aktiviert werden konnte (siehe 6.1.1). Vielmehr ließ sich das so durch eine Matrix Metalloproteinasen prozessierte Proenzym nicht mehr durch seinen nativen Aktivator, das Kallikrein, aktivieren. Weiterhin besaß der eingesetzte Faktor XII von vornherein eine geringe Aktivität gegenüber dem S-2302, d. h. die Probe enthielt bereits in Spuren den aktiven Faktor XIIa. Diese spezifische, wenn auch geringe, Aktivität gegenüber dem synthetischen Substrat wurde durch Inkubation mit den betrachteten Matrixinen sogar noch verringert. Die eingesetzten MMPs sind also in der Lage, den Hagemann-Faktor sowohl in latenter als auch in aktiver Form so zu proteolysieren, daß er nicht mehr aktiv ist bzw. aktiviert werden kann.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen den Schluß zu, daß zur Stabilisierung des aktiven Zentrums, und damit letztlich auch zur Generierung von proteolytischer Aktivität, die Ausbildung einer spezifischen Salzbrücke notwendig ist, die sich ebenso wie bei den bereits durch Röntgenstrukturanalyse charakterisierten Serinproteinasen Trypsin und Thrombin zwischen dem nativ generierten N-Terminus der aktiven Kette und einem Aspartat befinden. Bei diesem Aspartatrest, der selbst nicht Teil der katalytischen Triade, jedoch dem essentiellen Serin direkt benachbart ist, handelt es sich ebenfalls um einen hochkonservierten Rest im Baumuster der Serinproteinasen.



**Abbildung 37: Vergleich von proteolytischer Aktivierung des Hagemann Faktors durch das Kallikrein und proteolytischer Inaktivierung durch MMPs.** Die Matrix Metalloproteinasen spalten den für die katalytische Aktivität essentiellen N-Terminus der B-Kette ab, so daß die Ausbildung der Salzbrücke unterbleibt. Der Bereich der Salzbrücke ist durch die grüne Ellipse angedeutet.

Nach der MMP-vermittelten Degradation kann keine Stabilisierung des aktiven Zentrums über die Salzbrücke erfolgen. Folglich besitzt ein so prozessiertes Molekül

keine proteolytische Aktivität (siehe Abbildung 37). Zwar besitzen Trypsin und Thrombin am N-Terminus der Kette mit dem katalytischen Zentrum ein Isoleucin, doch kann dies dem Valin des Faktor XIIa in Größe, Polarität und Funktion als analog angesehen werden.

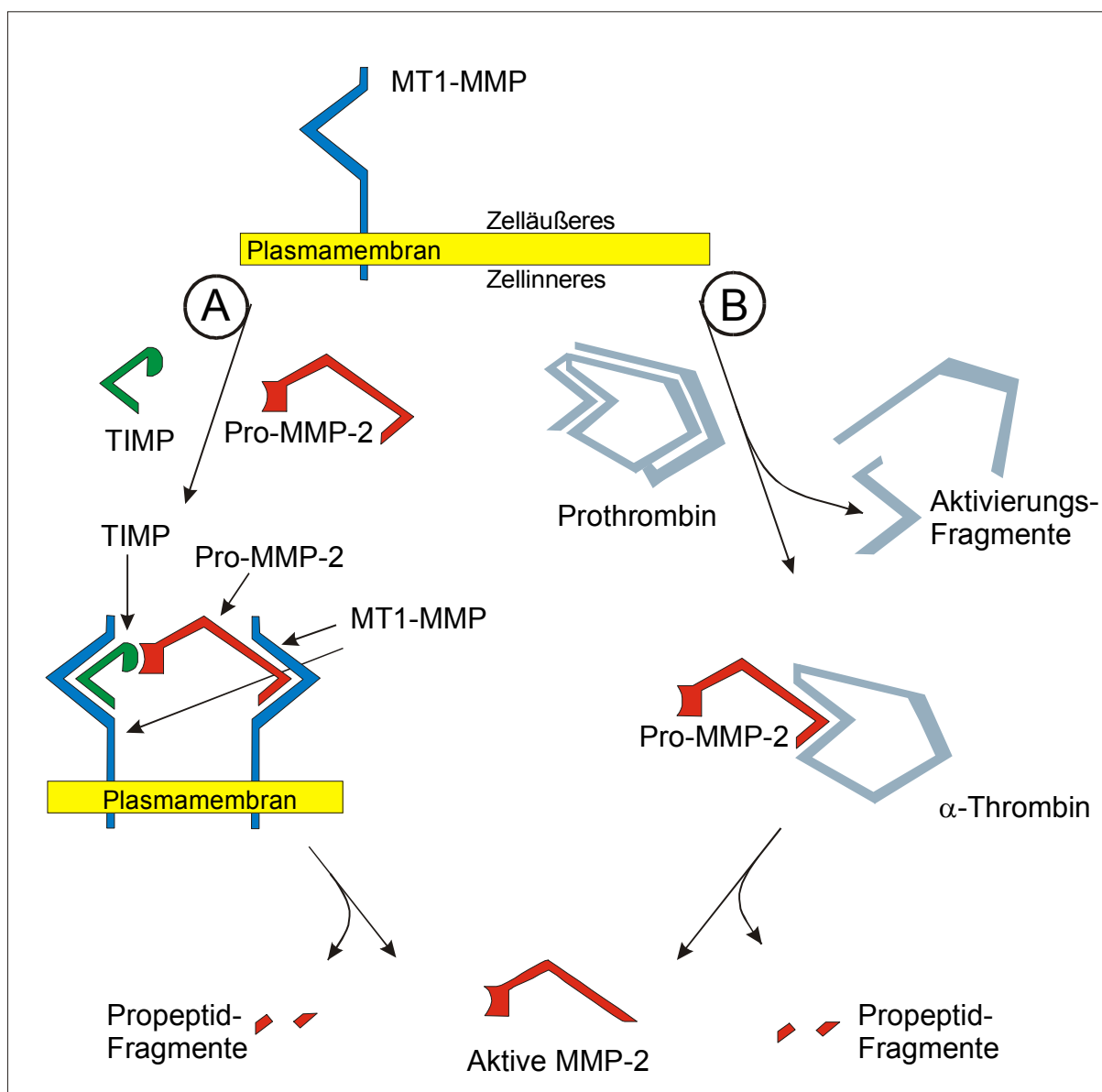
Die von der MMP-12 induzierte Spaltung an L<sup>379</sup>-R<sup>380</sup> sollte den vorangegangenen Betrachtungen analog behandelt werden. Die darüber hinaus ermittelten Spaltstellen liegen weiter am N-Terminus des Hagemann-Faktors (siehe Abbildung 17) und sollten daher keinen Einfluß auf die Aktivität haben.

Beim proteolytischen Abbau von Fibronectin und Plasminogen konnte die Generierung kryptischer Aktivität nachgewiesen werden [139, 140]. Ob durch die hier gezeigte Abspaltung von fibronectinartiger, EGF- oder Kringeldomäne des Hagemann Faktors ebenfalls kryptische Aktivität freigesetzt wird, ist bislang unklar.

## 7.2 Aktivierung von Prothrombin

Ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit ist die Untersuchung der Spaltung und Aktivierung von Prothrombin durch die Matrix Metalloproteinasen MMP-12 und MT1-MMP. Im Vorfeld durchgeführte Untersuchungen zeigten eine amidolytische Aktivität gegenüber chromogenen Substraten. Hier sollte eine Klärung des Aktivierungsweges erfolgen und die durch Matrixine aktivierten Fragmente des Prothrombins identifiziert werden. Die bisher bekannte Aktivierung durch den Faktor X der Blutgerinnungskaskade läuft ohne das Vorhandensein von Phospholipiden, Calcium-Ionen und Faktor V nur außerordentlich langsam ab. Erst der Zusammenschluß dieser Komponenten zum sogenannten Prothrombinase-Komplex führt zu einer Geschwindigkeitssteigerung um mindestens fünf Größenordnungen gegenüber der Katalyse durch den Faktor X allein. Bei einer Aktivierung durch die untersuchten Matrixine sind diese Komponenten nicht nötig. Damit eröffnen sich neue Möglichkeiten zur Aktivierung des Thrombins, aus der sich wiederum weitere neue Aspekte ergeben, z. B. zwei Möglichkeiten zur Aktivierung von proMMP-2: Zum Einen kann pro-MMP-2 über das sogenannte „Seiki-Modell“, bei dem die proGelatinase A auf der Zelloberfläche an einen Komplex aus MT1-MMP und TIMP-2 bindet und nach Assoziation einer zweiten MT1-MMP, die Teile des

Propeptids abspaltet, in einem Autolyseschritt vollständig aktiviert werden [141]. Zum Anderen kann proMMP-2 durch Thrombin, das ebenfalls die Aktivierung der Progelatinase A induzieren kann, prozessiert werden [69] (siehe Abbildung 38). Berücksichtigt man die zahlreichen zellulären Effekte, die wiederum das Thrombin induzieren kann (siehe Abschnitt 2.5) und die weit über seine Bedeutung bei der Blutgerinnung hinaus gehen, so ist die Matrixin-induzierte Aktivierung des Thrombins möglicherweise von erheblicher physiologischer, in jedem Fall aber wohl pathologischer Bedeutung.



**Abbildung 38:** Darstellung der zwei unabhängigen Aktivierungspfade der Pro-MMP-2 durch die MT1-MMP. Weg A zeigt das Seiki-Modell, bei dem durch Bildung eines quaternären Komplexes an der Zelloberfläche eine MT1-MMP-vermittelte Aktivierung erfolgt. Weg B zeigt die Aktivierung des Prothrombins zum  $\alpha$ -Thrombin, das seinerseits die Pro-MMP-2 aktivieren kann.

Durch Aktivitätstests mit dem synthetischen Substrat S-2238 konnte gezeigt werden, daß bei Inkubation mit der MT1-MMP beziehungsweise der MMP-12 tatsächlich eine Aktivierung des Prothrombins erfolgt. Die Tatsache, daß eine proteolytische Aktivität des Faktors II allein durch Behandlung mit einer dieser Matrix Metalloproteinasen induziert werden kann, ist insofern bemerkenswert, als *in vivo* die Gegenwart, mehrerer Komponenten, nämlich Faktor Xa, Calcium-Ionen, Phospholipid-Membranen und Faktor V (der sogenannte Prothrombinase-Komplex), für eine Aktivierung erforderlich ist. Eine Degradation von  $\alpha$ -Thrombin durch eine dieser beiden Matrix Metalloproteinasen ist hingegen nicht beobachtet worden. Die Aktivierung von Prothrombin ist folglich sehr effizient, da nach der Generierung des  $\alpha$ -Thrombins keine weitere Degradierung durch die MMPs erfolgt, die vorhandene Thrombin-Aktivität also durch MMPs nicht wieder reduziert wird.

Bei Betrachtung der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zur Degradierung von Prothrombin und von Faktor XII läßt sich ein Spaltungsmuster erkennen, bei dem sowohl die MMP-12, als auch die MT1-MMP bevorzugt N-terminal von Leucin- bzw. Isoleucin-Resten spalten, diese Ergebnisse bestätigen also die von mir zuvor gefundenen Resultate [107]. Diese Bevorzugung ist allerdings nicht derart ausgeprägt wie bei den Serin-Proteinasen, z. B. Trypsin und  $\alpha$ -Thrombin, die C-terminal von Lysin- und Arginin-Resten spalten. Dementsprechend hängt die Spezifität dieser beiden MMPs noch von anderen Strukturmerkmalen ab, die nicht in unmittelbarer Nähe der Spaltstelle liegen müssen.

### 7.2.1 Prothrombin-Prozessierung durch die MT1-MMP

Zunächst fallen die Spaltungen im Bereich der B-Kette ins Auge. Durch die Proteolyse der Bindungen N<sup>437</sup>-I<sup>438</sup>, A<sup>513</sup>-N<sup>514</sup> und P<sup>529</sup>-I<sup>530</sup> ist eine Beeinflussung der katalytischen Aktivität des Faktor II sehr wahrscheinlich, da die Spaltungen im aktiven Zentrum des Enzyms erfolgen. Der Vergleich der Spaltstellen, die bei der Autolyse des  $\alpha$ -Thrombins zunächst zum  $\beta$ - und dann zum  $\gamma$ -Thrombin führen mit den hier gefundenen MT1-MMP-induzierten Spaltstellen in der Peripherie des Moleküls zeigt eine große Ähnlichkeit dieser Spaltungen auf.

Die erste dieser drei Spaltungen erfolgt einen Rest hinter der bekannten Peptidbindung R<sup>436</sup>-N<sup>437</sup>, deren Spaltung zum  $\beta$ -Thrombin führt. Möglicherweise sind diese Spaltungen sogar identisch. Bei Aminosäure-Sequenzierungen nach Edman wurde wiederholt beobachtet, daß die erste Aminosäure des zu untersuchenden Peptidstranges bereits bei der Aufarbeitung, d. h. vor der eigentlichen Sequenzierung, abgespalten wurde. Die Entstehung des Aminoterminus N<sup>437</sup> wiederum ist in dem Reaktionsansatz ohnehin zu erwarten, da es sich ja um eine bereits dokumentierte Autolysestelle handelt. Die Spaltstelle A<sup>513</sup>-N<sup>514</sup> liegt inmitten der sogenannten „Autolyseschleife“ [142], diese erstreckt sich von Gly<sup>503</sup> bis Gly<sup>518</sup>. Spaltungen sind hier aufgrund der exponierten Lage und der Aminosäuresequenz sehr leicht möglich, sowohl autoproteolytisch, als auch durch andere Proteasen.

Die dritte Spaltung im Bereich der schweren Kette betrifft die Bindung P<sup>529</sup>-I<sup>530</sup>. Die nahe Lage am Ende der Autolyseschleife läßt eine Beeinträchtigung der Aktivität erwarten. Insgesamt lassen diese drei Spaltungen also eine langsame Abnahme an proteolytischer Aktivität vermuten. Diese sollte vergleichbar sein mit der Autolyse des Thrombins zum  $\beta$ - beziehungsweise  $\gamma$ -Thrombin.

Weiterhin konnte im Bereich der A-Kette die Bindung E<sup>312</sup>-G<sup>313</sup> als Spaltungsstelle für die MT1-MMP identifiziert werden. Das durch den Prothrombinase-Komplex aktivierte humane Thrombin ist um nur 2 Aminosäuren kürzer als dieses durch die MT1-MMP *in vitro* hergestellte Proteinfragment. Da der A-Kette des Thrombins praktisch keine Funktion bei der Substratspezifität beziehungsweise der Aktivität zugesprochen wird [22], sollte das so entstandene Fragment in seiner katalytischen Wirkung nicht von natürlich gebildetem Thrombin unterscheidbar sein. Der beim *in vivo* Prozeß normalerweise generierte N-Terminus ist ebenfalls nachweisbar und ist letztlich der Beweis dafür, daß bei dieser Aktivierung tatsächlich Thrombin gebildet wird und nicht ein aktives Fragment des Prothrombins mit amidolytischer Aktivität gegen ein synthetisches Thrombin-Substrat, das jedoch eine andere Teilsequenz aufweist als das bekannte  $\alpha$ -Thrombin. Die Identifizierung des N-Terminus T<sup>328</sup> kann als ein Nachweis von Thrombin-spezifischer Aktivität gegen makromolekulare Substrate angesehen werden. Dieser Aminoterminus wird bei der Aktivierung des Prothrombins *in vivo* durch das schon vorhandene Thrombin generiert (siehe Abschnitt 2.5.1).

Die Sequenz S<sup>199</sup>-E-G-S-S-V-N-L... wurde mehrfach, d. h. bei Fragmenten verschiedener Größe gefunden. Diese dürften vom größten nachweisbaren Fragment mit diesem N-Terminus durch schrittweise weitere Abspaltungen vom Carboxy-Terminus her entstanden sein. Es handelt sich hierbei genau um die aminoternale Sequenz des Prothrombins bzw. Meizothrombins (siehe Abbildung 6, Seite 21 und Abbildung 7, Seite 22) nach Abspaltung von Fragment 1. Ferner konnte keine Spaltstelle nachgewiesen werden, die vor dieser liegt, d. h. inmitten des als Fragment 1 bekannten Teilstückes. Dies zeigt zum Einen, daß das Fragment 1 vollständig abgespalten wird, zum Anderen, daß bereits gebildetes Thrombin bzw. Meizothrombin in einem entsprechenden Degradationsansatz maßgeblich mitverantwortlich sind für den schnellen Abbau des Prothrombins zu kleineren Fragmenten. Diese Betrachtungen sind noch einmal in Abbildung 40 zusammengefaßt.

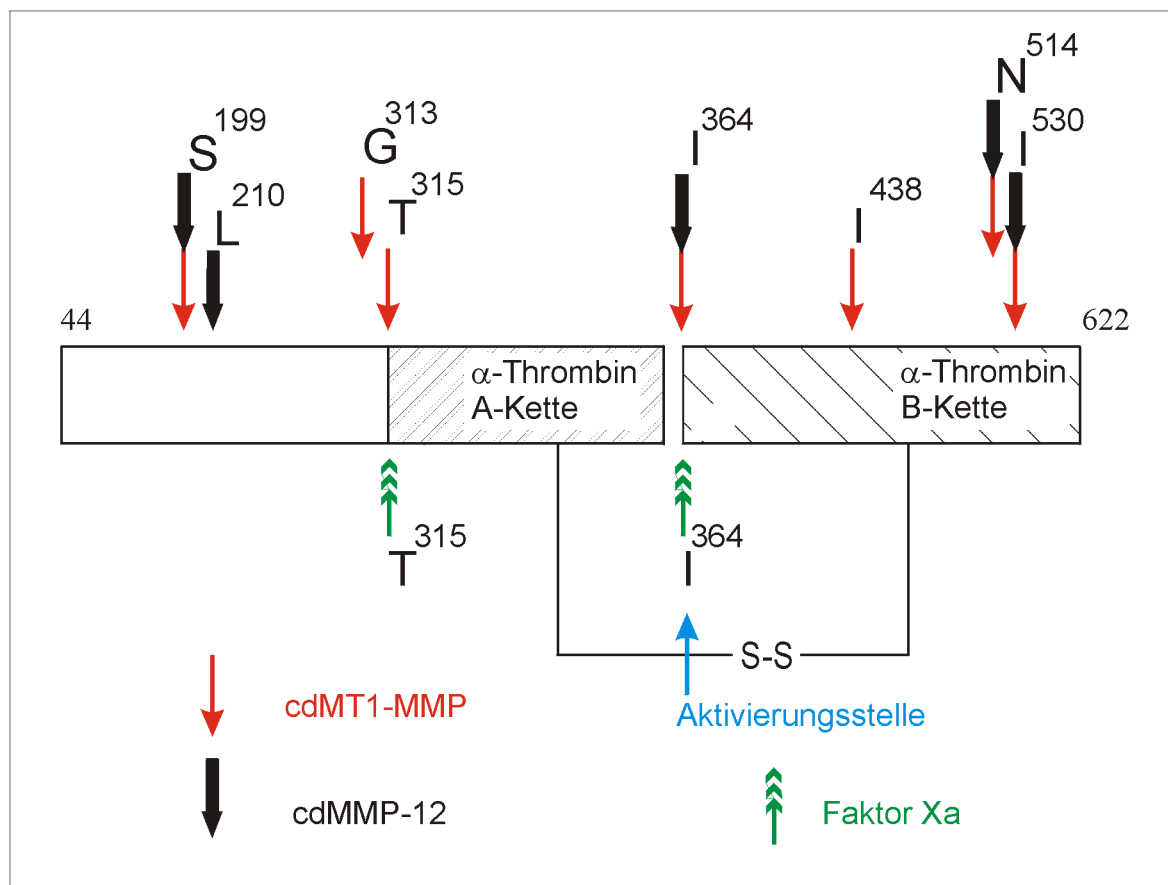


Abbildung 39: Schematische Darstellung der Prozessierung von Prothrombin durch die MT1-MMP und die MMP-12.



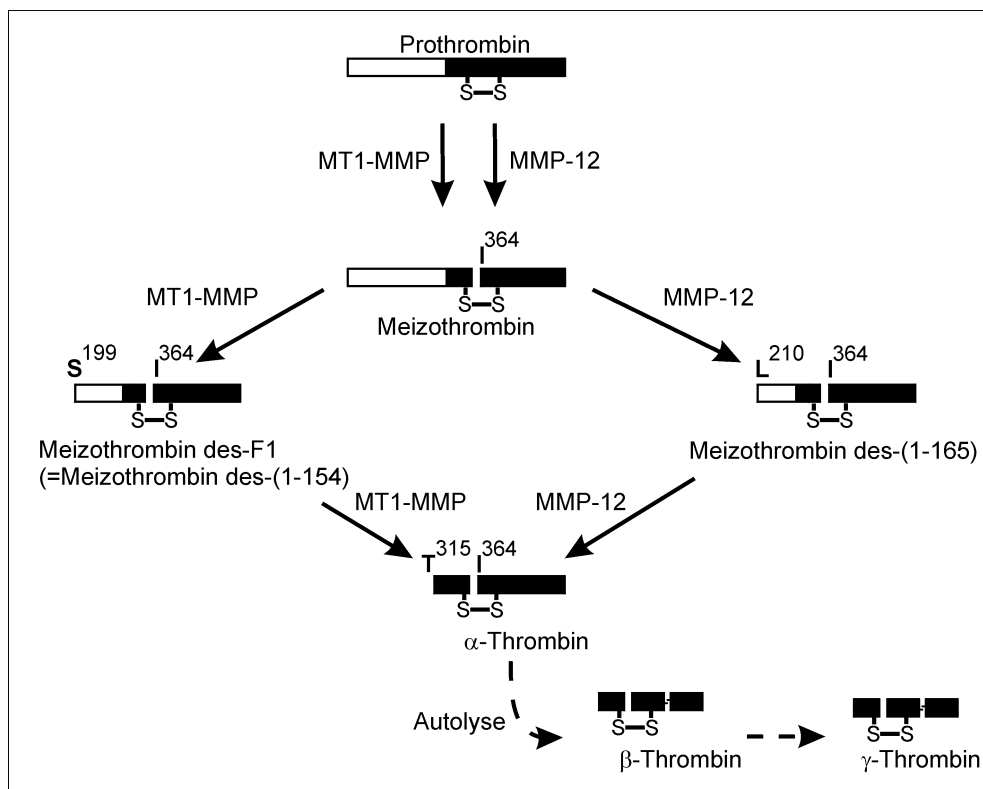
### 7.2.2 Prothrombin-Prozessierung durch die MMP-12

Es konnte bereits gezeigt werden, daß die für die katalytische Aktivität verantwortliche B-Kette des Thrombins durch MMP-12-vermittelte Degradierung des Prothrombins gebildet wird. Die A Kette wurde hier noch nicht einwandfrei identifiziert. Es ist aber wahrscheinlich, daß diese ebenfalls durch MMP-12-induzierte Proteolyse gebildet wird. Nach der natürlichen Prozessierung über die bekannte Aktivierungskaskade umfaßt die A-Kette die Reste G<sup>315</sup> bis R<sup>363</sup>. Sollte die durch MMP-12-vermittelte Prozessierung entstandene Kette von diesen Begrenzungen abweichen, so ist trotzdem nicht mit einer Veränderung der Aktivität bzw. Spezifität des so aktivierten Prothrombins zu rechnen, da die A-Kette ja hierauf keinen Einfluß hat [22].

Der Nachweis des für Thrombin-Aktivität obligatorischen Aminoterminus I<sup>364</sup>-V-E-G-S-D-A- zeigen das Vorhandensein Thrombin-spezifischer Aktivität eindeutig an. Der durch die MMP-12 gebildete N-Terminus L<sup>210</sup>-E-Q-A-V-P- konnte bei der durch die MT1-MMP induzierten Spaltung nicht nachgewiesen werden und tritt auch nicht bei der Spaltung von Faktor II durch den Prothrombinase-Komplex auf. Abbildung 40 faßt Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Prothrombin-Aktivierung durch die MT1-MMP bzw. durch die MMP-12 noch einmal zusammen.

Durch die Spaltung im Bereich des Fragment 2 (siehe Abbildung 7, Seite 22 und Abbildung 40, Seite 89) im Rahmen der MMP-12 induzierten Aktivierung sollten letztlich zwei neue Peptide entstehen, das erste umfaßt die Reste S<sup>199</sup> bis P<sup>209</sup>, das zweite die Aminosäuren L<sup>210</sup> bis R<sup>314</sup>. Es bleibt zu klären, ob diese Bruchstücke kryptische, d. h. neue, bisher unbekannte Eigenschaften besitzen.

Eine weitere sehr interessante Entdeckung ist, daß sowohl die MMP-12, als auch die MT1-MMP in der Lage sind, das Prothrombin zu spalten und auch zu aktivieren. Allerdings fehlt beiden Matrixinen die Fähigkeit, das  $\alpha$ -Thrombin zu proteolysieren. Möglicherweise sind also die im Bereich der B-Kette gefundenen Spaltungen nicht MMP-induziert, sondern autolytischer Natur. Dies gilt speziell für die Spaltungen im Bereich der sogenannten Autolyseschleife [142].



**Abbildung 40: Übersicht über die verschiedenen aktiven Stufen bei der Prothrombin-Aktivierung durch die MT1-MMP und die MMP-12.** Bei der Prozessierung des Meizothrombin des-(1-165) zum  $\alpha$ -Thrombin handelt es sich um einen potentiellen Aktivierungsschritt, da die leichte Kette des  $\alpha$ -Thrombins bei der Aktivierung durch die MMP-12 bislang nicht durch Sequenzanalysen nachgewiesen werden konnte.

Es bleibt daher zunächst offen, ob diese Spaltungen autolytisch durch das Thrombin verursacht werden, also bisher noch nicht in diesem Kontext in der Literatur zu finden sind, oder ob diese Spaltungen durch die Matrixine hervorgerufen werden.

### 7.3 Spaltung von Fibrinogen

Die Spaltung von Fibrinogen durch die MMP-8, die MMP-12 die MMP-13 und die MT1-MMP ist bereits bekannt und konnte bestätigt werden. Aufgrund der nachgewiesenen Abspaltung der RGD-Sequenzen (Adhäsionsstellen für  $\beta$ 3-Integrine an der  $\alpha$ -Kette) und der MT1-MMP-vermittelten Abspaltung des Carboxyterminus der  $\gamma$ -Kette (Thrombozyten-Bindungsregion und Fibrin-Polymerisationstelle) wurde die sich daraus ergebende Gerinnungsanomalie von MMP-behandeltem Fibrinogen untersucht. In einem Gerinnungstest nach der Methode von Clauss [124] konnte im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden, daß die Koagulation von Fibrinogen, das zuvor mit der MT1-MMP inkubiert wurde, erheblich beeinträchtigt ist. Entgegen früheren Messungen [107, 132] wurde jedoch zum Abstoppen der Fibrinogen-Degradierung nicht TIMP-2, sondern der synthetische Inhibitor Batimastat verwendet.

Der native Inhibitor der Matrixine ist für diesen Test offensichtlich nur bedingt geeignet, da TIMP-2 zwar eine sehr feste Bindung mit seinen Zielproteinasen eingeht, die Inhibierung aber sehr langsam erfolgt und somit die aufgenommenen Meßkurven beeinträchtigt. Das hier verwendete Batimastat inhibiert in dem zugesetzten 40-fachen Überschuß deutlich schneller. Die Abbildung 22 macht deutlich, daß unter den gewählten Bedingungen jede der untersuchten MMPs innerhalb von 20 Minuten eine Reduktion des funktionellen Fibrinogens auf unter 60% des Ausgangswertes bewirkt.

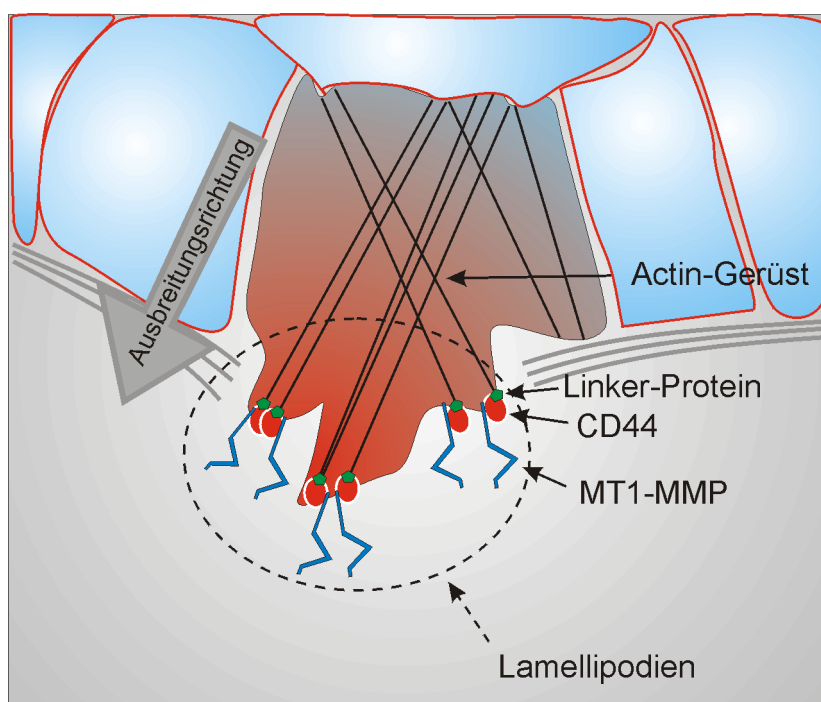
Eine interessante Erweiterung zu den bisher durchgeführten Gerinnungstests sollte die Verwendung von Blutplasma anstelle von Fibrinogenlösung darstellen. Allerdings ist die Bestimmung der Fibrin-Gerinnung stabilisierter Plasmaproben problematisch, da zumindest für die MT1-MMP in EDTA-stabilisiertem Plasma aufgrund der guten chelatisierenden Wirkung von EDTA keine Aktivität nachweisbar ist. Aus dem gleichen Grund kann auch kein Citrat-stabilisiertes Plasma verwendet werden. In Puffern mit Citrat-Konzentrationen, wie sie üblicherweise in stabilisiertem Blutplasma vorliegen, konnte eine vollständige Inaktivierung der cdMT1-MMP nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

### **7.3.1 Fibrin(ogen)-Abbau und Tumorwachstum**

Der Abbau von Fibrinogen durch vier verschiedene MMPs steht scheinbar in einem Widerspruch zu der Aktivierung von Prothrombin durch die MMP-12 und MT1-MMP. Allerdings läßt sich durch diese Ergebnisse das Tumorwachstum sehr gut begreifen: Zum Einen kann durch die Aktivierung des Prothrombins ein Fibrinmantel um den Tumor herum ausgebildet werden, der diesen dann vor der körpereigenen Immunantwort abschirmt. Zum Anderen wird der Tumor in seinem Wachstum nicht durch die ihn umgebende Fibrinhülle eingeschränkt, da die MMPs an der Kontaktstelle zwischen Tumor und Fibrinmatrix diese Barriere schwächen können. Abbildung 41 stellt diesen Zusammenhang schematisch dar.



Bei der MMP-vermittelten Generierung von Thrombin ist ein größerer Aktivitätsbereich zu erwarten, da das Thrombin nicht örtlich gebunden ist. Aufgrund der kaskadenartigen Aktivierung sollte die Konzentration des gebildeten Thrombins trotz der Diffusion in die Umgebung ausreichend hoch sein, um eine Polymerisation von Fibrin zu ermöglichen (dargestellt in Abbildung 41 oben).



**Abbildung 42:** Schematische Darstellung der Steuerung der MT1-MMP zu den Lamellipodien durch CD44-vermittelte Anheftung an das Actingerüst der Tumorzelle. Durch Lenkung des CD44 durch noch nicht aufgeklärte Wege kann über Linkerproteine eine Anheftung an das Actingerüst bei gleichzeitiger Komplexbildung mit der Hämopexin-ähnlichen Domäne der MT1-MMP erfolgen.

In dieser Arbeit wurden die katalytischen Domänen der MMPs eingesetzt, da diese einfacher rekombinant darzustellen sind und eine leichtere Handhabung besitzen als die Gesamtenzyme. Die so ermittelten Ergebnisse können nach dem derzeitigen Kenntnisstand ohne Einschränkung auf die Gesamtenzyme übertragen werden, da diese dieselben Substratspezifitäten wie die katalytischen Domänen besitzen. Bislang wurde nur eine Ausnahme zu dieser Regel gefunden. Es handelt sich hierbei um die Spaltung von tripelhelikalem Kollagen. Dieses wird nicht durch die katalytischen Domänen der MMP-8 und der MT1-MMP prozessiert, da hierzu eine Anbindung des Substrates an die Hämopexin-ähnliche Domäne erforderlich ist [144, 145]. Beim Abbau von Fibrinogen durch die Ektodomäne und die katalytische Domäne der MT1-MMP wurden Unterschiede in der Spezifität anhand der ermittelten aminoterminalen Sequenzen festgestellt [91]. Unter Berücksichtigung der Anzahl der

gefundenen Sequenzen und des komplexen Fragmentierungsmusters bei der SDS-PAGE-Analyse sind diese Ergebnisse eher eine Ergänzung zu den bisher gefundenen Spaltstellen als ein Widerspruch. Nach dem derzeitigen Kenntnisstand ist ohnehin davon auszugehen, daß *in vivo* neben dem Gesamtzym auch jeweils die katalytische Domäne präsent ist, da diese bei der MT1-MMP durch Autodegradierung freigesetzt [91], beziehungsweise bei der MMP-12 bereits im Rahmen der Aktivierung ausgelöst wird [146, 147]. Weitere Experimente haben außerdem gezeigt, daß auch die Ektodomäne der MT1-MMP in der Lage ist, Prothrombin zu aktivieren (nicht gezeigt). Diese Beobachtung befindet sich somit in völliger Übereinstimmung mit dem derzeitigen Verständnis von Aktivierung und Degradierung der Matrix Metalloproteinasen.

#### 7.4 Ausblick

Die Matrix Metalloproteinasen wurden ursprünglich als ECM-abbauende Enzymfamilie charakterisiert. Aus diesem Grunde wurde ihnen eine entscheidende Rolle bei der Tumorprogression und auch bei der Metastasierung zugesprochen. Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, daß die Matrixine in der Lage sind, auch andere Proteine als ausschließlich Komponenten der ECM zu degradieren. Die Bedeutung dieser Enzymfamilie geht damit über ihre Rolle bei Umbauprozessen, wie sie beim Wachstum, der Wundheilung und auch pathologischen Prozessen wie Tumorwachstum und Metastasierung auftreten, hinaus.

Inzwischen ist bekannt, daß Matrix Metalloproteinasen einen wesentlichen Einfluß auch auf Erkrankungen des Zentralen Nervensystems besitzen [99], sowie auf die Degradation einiger Blutplasmaproteine [84, 97, 135].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß eine Wirkung der Matrixine auf Komponenten des Hämostatischen Systems erfolgen kann. Diese ist sowohl intravasal als auch extravasal vorstellbar. Bei einer Proteolyse dieser Komponenten direkt im Gefäß ist folglich eine unmittelbare Beeinträchtigung der Hämostase möglich. Da einige Elemente der plasmatischen Gerinnung auch außerhalb der Gefäße, vornehmlich beim Tumorgeschehen, eine Rolle spielen, liefert die in dieser Arbeit gezeigte Proteolyse dieser Elemente durch MMPs möglicherweise einen wesentlichen Beitrag zur Integrität des Tumors in dem ihn umgebenden Fibrin-

Gerüst, sowie zum Tumorwachstum und der Metastasierung durch gerichtete Proteolyse und rezeptorvermittelte Ausschüttung von Wachstumsfaktoren. Somit könnten die Matrix Metalloproteinasen hier ein Bindeglied zwischen dem Krebsgeschehen und einer beeinträchtigten Hämostase darstellen, genau der Komplikation, die bei Krebspatienten am häufigsten festgestellt wird und die als zweithäufigste Todesursache bei diesen gilt [148]. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten histologischen Untersuchungen stützen eine solche Hypothese ebenso wie die nachgewiesenen erhöhten Konzentrationen der MMPs bei chronisch entzündlichen Erkrankungen sowie das Auftreten einer beeinträchtigten Hämostase bei Krebspatienten, die bisher noch nicht vollständig verstanden ist [82, 103]. Die Folge einer durch pathologische Prozesse (lokal) erhöhten Konzentration von Matrixin oder auch MMP-Substrat könnte also tatsächlich eine in ihrer Funktion beeinträchtigte Blutgerinnung beziehungsweise ein begünstigtes Tumorwachstum sein.

Es bleibt zunächst unklar, ob die Matrixine tatsächlich eine signifikante Wirkung auf den Ablauf der Blutgerinnung *in vivo* besitzen. Diese ist jedoch aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten *in vitro*-Ergebnisse durchaus vorstellbar. Weiterhin erscheint die Durchführung von Gerinnungstests als sinnvoll, in denen jeweils ein einzelner Faktor der Blutgerinnungskaskade nach Degradation durch MMPs auf seine Funktionsfähigkeit untersucht wird.

Insgesamt lässt sich eine Vielzahl von Interaktionen der Matrix Metalloproteinasen mit den Elementen des hämostatischen Systems feststellen. Die in dieser Arbeit gefundenen Erkenntnisse erlauben ein besseres Verständnis der Prozesse beim Krebsgeschehen, zumal inzwischen auch nicht mehr nur MMP-Inhibitoren als Krebsmedikamente zum Einsatz kommen, sondern auch Hemmstoffe der Blutgerinnung als Medikamente in der Krebstherapie eingesetzt werden. [58]. Sollten die in dieser Arbeit aufgezeigten Hinweise auf eine Beteiligung der MMPs an der Blutgerinnung durch weitere Untersuchungen bestätigt werden, so müssten die derzeit gebräuchlichen Strategien zur Therapie von Gerinnungsanomalien überdacht werden. Beispielsweise könnten bei einer erhöhten Thrombinaktivität den Medikamenten auch spezifische MMP-Inhibitoren zugesetzt werden. Eine interessante Fragestellung, die sich im Zusammenhang mit der Degradation von

Plasmaproteinen durch MMPs ergibt, ist die Freisetzung von ursprünglich im Protein vorhandener kryptischer Aktivität, die in den Fragmenten zur Freisetzung gelangt. So wie eine solche Generierung von Proteinfragmenten mit neuen, bis dahin unbekanntem Eigenschaften auch schon z. B. von der Degradation des Fibronektins oder auch des Plasmins bekannt ist, könnte auch bei den in dieser Arbeit beschriebenen Degradierungen eine Freisetzung kryptischer Fragmente erfolgen. Der Effekt solcher Fragmente auf Zellen könnte in entsprechenden Tests untersucht werden.



## 8 Literatur

- [1] Greiling,H. & Gressner,A.M. (1987): *Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie*. Schattauer Verlag: Stuttgart, New York, 716-765.
- [2] Vossschulte,K., Lasch,H.G. & Heinrich,F. (1979): *Innere Medizin und Chirurgie*. Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York, 221-226.
- [3] Löffler,G. (1994): *Funktionelle Biochemie*. Springer Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, 403-409.
- [4] Jungermann,K. & Möhler,H. (1980): *Biochemie*. Springer Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, 224.
- [5] Delvos,U. & Müller-Berghaus,G. (1985): Die Regulation der Blutgerinnung. *Naturwissenschaften*, **72**, 461-469.
- [6] Lehninger,A.L., Nelson,D.L. & Cox,M.M. (1994): *Prinzipien der Biochemie*. Spektrum Verlag: Heidelberg, Berlin, Oxford, 270-272.
- [7] Butenas,S. & Mann,K.G. (2002): Blood coagulation. *Biochemistry (Mosc.)*, **67**, 3-12.
- [8] Cool,D.E., Edgell,C.-J.S., Louie,G.V., Zoller,M.J., Brayer,G.D. & MacGillivray,R.T.A. (1985): Characterization of human blood coagulation factor XII cDNA. *Journal of Biological Chemistry*, **260**, 13666-13676.
- [9] Rosing,J., Tans,G., Govers-Riemslog,J.W.P., Zwaal,R.F.A. & Hemker,H.C. (1980): The role of phospholipids and factor Va in the prothrombinase complex. *Journal of Biological Chemistry*, **255**, 274-283.
- [10] Van Rijn,J.L.M.L., Govers-Riemslog,J.W.P., Zwaal,R.F.A. & Rosing,J. (1984): Kinetic studies of prothrombin activation: effect of factor Va and phospholipids on the formation of the enzyme-substrate complex. *Biochemistry*, **23**, 4557-4564.

- [11] Petersen,T.E., Martzen,M.R., Ichinose,A. & Davie,E.W. (1990): Characterization of the gene for human plasminogen, a key proenzyme in the fibrinolytic system. *Journal of Biological Chemistry*, **265**, 6104-6111.
- [12] Huang,C., Wong,G.W., Ghildyal,N., Gurish,M.F., Sali,A., Matsumoto,R., Qiu,W.T. & Stevens,R.L. (1998): The tryptase, mouse mast cell protease 7, exhibits anticoagulant activity *in vivo* and *in vitro* due to its ability to degrade fibrinogen in the presence of the diverse array of protease inhibitors in plasma. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 31885-31893.
- [13] Rock,G. & Wells,P. (1997): New concepts in coagulation. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, **34**, 475-501.
- [14] Stryer,L. (1990): *Biochemie*. Spektrum Verlag: Heidelberg, Berlin, 231-240.
- [15] Birktoft,J.J. & Blow,D.M. (1972): Structure of crystalline  $\alpha$ -chymotrypsin. V. The atomic structure of tosyl- $\alpha$ -chymotrypsin at 2 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, **68**, 187-240.
- [16] Freer,S.T., Kraut,J., Robertus,J.D., Wright,H.T. & Xuong,N.H. (1970): Chymotrypsinogen: 2.5-angstrom crystal structure, comparison with alpha-chymotrypsin, and implications for zymogen activation. *Biochemistry*, **9**, 1997-2009.
- [17] Bode,W., Schwager,P. & Huber,R. (1978): The transition of bovine trypsinogen to a trypsin-like state upon strong ligand binding. The refined crystal structures of the bovine trypsinogen-pancreatic trypsin inhibitor complex and of its ternary complex with Ile-Val at 1.9 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, **118**, 99-112.
- [18] Smirnova,I.V., Salazar,A., Arnold,P.M., Glatt,S., Handler,M. & Festoff,B.W. (1997): Thrombin and its precursor in human cerebrospinal fluid. *Thrombosis and Haemostasis*, **78**, 1473-1479.

- [19] Rabiet,M.J., Blashill,A., Furie,B. & Furie,B.C. (1986): Prothrombin fragment 1·2·3, a major product of prothrombin activation in human plasma. *Journal of Biological Chemistry*, **261**, 13210-13215.
- [20] Rosing,J., Tans,G., Govers-Riemslog,J.W.P., Zwaal,R.F.A. & Hemker,H.C. (1980): The role of phospholipids and factor Va in the prothrombinase complex. *Journal of Biological Chemistry*, **255**, 274-283.
- [21] Rosing,J., Zwaal,R.F. & Tans,G. (1986): Formation of meizothrombin as intermediate in factor Xa-catalyzed prothrombin activation. *Journal of Biological Chemistry*, **261**, 4224-4228.
- [22] Bode,W., Turk,D. & Karshikov,A. (1992): The refined 1.9-A X-ray crystal structure of D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone-inhibited human alpha-thrombin: structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure-function relationships. *Protein Science*, **1**, 426-471.
- [23] Govers-Riemslog,J.W., Johnsen,L., Petrovan,R.J., Rosing,J. & Tans,G. (1998): A kinetic assay to determine prothrombin binding to membranes. *Thrombosis Research*, **92**, 239-247.
- [24] Doyle,M.F. & Mann,K.G. (1990): Multiple active forms of thrombin. IV. Relative activities of meizothrombins. *Journal of Biological Chemistry*, **265**, 10693-10701.
- [25] Esmon,C.T., Owen,W.G. & Jackson,C.M. (1974): The conversion of prothrombin to thrombin. II. Differentiation between thrombin- and factor Xa-catalyzed proteolyses. *Journal of Biological Chemistry*, **249**, 606-611.
- [26] Boissel,J.P., Le Bonniec,B., Rabiet,M.J., Labie,D. & Elion,J. (1984): Covalent structures of beta and gamma autolytic derivatives of human alpha-thrombin. *Journal of Biological Chemistry*, **259**, 5691-5697.

- [27] Elion,J., Boissel,J.P., Le Bonniec,B., Bezeaud,A., Jandrot-Perrus,M., Rabet,M.J. & Guillin,M.C. (1986): Proteolytic derivatives of thrombin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **485**, 16-26.
- [28] Hofsteenge,J., Braun,P.J. & Stone,S.R. (1988): Enzymatic properties of proteolytic derivatives of human alpha-thrombin. *Biochemistry*, **27**, 2144-2151.
- [29] Gettins,P.G.W., Patston,P.A. & Olson,S.T. (1996): *Serpins: Structure, function and biology*. Springer Verlag: Heidelberg, 65-110.
- [30] Bode,W., Brandstetter,H., Mather,T. & Stubbs,M.T. (1997): Comparative analysis of haemostatic proteinases: Structural aspects of Thrombin, Factor Xa, Factor IXa and Protein C. *Thrombosis and Haemostasis*, **78**, 501-511.
- [31] Kahn,M.L., Nakanishi-Matsui,M., Shapiro,M.J., Ishihara,H. & Coughlin,S.R. (1999): Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *Journal of Clinical Investigation*, **103**, 879-887.
- [32] Kranzhofer,R., Clinton,S.K., Ishii,K., Coughlin,S.R., Fenton,J.W. & Libby,P. (1996): Thrombin potently stimulates cytokine production in human vascular smooth muscle cells but not in mononuclear phagocytes. *Circulation Research*, **79**, 286-294.
- [33] Hamilton,J.R., Nguyen,P.B. & Cocks,T.M. (1998): Atypical protease-activated receptor mediates endothelium-dependent relaxation of human coronary arteries. *Circulation Research*, **82**, 1306-1311.
- [34] Dabbagh,K., Laurent,G.J., McAnulty,R.J. & Chambers,R.C. (1998): Thrombin stimulates smooth muscle cell procollagen synthesis and mRNA levels via a PAR-1 mediated mechanism. *Thrombosis and Haemostasis*, **79**, 405-409.

- [35] Chambers,R.C., Dabbagh,K., McAnulty,R.J., Gray,A.J., Blanc-Brude,O.P. & Laurent,G.J. (1998): Thrombin stimulates fibroblast procollagen production via proteolytic activation of protease-activated receptor 1. *Biochemical Journal*, **333**, 121-127.
- [36] Rottingen,J.A., Camerer,E., Mathiesen,I., Prydz,H. & Iversen,J.G. (1997): Synchronized  $Ca^{2+}$  oscillations induced in Madin Darby canine kidney cells by bradykinin and thrombin but not by ATP. *Cell Calcium*, **21**, 195-211.
- [37] Smirnova,I.V., Zhang,S.X., Citron,B.A., Arnold,P.M. & Festoff,B.W. (1998): Thrombin is an extracellular signal that activates intracellular death protease pathways inducing apoptosis in model motor neurons. *Journal of Neurobiology*, **36**, 64-80.
- [38] Lafay,M., Laguna,R., Le Bonniec,B.F., Lasne,D., Aiach,M. & Rendu,F. (1998): Thrombomodulin modulates the mitogenic response to thrombin of human umbilical vein endothelial cells. *Thrombosis and Haemostasis*, **79**, 848-852.
- [39] Stouffer,G.A. & Runge,M.S. (1998): The role of secondary growth factor production in thrombin-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, **24**, 145-150.
- [40] Xu,W.F., Andersen,H., Whitmore,T.E., Presnell,S.R., Yee,D.P., Ching,A., Gilbert,T., Davie,E.W. & Foster,D.C. (1998): Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 6642-6646.
- [41] Ishihara,H., Connolly,A.J., Zeng,D., Kahn,M.L., Zheng,Y.W., Timmons,C., Tram,T. & Coughlin,S.R. (1997): Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature*, **386**, 502-506.
- [42] Dáry,O. & Bunnett,N.W. (1999): Proteinase-activated receptors: a growing family of heptahelical receptors for thrombin, trypsin and tryptase. *Biochemical Society Transactions*, **27**, 246-254.

- [43] Vu,T.K., Hung,D.T., Wheaton,V.I. & Coughlin,S.R. (1991): Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*, **64**, 1057-1068.
- [44] Schmidt,V.A., Nierman,W.C., Maglott,D.R., Cupit,L.D., Moskowitz,K.A., Wainer,J.A. & Bahou,W.F. (1998): The human proteinase-activated receptor-3 (PAR-3) gene. Identification within a Par gene cluster and characterization in vascular endothelial cells and platelets. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 15061-15068.
- [45] Hou,L., Ravenall,S., Macey,M.G., Harriott,P., Kapas,S. & Howells,G.L. (1998): Protease-activated receptors and their role in IL-6 and NF-IL-6 expression in human gingival fibroblasts. *Journal of Periodontal Research*, **33**, 205-211.
- [46] Naldini,A., Sower,L., Bocci,V., Meyers,B. & Carney,D.H. (1998): Thrombin receptor expression and responsiveness of human monocytic cells to thrombin is linked to interferon-induced cellular differentiation. *Journal of Cellular Physiology*, **177**, 76-84.
- [47] Tordai,A., Fenton,J.W., Andersen,T. & Gelfand,E.W. (1993): Functional thrombin receptors on human T lymphoblastoid cells. *Journal of Immunology*, **150**, 4876-4886.
- [48] Smirnova,I.V., Vamos,S., Wiegmann,T., Citron,B.A., Arnold,P.M. & Festoff,B.W. (1998): Calcium mobilization and protease-activated receptor cleavage after thrombin stimulation in motor neurons. *Journal of Molecular Neuroscience*, **10**, 31-44.
- [49] Nierodzik,M.L., Chen,K., Takeshita,K., Li,J.J., Huang,Y.Q., Feng,X.S., D'Andrea,M.R., Andrade-Gordon,P. & Karpatkin,S. (1998): Protease-activated receptor 1 (PAR-1) is required and rate-limiting for thrombin-enhanced experimental pulmonary metastasis. *Blood*, **92**, 3694-3700.

- [50] Cirino,G., Cicala,C., Bucci,M.R., Sorrentino,L., Maraganore,J.M. & Stone,S.R. (1996): Thrombin functions as an inflammatory mediator through activation of its receptor. *Journal of Experimental Medicine*, **183**, 821-827.
- [51] Muramatsu,I., Laniyonu,A., Moore,G.J. & Hollenberg,M.D. (1992): Vascular actions of thrombin receptor peptide. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, **70**, 996-1003.
- [52] Rabiet,M.J., Plantier,J.L., Rival,Y., Genoux,Y., Lampugnani,M.G. & Dejana,E. (1996): Thrombin-induced increase in endothelial permeability is associated with changes in cell-to-cell junction organization. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **16**, 488-496.
- [53] Ellis,C.A., Tirupathi,C., Sandoval,R., Niles,W.D. & Malik,A.B. (1999): Time course of recovery of endothelial cell surface thrombin receptor (PAR-1) expression. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, **276**, C38-C45.
- [54] Maragoudakis,M.E., Tsopanoglou,N.E., Andriopoulou,P. & Maragoudakis,M.M. (2000): Effects of thrombin/thrombosis in angiogenesis and tumour progression. *Matrix Biology*, **19**, 345-351.
- [55] Tsopanoglou,N.E. & Maragoudakis,M.E. (1999): On the mechanism of thrombin-induced angiogenesis. Potentiation of vascular endothelial growth factor activity on endothelial cells by up-regulation of its receptors. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 23969-23976.
- [56] Tsopanoglou,N.E., Pipili-Synetos,E. & Maragoudakis,M.E. (1993): Thrombin promotes angiogenesis by a mechanism independent of fibrin formation. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, **264**, C1302-C1307.
- [57] Walz,D.A. & Fenton,J.W. (1994): The role of thrombin in tumor cell metastasis. *Invasion and Metastasis*, **14**, 303-308.

- [58] Zacharski,L.R., Costantini,V., Wojtukiewicz,M.Z., Memoli,V.A. & Kudryk,B.J. (1990): Anticoagulants as cancer therapy. *Seminars in Oncology*, **17**, 217-227.
- [59] Belloni,P.N., Carney,D.H. & Nicolson,G.L. (1992): Organ-derived microvessel endothelial cells exhibit differential responsiveness to thrombin and other growth factors. *Microvascular Research*, **43**, 20-45.
- [60] Herbert,J.M., Dupuy,E., Laplace,M.C., Zini,J.M., Bar,S.R. & Tobelem,G. (1994): Thrombin induces endothelial cell growth via both a proteolytic and a non-proteolytic pathway. *Biochemical Journal*, **303**, 227-231.
- [61] Schaeffer,P., Riera,E., Dupuy,E. & Herbert,J.M. (1997): Nonproteolytic activation of the thrombin receptor promotes human umbilical vein endothelial cell growth but not intracellular  $Ca^{2+}$ , prostacyclin, or permeability. *Biochemical Pharmacology* , **53**, 487-491.
- [62] Ollivier,V., Chabbat,J., Herbert,J.M., Hakim,J. & de Prost,D. (2000): Vascular endothelial growth factor production by fibroblasts in response to factor VIIa binding to tissue factor involves thrombin and factor Xa. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **20**, 1374-1381.
- [63] Mohle,R., Green,D., Moore,M.A., Nachman,R.L. & Rafii,S. (1997): Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 663-668.
- [64] Benezra,M., Vlodaysky,I., Ishai-Michaeli,R., Neufeld,G. & Bar-Shavit,R. (1993): Thrombin-induced release of active basic fibroblast growth factor-heparan sulfate complexes from subendothelial extracellular matrix. *Blood*, **81**, 3324-3331.
- [65] Lee,T.H., Rhim,T. & Kim,S.S. (1998): Prothrombin kringle-2 domain has a growth inhibitory activity against basic fibroblast growth factor-stimulated capillary endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 28805-28812.



- [66] Rhim,T.Y., Park,C.S., Kim,E. & Kim,S.S. (1998): Human prothrombin fragment 1 and 2 inhibit bFGF-induced BCE cell growth. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **252**, 513-516.
- [67] O'Reilly,M.S., Pirie-Shepherd,S., Lane,W.S. & Folkman,J. (1999): Antiangiogenic activity of the cleaved conformation of the serpin antithrombin. *Science*, **285**, 1926-1928.
- [68] Zucker,S., Mirza,H., Conner,C.E., Lorenz,A.F., Drews,M.H., Bahou,W.F. & Jesty,J. (1998): Vascular endothelial growth factor induces tissue factor and matrix metalloproteinase production in endothelial cells: Conversion of prothrombin to thrombin results in progelatinase A activation and cell proliferation. *International Journal of Cancer*, **75**, 780-786.
- [69] Zucker,S., Conner,C.E., DiMassmo,B.I., Ende,H., Drews,M.H., Seiki,M. & Bahou,W.F. (1995): Thrombin induces the Activation of Progelatinase A in Vascular Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 23730-23738.
- [70] Dvorak,H.F., Harvey,V.S., Estrella,P., Brown,L.F., Mcdonagh,J. & Dvorak,A.M. (1987): Fibrin containing gels induce angiogenesis. Implications for tumor stroma generation and wound healing. *Laboratory Investigation*, **57**, 673-686.
- [71] Qi,J., Goralnick,S. & Kreutzer,D.L. (1997): Fibrin regulation of interleukin-8 gene expression in human vascular endothelial cells. *Blood*, **90**, 3595-3602.
- [72] Brooks,P.C., Montgomery,A.M., Rosenfeld,M., Reifeld,R.A., Hu,T., Klier,G. & Cheresch,D.A. (1994): Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell*, **79**, 1157-1164.
- [73] Wojtukiewicz,M.Z., Sierko,E., Klement,P. & Rak,J. (2001): The hemostatic system and angiogenesis in malignancy. *Neoplasia*, **3**, 371-384.

- [74] Murphy,G., Knäuper,V., Cowell,S., Hembry,R., Stanton,H., Butler,G., Freije,J., Pendas,A.M. & Lopez-Otin,C. (1999): Evaluation of some newer matrix metalloproteinases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **878**, 25-39.
- [75] O'Reilly,M.S., Holmgren,L., Shing,Y., Chen,C., Rosenthal,R.A., Moses,M., 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**, 315-328.
- [76] Moser,T.L., Stack,M.S., Wahl,M.L. & Pizzo,S.V. (2002): The mechanism of action of angiostatin: can you teach an old dog new tricks? *Thrombosis and Haemostasis*, **87**, 394-401.
- [77] McMullen,B.A. & Fujikawa,K. (1985): Amino acid sequence of the heavy chain of human  $\alpha$ -factor XIIa (activated Hagemann factor). *Journal of Biological Chemistry*, **260**, 5328-5338.
- [78] Fujikawa,K. & McMullen,B.A. (1983): Amino acid sequence of human  $\beta$ -factor XIIa. *Journal of Biological Chemistry*, **258**, 10924-10933.
- [79] Gollwitzer,R. & Bode,W. (1986): X-Ray crystallographic and biochemical characterization of single crystals formed by proteolytically modified human fibrinogen. *European Journal of Biochemistry* , **154**, 437-443.
- [80] Blombäck,B., Hessel,B., Hogg,D. & Therkildsen,L. (1978): A two-step fibrinogen-fibrin transition in blood coagulation. *Nature*, **275**, 501-505.
- [81] Doolittle,R.F. (1984): Fibrinogen and fibrin. *Annual Review of Biochemistry*, **53**, 193-229.
- [82] Dvorak,H.F. (1986): Tumors: Wounds that do not heal. *New England Journal of Medicine*, **315**, 1650-1659.
- [83] Dvorak,H.F., Senger,D.R. & Dvorak,A.M. (1983): Fibrin as a component of the tumor stroma: origins and biological significance. *Cancer and Metastasis Review*, **2**, 41-73.

- [84] Sternlicht,M.D. & Werb,Z. (2001): How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **17**, 463-516.
- [85] Massova,I., Kotra,L.P., Fridman,R. & Mobashery,S. (1998): Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB Journal*, **12**, 1075-1095.
- [86] Gomez,D.E., Alonso,D.F., Yoshiji,H. & Thorgeirsson,U.P. (1997): Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *European Journal of Cell Biology*, **74**, 111-122.
- [87] Singer,C.F., Kronsteiner,N., Marton,E., Kubista,M., Cullen,K.J., Hirtenlehner,K., Seifert,M. & Kubista,E. (2002): MMP-2 and MMP-9 expression in breast cancer-derived human fibroblasts is differentially regulated by stromal-epithelial interactions. *Breast Cancer Research and Treatment*, **72**, 69-77.
- [88] Sternlicht,M.D. & Bergers,G. (2000): Matrix Metalloproteinases as emerging targets in anticancer therapy: status and prospects. *Emerging Therapeutic Targets*, **4**, 609-633.
- [89] Behrens,P., Rothe,M., Wellmann,A., Krischler,J. & Wernert,N. (2001): The Ets-1 transcription factor is up-regulated together with MMP 1 and MMP 9 in the stroma of pre-invasive breast cancer. *Journal of Pathology*, **194**, 43-50.
- [90] Bloomston,M., Shafii,A., Zervos,E.E., Rojiani,A. & Rosemurgy,A.S. (2002): MMP-2 and TIMP-1 are derived from, not in response to, pancreatic cancer. *Journal of Surgical Research*, **102**, 35-38.
- [91] Roderfeld,M. (2001). Klonierung, Expression und Charakterisierung der Ektodomäne der MT1-MMP. Universität Bielefeld. Dissertation.
- [92] Cleutjens,J.P. (1996): The role of matrix metalloproteinases in heart disease. *Cardiovascular Research*, **32**, 816-821.

- [93] Libby,P., Schoenbeck,U., Mach,F., Selwyn,A.P. & Ganz,P. (1998): Current concepts in cardiovascular pathology: the role of LDL cholesterol in plaque rupture and stabilization. *American Journal of Medicine*, **104**, 14S-18S.
- [94] Arthur,M.J. (1997): Matrix degradation in liver: a role in injury and repair. *Hepatology*, **26**, 1069-1071.
- [95] Thompson,R.W. & Parks,W.C. (1996): Role of matrix metalloproteinases in abdominal aortic aneurysms. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **800**, 157-174.
- [96] Tyagi,S.C., Kumar,S., Voelker,D.J., Reddy,H.K., Janicki,J.S. & Curtis,J.J. (1996): Differential gene expression of extracellular matrix components in dilated cardiomyopathy. *Journal of Cell Biology*, **63**, 185-198.
- [97] Knäuper,V., Reinke,H. & Tschesche,H. (1990): Inactivation of human plasma  $\alpha_1$ -proteinase-inhibitor by human PMN leucocyte collagenase. *FEBS Letters*, **263**, 355-357.
- [98] Bini,A., Itoh,Y., Kudryk,B.J. & Nagase,H. (1996): Degradation of cross-linked fibrin by matrix metalloproteinase 3 (Stromelysin 1): Hydrolysis of the  $\gamma$  Gly 404-Ala 405 peptide bond. *Biochemistry*, **35**, 13056-13063.
- [99] Yong,V.W., Krekoski,C.A., Forsyth,P.A., Bell,R. & Edwards,D.R. (1998): Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. *Trends in Neurosciences*, **21**, 75-80.
- [100] Chandler,S., Miller,K.M., Clements,J.M., Lury,J., Corkill,D., Anthony,D.C., Adams,S.E. & Gearing,A.J. (1997): Matrix metalloproteinases, tumor necrosis factor and multiple sclerosis: an overview. *Journal of Neuroimmunology*, **72**, 155-161.
- [101] Evans,T.R., Mansi,J.L. & Bevan,D.H. (1996): Trousseau's syndrome in association with ovarian carcinoma. *Cancer*, **77**, 2544-2549.

- [102] Valente,M. & Ponte,E. (2000): Thrombosis and cancer. *Minerva Cardioangiologica*, **48**, 117-127.
- [103] Wojtukiewicz,M.Z., Rucinska,M., Zacharski,L.R., Kozlowski,L., Zimnoch,L., Piotrowski,Z., Kudryk,B.J. & Kisiel,W. (2001): Localization of blood coagulation factors in situ in pancreatic carcinoma. *Thrombosis and Haemostasis*, **86**, 1416-1420.
- [104] Sudhoff,T. & Schneider,W. (1992): Fibrinolytic mechanisms in tumor growth and spreading. *Journal of Clinical Investigation*, **70**, 631-636.
- [105] Bussey,H. (2002): Traditional anticoagulant therapy: why abandon half a century of success? *American Journal of Health-System Pharmacy*, **59**, S3-S6.
- [106] Prandoni,P., Lensing,A.W., Piccioli,A., Bernardi,E., Simioni,P., Girolami,B., Marchiori,A., Sabbion,P., Prins,M.H., Noventa,F. & Girolami,A. (2002): Recurrent venous thromboembolism and bleeding complications during anticoagulant treatment in patients with cancer and venous thrombosis. *Blood*, **100**, 3484-3488.
- [107] Hiller,O. (1998). Proteolyse von Blutplasmaproteinen durch Matrixmetalloproteinasen und Identifizierung der erzeugten Spaltprodukte. Universität Bielefeld. Diplomarbeit.
- [108] Weber,K. & Osborn,M. (1969): The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry*, **244**, 4406-4412.
- [109] Rehm,H. (1997): *Der Experimentator: Proteinbiochemie*. G. Fischer: Stuttgart; Jena; Lübeck; Ulm
- [110] Laemmli,U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

- [111] Hardy,E., Santana,H., Sosa,A., Hernandez,L., Fernandez-Patron,C. & Castellanos-Serra,L. (1996): Recovery of biologically active proteins detected with imidazole-sodium dodecyl sulfate-zinc (reverse stain) on sodium dodecyl sulfate gels. *Analytical Biochemistry*, **240**, 150-152.
- [112] Schoenle,E.J., Adams,L.D., Sammons,D.W. & Abrahams,J.P. (1984): Insulin-induced rapid decrease of a major protein in fat cell plasma membranes. *Journal of Biological Chemistry*, **259**, 12112-12115.
- [113] Heukeshoven,J. & Dernick,R. (1988): Improved silver stain procedure for fast staining in Phastsystem development unit; staining of sodium dodecylsulfate gels. *Electrophoresis*, **9**, 28-32.
- [114] Maurer,H. (1971): *Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis*. Walter de Gruyter: Berlin, New York, 32-34.
- [115] Matsudaira,P. (1987): Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *Journal of Biological Chemistry*, **262**, 10035-10038.
- [116] Blake,M.S., Johnston,K.H., Russell-Jones,G.J. & Gotschlich,E.C. (1984): A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Analytical Biochemistry*, **136**, 175-179.
- [117] Edman,P. & Begg,G. (1967): A protein sequenator. *European Journal of Biochemistry*, **1**, 80-91.
- [118] Fischer,P. (1992): 25 Jahre automatisierte Proteinsequenzierung. *Nachrichten aus Chemie, Technik und Laboratorium*, **40**, 963-971.
- [119] Cleland,W.W. (1964): Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. *Biochemistry*, **3**, 480-482.
- [120] Ruegg,U.T. & Rudinger,J. (1977): Reductive cleavage of cystine disulfides with tributylphosphine. *Methods in Enzymology*, **47**, 111-116.

- [121] Cunico,R.L., Gooding,K.M. & Wehr,T. (1998): *Basic HPLC and CE of Biomolecules*. Bay Bioanalytical Laboratory: Richmond
- [122] Aguilar,M. & Hearn,M. (1996): High resolution reversed-phase high-performance liquid chromatography of peptides and proteins. *Methods in Enzymology*, **270**, 3-26.
- [123] Masui,Y., Takeomoto,T., Sakabira,S., Hori,H. & Nagai,Y. (1977): Synthetic substrate for vertebrate collagenase. *Biochemical Medicine*, **17**, 215-221.
- [124] Clauss,A. (1957): Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. *Acta Haematologica*, **17**, 237-246.
- [125] Knäuper,V., Reinke,H. & Tschesche,H. (1990): Inactivation of human plasma  $\alpha_1$ -proteinase-inhibitor by human PMN leucocyte collagenase. *FEBS Letters*, **263**, 355-357.
- [126] 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). *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **477**, 217-228.
- [127] Kocourek,A. (2002). Darstellung und Charakterisierung der katalytischen Domäne der humanen Makrophagenelastase. Universität Bielefeld. Dissertation.
- [128] Oberpichler,A. (1999). Klonierung, Expression und Charakterisierung verschiedener Varianten der Kollagenase-3 und Untersuchung des Einflusses der Hämodialyse auf Plasmaproteine. Universität Bielefeld. Dissertation.
- [129] Petrovan,R.J., Govers-Riemslog,J.W., Nowak,G., Hemker,H.C., Tans,G. & Rosing,J. (1998): Autocatalytic peptide bond cleavages in prothrombin and meizothrombin. *Biochemistry*, **37**, 1185-1191.
- [130] Nagase,H. & Woessner,J.F., Jr. (1999): Matrix Metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 21491-21494.

- [131] Bini,A., Wu,D., Schnuer,J. & Kudryk,B.J. (1999): Characterization of stromelysin 1 (MMP-3), matrilysin (MMP-7), and membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) derived fibrin(ogen) fragments D-dimer and D-like monomer: NH<sub>2</sub>-terminal sequences of late-stage digest fragments. *Biochemistry*, **38**, 13928-13936.
- [132] 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. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 33008-33013.
- [133] Hibbs,M.S., Hasty,K.A., Seyer,J.M., Kang,A.H. & Mainardi,C.L. (1985): Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. *Journal of Biological Chemistry*, **260**, 2493-2500.
- [134] Lewalle,J.M., Munaut,C., Pichot,B., Cataldo,D., Baramova,E. & Foidart,J.M. (1995): Plasma membrane-dependent activation of gelatinase A in human vascular endothelial cells. *Journal of Cellular Physiology*, **165**, 475-483.
- [135] Lichte,A. (1997). Klonierung, Expression und biochemische Charakterisierung verschiedener Varianten der MT1-MMP. Universität Bielefeld. Dissertation.
- [136] Lijnen,H.R., Ugwu,F., Rio,M.C. & Collen,D. (1998): Plasminogen/plasmin and matrix metalloproteinase system function in mice with targeted inactivation of stromelysin-3 (MMP-11). *Fibrinolysis and Proteolysis*, **12**, 155-164.
- [137] Patterson,B.C. & Sang,Q.A. (1997): Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase b/type IV collagenase (MMP-9). *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 28823-28825.
- [138] Dvorak,H.F. (1987): Thrombosis and cancer. *Human Pathology*, **18**, 275-284.



- [139] Schnepel,J., Unger,J. & Tschesche,H. (2001): Recombinant cryptic human fibronectinase cleaves actin and myosin: substrate specificity and possible role in muscular dystrophy. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, **382**, 1707-1714.
- [140] Abad,M.C., Arni,R.K., Grella,D.K., Castellino,F.J., Tulinsky,A. & Geiger,J.H. (2002): The X-ray Crystallographic Structure of the Angiogenesis Inhibitor Angiostatin. *Journal of Molecular Biology*, **318**, 1009-1017.
- [141] Toth,M., Bernardo,M.M., Gervasi,D.C., Soloway,P.D., Wang,Z., Bigg,H.F., Overall,C.M., DeClerck,Y.A., Tschesche,H., Cher,M.L., Brown,S., Mobashery,S. & Fridman,R. (2000): Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 acts synergistically with synthetic matrix metalloproteinase (MMP) inhibitors but not with TIMP-4 to enhance the (Membrane type 1)-MMP-dependent activation of pro-MMP-2. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 41415-41423.
- [142] Rydel,T.J., Yin,M., Padmanabhan,K.P., Blankenship,D.T., Cardin,A.D., Correa,P.E., Fenton,J.W. & Tulinsky,A. (1994): Crystallographic structure of human gamma-thrombin. *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 22000-22006.
- [143] Mori,H., Tomari,T., Koshikawa,N., Kajita,M., Itoh,Y., Sato,H., Tojo,H., Yana,I. & Seiki,M. (2002): CD44 directs membrane-type 1 matrix metalloproteinase to lamellipodia by associating with its hemopexin-like domain. *EMBO Journal*, **21**, 3949-3959.
- [144] Schnierer,S., Kleine,T., Gote,T., Hillemann,A., Knäuper,V. & Tschesche,H. (1993): The recombinant catalytic domain of human neutrophil collagenase lacks type I collagen substrate specificity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **191**, 319-326.

- [145] D'Ortho,M.P., Will,H., Atkinson,S., Butler,G., Messent,A., Gavrilovic,J., Smith,B., Timpl,R., Zardi,L. & Murphy,G. (1997): Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases. *European Journal of Biochemistry*, **250**, 751-757.
- [146] 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. *Journal of Biological Chemistry*, **267**, 4664-4671.
- [147] Shapiro,S.D., Kobayashi,D.K. & Ley,T.J. (1993): Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, **268**, 23824-23829.
- [148] Wojtukiewicz,M.Z., Rucinska,M., Zimnoch,L., Jaromin,J., Piotrowski,Z., Rózanska-Kudelska,M., Kisiel,W. & Kudryk,B.J. (2000): Expression of prothrombin fragment 1+2 in cancer tissue as an indicator of local activation of blood coagulation. *Thrombosis Research*, **97**, 335-342.

## 9 Anhang

### Lebenslauf

Oliver Hiller  
 Regenpfeiferweg 17  
 33335 Gütersloh  
 Tel.: 05209/4856  
 Email: ohiller@uni-bielefeld.de

**Name:** Oliver Hiller

**Geburtsdatum:** 29.02.1972

**Geburtsort:** Senne I, j. Bielefeld

**Familienstand:** ledig

**Schulbildung:** Aug. 1978 bis Juni 1982 Grundschulausbildung  
 Aug. 1982 bis Juni 1991 Gymnasium Verl

**Grundwehrdienst:** Juli 1991 bis Juni 1992

#### Wissenschaftliche Ausbildung:

seit Okt. 1992	Chemiestudium an der Universität Bielefeld
Oktober 1994	Diplomvorprüfung in Chemie (sehr gut)
November 1997	Diplomprüfungen in Chemie (gut)
bis August 1998	Diplomarbeit (sehr gut)
seit September 1998	Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Tschesche (Biochemie I, Universität Bielefeld); Beschäftigung als wissenschaftlicher Angestellter
Oktober 1999 bis August 2000	Teilnahme am Programm „Studierende und Wirtschaft“ der Universität Bielefeld

**Hobbys:** Laufen, Radfahren, Motorradfahren, Wasserski