

**Induktion der Integrin vermittelten  
Synthese und Aktivierung von Matrix Metalloproteinasen  
durch Schlangengift Metalloproteinasen  
in dermalen Fibroblasten**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Kristina Grimm  
aus Essen

Köln 2003

Berichtersteller:

Prof. Dr. H.W. Klein  
Dr. R. Nischt

Tag der mündlichen Prüfung:

11. November 2003

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	3
1.1 Matrix Metalloproteinasen .....	3
1.2 Regulation der MMP-Synthese und -Aktivität .....	6
1.2.1 Regulation der Transkription .....	6
1.2.2. Regulation durch Proenzym-Aktivierung .....	7
1.2.3 Inhibition der MMP-Aktivität.....	11
1.3. Regulation des Zellstoffwechsels durch Integrin-Kollagen-Wechselwirkungen.....	12
1.3.1 Die Integrinfamilie .....	12
1.3.2. Aktivierung der Integrine und Inside-Out-Signaling.....	14
1.3.3. Substratbindung der Integrine und Outside-In-Signaling .....	15
1.3.4. Regulation der MMP-Synthese durch Integrine .....	16
1.4. Einfluss von Schlangengift-Metalloproteinasen auf Integrin-Matrix-Wechselwirkungen ....	18
1.4.1 Struktur und Funktion von Schlangengift-Metalloproteinasen .....	19
1.4.2 Einfluss Jararhagins auf Fibroblasten im Monolayer .....	21
1.5 Ziel dieser Arbeit .....	22
<b>2. Material und Methoden</b> .....	24
2.1 Materialien .....	24
2.1.1 Chemikalien.....	24
2.1.2 häufig verwendete Puffer.....	24
2.1.3 Bakterienkulturen .....	25
2.1.4 Plasmide.....	25
2.1.5 Zellkultur .....	25
Medien.....	25
Zellen.....	26
2.1.6 Synthetische Oligonukleotide .....	26
2.1.7 Antikörper .....	26
2.1.8 Schlangengift-Metalloproteinasen: Domänen und Peptide.....	27
2.2 Methoden.....	27
2.2.1 Zellbiologische Methoden.....	27
Humane dermale Fibroblasten.....	27
Isolierung von humanen dermalen Fibroblasten .....	27
Mykoplasmentest.....	28
Herstellung von dreidimensionalen Kollagengelen .....	28
Herstellung von konditioniertem Fibroblastenmedium .....	29
Adhäsionsversuche .....	29
Zellmigrationsversuche.....	30
Immunfluoreszenz-Färbung des Aktinskeletts .....	30
Photographie.....	30
FACS-Analysen .....	30
Embryonale Stammzell-Kultur.....	31
Isolierung von embryonalen Fibroblasten (CD 1 Neo /feeder cells).....	31
Mitomycin C Behandlung embryonaler Fibroblasten .....	31
Kultivierung embryonaler Stammzellen .....	31
Transfektion embryonaler Stammzellen .....	32
Antibiotika-Selektion und Picken transfizierter ES-Zellen.....	32
Teilen und Einfrieren der ES-Zellklone.....	33

2.2.3 Proteinbiochemie .....	33
Proteinbestimmung .....	33
Proteinfällung (TCA) .....	33
SDS-Polyacrylamid Gel-Elektrophorese (SDS-Page) und Immunoblot-Analyse .....	34
Gelatine-Zymographie .....	34
Bindungsstudien .....	35
2.2.4 Nukleinsäureanalyse.....	36
DNA-Isolierung aus ES-Zellen .....	36
Herstellung radioaktiv markierter cDNA-Sonden .....	36
Southern Blot Analyse (Southern, 1975) .....	37
RNA-Isolierung aus Fibroblasten .....	38
RNA-Analyse (Northern Blot) .....	38
2.2.5 Rekombinante DNA Techniken .....	39
Restriktionsverdau, DNA Extraktion, Ligation .....	39
Bakterien-Transformation und Plasmid-Präparationen.....	39
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>40</b>
3.1 Interaktion von humanen Hautfibroblasten mit Schlangengift-Metalloproteinasen.....	41
3.2 Bedeutung der Kollagenrezeptoren $\alpha_1\beta_1$ - und $\alpha_2\beta_1$ -Integrin für die Interaktion von SVMPs mit Fibroblasten .....	43
3.3 Einfluss der Domänen und Peptide auf die Interaktion von Hautfibroblasten mit Kollagen Typ I.....	46
3.4 Einfluss verschiedener Bereiche der SVMPs auf die MMP-Synthese .....	50
3.4.1 Analyse der MMP-Synthese im Monolayer.....	51
3.4.2 Analyse der MMP-Synthese im Kollagengel .....	54
3.4.3 Bedeutung der Kollagenrezeptoren $\alpha_1\beta_1$ - und $\alpha_2\beta_1$ -Integrin für die Regulation der MMP-Synthese durch SVMPs .....	56
3.4.4 Bedeutung der Proteaseaktivität der Metalloproteinase-Domäne für die Induktion und Aktivierung von MMPs .....	60
3.5 Regulation der Typ I Kollagensynthese durch SVMPs .....	62
3.6 Zellmorphologie .....	63
3.6.1 Bedeutung der $\alpha_2$ -Integrinuntereinheit für die veränderte Zellmorphologie .....	65
3.7 Migration.....	66
3.8 Einfluss der Metalloproteinase-Domäne auf die Matrix der Fibroblasten.....	68
3.9 Etablierung eines Mausstammes mit einem konditional inaktivierbaren MT1-MMP Gen ...	70
3.9.1. Die Strategie zur Inaktivierung des <i>MMP-14</i> Gens .....	71
3.9.2 Klonierung des Austauschvektors MT-Neolox5 .....	73
3.9.3 Transfektion der ES-Zellen mit dem Ersatzvektor.....	75
3.9.4. Analyse der transfizierten ES-Zellen.....	75
3.9.5 Weitere Strategie zur Generierung von geflochten ES-Zellen.....	76
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>79</b>
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	<b>94</b>
<b>6. Summary</b> .....	<b>96</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>98</b>
<b>8. Abkürzungen</b> .....	<b>111</b>

# 1. Einleitung

Die extrazelluläre Matrix (ECM) besteht aus Proteinen und Glykosaminoglykane, die die interzellulären Zwischenräume des Bindegewebes ausfüllen oder die Basalmembran bilden, eine flexible Schicht, die verschiedene Zelltypen voneinander oder von dem darunter liegenden Bindegewebe trennt (Übersicht: Aumailley und Gayraud, 1998; Timpl, 1996). Die Basalmembran spielt eine besondere Rolle als mechanische Barriere. Zum Beispiel stellt sie in der Haut die Grenze zwischen epidermalen und dermalen Zellen dar. Die extrazelluläre Matrix kann darüber hinaus ein stützendes Gerüst bilden und als Reservoir für Wachstumsfaktoren dienen. Im Bindegewebe werden die ECM-Bestandteile von den Fibroblasten und Endothelzellen gebildet. Die hauptsächlichen Protein-Bestandteile der extrazellulären Matrix sind dabei Kollagene, Elastin und Glykoproteine. Daneben enthält die Matrix weitere Strukturproteine wie Fibronectin und Laminine. Die zweite Gruppe an ECM Bestandteilen sind Glykosaminoglykane, wie Heparansulfat und Proteoglykane.

Die Degradation von Bestandteilen der extrazellulären Matrix spielt eine wichtige Rolle in verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen, wie der Embryonalentwicklung, Angiogenese, Wundheilung und Tumorerkrankungen (Übersicht: Eckes et al., 2000; Werb, 1997; Werb und Chin, 1998). Bei der Wundheilung wird beispielsweise die Expression und Degradation verschiedener Kollagen-Typen zeitlich und räumlich strikt reguliert. Bei der Invasion und Metastasierung von epidermalen Tumoren der Haut muss die Basalmembran abgebaut werden, damit der Tumor in das darunter liegende Bindegewebe der Dermis invadieren kann. Im weiteren Verlauf werden die interstitiellen ECM Bestandteile und die Basalmembran um die Blutgefäße degradiert, über die die Tumorzellen zu Organen transportiert werden, wo sie Metastasen bilden können. Es ist gezeigt worden, dass neben verschiedenen Gruppen von Proteasen, wie Serin- und Cysteinproteasen hauptsächlich Matrix Metalloproteinasen an der Matrixdegradation beteiligt sind.

## 1.1 Matrix Metalloproteinasen

Matrix Metalloproteinasen (MMPs) sind eine Gruppe von  $Zn^{2+}$ -abhängigen Endopeptidasen, die verschiedene Komponenten des interstitiellen Bindegewebes und

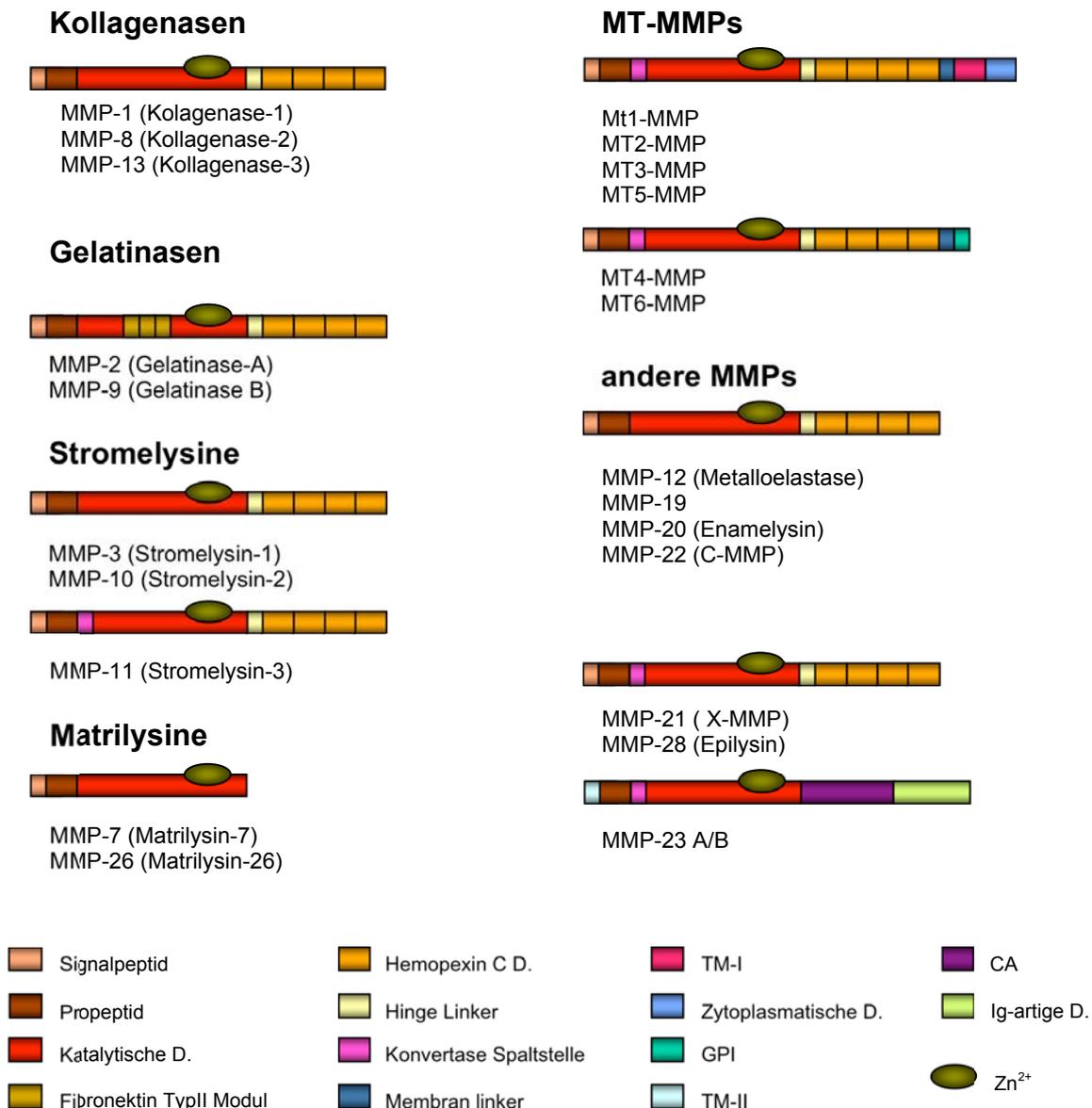
der Basalmembran degradieren können (Seiki, 1999). Darüber hinaus sind sie beteiligt an der Spaltung und Freisetzung von Zelloberflächenrezeptoren, der Aktivierung und Inaktivierung von Zytokinen und der Freisetzung von Apoptose-Faktoren (Werb, 1997; Egeblad und Werb, 2002). Aufgrund dieser Fähigkeiten spielen sie eine wichtige Rolle in einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen, wie z.B. der Gewebeumbildung während der Embryonalentwicklung, verschiedenen Aspekten des Tumorwachstums und einigen chronisch entzündlichen Krankheiten wie Arthritis und Colitis (Brenner et al., 1989; Egeblad und Werb, 2002; Lark et al., 1997; McKaig et al., 2003; Overall, 2002, Werb und Chin, 1998).

Auch in der Haut sind sie essentiell an einer Reihe von physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen beteiligt. Dazu gehören die Wundheilung (Armstrong und Jude, 2002; Eckes et al., 2000), die Tumordinvasion und Metastasierung (Kähäri und Saarialho-Kere, 1999; Overall und Lopez-Otin, 2002) und die Bildung von Fibrosen (Holmbeck et al., 1999).

Zurzeit weiß man, dass die Genfamilie der humanen MMPs für 25 homologe Proteinasen und drei Pseudogene kodiert. Die meisten MMPs werden von den Zellen sezerniert, doch es gibt auch membrangebundene Formen (MT-MMPs und MMP-23). Die sezernierten MMPs werden gemäß ihrer Substratspezifität in Gelatinasen und Kollagenasen eingeordnet. Dazu kommen die Gruppen der Stromelysine und Matrilysine und die heterogene Gruppe der übrigen MMP (Übersicht: Overall, 2002; vgl. Abbildung 1.1).

Alle MMPs enthalten eine katalytische Domäne und ein Propeptid am N-terminalen Ende. Außer den MT-MMPs und MMP-11 werden alle MMPs als inaktive Zymogene sezerniert. Verantwortlich für die enzymatische Latenz ist das 80 Aminosäure umfassende Propeptid am N-Terminus der katalytischen Domäne. Dieses Propeptid wird bei der Enzymaktivierung abgespalten, wie später genauer beschrieben wird. Die daran anschließende katalytische Domäne enthält das  $Zn^{2+}$ -bindende Zentrum. Bei den meisten MMPs wird die katalytische Domäne über eine prolinreiche Region mit der Hemopexin-C Domäne verbunden (Übersicht: Nagase, 1997; Overall, 2002). Diese Domäne kann in Kollagenase 1, 2 und 3, in Stromelysin-1 und MT1-MMP natives Kollagen binden (Übersicht: Overall, 2002), in Gelatinase A (MMP-2) dagegen nicht (Wallon und Overall, 1997). Die Gelatinasen besitzen am N-Terminus der katalytischen Domäne eine zusätzliche Region, die aus drei Fibronectin Typ II Modulen besteht (Collier et al., 1991). Ursprünglich wurde diese Region als Gelatinebindende Domäne

bezeichnet, doch es konnte gezeigt werden, dass sie neben Gelatine auch natives Kollagen binden kann (Overall, 2002).



**Abbildung 1.1: Die Familie der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)** Die Abbildung zeigt die verschiedenen Gruppen innerhalb der MMPs und deren Domänen. TM: Transmembran-Domäne; GP: Glycosylphosphat; CA: Cysteine Array; Ig-artige: Immunoglobulinartige

Kollagenasen (MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18) können fibrilläres Kollagen an spezifischen Stellen in zwei Fragmente spalten. Dabei entsteht ein N-terminales  $\alpha_1$  (TC-A) und ein C-terminales  $\alpha_2$  (TC-B) Fragment (Krane et al., 1996). Bei Körpertemperatur denaturieren diese Fragmente schnell zu Gelatine und werden dann von den Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9) degradiert, die nicht tripel-helikale Bereiche von Kollagenen spalten können (Kähäri und Saarialho-Kere, 1999; Mauch und Krieg, 1993). Es ist aber bekannt, dass es bezüglich der Substratspezifität zu Überschneidungen

zwischen den Familien kommen kann. So spaltet z.B. die Gelatinase A (MMP-2) auch natives Kollagen Typ IV, das über nicht tripel-helikale Bereiche verfügt (Aimes und Quigley, 1995).

Neben der großen Gruppe sezernierter MMPs sind sechs Membrangebundene MT-MMPs identifiziert worden, die mit einer Typ I Transmembrandomäne (MT1-3 -, MT5-MMP) oder über GPI (Glycosylphosphatidylinositol) (MT4- und MT6-MMP) in der Membran verankert sind (Seiki, 1999; Velasco et al, 2000). Des Weiteren gibt es mit der MMP-23 eine Matrix Metalloproteinase, die mit einer Typ II Transmembrandomäne in der Membran integriert ist. Da diese Domäne innerhalb des Propeptides liegt, das bei der Aktivierung abgespalten wird, löst sich die aktive MMP von der Membran und wirkt wie eine sezernierte MMP (Pei et al., 2000).

Neuere Ergebnisse haben gezeigt, dass auch sezernierte MMPs membranassoziiert vorliegen können. So binden die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 an verschiedene Integrinrezeptoren der Zellmembran (Brooks et al., 1996; Yu und Stamenkovic, 2000). Die Kollagenase MMP-1 zeigt Bindung an den Kollagenrezeptor  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin in Keratinozyten (Dumin et al., 2001; Stricker et al., 2001).

## 1.2 Regulation der MMP-Synthese und -Aktivität

Die proteolytische Aktivität der MMPs wird hauptsächlich auf drei Ebenen reguliert – Transkription, Aktivierung der Proformen und Inhibition. Zusätzlich wird die Aktivität über mRNA-Stabilität, Translation, „shedding“ und Autolyse reguliert (Übersicht: Overall und Lopez-Otin, 2002).

### 1.2.1 Regulation der Transkription

Die Regulationsmechanismen der MMP-Transkription sind komplex und beziehen eine Vielzahl von Faktoren wie Zytokine, Wachstumsfaktoren und Onkogene ein, die in Tumorzellen und in Zellen des umgebenden Stromas die Transkription von MMPs induzieren (Übersicht: Westermarck und Kähäri, 1999). Dazu gehören zum Beispiel TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) und IL-1 (Interleukin-1) (Benbow und Brinckerhoff, 1997). Andere Faktoren wie TGF- $\beta$  (Tumor Growth Factor  $\beta$ ) und Retinsäure können

die MMP-Expression sowohl aktivieren als auch inaktivieren, abhängig vom Zelltyp, von dem sie exprimiert werden (Overall, 1995; Uriah et al., 1998). Darüber hinaus kann die Transkription der MMPs durch Veränderungen der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte und der Zellmorphologie induziert werden (Kheradmad et al., 1998; Overall und Lopez-Otin, 2002). Ein weiterer induzierender Faktor ist UVB-Strahlung, die die Expression verschiedener MMPs, wie MMP-1 und MMP-3 in humanen dermalen Fibroblasten verstärkt (Brenneisen et al., 1998).

Auch die Signaltransduktionswege, die die Wirkung dieser Transkriptionsregulatoren vermitteln sind komplex. Dazu gehört zum Beispiel der p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) Transduktionsweg, der je nach Zelltyp aktivierend oder inaktivierend auf die MMP-Transkription wirkt (Westermarck und Kähäri, 1999).

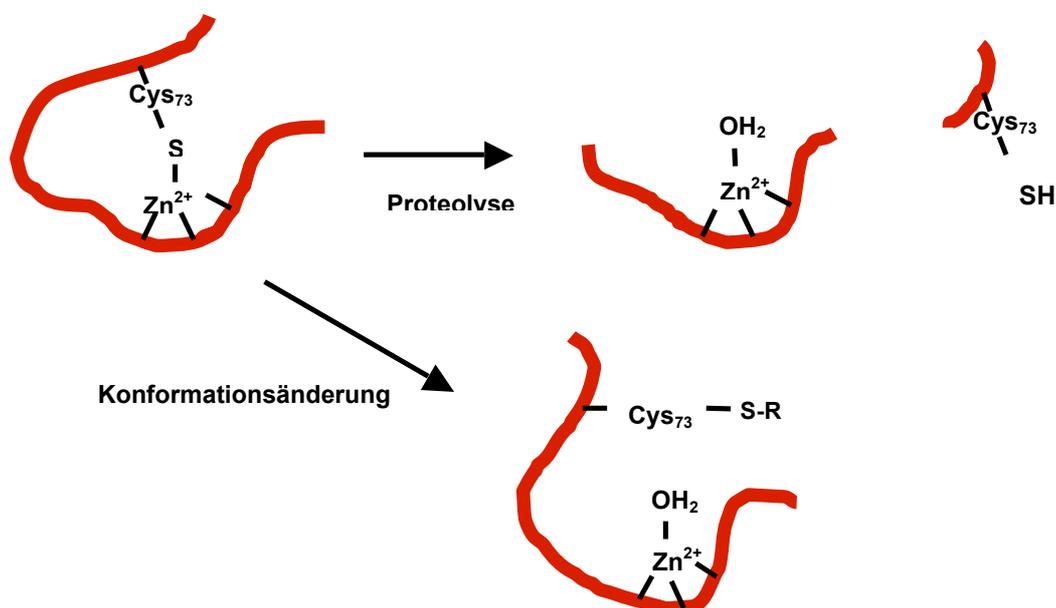
Viele der beteiligten Signalwege führen zur Interaktion von Transkriptionsfaktoren mit AP-1 (Activator Protein-1) Bindungsstellen in der Promotorregionen der meisten MMP-Gene (MMP-1, -3, -7, -9, -10, -12, -13) (Übersicht: Benbow und Brinckerhoff, 1997). Die Transkriptionsfaktoren, die an die AP-1 Bindungsstellen, binden sind Homo- oder Heterodimere aus Mitgliedern der FOS- und JUN-Protein-Familie. Es wurde angenommen, dass die Promotorregion der MT1-MMP und MMP-2 keine AP-1 Bindungsstellen enthalten (Corcoran et al., 1996; Haas et al., 1999). Neuere Untersuchungen an kardialen Zellen lassen aber darauf schließen, dass es doch eine AP-1 Sequenz in der Promotorregion der MMP-2 gibt (Bergman et al., 2003). Außerdem wird die MMP-2 Transkription möglicherweise über den IGF-1 (Insulin-like Growth factor-1) Rezeptor und den PI 3-Kinase/Akt (Phosphoinositol 3-Kinase/Akt) Signalweg reguliert (Zhang und Brodt, 2003). Für Erg-1, einem Mitglied der ETS-Familie von Transkriptionsfaktoren wurde gezeigt, dass es die Transkription der MT1-MMP regulieren kann. Mitglieder dieser Proteinfamilie binden an PEA3 cis-Elemente in der Promotorregion verschiedener MMPs (Übersicht: Overall und Lopez-Otin, 2002). Des Weiteren sind der EGF (Epidermal Growth Factor)-Rezeptor und der IGF-1 Rezeptor auch an der Regulation der MT1-MMP beteiligt (Kheradmad et al., 2001; Zhang und Brodt, 2003).

### **1.2.2. Regulation durch Proenzym-Aktivierung**

Wie bereits beschrieben werden die meisten MMPs als inaktive Zymogene sezerniert. Während der Aktivierung wird ihr N-terminales Propeptid abgespalten. Dieses enthält

die so genannte „Cystein-switch“-Sequenz PRCG(N/V)D, die an der Enzymaktivierung beteiligt ist (Springmann et al., 1990; van Wart et al., 1990). In der sich anschließenden katalytischen Metalloproteinase-Domäne befindet sich eine unter den MMPs konservierte Sequenz, das HExxHxxGxxH  $Zn^{2+}$ -bindende Motiv (Bode, 1995). Durch Interaktion der drei Histidinreste dieser Sequenz mit einem  $Zn^{2+}$ -Kation wird dieses im katalytischen Zentrum gebunden (Bode et al., 1993; Windsor et al., 1994).

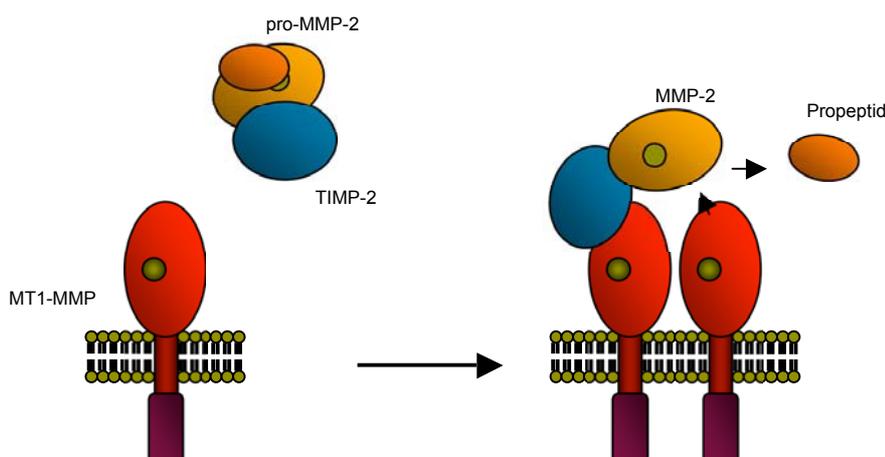
Für die Metalloproteinase Aktivität ist darüber hinaus die Interaktion des  $Zn^{2+}$ -Kation mit einem Wassermolekül notwendig. Durch das negativ geladene Sauerstoffmolekül stabilisiert sich die aktive Konformation dieser Domäne. Das Propeptid enthält in seiner „Cystein-switch“-Sequenz einen Cysteinrest, der über eine Sulfhydrylgruppe mit dem  $Zn^{2+}$ -Kation interagiert. Dadurch wird dessen Wechselwirkung mit dem Wassermolekül verhindert und so die proteolytische Aktivität der MMP inhibiert. Durch Abspaltung des Propeptids oder eine Konformationsänderung, die die Cysteinreste vom aktiven Zentrum räumlich entfernt, kann das  $Zn^{2+}$ -Ion nun mit einem Wassermolekül interagieren. Dieses von Springmann et al. (1990) und van Wart et al. (1990) vorgeschlagene „Cystein-switch“ Modell, konnte durch Strukturanalysen von proMMP-1 und proMMP-3 bestätigt werden (Becker et al., 1995; Morgunova et al., 1999).



**Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des „Cystein-switch“-Modell der MMP-Aktivierung** (modifiziert nach Springmann et al., 1990). Im inaktiven MMP-Molekül ist das  $Zn^{2+}$ -bindende Zentrum durch die Interaktion mit einem Cysteinrest (Cys73) des Propeptides verdeckt. Nach Proteolyse des Propeptides oder Konformationsänderungen, induziert zum Beispiel durch Oxidantien oder SDS kommt das  $Zn^{2+}$ -Ion in Kontakt mit Wasser und wird so aktiviert.

Für die Abspaltung des Propeptids sind je nach MMP unterschiedliche Enzyme verantwortlich: Einige MMPs werden durch Serinproteasen wie Plasmin und uPA (Urokinase Plasminogen Activator) aktiviert, andere, zum Beispiel die MT-MMPs, besitzen keine Spaltstellen für Serinproteasen, sondern eine Konvertase-Spaltstelle (vgl. Abbildung 1.1). Diese MMPs werden intrazellulär durch Furinartige Proprotein-Konvertasen aktiviert (Pei et al., 2000; Pei und Weiss, 1995; Seiki, 1999). *In vitro* Daten zeigen, dass Furin auch an der extrazellulären MT1-MMP-Aktivierung an der Zelloberfläche beteiligt sein kann (Pei et al., 2000).

MMPs können aber auch durch andere MMPs aktiviert werden. So sind die MT-MMPs an der Aktivierung der MMP-2 beteiligt, die nicht durch Serinproteasen aktiviert werden kann und auch keine Konvertase-Spaltstelle besitzt (Nagase, 1997; Seiki, 1999). Am besten ist die proMMP-2-Aktivierung durch die MT1-MMP untersucht (Sato et al., 1994). Es wird angenommen, dass die membranständige MT1-MMP mit der proMMP-2 und deren Inhibitor TIMP-2 (Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase-2) einen trimolekularen Komplex bildet (Butler et al., 1998; Strongin et al., 1995), dabei ist TIMP-2 mit dem C-Terminus an die Hemopexin-Domäne der proMMP-2 gebunden (Overall et al., 1999). Der initiale Schritt ist die Interaktion der N-terminalen Domäne von TIMP-2 mit der katalytischen Domäne der MT1-MMP an der Zelloberfläche (Butler et al., 1998; Zucker et al., 1998). Die proMMP-2 Aktivierung erfolgt dann durch ein weiteres MT1-MMP-Molekül (Butler et al., 1998) (Abb. 1.3).



**Abbildung 1.3: Mechanismus der proMMP-2 Aktivierung durch MT1-MMP** Das TIMP-2-Molekül (blau) rekrutiert ein proMMP-2-Molekül (orange) durch die Bindung an MT1-MMP (rot) an die Zelloberfläche. Dort wird durch ein zweites MT1-MMP-Molekül das Propeptid von proMMP-2 abgespalten und so MMP-2 aktiviert. (Grün:  $Zn^{2+}$ -Ion)

Neben der MMP-2 wird auch die MMP-13 durch MT1-MMP aktiviert (Cowell et al., 1998). Ein weiteres Beispiel der MMP-Aktivierung durch eine andere MMP ist die Aktivierung der proMMP-2 und proMMP-9 durch MMP-3 (Murphy et al., 1987; Nagase et al., 1990).

MT1-MMP wurde als erste Membrangebundene MMP identifiziert (Sato et al., 1994) und ist die am besten untersuchte. Die 63 kDa Protease besteht aus einer katalytischen und einer Hemopexin C Domäne, die über einen Hinge-Linker verbunden sind (Sato et al., 1994, vgl. Abbildung 1.1). Außerdem besitzt sie hinter dem Propeptid eine Konvertase-Spaltstelle und zur Integration in die Zellmembran eine Typ I Transmembrandomäne.

MT1-MMP hat eine breite Substratspezifität und kann Kollagen Typ I, II, III, Laminine, Gelatine, Vitronectin und Fibronectin degradieren (d'Ortho et al., 1997; Ohuchi et al., 1997). Neben der proteolytischen Abspaltung des Propeptids der MT1-MMP kann es auch zur Autolyse kommen. Das dabei entstehende 44kDa Fragment, bestehend aus Transmembran- und zytoplasmatischer Domäne, Hinge Linker und Hemopexin C Domäne zeigt keinerlei enzymatische Aktivität (Ellerbroeck et al., 1999; Lehti et al., 1998). Es kann aber über die Hemopexin C Domäne an Kollagen binden und so dessen Degradation durch andere aktive MT1-MMP-Moleküle verhindern (Tam et al., 2002). Des Weiteren haben Mutagenesestudien gezeigt, dass auch trunkierte MT1-MMP Fragmente, die nur aus der extrazellulären Domäne bestehen und somit als sezernierte Formen vorliegen, proMMP-2 aktivieren und extrazelluläre Matrixproteine degradieren können (Pei und Weiss, 1996).

Während der Mausentwicklung wird MT1-MMP in den meisten embryonalen Geweben exprimiert (Apte et al., 1997). Die Expression ist zeitlich und räumlich reguliert und ist am ausgeprägtesten im skelettalen und periskelettalen Gewebe (Apte et al., 1997; Kinoh et al., 1996). Die Expression korreliert mit der Expression von MMP-2. Im adulten Organismus ist die MT1-MMP am stärksten in Lunge, Niere und Plazenta exprimiert, wo ein Umbau der extrazellulären Membran relativ häufig vorkommt (Takino et al., 1996).

Dieses Expressionmuster deutet auf eine spezifische Rolle der MT1-MMP hin. Auch in verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen spielt die MT1-MMP eine entscheidende Rolle. Sie ist unter anderem an Tumorwachstum und Angiogenese (Collen et al., 2003; Seiki, 1999; Sounni et al., 2003), Zellinvasion (Sato et al., 1997) und Wundheilung (Madlener et al., 1998) beteiligt.

MT1-MMP scheint eine besondere Stellung innerhalb der MMPs einzunehmen, wie Analysen genetisch veränderter Mäuse gezeigt haben. Mäuse, die defizient für MMP-2 (Itoh et al., 1997), MMP-3 (Mudgett et al., 1998), MMP-7 (Wilson et al., 1997), MMP-9 (Vu et al., 1998), MMP-10 (Masson et al., 1998) oder MMP-12 (Shipley et al., 1996) sind, entwickeln sich zum größten Teil normal und können sich vermehren. Dagegen führt die Defizienz der MT1-MMP in Mäusen zu starken Entwicklungsstörungen (Holmbeck et al., 1999; Zhou et al., 2000). Es kommt zu Zwergenwachstum, Beeinträchtigungen der Knochenentwicklung und der Angiogenese und zu Fibrosen in der Haut. Die Mäuse sind nicht länger als drei Wochen lebensfähig.

### 1.2.3 Inhibition der MMP-Aktivität

Die MMP-Aktivität kann durch allgemeine Inhibitoren wie  $\alpha_2$  Macroglobulin und durch spezifische Inhibitoren, den TIMPs (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase) inhibiert werden. Wie oben beschrieben spielen die TIMPs eine Rolle bei der Aktivierung von MMPs, doch sind sie ursprünglich als deren Inhibitoren identifiziert worden (Übersicht: Bode et al., 1999). Zurzeit sind 4 verschiedene TIMPs bekannt. TIMPs bilden mit MMPs einen nicht kovalenten Komplex, dabei unterscheiden sie sich in der Affinität der Bindung an die verschiedenen MMPs (Olson et al., 1997; Henriot et al., 1999).

TIMP-2 bindet nicht nur an proMMP-2 und bewirkt so deren Rekrutierung zur Plasmamembran, sondern es bindet direkt an das katalytische Zentrum der MT1-MMP und verhindert so deren Aktivität (Übersicht: Bode et al., 1999, Murphy et al., 1999). Bei einem Überschuss von TIMP-2 können proMMP-2 Moleküle an die Zelloberfläche rekrutiert werden, aber es sind keine weiteren aktiven MT1-MMP Moleküle vorhanden, die das Propeptid abspalten und so MMP-2 aktivieren können. TIMP-2 kann auch direkt im katalytischen Zentrum von MMP-2 binden, was deren Inaktivierung zur Folge hat (Murphy et al., 1994; Olson et al., 1997).

Neben den TIMPs gibt es eine Reihe weiterer endogener MMP Inhibitoren, die teilweise Homologien zu der inhibitorischen Region der TIMPs aufweisen (Übersicht: Overall und Lopez-Otin, 2002). Zu diesen Inhibitoren gehören unter anderem RECK (Reversion Inducing Cysteine-rich Protein with Kazal Motifs), ein membrangebundener MMP-Inhibitor und TFPI2 (Tissue Factor Pathway Inhibitor-2), ein Serinprotease-Inhibitor, die auch die ECM-Integrität und Angiogenese regulieren.

Viele der in diesem Abschnitt beschriebenen Regulationsmechanismen der Synthese und Aktivierung von MMPs werden durch die Interaktion von Zellen mit der umgebenden Matrix vermittelt. Über Zelloberflächenrezeptoren, den Integrinen können die Zellen an die Matrix binden und über diese Transmembranproteine können intrazelluläre Signalwege induziert werden. Im nächsten Abschnitt werden daher diese Rezeptoren und ihre Rolle für den Zellstoffwechsel genauer vorgestellt.

### **1.3. Regulation des Zellstoffwechsels durch Integrin-Kollagen-Wechselwirkungen**

#### **1.3.1 Die Integrinfamilie**

Integrine sind Zelloberflächenrezeptoren, die Interaktionen der Zellen mit Proteinen der extrazellulären Matrix vermitteln (Hynes, 1992; Hynes, 1999). Darüber hinaus können sie auch an der Bildung von Zell-Zell-Kontakten beteiligt sein (Smith, 1994). In dieser Funktion als Zelladhäsionsmoleküle sind sie auch an der Zytoskelettorganisation, Motilität, Proliferation, Transkription und Apoptose beteiligt (Hynes, 2002). Auch bei der Angiogenese und Tumorerkrankung spielen sie eine Rolle (Übersicht: Mizejewski, 1999).

Integrine sind Heterodimere aus zwei nicht kovalent assoziierten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten (vgl. Abb.1.4). Zurzeit sind 24 verschiedene Integrinrezeptoren bekannt, die durch Kombination von 18 unterschiedlichen  $\alpha$ -Untereinheiten und 8  $\beta$ -Untereinheiten entstehen (Übersicht in Hynes, 2002; Plow et al, 2000). Darüber hinaus führt alternatives „Splicing“ der Integrin-mRNAs zu weiteren Variationen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten (Übersicht: de Melker und Sonnenberg, 1999).

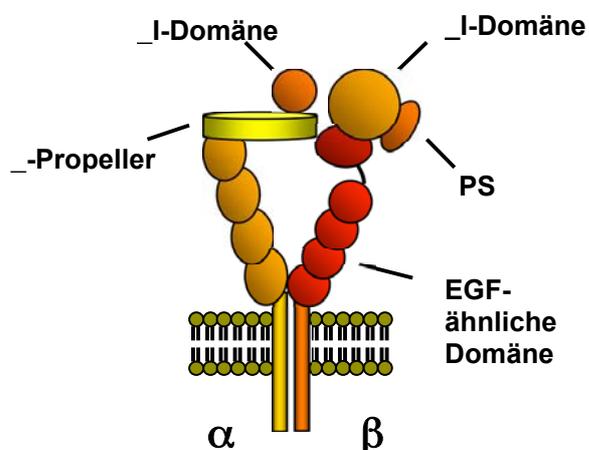
Die unterschiedlichen Kombinationen der Untereinheiten bestimmen die verschiedenen Substratspezifitäten der Integrine (Übersicht: Plow et al., 2000; van der Flier und Sonnenberg, 2001).

Die Bindung der unterschiedlichen Substrate erfolgt über die extrazelluläre Domäne der transmembranen Integrine, die aus den N-Termini der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit bestehen. Am distalen Ende bilden beide Untereinheiten einen globulären Kopf, mit dem die Substratbindung erfolgt (Erb et al., 1997). Es wurden verschiedene konservierte Bereiche in diesen Regionen der Untereinheiten identifiziert, die für die

Ligandenbindung notwendig sind (Übersicht: Hynes, 2002). Zum einem bestehen die  $\alpha$ -Untereinheiten an ihrem distalen N-terminalen Ende aus sieben repetitiven Elementen, die einen siebenblättrigen  $\beta$ -Propeller bilden. Diese Struktur ist Teil der Ligandenbindungsstelle und an der unteren Seite der Blätter 4-7 befinden sich die Bindungsstellen für zweiwertige Kationen (Humphries, 2000; Springer, 1997; Xiong et al, 2001;).

Einige  $\alpha$ -Untereinheiten (die Kollagenbindenden Integrine  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_{10}$ ,  $\alpha_1$ , das E-Cadherin bindende Integrin  $\alpha_E$  und die Leukozyten Integrine  $\alpha_D$ ,  $\alpha_M$ ,  $\alpha_L$ ,  $\alpha_X$ ) besitzen zwischen Blatt 2 und 3 des  $\beta$ -Propellers eine Insertion von etwa 200 AS Länge, die als so genannte I-Domäne bezeichnet wird (Übersicht: Gullberg und Lundgren-Akerlund, 2002). Diese Domäne gehört zur Familie der „rossmann folds“-Proteine, mit einem Kern aus parallelen  $\beta$ -Faltblättern und  $\alpha$ -Helices (Lee et al., 1995). Sie besitzt große Homologien zu den von Willebrund Faktor-Domänen, die in vielen Proteinen zu finden sind (Übersicht: Whittacker und Hynes, 2002). Innerhalb der I-Domäne liegt ein  $Mg^{2+}$ -abhängiges Bindungsmotiv (MIDAS: metal ion dependent adhesion motif), das Einfluss auf die Ligandenbindung hat (Lee et al, 1995; Plow et al., 2000).

Es konnte gezeigt werden, dass auch in der  $\alpha_1$ -Untereinheit der Integrine eine I-Domäne vorhanden ist, die möglicherweise an der Bindung der Liganden beteiligt ist (Loftus und Liddington, 1997; Xiong et al., 2001). Diese I-Domäne der  $\alpha$ -Untereinheit befindet sich am distalen Ende der extrazellulären Domäne, liegt aber in der Primärstruktur nicht am N-Terminus, an dem sich eine 54 Aminosäure lange Sequenz, die PSI Domäne befindet.



**Abbildung 1.4: Schematische Darstellung eines Integrin Heterodimers mit einer I-Domäne in der  $\alpha$ -Untereinheit.** EGF: Epidermal Growth Factor; PSI: plexins, semaphorins, integrins (modifiziert nach Humphries et al., 2000)

Mit der zytoplasmatischen Domäne des Integrins sind verschiedene Proteine assoziiert, die sich in drei Hauptgruppen einteilen lassen (Übersicht: van der Flier und Sonnenberg, 2001). Zum einen Zytoskelett-assoziierte Proteine, wie  $\alpha$ -Aktinin, Talin und Vinculin, zum anderen Signalmoleküle, die an der Bildung von intrazellulären Zytoskelettverknüpfungen und Signaltransduktionswegen beteiligt sind. Des Weiteren interagieren kalziumbindende und akzessorische Proteine mit den Integrinen und beeinflussen deren Aktivierung und Faltung.

### 1.3.2. Aktivierung der Integrine und Inside-Out-Signaling

Wie oben beschrieben enthält die  $\alpha$ -Untereinheit verschiedene Bindungsstellen für bivalente Kationen, die regulative Auswirkungen auf die Substratbindung haben (Lee et al., 1995; Plow et al., 2000). Die Bindung verschiedener zweiwertiger Kationen inhibiert oder erleichtert die Bindung von Substraten. Aber auch Interaktionen der zytoplasmatischen Bereiche der Integrine modifizieren die Substratbindung („inside-out-signaling“), bestimmen eine „aktiven“ (bindenden) oder „inaktiven“ (nicht bindenden) Zustand des Integrins.

Der Aktivierungsmechanismus des Inside-Out-Signaling ist am besten untersucht am Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 in Thrombozyten (Kieffer und Phillipps, 1990). Dieses Integrin liegt in den Blutplättchen so lange im inaktiven Zustand vor, bis es durch Bindung seines Substrates Fibrinogen zur Blutgerinnung beiträgt. Wäre es konstitutiv aktiv, würde es permanent Fibrinogen binden und so zu Thrombosen führen.

Zurzeit geht man davon aus, dass Bereiche der  $\beta$ -Untereinheit des Integrins direkt oder indirekt, über assoziierte Proteine, die Interaktion der  $\beta$ -Untereinheit mit Bestandteilen des Zytoskelettes inhibiert. Durch Bindung eines Liganden oder durch Signaltransduktionswege, die durch einen anderen Agonisten vermittelt werden, wird diese Inhibition aufgehoben und die Konformation des Integrins derart verändert, dass es in aktiver Form vorliegt (Hughes et al., 1996; Vinogradova et al., 2000).

Untersuchungen, in denen trunkierte Integrin-Untereinheiten analysiert wurden, haben gezeigt, dass eine konservierte GFFKR Sequenz, die intrazellulär innerhalb der  $\alpha$ -Untereinheit proximal der Membran gelegen ist, die Adhäsivität des Integrinrezeptors beeinflusst (Lu et al., 2001). Partielle Deletionen der extrazellulären Domänen der  $\alpha$ -

und  $\beta$ -Untereinheiten verändern nichts an den Bindungseigenschaften des Integrins, es liegt inaktiv vor. Dagegen führt eine komplette, die GFFKR-Sequenz einschließende Deletion zur konstitutiven Aktivierung des Integrins. Anscheinend hält diese Region der zytoplasmatischen Domäne den Integrinrezeptor in einem inaktiven Status.

### 1.3.3. Substratbindung der Integrine und Outside-In-Signaling

Wie oben erwähnt sind Integrine an der Bindung von extrazellulären Matrixproteinen und darüber hinaus an Signaltransduktionswegen beteiligt. Dabei kann ein Integrinrezeptor-Typ Affinitäten zu verschiedenen Substraten besitzen und gleichzeitig werden verschiedene Matrixproteine von verschiedenen Integrinen erkannt (Übersicht: van der Flier und Sonnenberg, 2001). Außerdem sind die Bindungsaffinitäten der Integrine von dem Zelltyp abhängig, in dem sie exprimiert werden, wie Versuche von Kirchhofer et al. (1990) an  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin exprimierenden endothelialen Zellen und Blutplättchen gezeigt haben.

Zu den Substraten der Integrine gehören Kollagene, Laminine, Fibronectin, Fibrinogen, Thrombospondin, Vitronectin und andere. Durch deren Bindung kommt es zum „Clustering„ der Integrine in der Zellmembran, dem initialen Schritt der Bildung von so genannten Fokalkontakten („focal contacts“; Burridge und Chrzanowska-Wodnicka, 1996; Miyamoto et al., 1995). In den Fokalkontakten kolokalisieren Integrine, Signalmoleküle und Moleküle des Zytoskeletts.

Die meisten Integrine erkennen eine spezifische Sequenz in Proteinen der extrazellulären Matrix, wie z.B. Arg-Gly-Asp (RGD), die in Fibronectin, Vitronectin und denaturiertem Kollagen zu finden ist (Übersicht: Rouslahti und Pierschbacher, 1987). Es konnte gezeigt werden, dass synthetische Peptide, die diese RGD-Sequenz enthalten, die Adhäsion von Zellen an Bestandteile der extrazellulären Matrix kompetitiv blockieren können (Liaw et al., 2001).

Eine besondere Rolle bei der Substratbindung spielt die I-Domäne. Untersuchungen an kristallisierten I-Domänen des  $\alpha_M$ -Integrins oder an rekombinanten mutierten I-Domänen der  $\alpha_L$  Untereinheiten zeigen, dass diese in zwei Konformationen vorliegen, der so genannten „offenen“ und „geschlossenen“ Konformation (Xiong et al., 2001). Beide Konformationen unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit Liganden zu binden. Die offene Form hat eine hohe Ligandenaffinität, ist also „aktiv“. Die geschlossene Form

zeigt dagegen kaum Ligandenbindung, wird daher als „inaktiv“ angesehen. Durch Vergleiche der Kristallstrukturen von aktiven und inaktiven  $\alpha_2$ -Untereinheiten wurde festgestellt, dass die Position des siebten Blattes des  $\beta$ -Propellers der extrazellulären Domäne verschoben und die Lage des Metallions in der MIDAS-Sequenz verändert ist (Emsley et al., 1997; 2000). Diese Konformationsänderung wird durch die Ligandenbindung vermittelt, kann aber auch durch andere bekannte Stimuli wie aktivierende Antikörper oder  $Mn^{2+}$ -Kationen induziert werden (Emsley et al., 2000). Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die I-Domäne bzw. ihre Konformation für die Integrinaktivierung und die Substratspezifität verantwortlich ist. Da man für alle  $\beta$ -Untereinheiten die Existenz einer I-Domäne nachgewiesen hat, ist auch die Regulation für Integrine, die keine I-Domäne in ihrer  $\alpha$ -Untereinheit besitzen, über diesen Mechanismus zu erklären (Xiong et al., 2001, Springer, 1997). Möglicherweise ist die I-Domäne die Schlüsselregion zur Integrinaktivierung.

Durch die Bindung des Liganden kann es zu Konformationsänderungen kommen, durch die Signale in das Innere der Zelle vermittelt werden (outside-in-signaling; Übersicht: Giancotti und Rouslahti, 1999). Durch die Ligandenbindung kommt es durch Mitglieder der src-Proteinkinasefamilie zu Phosphorylierungen von Proteinen, die mit der zytoplasmatischen Domäne der Integrine assoziiert sind. Weitere Signalwege schließen die Rho-ähnlichen GTPasen, Phospholipase  $C_\gamma$  und die MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)-Kaskade ein, die letztlich zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren und erhöhter Genexpression führen. Ein Beispiel für das Outside-in-signaling ist die Induktion der MMP-Synthese durch die Interaktion zwischen Kollagen Typ I und  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin, die im nächsten Kapitel beschrieben wird.

### 1.3.3. Regulation der MMP-Synthese durch Integrine

Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass in Zellen, die in Gegenwart von ECM-Proteinen wie Kollagen oder Fibronectin kultiviert werden, die MMP-Expression induziert wird (Huttenlocher et al., 1996; Langholz et al., 1995; Mauch et al., 1989; Tremble et al., 1994). Diese Induktion wird durch Integrinrezeptoren vermittelt, die an diese Substrate binden. Auch durch die Bindung Integrin-aktivierender Antikörper kann die MMP-Synthese induziert werden (Kubota et al., 1997; Larjava et al., 1993). Es sind fünf Integrinrezeptoren identifiziert worden, über die die MMP-Expression induziert

werden kann (Übersicht: Lehtinen und Heino, 1999). Dazu gehören zum Beispiel der Typ I Kollagenrezeptor  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin und der Fibronektinrezeptor  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin, die die MMP-1 Expression in Fibroblasten induzieren (Damsky et al., 1992; Huhtala et al., 1995; Langholz et al., 1995). Dagegen wird durch Bindung von Fibronektin an den  $\alpha_4\beta_1$ -Integrinrezeptor die MMP-1 Expression reduziert (Huhtala et al., 1995).

Dem  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin kommt eine wichtige Rolle bei der Regulation der MMP-Synthese zu. Zum Beispiel wird bei der Wundheilung die MMP-1 Expression in Keratinozyten, die auf einer provisorischen, hauptsächlich aus Kollagen Typ I bestehenden Wundmatrix von den Wundrändern einwandern, induziert (Saarialho-Kere et al., 1996). Durch die Interaktion zwischen  $\alpha_2\beta_1$ -Integrinrezeptoren der Keratinozyten und Typ I Kollagen wird die MMP-1 induziert (Pilcher et al., 1997). Auch bei der Tumordinvasion spielt dieses Integrin eine besondere Rolle. In Melanomzellen ist es für die Migration in die Dermis notwendig (Heino et al., 1996). In Rhodomyosarcoma-Zelllinien spielt  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin eine wichtige Rolle für die Ausbildung von Metastasen (Chan et al., 1991).

Die Rolle von Kollagenrezeptoren kann gut in Typ I Kollagengelen untersucht werden. Diese Kollagengele bieten humanen dermalen Fibroblasten dreidimensionale Umgebung. Fibroblasten kommen in diesem System in Kontakt mit fibrillären Kollagen Typ I. Dieses *in vitro* Modell entspricht eher der *in vivo* Situation in der Haut, als die Kultivierung als Monolayer. Somit kann in diesem Zellkultursystem die Mechanismen der Zell-Matrix Interaktion auf molekularer Ebene untersucht werden. Im dreidimensionalen Kollagengel nehmen die Fibroblasten eine weniger ausgebreitete Morphologie an und verringern ihre Proliferationsrate (Übersicht: Grinnel, 1994). Darüber hinaus kommt es zur Aktivierung von Signalwegen, die die Expression verschiedener Gene beeinflussen. Neben einer reduzierten Kollagen Typ I Synthese (Mauch et al., 1988; Mauch et al., 1992) führt der Kontakt von Fibroblasten mit fibrillären Typ I Kollagen zu einer veränderten MMP Regulation. Die Expression von MMP-1 und MT1-MMP wird induziert (Mauch et al., 1989; Tomasek et al., 1997, Zigrino et al., 2001). Darüber hinaus wird MMP-1 und vermittelt durch MT1-MMP auch MMP-2 aktiviert (Seltzer et al., 1994; Tomasek et al., 1997; Zigrino et al., 2001). Daneben erhöht sich auch die Menge an aktiven MT1-MMP-Molekülen.

Neben  $\alpha_2\beta_1$  und  $\alpha_1\beta_1$  wurde mit  $\alpha_{11}\beta_1$  ein weiterer Typ I Kollagenrezeptoren identifiziert (Elices und Hemler, 1989; Gulberg et al., 1992; Gullberg et al., 1995; Tiger et al., 2001). Langholz et al. (1995) konnten durch Integrinblockierende Antikörper zeigen, dass in humanen dermalen Fibroblasten der  $\alpha_2\beta_1$ -Integrinrezeptor für die Regulation der MMP-

1-Synthese verantwortlich ist, während die Reduktion der Kollagensynthese über  $\alpha_1\beta_1$ -Integrin vermittelt wird.

Wie in Abschnitt 1.3.3 beschrieben erkennen Integrine eine spezifische Sequenz in Matrixproteinen. Diese Peptidsequenzen, wie z.B. das RGD-Peptide, können auch die MMP-Synthese und die Aktivierung der MMP-2 beeinflussen (Teti et al., 1998; Werb et al., 1989). Weitere Untersuchungen haben ergeben, dass RGD-Pseudopeptide, bei denen eine Aminosäure der RGD-Sequenz verändert wurde, die Matrixdegradation durch MMPs inhibieren können und möglicherweise dadurch die Metastasierung verschiedener Zelllinien blockieren (Fujii et al., 1998; Tsuchiya et al., 2002).

Durch die Bindung von Kollagen an Integrine wird der Ras/MAP-Kinase Signaltransduktionsweg aktiviert (Schenk und Snaar-Jagalska, 1999). Die MAP-Kinasen p38, ERK (extracellular signal regulated kinase)1 und 2 sind beteiligt an der Induktion der MMPs (Lehtinen und Heino, 1999) P. Zigrino (2000) konnte zeigen, dass in Typ I Kollagengelen mit Hautfibroblasten die p38 Kinase in die Induktion der MMP-1 und MT1-MMP Synthese involviert ist, ERK1 und 2 dagegen nur in die Induktion der MT1-MMP Expression. Desweiteren wird in Fibroblasten die MMP-1 Expression durch die Aktivierung der Protein Kinase  $C\gamma$  und  $NF\kappa B$  nach Kontakt mit Kollagen (Xu und Clark, 1997).

#### **1.4. Einfluss von Schlangengift-Metalloproteinasen auf Integrin-Matrix-Wechselwirkungen**

Wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, kann man das dreidimensionale System der Kollagengele nutzen, um die Mechanismen der Kollagen-Integrin-Wechselwirkungen zu untersuchen. Die Zellen liegen aber in so einem dichten Netz von fibrillären Kollagen vor, dass zelluläre Veränderungen der Morphologie oder des Migrationsverhaltens technisch nur schwierig untersucht werden können. Es gibt aber andere Integrinbindende Substrate wie Schlangengift-Metalloproteasen, die solche Untersuchungen im Monolayer ermöglichen.

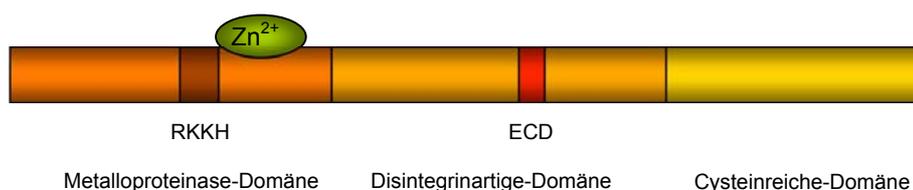
### 1.4.1 Struktur und Funktion von Schlangengift-Metalloproteinasen

Schlangengifte enthalten neben Neurotoxinen, Kardiotoxinen und vielen anderen bioaktiven Proteinen drei Klassen von Proteinen, die die Zelladhäsion und Hämostase beeinflussen: GPIb (Glycoprotein Ib) bindende Proteine, die die Blutplättchen-Aggregation inhibieren, die hämorrhagischen Toxine der Familie der Schlangengift-Metalloproteinasen und die Disintegrine (Übersicht: Fujimura et al., 1996; Kamiguti et al., 1998; Huang, 1998).

Disintegrine sind lösliche cysteinreiche Proteine, die eine RGD-Sequenz enthalten, mit der sie an Integrine binden. Es ist gezeigt worden, dass Disintegrine im Schlangengift durch Bindung an GPIIb/IIIa-Integrin die durch dieses Integrin vermittelte Thrombozyten-Aggregation blockieren können (Huang et al., 1994).

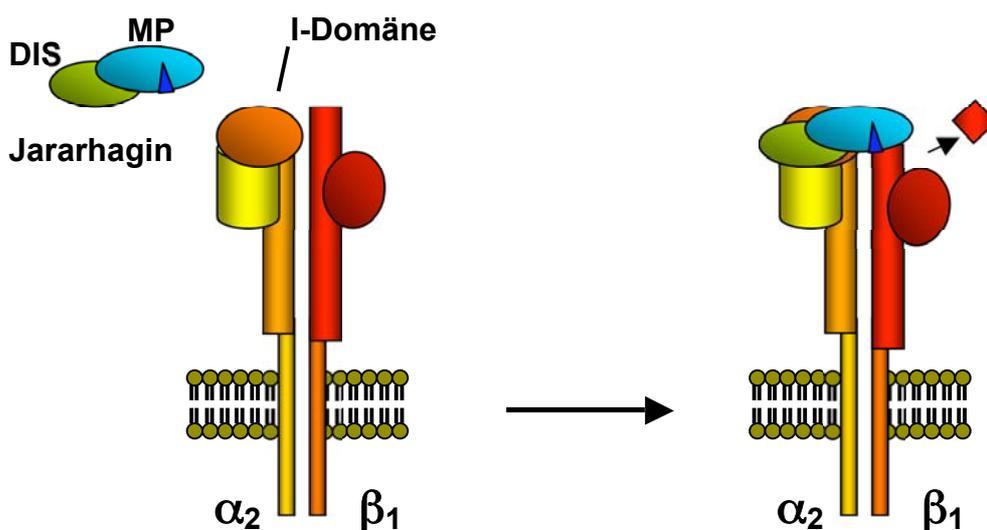
Die Gruppe der Schlangengift Metalloproteinasen (SVMPs, snake yenom metalloproteinases) kann in vier Klassen, P-I bis IV, eingeteilt werden (Bjarnason und Fox, 1994). Proteasen der P-I-Klasse bestehen nur aus einer Metalloproteinas-Domäne, Proteasen der P-II-Klasse besitzen zusätzlich eine C-terminale Disintegrinartige-Domäne. Die Klassen P-III und P-IV enthalten weitere Domänen am C-Terminus: P-III-Proteasen besitzen eine Cysteinreiche Domäne (vgl. Abb.1.5), die P-IV-Proteasen eine Lectin-Domäne.

Die P-II, P-III und P-IV Klassen der SVMPs zeigen starke Homologien zu den ADAMs (a disintegrin and metalloproteinase), welche aber im Gegensatz zu den löslichen SVMPs membrangebunden vorliegen (Wolfsberg und White, 1996). Außerdem ist bei den SVMPs die RGD-Sequenz der Disintegrin-Domäne durch eine ECD-Sequenz ersetzt, aber auch diese kann an Integrine binden und so die Wechselwirkungen mit der Matrix blockieren (Jia et al., 1997). Man spricht daher von Proteasen mit einer Disintegrinartigen-Domäne. Die Metalloproteinas-Domäne kann verschiedene Matrixbestandteile degradieren (Baramova et al., 1989).



**Abbildung 1.5: Struktur der PIII Klasse SVMP Jararhagin** Das 82kDa-Protein Jararhagin besteht aus der Metalloproteinas-, Disintegrinartigen- und Cysteinreichen Domäne. RKKH und ECD sind Bindungsstellen für  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin

Die am besten untersuchte Schlangengift-Metalloproteinase ist Jararhagin, eine 52 kDa große P-III-Klasse Protease aus dem Gift der brasilianischen Viper *Bothrops jararaca* (Paine et al., 1992; Kamiguti et al., 1998; Hati et al., 1999). Bei einem Schlangengebiss wirkt Jararhagin in verschiedener Weise auf die Thrombozyten-Kollagen-Wechselwirkung ein und führt zu systemischer Hämorrhagie (Abb. 1.6). Erstens kann Jararhagin extrazelluläre Matrixproteine an der Gefäßwand degradieren und zerstört so die Integrität des Zellverbundes, es kommt zu Einblutungen (Kamiguti et al., 1996; Hati et al., 1999). Jararhagin bindet an den  $\alpha_2$ -Integrinrezeptor der Thrombozyten und inhibiert deren kollageninduzierte Aggregation (De Luca et al., 1995, Kamiguti et al., 1996b). Weiterhin degradiert es die  $\alpha_1$ -Integrin Untereinheit von Thrombozyten und beeinflusst dadurch Signaltransduktionswege, die für die Aggregation notwendig sind (Kamiguti et al., 1997b).



**Abbildung 1.6: Mechanismus der Wirkungsweise Jararhagins** Jararhagin bindet mit DIS an die I-Domäne der  $\alpha_2$ -Untereinheit des Integrinrezeptors und spaltet mit der MP ein Fragment der  $\beta_1$ -Untereinheit ab. DIS: Disintegrinartige Domäne; MP: Metalloproteinase Domäne.

Zelladhäsionsexperimente mit Zelllinien und transfizierten Zellen, die nur eines der Integrinheterodimere  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$ ,  $\alpha_{11b}\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_M\beta_2$  exprimieren, ergaben, dass Jararhagin ausschließlich an  $\alpha_2\beta_1$  Integrin bindet (Moura-da Silva et al., 2001). Eine prozessierte, kleinere 28kDa Form (Jararcetin), die nur aus der

Disintegrinartigen Domäne besteht kann die Interaktion mit  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin blockieren (De Luca et al., 1995).

Des Weiteren konnte anhand von synthetischen Peptiden gezeigt werden, dass eine in Jararhagin vorhandene Sequenz an rekombinante I-Domänen der  $\alpha_2$ -Untereinheit in der Nähe der MIDAS Region bindet und die Interaktion mit Kollagen inhibiert (Ivaska et al., 1999; Pentikäinen et al., 1999). Diese RKKH (Arg-Lys-Lys-His) Sequenz liegt in der Metalloproteinase-Domäne, wie in Abbildung 1.5 gezeigt. Somit besitzt auch diese möglicherweise eine Integrinbindungssequenz. Wichtig für die Bindung des RKKH-Peptides und dessen inhibitorischen Effekt ist seine Konformation. Nur als zyklisches Peptid hat es eine entsprechende Konformation wie im Protein und kann *in vitro* an  $\alpha_2$ -Domänen binden (Ivaska et al., 1999).

In Thrombozyten wurde gezeigt, dass es parallel zur Bindung an die  $\alpha_2$ -Untereinheit zu einer Spaltung der  $\alpha_1$ -Untereinheit durch Jararhagin kommt (Kamiguti et al., 1996a, Kamiguti et al., 1996b). Diese Spaltung ist möglicherweise mitverantwortlich für die Inhibition der Integrin-Kollagen Wechselwirkungen. Darüber hinaus inhibiert diese Spaltung Kollageninduzierte Signaltransduktionswege innerhalb der Zelle. Durch die Kollageninduzierte Stimulierung der Thrombozyten wird die  $\alpha$ -Kette, pp72<sup>syk</sup>, des Fc-Rezeptors phosphoryliert (Gibbins et al., 1996). Degradierung der  $\alpha_1$ -Integrin Untereinheit durch Jararhagin verhindert diese Phosphorylierung (Kamiguti et al., 1997b).

Die verschiedenen Mitglieder der Familie der Schlangengift-Metalloproteinasen zeigen im Bereich der Disintegrin- und der Disintegrinartigen-Domäne Homologien von bis zu 98 %. Dagegen bestehen im Bereich der Metalloproteinase-Domäne sehr geringe Homologien. Zum Beispiel enthält die SVMP Atrolysin in ihrer Metalloproteinase-Domäne nicht die für Jararhagin beschriebene RKKH-Sequenz (Shannon et al., 1989). SVMPs können auch in prozessierter Form im Schlangengift vorliegen. Wie oben erwähnt enthält das Gift von *Bothrops jararaca* neben Jararhagin auch Jaracetin, die 28kDa große Disintegrinartige/Cysteinreiche-Domäne. Aus dem Gift der Vipern *Crotalus atrox* und *Bothrops alternatus* wurden die Disintegrinartigen/Cysteinreichen-Domänen von Catrocollastatin und Alternagin isoliert, die ähnlich wie Jararhagin in der Lage sind, die  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin/Kollagen-Interaktion oder die Aggregation der Thrombozyten zu inhibieren (Shimokawa et al., 1997; Souza et al., 2000). Darüber hinaus ist auch für die Cysteinreiche-Domäne von Atrolysin aus *Crotalus atrox* ein inhibitorischer Effekt auf die Blutplättchen-Aggregation beschrieben worden (Jia et al., 2000).

### 1.4.2 Einfluss Jararhagins auf Fibroblasten im Monolayer

Aufgrund der selektiven Bindung Jararhagins an  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin in Thrombozyten und der dadurch induzierten Effekte, wie Inhibition der Integrin-Kollagenwechselwirkungen und der damit verbundenen Signaltransduktionswege, wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Mauch (Dermatologische Klinik, Universität zu Köln) untersucht, inwiefern durch den Einfluss Jararhagins die durch Kollagen/ $\alpha_2\beta_1$ -Integrin Wechselwirkungen induzierte MMP-Synthese und Aktivierung in humanen dermalen Fibroblasten modifiziert wird.

Wie bereits beschrieben exprimieren humane dermale Fibroblasten in dreidimensionalen Kollagengelen MMP-1 und MT1-MMP und es kommt zur Aktivierung von MMP-2 und MMP-1. Durch Jararhagin kann diese Induktion nicht inhibiert werden. Im Gegenteil, es kommt bei Fibroblasten, die im Monolayer kultiviert werden durch Jararhagin zu ähnlichen Induktionseffekten wie im Kollagengel. Die Expression und Synthese der MMP-1 und MT1-MMP wird induziert. Die MMP-1 und MMP-2 werden aktiviert (P.Zigrino, 2000; Zigrino et al., 2002).

Darüber hinaus hat Jararhagin auch auf anderer zellulärer Ebene Effekte auf Fibroblasten, die sonst nur bei Interaktion der Zellen mit einer Kollagenmatrix beobachtet wurden. Die Zellmorphologie ändert sich ähnlich der im Kollagengel zu einem spindelförmigen, bipolarem Erscheinungsbild. Die Expression von  $\alpha_2$ -Integrin wird induziert und die Expression von Kollagen Typ I reduziert (P. Zigrino, 2000). Wie Jararhagin diese Veränderungen induziert, ist weitgehend unklar. Es konnte Bindung dieser SVMP an die Zelloberfläche von Fibroblasten nachgewiesen werden, und Adhäsionsversuche zeigten, dass die Adhäsion der Zellen an Jararhagin abhängig vom  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin ist (Moura-da-Silva et al., 2001; Zigrino et al., 2002). Die für die Thrombozyten beschriebene proteolytische Spaltung der  $\beta_1$ -Integrin Untereinheit konnte in Hautfibroblasten nicht nachgewiesen werden (P. Zigrino, 2000). Versuche mit inaktivierter Metalloproteinase-Domäne führten zu der Annahme, dass die MMP-regulierende Wirkung Jararhagins unabhängig von der proteolytischen Aktivität ist. Somit ist anzunehmen, dass durch die Bindung Jararhagins an den  $\alpha_2\beta_1$ -Integrinrezeptor die Bindung des Typ I Kollagen imitiert wird und so die beschriebenen zellulären Effekte ausgelöst werden.

## 1.5 Ziel dieser Arbeit

Wie in der Einleitung beschrieben, spielt die Familie der Matrix Metalloproteinasen durch ihre Fähigkeit Matrix-Bestandteile zu degradieren eine wichtige Rolle bei verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen. Durch den Kontakt von Kollagen Typ I mit  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin wird in Fibroblasten, die in Kollagengelen kultiviert werden, die Synthese von MMP-1 und MT1-MMP und die Aktivierung von MMP-1 und MMP-2 induziert. Dieses Zellkultursystem dient zur Analyse verschiedener Kollagen-induzierter zellulärer Effekte, wie auch der Kollagensynthese und Zellmorphologie. Der Nachteil dieses System ist, dass durch die dichte Kollagenmatrix verschiedene molekularbiologische und morphologische Untersuchungen nicht möglich sind. Es konnte aber gezeigt werden, dass ähnliche zelluläre Effekte durch die Schlangengift Metalloproteinase Jararhagin auch bei Fibroblasten im Monolayer induziert werden können. Diese SVMP kann an den  $\alpha_2\beta_1$ -Integrinrezeptor binden und wirkt kollagenimitierend. Somit könnten SVMPs die detaillierte Analyse von Integrinvermittelten zellulären Effekten ermöglichen.

In dieser Arbeit sollte daher die Induktion der MMP-Synthese und Aktivierung und andere durch SVMPs induzierte zelluläre Effekte genauer untersucht werden. Dazu werden verschiedene Domänen, die Disintegrinartige- und die Metalloproteinase-Domäne von SVMPs, die an  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin binden können, genutzt. Außerdem werden rekombinante Peptide eingesetzt, die zu Integrinbindungsstellen dieser SVMPs korrespondieren. Die Untersuchung im Monolayer sollte die Mechanismen der Integrinaktivierung näher beleuchten und die funktionale Analyse der Morphologieänderung ermöglichen.

Neben diesem *in vitro* Modell, das die Analyse der MMP-Regulation erleichtern könnte, soll mit der Generierung eines gewebsspezifischen MT1-MMP defizienten Mausstammes ein *in vivo* Modell etabliert werden, das die Untersuchung der Rolle dieser MMP bezüglich Wundheilungsprozessen und Tumorinvasion ermöglicht. In dieser Arbeit wurden die ersten Experimente zur Etablierung dieses Mausstammes durchgeführt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien stammten, wenn nicht anders angegeben von den Firmen Amersham Pharmacia, Bio-Rad, Life Technologies, Merck, Roche, Roth, Serva, Sigma-Aldrich. Radioaktive Chemikalien wurden von ICN bezogen.

Restriktionsenzyme, Enzyme zur DNA-Modifizierung und DNA-Größenmarker wurden von New England Biolabs bezogen und molekulare Gewichtsmarker für Proteine von Bio-Rad.

#### 2.1.2 häufig verwendete Puffer

<u>PBS</u>	162 mM 3 mM 8 mM 1,5 mM	NaCl KCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4
<u>MT-PBS</u>	150mM 16mM 4mM	NaCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O, pH 7,3
<u>TBE (10x)</u>	0,89 M 0,89 M 20 mM	Tris-HCl, pH 8,0 Borsäure EDTA
<u>TAE (10x)</u>	2 M 5,7% 50 mM	Tris Essigsäure EDTA
<u>20xSSC</u>	3 M 0,3 M	NaCl Natriumcitrat, pH 7,0
<u>TBS</u>	1,37 M 250 mM	NaCl Tris-HCl, Ph 7,4

### 2.1.3 Bakterienkulturen

Alle Transformationen wurden mit dem Escherichia coli Stamm DH5\_ (Life Technologies) durchgeführt. Der Genotyp ist F', supE44, \_lacU169 (\_80lacZ\_M15), hsdR17, recA1, gyrA96, thi-1, relA1.

### 2.1.4 Plasmide

- Klonierungen wurden mit dem Vektor pGem®-4 von Promega durchgeführt
- Plasmide zur Generierung des Ersatzvektors für die ES-Zelltransfektion waren MT1-MMP-Fragmente im pBluescript SK<sup>+</sup> Vektor (Holmbeck et al., 1999; Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Birkedal-Hansen, National Institute of Dental and Craniofacial Research, Bethesda, USA)
- Das Plasmid pNeoflox8 enthält ein von zwei loxP-Sequenzen flankiertes Neomycinresistenzgen unter Kontrolle des Polyoma enhancer/herpes simplex virus Thymidin Kinase (MC1) Promotors (Thomas and Capecchi, 1987). Das Plasmid wurde freundlicherweise von Dr. W. Müller, Universität Braunschweig zur Verfügung gestellt.

### 2.1.5 Zellkultur

Es wurden ZellLochplatten und Flaschen der Firma Greiner, Costar und TLC verwendet. Zellkulturmedien und Zusätze wurden von der Firma Gibco BRL bezogen. Fötales Kälberserum (FKS) stammt von der Firma PAA Laboratories.

#### Medien

Zellkulturmedien für Fibroblasten und embryonale Stammzellen wurden wie im „Laboratory Protocols for Conditional Gene Targeting“ (Torres and Kühn, 1997) beschrieben hergestellt. Für embryonale Mausfibroblasten und für humane dermale Fibroblasten wurde das gleiche Medium verwendet.

#### Fibroblastenmedium

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	500	ml
FKS	50	ml
Penicillin/Streptomycin (10000U/10000µg/ml)	6	ml
L-glutamine (200mM)	6	ml

ES Medium (Für embryonale Stammzellen)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	500	ml
FKS*	75	ml
Penicillin/Streptomycin (10000U/10000µg/ml)	6	ml
L-glutamine (200mM)	6	ml
Natrium Pyruvat (100mM)	6	ml
Nicht essentielle Aminosäuren (100x)	6	ml
1M $\beta$ -Mercaptoethanol	1,2	ml
ESGRO Leukaemia Inhibitory Factor	10 <sup>6</sup>	U/ml

\*ES-Zellen, die mit dieser Charge FKS behandelt wurden, waren positiv auf Keimbahngängigkeit getestet worden.

**Zellen**

Humane dermale Fibroblasten und embryonale Mausfibroblasten wurden aus Hautbiopsien und Mausembryonen präpariert.

Maus ES-Zellen der Zelllinie IB10 wurden von Dr. Neil Smyth (Institut für Biochemie II, Universität zu Köln) zur Verfügung gestellt. Murine Hautfibroblasten aus Wildtyp- und  $\alpha_2$ -Integrin defizienten Mäusen (Holtkötter et al., 2002) wurden freundlicherweise von Kerstin Elias (Dermatologische Klinik, Universität zu Köln) präpariert und kultiviert.

**2.1.6 Synthetische Oligonukleotide**

Primer	Sequenz	benutzt für
lox Nco 3'	GAT CAT AAC TTC GTA TAA TGT ATG CTA TAC GAA GTT	Einbringen der loxP site
lox Nco 5'	GAT CTC CAT GGA TAA CTT CGT ATA GCA TAC ATT ATA	Einbringen der loxP site

Alle Oligonukleotide wurden von MWG bezogen.

**2.1.7 Antikörper**

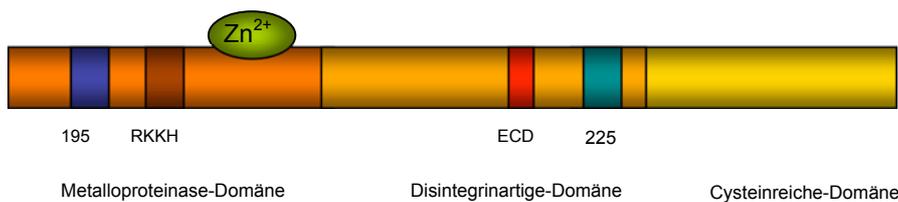
Antikörper	Spezies	Quelle
anti MMP-1	Kaninchen (Serum)	P.Angel, DKFZ Heidelberg
anti $\alpha_1$ Integrin (FB12)	Maus	Chemicon
anti $\alpha_2$ Integrin (P1E6)	Maus	Chemicon
anti SVMP (Metalloprot. Domäne) MPA	Maus (Serum)	J.Fox, University of Virginia, USA
Cy-3 konjugiert anti Maus	Kaninchen	Jackson Laboratories, Dianova
HRP konjugiert anti Kaninchen	Schwein	DAKO

### 2.1.8 Schlangengift-Metalloproteinasen: Domänen und Peptide

In dieser Arbeit wurde neben Jararhagin aus *Bothrops jararaca* (Paine et al., 1992) die rekombinante Metalloproteinasedomäne aus Atrolysin (Bjarnason and Fox, 1987) und die rekombinante Disintegrinartige Domäne aus Catrocollastatin (Shimokawa et al., 1997) benutzt. Außerdem wurden Peptide mit beschriebenen Integrin-bindenden Sequenzen verwendet. Jararhagin wurde aufgereingt von Dr. A. Kamiguti, University of Liverpool. Alle Domänen und Peptide der Schlangengift-Metalloproteinasen Jararhagin, Atrolysin und Catrocollastatin wurden rekombinant im Labor von J.W. Fox, University of Virginia, USA hergestellt.

Peptid	Sequenz	Quelle
ECD	Cys*-Arg-Pro-Ala-Arg-Ser-Glu-Cys*-Asp-Ile-Ala-Glu-Ser-Cys	Jia et al., 1997
RKKH	Cys*-Thr-Arg-Lys-Lys-His-Asp-Ala-Glu-Cys*	J. Fox, University of Virginia, USA
195	Cys*-Glu-Gln-Gln-Arg-Tyr-Asp-Pro-Tyr-Lys-Cys*	Ivaska et al., 1999
225	Cys*-Pro-Ala-asp-Val-Phe-His-Lys-Asn-Cys*	Ivaska et al., 1999

\* bezeichnet die Cysteinreste, zwischen denen Disulfidbrücken bestehen



**Abbildung 2.1: Struktur der SVMP Jararhagin** Die Abbildung zeigt die Lage der funktionellen Domänen und der Integrinbindungssequenzen RKKH und ECD (rot). Die Kontrollpeptide 195 und 225 sind blau dargestellt.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellbiologische Methoden

#### Humane dermale Fibroblasten

##### **Isolierung von humanen dermalen Fibroblasten**

Zur Isolierung von humanen dermalen Fibroblasten wurde das subkutane Fettgewebe von Hautbiopsien entfernt, diese wurden in kleine Stücke (etwa 3mm Durchmesser) geschnitten und mit der dermalen Seite nach unten in Zellkulturflaschen gepflanzt und

für etwa 1 Stunde bei 37°C inkubiert, bis die Gewebestücke angetrocknet waren. Nach vorsichtiger Zugabe von Fibroblasten-Medium wurden die Biopsien für zwei bis vier Wochen kultiviert. Während dieser Zeit wuchsen die Fibroblasten aus den Gewebestücken aus. Sobald die Zellen konfluent waren, wurden sie durch Inkubation mit Trypsin-Lösung (0,1% w/v Trypsin/0,02% w/v EDTA) bei 37°C für 3 bis 5 Minuten abgelöst. Durch Zugabe des dreifachen Volumens an Fibroblasten-Medium wurde die enzymatische Reaktion gestoppt. Die Zellen wurden in Zentrifugenröhrchen überführt und durch Zentrifugieren 1200 UpM für 5 Minuten sedimentiert. Die Zellen wurden in Fibroblasten-Medium resuspendiert und auf ZellLochplatten verteilt.

Solange die Gewebestücke an dem Flaschenboden hafteten, konnten nach Zugabe neuen Mediums weitere Fibroblasten auswachsen und isoliert werden. Humane dermale Fibroblasten wurden in Fibroblasten-Medium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>- Gehalt kultiviert.

### **Mykoplasmentest**

Nach Isolierung der Zellen wurden diese mittels einer DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindol) Kernfärbung auf das Vorhandensein von Mykoplasmen getestet. Dazu wurden 1000 Fibroblasten auf einer Kammer eines 8- Kammerobjektträgers (Becton Dickinson) für 48 Stunden in antibiotikafreien Medium kultiviert. Die Fibroblasten wurden 5 Minuten mit kaltem Aceton fixiert, und zweimal mit PBS für 5 Minuten gewaschen. Die Zellen wurden in DAPI (1:1000 in MeOH) für 15 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen (5 Minuten) mit PBS wurden die Zellen in Fluoromount-G (Biozol Diagnostica) eingebettet und an einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioskop) ausgewertet. Waren die Fibroblasten durch Mykoplasmen kontaminiert, sah man deren prokaryotischen Kerne perlenschnurartig neben den Kernen der Hautfibroblasten.

### **Herstellung von dreidimensionalen Kollagengelen**

Kollagengele wurden wie in Mauch et al. (1988) beschrieben hergestellt. Dazu wurden in 1ml Gesamtvolumen 0,2ml 5xDMEM-Lösung (5xDMEM mit 175mM NaHCO<sub>3</sub>), 0,3ml Kollagen Typ I (3mg/ml in 0,1% v/v Essigsäure), 50\_1 0,1M NaOH, 0,1ml FKS, 0,25 ml H<sub>2</sub>O und 0,1ml Zellsuspension (5 x 10<sup>5</sup> Fibroblasten) kombiniert. Die Zellsuspension wurde als letztes zu der Lösung gegeben. Auf einer Lochplatte mit 6 cm Durchmesser wurden 2ml der Lösung eingesetzt, auf andere Schalengrößen entsprechende Mengen.

Durch die Interaktion der Kollagenrezeptoren mit Kollagen Typ I entstanden gelartige Strukturen, die über den Inkubationszeitraum von 48 Stunden kontrahierten. Nach einer Stunde wurden die Kollagengele durch leichtes Schwenken der Lochplatten von der Schalenwand gelöst. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde der Durchmesser der Gele bestimmt und so die Gelkontraktion ermittelt.

### **Herstellung von konditioniertem Fibroblastenmedium**

$4 \times 10^4$  Hautfibroblasten in 500  $\mu$ l Medium wurden als Monolayer oder im Kollagengel in 24-Lochplatten kultiviert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für weitere 24 Stunden in FKS-freiem Medium kultiviert. Das konditionierte Fibroblastenmedium enthielt die von den Fibroblasten über 24h sezernierten Proteine, wie zum Beispiel MMPs. Die Überstände wurden abgenommen und können bei 4°C mehrere Tage gelagert werden. Sollte die Gesamtproteinmenge des konditionierten Mediums bestimmt werden, musste DMEM ohne Phenolrot benutzt werden, da dieses die Proteinbestimmung beeinträchtigte.

### **Adhäsionsversuche**

Um die Adhäsion von Fibroblasten an verschiedene Substrate zu untersuchen, wurden 96-Lochplatten über Nacht mit 100  $\mu$ l Substratlösung in PBS bei 4°C beschichtet. Die SVMP Domänen wurden in einer Konzentration von 1  $\mu$ M und die Peptide in einer Konzentration von 100  $\mu$ M eingesetzt. Als Kontrollen wurden weitere Löcher mit 100  $\mu$ l Kollagen Typ I Lösung (100  $\mu$ g/ml, gelöst in 0,1% v/v Essigsäure, Vitrogen) und mit BSA (1% w/v in PBS) beschichtet. Am folgenden Tag wurden die Vertiefungen mit PBS gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit BSA inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden  $1 \times 10^4$  Fibroblasten in serumfreiem Medium auf den Substraten ausgesät und für 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Bestimmung der Anzahl adhärenter Zellen erfolgte modifiziert nach einer bereits beschriebenen Methode (Kueng et al., 1989). Dazu wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und die Zellen für 10 Minuten mit Paraformaldehyd-Lösung (5% v/v PFA /PBS) fixiert. Danach folgte das Anfärben der Zellmembranen mittels Kristallviolett (0,5% w/v in 20% MeOH) für 15 Minuten. Nach mehrmaligem vorsichtigem Waschen mit Leitungswasser wurde der Farbstoff mit 100  $\mu$ l Natriumcitrat (0,1M in 50% v/v EtOH) aus den Zellen eluiert und die Extinktion bei 495nm im Elisa Reader bestimmt.

### **Zellmigrationsversuche**

Die Migration der Fibroblasten wurde in Boyden Kammern (Mensing et al., 1983) bestimmt. Dazu wurden  $1 \times 10^4$  Fibroblasten in 100\_μl serumfreiem Medium im oberen Kompartiment der Kammer über permeablen Nucleopore Membranen (VWR, Porengröße: 8\_μm) ausgesät. In der unteren Kammer befanden sich 200\_μl eines Chemoattraktans enthaltenden Mediums. Nach 6 Stunden wurden die migrierten Zellen auf der Unterseite der Membranen mittels des DIFF-Färbekits (Dade Behring) nach Herstellerangabe fixiert und angefärbt. Die auf der Oberseite der Membran anhaftenden Zellen wurden vorsichtig abgewischt und die Membranen ausgewertet. Die migrierten Zellen auf jeder Membran wurden an einem Leitz Dialux Mikroskop ausgezählt.

### **Immunfluoreszenz-Färbung des Aktinskeletts**

Hautfibroblasten wurden auf Kammerobjektträgern (Becton Dickinson) für 48 Stunden kultiviert. Danach wurden sie für 10 Minuten in eiskaltem Aceton fixiert. Die Zellen auf den Objektträgern ließ man antrocknen und färbte sie mit FITC konjugiertem Phalloidin (25μg/ml, Sigma) für eine Stunde in einer feuchten Kammer. Nach dreimaligem 10minütigen Waschen in PBS wurden die Zellen in Fluoromount-G (Biozol Diagnostica) eingebettet.

### **Photographie**

Die S/W-Aufnahmen der Zellen entstanden an einem Nikon Diaphot mit einer Nikon 601M Kamera. Als Film wurde ein AGFA-Pan 25X verwendet.

Die Fluoreszenz-Aufnahmen wurden mit einem Nikon Eclipse E800 aufgenommen.

### **FACS-Analysen**

Fibroblasten wurden nach zweitägiger Inkubation in Anwesenheit von  $1 \mu\text{M}$  der Metalloproteinasedomäne mit 0,5% v/v EDTA in PBS vom Schalenboden abgelöst und nach zweimaligem Waschen in PBS in Inkubationspuffer (1% w/v BSA, 0,01% w/v  $\text{NaN}_3$  in PBS) in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml resuspendiert. Für 45 Minuten wurden die Zellen auf Eis mit dem primären Antikörper gegen die Metalloproteinase-Domäne (MPA, 1:50) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen im Arbeitspuffer mit Cy-3-konjugierten sekundärem Antikörper (1:200) resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen und in 1ml PBS für die Analyse aufgenommen. Die FACS-Analyse wurde an einem FACScan

Zytometer mit Cellquest software (Becton Dickinson) durchgeführt. Es wurden aus jeder Probe  $5 \times 10^3$  Zellen analysiert.

## **Embryonale Stammzell-Kultur**

### **Isolierung von embryonalen Fibroblasten (CD 1 Neo /feeder cells)**

Zur Isolierung von embryonalen Mausfibroblasten wurden 13,5 Tage alte Embryonen aus dem Uterus präpariert. Die Plazenten wurden entfernt, Organe, die blutbildende Stammzellen enthalten können, wie Herz und Leber und das Gehirn wurden herauspräpariert. Zwischen jedem Präparationsschritt wurden die Embryonen mit PBS gewaschen. Mit einer Schere wurden die Embryonen 2-3 Minuten zerkleinert und in Trypsinlösung (2ml/Embryo) überführt. Für 5 Minuten wurde das embryonale Gewebe auf Eis gestellt und dann für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die enzymatische Reaktion des Trypsins wurde durch die Zugabe von Zweieinhalbfachen Volumen an Fibroblastenmedium gestoppt. Nach Schütteln der Lösung waren jetzt abgelöste Fibroblasten im Medium enthalten. Das Medium wurde abgenommen und auf Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser überführt. Durch erneute Zugabe von Medium konnten weitere Zellen aus dem Gewebe gelöst werden. Pro Embryo wurde eine 10cm-Schale in Kultur gebracht.

Die Fibroblasten wurden für ein bis zwei weitere Passagen kultiviert und auf das Vorhandensein von Mykoplasmen getestet. Dann wurden sie entweder in 10% v/v DMSO/FKS bei -80°C eingefroren (1Kryoröhrchen/10 cm Schale) oder mit Mitomycin C (MMC) behandelt und für die Kultivierung von ES-Zellen genutzt.

### **Mitomycin C Behandlung embryonaler Fibroblasten**

ES-Zellen wurden auf embryonalen Mausfibroblasten (EF-Zellen), die mit Mitomycin C (MMC) behandelt wurden, kultiviert. Dazu wurden konfluente EF-Zellen für 2 Stunden mit 10µg/ml MMC inkubiert. Danach wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen und in neuem Medium weiter kultiviert.

### **Kultivierung embryonaler Stammzellen**

Zu MMC-behandelten embryonalen Fibroblasten wurde ES-Medium gegeben. ES-Zellen wurden aufgetaut, in ES-Medium überführt und bei 1500 x g in einer Beckmann

GPKR Zentrifuge für 5 Minuten abzentrifugiert. Nach Resuspension in ES-Medium wurden die ES-Zellen auf den embryonalen Fibroblasten ausgesät. Das Medium wurde mindestens alle 24 Stunden gewechselt.

### **Transfektion embryonaler Stammzellen**

Zur Transfektion der ES-Zellen wurden 100µg des Austauschvektors pMT-Neolox5 über Nacht bei 37°C mit 100U des Restriktionsenzym Sal I linearisiert. Anschließend wurde der Vektor dreimal extrahiert: mit Tris-gepuffertem Phenol pH 8, mit Phenol:Chloroform (2:1) und Chloroform alleine. Durch Zugabe des gleichen Volumens an Isopropanol wurde die DNA präzipitiert und nach zweimaligen Waschen in Ethanol in 50µl Tris-HCl, pH 8 resuspendiert. Messungen der OD ergaben eine durchschnittliche Ausbeute an 60-70µg DNA bei einer  $OD_{260/280}$  von 1,8.

Die ES-Zellen einer konfluenten 10 cm-Schale (ca.  $1-1,5 \times 10^7$  Zellen) wurden trypsiniert, abzentrifugiert und mit MT-PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in MT-PBS aufgenommen ( $1 \times 10^7$  Zellen/ml) und gut resuspendiert. 1ml der Zellsuspension wurde in eine Transfektionsküvette (BTX) überführt, und 25µg des linearisierten Vektors wurden zugegeben.

In einer Elektroporationsanlage wurde durch einen Puls bei 240V die Transfektion durchgeführt. Die transfizierten ES-Zellen wurden in zwei verschiedenen Konzentrationen ( $1,5$  und  $2 \times 10^6$  Zellen) auf 10cm-Schalen mit Mitomycin behandelten embryonalen Fibroblasten ausgesät. Zusätzlich wurden  $1 \times 10^6$  nicht transfizierte ES-Zellen auf embryonalen Fibroblasten kultiviert, die als Kontrolle für die anschließende Antibiotika-Selektion dienen.

### **Antibiotika-Selektion und Picken transfizierter ES-Zellen**

Transfizierte ES-Zellen und Kontrollzellen wurden für 48 Stunden in ES-Medium kultiviert. Danach beginnt die Selektion der transfizierten Zellen durch Zugabe von Neomycin (175µg G418/ml ES-Medium). Das Selektionsmedium wurde täglich erneuert. Nach etwa 3 Tagen beginnen Zellen, die nicht den Vektor mit dem Neomycinresistenz-Gen aufgenommen haben, abzusterben. Nach etwa 9 Tagen waren alle nicht transfizierten Zellen gestorben und die verbleibenden Zellklone als große, scharf umrandete Kolonien erkennbar.

Bevor diese Kolonien gepickt werden konnten, mussten 48-Lochplatten mit MMC behandelten embryonalen Fibroblasten vorbereitet werden.

Das Picken der Klone fand unter der Sterilbank an einem Stereo-Mikroskop statt. Die ES-Zellen wurden in MT-PBS überführt und offen unter das Mikroskop gestellt.

8 Kolonien wurden mit einer 20µl Pipette gepickt und in 50µl Trypsin in 96-Lochplatten überführt. Nach 5 Minuten wurden die Zellen mit einer 200µl Pipette resuspendiert und auf die EF-Zellen in den 48-Lochplatten ausgesät. Mit täglichen Mediumwechseln wurden die Zellen für weitere 3-4 Tage kultiviert.

### **Teilen und Einfrieren der ES-Zellklone**

Die konfluenten, gepickten Zellen wurden geteilt um einen Teil einzufrieren und den anderen Teil zur Analyse des Genotypes zu verwenden.

Dazu wurden 48-Lochplatten mit 0,1% Gelatine (in PBS) beschichtet und unter der Sterilbank getrocknet. Die Vertiefungen wurden mit 500µl ES-Medium gefüllt.

Die gepickten Zellen wurden mit MT-PBS gewaschen und mit 100µl Trypsinlösung abgelöst. Durch Zugabe von 50µl FKS wurde die enzymatische Reaktion gestoppt. Die Zellen wurden resuspendiert und 50µl der Suspension wurden auf den beschichteten 48-Lochplatten ausgesät. Diese Zellen wurden bis zur Isolierung der genomischen DNA weiter kultiviert. Zu den verbleibenden 100µl Zellsuspension wurden 500µl des Einfriermediums (12% v/v DMSO/FKS) gegeben und die Zellen in Kryo-Röhrchen überführt. Diese wurden bei -80°C eingefroren.

## **2.2.3 Proteinbiochemie**

### **Proteinbestimmung**

Die Proteinbestimmung der für die Analyse genutzten konditionierten Medien (vgl. 2.1.2) wurde mit dem BCA-Proteinassay (Pierce) durchgeführt. Üblicherweise lag die Gesamtproteinkonzentration im konditionierten Fibroblastenmedium bei 1µg/µl.

### **Proteinfällung (TCA)**

Zu 1ml Proteinlösung wurden 250\_µl einer 50%-igen w/v TCA-(Tri-Chloressigsäure) Lösung und 10\_µl einer 10%-igen v/v Triton-X-100 Lösung zugegeben. Die Mischung wurde für 20 bis 30 Minuten auf Eis inkubiert und dann bei 14 000 rpm 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml kalten Aceton gewaschen und erneut

abzentrifugiert (14 000 rpm, 4°C, 15 Minuten). Danach wurde das Sediment getrocknet und in 10 bis 100µl PBS resuspendiert.

### **SDS-Polyacrylamid Gel-Elektrophorese (SDS-Page) und Immunoblot-Analyse**

Zur Proteinanalyse wurden 10µg Gesamtprotein von konditioniertem Fibroblastenmedium auf 10%-igen SDS-Polyacrylamidgelen wie beschrieben (Laemmli, 1970) aufgetrennt. Dazu wurden die Proben zuvor in Laemmli-Puffer (62,5 mM Tris/HCl, pH 6,8; 25% v/v Glycerin; 2% w/v SDS; 0,01% w/v Bromphenol Blau) mit 5% v/v β-Mercaptoethanol für fünf Minuten auf 95°C erhitzt und dann auf das Gel geladen.

Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond-C Super™, Amersham Pharmacia) mittels einer Semi-dry Transferkammer (Amersham Pharmacia) gemäß Herstellerangabe transferiert. Der Transfer wurde durch Anfärben der Proteinbanden auf der Membran mittels Ponceau red™ (Sigma) überprüft.

Alternativ wurden die Polyacrylamidgele mit Coomassie Färbelösung (10% v/v Isopropanol, 10% v/v Essigsäure, 0,2% v/v Serva Blau R, filtriert) angefärbt und solange in Entfärbelösung (5% v/v Ethanol, 10% v/v Essigsäure) inkubiert, bis Proteinbanden sichtbar wurden.

Zur Reduktion unspezifischer Proteinbindungen wurden die Membranen in fettfreiem Milchpulver (5% w/v in 0,5% w/v Tween/PBS) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dazu wurde anschließend der Kaninchen anti hMMP-1 Antikörper in einer Verdünnung von 1:3000 in 0,5% v/v Tween/PBS gegeben und die Membran darin für eine weitere Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 0,5% v/v Tween/PBS für jeweils 7 Minuten wurde die Membran für 10 Minuten erneut mit Milchpulverlösung behandelt und dann mit dem zweiten Antikörper (HRP konjugierten Schwein anti Kaninchen, 1:2000) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach erneutem dreimaligem Waschen mit 0,5% v/v Tween/PBS wurden die gebundenen Antikörper mittels des ECL™-System (Amersham Pharmacia) gemäß Herstellerangaben detektiert.

### **Gelatine-Zymographie**

Um die gelatinolytische Aktivität von MMPs zu detektieren wurden wie in Howard et al. (1991) beschrieben Gelatine-Zymographien durchgeführt. Dazu wurden 10µg Gesamtprotein von konditionierten Fibroblastenmedien auf 10%-igen SDS-Polyacrylamidgelen, die 1mg/ml Rindergelatine (Sigma) enthalten, aufgetrennt. Die

Auftrennung erfolgt unter nicht reduzierenden Bedingungen. Die Gele wurden nach kurzem Abspülen mit ddH<sub>2</sub>O eine halbe Stunde in 2,5% v/v Triton-X 100 gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation im Substratpuffer (50mM Tris-HCl, pH 8, 5 mM CaCl<sub>2</sub>) bei 37°C. Nach 16-48 Stunden wurden die Gele mit Coomassie Färbelösung (10% v/v Isopropanol, 10% v/v Essigsäure, 0,2% w/v Serva Blau R, filtriert) gefärbt und in Entfärberlösung (5% v/v Ethanol, 10% v/v Essigsäure) inkubiert, bis gelatinolytische Proteine als weiße Banden erkennbar waren. Auch die proMMP-2 hat in diesem System proteolytische Aktivität, da durch die denaturierende Wirkung des SDS das Protein so aufgefaltet ist, dass das katalytische Zentrum freigelegt ist.

### **Bindungsstudien**

Bindungsstudien an löslichen rekombinanten  $\alpha_1\beta_1$ - und  $\alpha_2\beta_1$ -Integrinektodomänen wurden wie in Eble et al., 2001 beschrieben durchgeführt. Die Ektodomänen der Integrine sind über das jun/fos Dimerisierungsmotiv verbunden. Als getestete Substrate dienten Jararhagin, die Metalloproteinasedomäne aus Atrolysin und die Disintegrinartige Domäne aus Catrocollastatin. 96-Lochplatten wurden mit 100nm Jararhagin, 1  $\mu$ M Disintegrinartiger- bzw. Metalloproteinase-Domäne in 20mM NaPH<sub>2</sub>O, pH7.0, 70mM NaCl über Nacht beschichtet. Als Negativkontrolle diente BSA (1% w/v in TBS, 2mM MgCl<sub>2</sub>), als Positivkontrolle Rinder-Kollagen Typ I (bCol1, 20  $\mu$ g/ml in 0,1% v/v Essigsäure) oder ein helikales Fragment aus Kollagen Typ IV (CB3, 10  $\mu$ g/ml in TBS/MgCl<sub>2</sub>). Am nächsten Tag wurden die Kulturplatten dreimal mit TBS/MgCl<sub>2</sub> gewaschen und für 2 Stunden mit 1% w/v BSA in TBS/MgCl<sub>2</sub> bei Raumtemperatur geblockt. Darauf hin wurden die Integrinektodomänen (100nM bzw. 50nM in 1% w/v BSA/TBS/MgCl<sub>2</sub>) für 2 Stunden zu den Substraten gegeben. Zusätzlich wurden 1mM MnCl<sub>2</sub> bzw. CaCl<sub>2</sub> oder 10mM EDTA zugegeben. Nach zweimaligen Waschen in HEPES-Puffer (50mM HEPES, pH7.5, 150mM NaCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM MnCl<sub>2</sub>) wurden die gebundenen Integrinektodomänen mit 2,5% Glutaraldehyd in HEPES-Puffer für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach weiterem dreimaligen Waschen in TBS/MgCl<sub>2</sub> wurde der Anteil an gebundenen Ektodomänen durch die Inkubation im primären Antikörper (Kaninchen anti human  $\alpha_1$ -Integrin-Untereinheit Serum, 1:400) für 90 Minuten bei Raumtemperatur und mit sekundären Antikörper (AP-konjugiert anti-Kaninchen IgG, 1:600) im ELISA-reader bestimmt. Daraufhin folgten drei Waschschritte in TBS/MgCl<sub>2</sub>. Die Substratfärbereaktion wurde mit p-Nitrophenyltphosphat durchgeführt und bei 405nM bestimmt.

## 2.2.4 Nukleinsäureanalyse

### DNA-Isolierung aus ES-Zellen

Konfluente ES-Zellen auf Gelatine-beschichteten 48-Lochplatten wurden wie bereits beschrieben mit Trypsin abgelöst (vgl. Abschnitt 2.2.1). Die Reaktion wurde durch Zugabe von Medium gestoppt, die Zellen in 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und bei 3000 UpM in einer Tischzentrifuge für 3 Minuten sedimentiert. Die Zellen wurden in MT-PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden 250µl DNA-Lysepuffer A (50mM Tris, pH8; 100mM NaCl; 10mM EDTA) mit 20\_g/ml RNase zugegeben. Darin wurden die Zellen für eine Stunde bei 37°C auf einem Zellschüttler inkubiert. Nach Zugabe von 250µl DNA-Lysepuffer B (50mM Tris, pH8; 100mM NaCl; 10mM EDTA; 0,4% w/v SDS) mit 100µg/ml Proteinase K wurde die Zellsuspension über Nacht bei 55°C weiter geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die DNA durch Zugabe von 500µl Isopropanol präzipitiert. Nach einmaligem Waschen mit 500µl 70% v/v Ethanol wurde die DNA in 50µl 10mM Tris-HCl, pH8 über Nacht auf dem Schüttler bei 55°C resuspendiert.

### Herstellung radioaktiv markierter cDNA-Sonden

<sup>32</sup>P-markierte cDNA-Sonden wurden mittels des „Ladderman™ labelling kit“ (TAKARA) nach dem Herstellerprotokoll synthetisiert. Diese Methode beruhte auf dem Prinzip des „Random priming“ (Feinberg und Vogelstein, 1983).

Es wurden 25ng doppelsträngige DNA-Fragmente eingesetzt, durch fünf-minütiges Erhitzen auf 95°C denaturiert und nach Herstellerangaben durch Zugabe von 1,87 Mbq ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P) dCTP (spezifische Aktivität größer 111tBq/mmol, ICN) markiert. Die Sonden wurden dann über Sephadex-G50-Säulen („Probe Quant™ G-50 Micro Columns“, Amersham Pharmacia) von nicht eingebauten Nukleotiden getrennt. 1µl der aufgereinigten Sonde wurden im Szintillationszähler (Beckmann) gemessen.

Sonde für den Nachweis von	Größe	Restriktion	Quelle
MMP-1	1800 bp	XbaI/NotI	Angel et al., 1987
MT1-MMP	1100 bp	Eco RI	Okada et al., 1995
Collagen_1 (I)	1400 bp	HpaI/EcoRI	Chu et al., 1982
18s RNA	24mer-Oligonukleotid		Carlson et al., 1993
externe Probe (MT1-MMP)	300 bp	NdeI/BglIII	

### **Southern Blot Analyse (Southern, 1975)**

25µl genomische DNA wurden mit 50 U des Restriktionsenzymes Bam HI für 2-3 Stunden bei 37°C in einem Reaktionsvolumen von 200µl geschnitten. Nach erneuter Zugabe von 50 U des Enzymes wurde der Restriktionsansatz weiter über Nacht inkubiert.

Die verdaute DNA wurde durch Zugabe von 20µl 3M Natriumacetat, pH 5,6 und 500µl Ethanol präzipitiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 70% v/v Ethanol wurde die DNA in 20 µl 10mM Tris-HCl, pH8 resuspendiert. Um den Alkohol vollständig zu verdampfen, wurde die DNA für 10 Minuten bei 75°C inkubiert.

Die geschnittene DNA wurde über Nacht auf einem 0,8%igen TAE-Agarosegel aufgetrennt. Am nächsten Tag wurde das Gel zusammen mit einem daneben ausgerichteten Lineal photographiert um die Position der Banden der 1kb DNA-Leiter (Life Technologies) markieren zu können.

Bevor die DNA auf eine Nylonmembran (Hybond N+™, Amersham Pharmacia) übertragen wurde, wurde sie zunächst durch Inkubation des Gels für 5 -10 Minuten in 0,25M HCl depurinert und dann das Gel für 30 Minuten im Alkali-Transfer Puffer (0,6M NaCl, 0,4M NaOH) inkubiert. Der Transfer geschah über Nacht mittels Kapillarblot mit Alkali-Transfer-Lösung.

Am nächsten Tag wurde die Membran in 0,5M NaCl/1M NaOH für 5 Minuten gewaschen, getrocknet und bei 80°C eine Stunde lang gebacken, um die DNA auf der Membran zu fixieren.

Die Membran wurde dann in einer rotierenden Hybridisierungsröhre bei 65°C für eine Stunde im Prähybridisierungspuffer (4xSSC, 0,4% w/v Milchpulver, 4% w/v SDS, 0,3mg/ml Heringssperma ssDNA) inkubiert. Nach der Prähybridisierung wurde der Puffer gegen den Hybridisierungspuffer (4xSSC, 0,4% w/v Milchpulver, 4% w/v SDS, 20% w/v Dextransulfat, 0,3mg/ml Heringssperma ssDNA) ausgetauscht und die Membran darin mit der denaturierten markierten Sonde ( $3 \times 10^6$ cpm/ml) über Nacht bei 65°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Membran zweimal mit 0,1x SSC; 0,1% w/v SDS bei 55°C gewaschen. Ein Röntgenfilm wurde für ein bis drei Tage (Amersham Pharmacia) in Röntgenkassetten bei -80°C aufgelegt.

### **RNA-Isolierung aus Fibroblasten**

1-1,5 x 10<sup>6</sup> dermale Fibroblasten wurden auf 6 cm Zellkulturschalen in 3ml Medium als Monolayer oder im Kollagengel kultiviert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen im Monolayer mit PBS gewaschen, in 1ml RNAzol B (WAK Chemie) mit einem Zellschaber vom Schalenboden abgekratzt und in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt. Die Kollagengele wurden dreimal mit PBS gewaschen und in 1ml RNAzol B überführt. Mit Hilfe eines Skalpells und einer 22g Kanüle wurden die Gele zerkleinert und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Die RNA wurde mit 300µl Chloroform extrahiert und mit dem gleichen Volumen an Isopropanol gefällt. Nach einem weiteren Waschschrift mit 500µl 70% v/v Ethanol wurde die RNA in 10-20µl DEPC (Diethylpyrocarbonat)-H<sub>2</sub>O resuspendiert und die OD (optische Dichte) gemessen.

### **RNA-Analyse (Northern Blot)**

5µg Gesamt-RNA wurde in RNA-Denaturierungspuffer (0,02M MOPS (M-Morpholin propan sulphonic acid), 6M Formaldehyd, 50% v/v Formamid, 50µg/ml Ethidiumbromid, 5% v/v Glycerin, 0,1M EDTA, 0,04% w/v Bromphenolblau, 0,04% w/v Xylencyanol) für 10 Minuten bei 65°C inkubiert. Nach der Denaturierung wurde die RNA auf einem 1%igen Formaldehyd (FA)-Agarose Gel, das mit FA-Puffer (20mM MOPS, 5mM Natriumacetat, 1mM EDTA, pH 7,0) mit 0,66M Formaldehyd hergestellt wurde, aufgetrennt. Als Laufpuffer dient FA-Puffer. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 10 Minuten in 2xSSC inkubiert und die RNA durch die Kapillar-Transfer-Methode über Nacht auf eine Nylonmembran (Hybond N+™, Amersham Pharmacia) übertragen. Als Transferpuffer wurde 20xSSC benutzt. Am nächsten Tag wurde die Membran zur Fixierung der RNA im „UV-Crosslinker“ (Stratagene) bestrahlt. Zur Prähybridisierung und Hybridisierung der Membran in Glasküvetten bei 42°C für 2 Stunden wurde ULTRAhyb (Ambion) benutzt. Nach Zugabe der radioaktiv markierten und denaturierten Sonde (1x10<sup>6</sup> cpm/ml) wurde die Membran über Nacht bei 42°C hybridisiert.

Am nächsten Tag wurde die Membran zweimal 15 Minuten mit 0,1xSSC/ 0,1% w/v SDS bei 42°C gewaschen und auf einem Röntgenfilm (Amersham Pharmacia) für ein bis drei Tage bei -80°C exponiert.

## 2.2.5 Rekombinante DNA Techniken

Alle Techniken zur DNA Modifizierung wurden gemäß den Protokollen in „Molecular Cloning. A Laboratory Manual“ (Sambrook et al., 1989) durchgeführt.

### Restriktionsverdau, DNA Extraktion, Ligation

Alle Restriktionsansätze wurden gemäß Herstellerangaben durchgeführt. DNA Fragmente wurden aus TBE-Agarosegelen mittels „QIAquick Gel Extraktion Kit“ (QIAGEN) isoliert.

Ligationen wurden über Nacht bei 16°C durchgeführt. Üblicherweise ist das Verhältnis von Vektor zu Insert 1:5 und für einen 10µl Reaktionsansatz wurden 1U T4 DNA Ligase benutzt.

### Bakterien-Transformation und Plasmid-Präparationen

50µl kompetenter *E.coli* (DH5\_) Bakterien (Life Technologies) wurden gemäß Herstellerangaben für die Transformation benutzt. Dabei wurden 50ng des Plasmides oder der gesamte Ligationsansatz (10µl) eingesetzt. Die transformierten Bakterien wurden in 500µl dYT-Medium (0,5% w/v NaCl, 1,6% w/v Trypton, 1% w/v Hefextrakt in H<sub>2</sub>O) eine Stunde lang bei 37°C geschüttelt und auf dYT-Agarplatten (dYT-Medium mit 15g/l Agar und 50mg/ml Ampicillin) ausgestrichen. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wurden Kolonien gepickt und für Plasmid DNA-Präparationen in neuen dYT-Kulturen über Nacht bei 37°C vermehrt. Dabei wurden für große Präparation 500ml - Kulturen, für kleine Präparationen 3ml -Kulturen angesetzt.

Plasmid-DNA-Präparationen wurden mit dem „Qiaprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit“ und dem „Qiagen<sup>®</sup> Plasmid Maxi Kit“ von QIAGEN nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Methoden beruhen auf dem Alkali-Lyse-Verfahren von Birnboim et al. (1979).

### 3. Ergebnisse

Wie in der Einleitung beschrieben, wurde in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass Jararhagin, eine Schlangengift-Metalloproteinase (snake venom metalloproteinase, SVMP) einer brasilianischen Viper, die  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin-vermittelte Synthese von Matrix Metalloproteinasen (MMPs) in humanen dermalen Fibroblasten induzieren kann (Zigrino et al., 2002). Darüber hinaus konnten weitere Veränderungen beobachtet werden, wie sie auch bei der Kultivierung von Fibroblasten in dreidimensionalen Typ I Kollagengelen gefunden werden. Dazu gehören die Reduktion der  $\alpha_1$  (I) und  $\alpha_2$  (II) Kollagen Synthese und eine morphologische Änderung (Zigrino, 2000; Mauch et al., 1986; Grinnel, 1994). Basierend auf diesen Ergebnissen konnte man davon ausgehen, dass die Bindung Jararhagins an den Kollagenrezeptor  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin die modulierende Wirkung von fibrillären Kollagen Typ I imitiert. Unklar war, ob alle oder gegebenenfalls einzelne Domänen der SVMP diese Veränderungen induzieren und ob einzelne Domänen oder Bereiche eine blockierende Wirkung haben könnten.

Zur Analyse der Interaktion verschiedener Bereiche der Schlangengift-Metalloproteinasen mit humanen dermalen Fibroblasten benutzten wir die unter Material und Methoden beschriebenen vier zyklischen Peptide, die zu verschiedenen Regionen der SVMPs korrespondieren. Zwei dieser Peptide enthielten beschriebene Bindungssequenzen für die I-Domäne der  $\alpha_2$ -Integrin-Untereinheit: die ECD Sequenz in der Disintegrinartigen Domäne (Kamiguti et al., 1998; Jia et al., 1997) und die RKKH-Sequenz in der Metalloproteinase-Domäne (Ivaska et al., 1999). Zwei Peptide (195 in der Metalloproteinase-Domäne und 225 in der Disintegrinartigen Domäne) waren Kontrollpeptide, welche keine Bindungsstelle für  $\alpha_2$ -Domänen darstellten (Ivaska et al., 1999).

Des Weiteren wurden rekombinante Domänen von SVMPs benutzt: Atrolysin C (Ht-c Form), bestehend aus der Metalloproteinase-Domäne (Bjarnason and Fox, 1987), die nicht die RKKH-Sequenz enthält und Catrocollastatin C, bestehend aus der Disintegrinartigen-Domäne, einschließlich der ECD-Sequenz und der Cysteinreichen-Domäne (Shimokawa et al., 1997).

<b>Domänen</b>	<b>MP</b>	rekombinante Metalloproteinase-Domäne von Atrolysin, enthält keine beschriebene Integrinbindungsstelle (ohne RKKH-Sequenz)
	<b>DIS</b>	rekombinante Disintegrinartige- und Cysteinreiche-Domäne aus Catrocallostatin, enthält ECD Sequenz
<b>Peptide</b>	<b>RKKH</b>	$\alpha_2$ I-Domäne-Bindungssequenz in der Metalloproteinase-Domäne von Jararhagin
	<b>ECD</b>	$\alpha_2\beta_1$ -Integrin-Bindungssequenz in der Disintegrinartigen Domäne von SVMPs
	<b>195</b>	Kontrollpeptid aus der MP Domäne von Jararhagin
	<b>225</b>	Kontrollpeptid aus der DIS Domäne von Jararhagin

**Tabelle 3.1: Auflistung der verwendeten Bereiche aus Jararhagin und anderen SVMPs**

Mittels dieser Domänen und der Peptide wurde untersucht, inwiefern die Synthese der MMP-1 und MT1-MMP beeinflusst und eventuell gehemmt werden kann, indem die Integrin/Kollagen Wechselwirkungen blockiert werden. Darüber hinaus wurde auch deren Effekt auf Änderungen der Kollagensynthese und Zellmorphologie analysiert.

### 3.1 Interaktion von humanen Hautfibroblasten mit Schlangengift-Metalloproteinasen

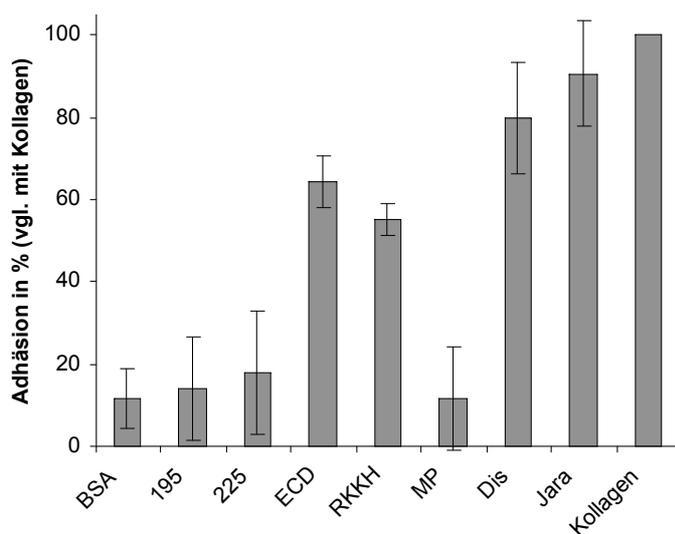
Der erste Schritt zur Analyse der Interaktion der verschiedenen Regionen der SVMPs mit Hautfibroblasten waren Untersuchungen zur Adhäsion und Bindung dieser Domänen an die Zelloberfläche der Fibroblasten und verschiedener Rezeptoren.

Die Fähigkeit humaner dermaler Fibroblasten spezifisch mit den beiden Domänen, der Disintegrinartigen- und der Metalloproteinase-Domäne und den Bindungspeptiden RKKH und ECD zu interagieren, wurde zunächst mit Hilfe von Adhäsionsversuchen untersucht. (Abb. 3.1). Dazu wurden Fibroblasten auf den immobilisierten Peptiden und Domänen wie unter Material und Methoden beschrieben ausgesät. Nach 90 Minuten wurde die Anzahl der adhärenen Fibroblasten ermittelt. Kollagen Typ I diente als Positivkontrolle, als negative Kontrollsubstrate dienten BSA und die Peptide 195 und 225. Im Vergleich zu Kollagen Typ I adhären die Zellen gut an Jararhagin (als vollständige SVMP) und an die Disintegrinartige Domäne (80%). Auch die in der Disintegrinartige-Domäne liegende ECD-Sequenz stellt ein gutes Substrat für Fibroblasten dar (64%). Dagegen war die Adhäsion an die Metalloproteinase-Domäne nicht signifikant höher als an BSA (12%) und an die zyklischen Kontrollpeptide (14% bzw. 18%). Aber Fibroblasten adhären an das RKKH-Peptid (56%), dessen Sequenz in der Metalloproteinase-Domäne von Jararhagin liegt. Möglicherweise können die

Fibroblasten nicht an die verwendete Metalloproteinase-Domäne adhären, da dieser die RKKH-Sequenz fehlt.

Um auszuschließen, dass die proteolytische Aktivität der MP-Domäne für die fehlende Adhäsion der Fibroblasten an dieses Substrat verantwortlich ist, wurde die Aktivität der Metalloproteinase-Domäne mit 1,10-Phenanthrolin inaktiviert. Wie unter Abschnitt 3.8 dargestellt ist die rekombinante Domäne fähig, Fibronectin zu spalten und verliert diese Fähigkeit nach Inkubation in 10mM 1,10-Phenanthrolin.

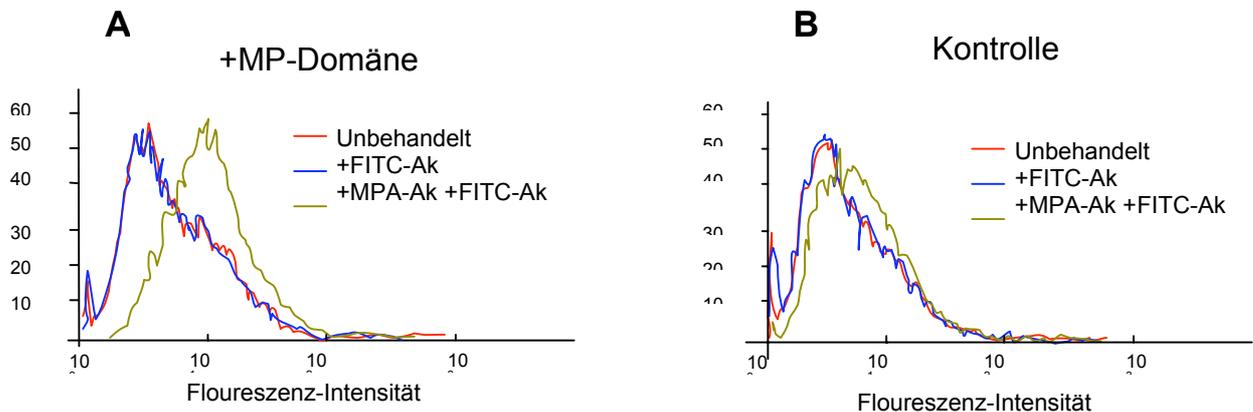
In Adhäsionsversuche mit der inaktivierten Metalloproteinase-Domäne konnte ebenfalls keine Adhäsion der Zellen beobachtet werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Somit ist mit diesem experimentellen Ansatz keine Interaktion der Fibroblasten mit der Metalloproteinase-Domäne nachzuweisen.



**Abbildung 3.1: Adhäsion von humanen dermalen Fibroblasten an verschiedene Regionen der SVMPs** Die Disintegrinartige- (DIS), die Metalloproteinase-Domäne (MP) und die Peptide RKKH, ECD, 195 und 225 wurden auf 96-Lochplatten immobilisiert. (Domänen: 1µM; Peptide: 100µM). Als Positivkontrolle dienten Jararhagin (100nM) und Kollagen Typ I (100µg/ml). 1x10<sup>4</sup> Fibroblasten wurden auf diesen Substraten ausgesät und nach 90 Minuten fixiert. Die adhären Zellen wurden mittels Kristallviolett angefärbt, der Farbstoff aus den Membranen extrahiert und die Extinktion bei 495nm im Elisa Reader bestimmt. Die Extinktion wurde für Kollagen als 100% definiert und mit den anderen verglichen. Der Versuch wurde dreimal mit drei Parallelansätzen ausgeführt.

In Adhäsionsstudien konnte keine Bindung der Fibroblasten an die Metalloproteinase-Domäne nachgewiesen werden. Daher wurden zur weiteren Untersuchung einer möglichen Bindung FACS (fluorescence activated cell sorter) Analysen durchgeführt (Abb. 3.3). Fibroblasten wurden mit der Metalloproteinase-Domäne inkubiert und mittels eines Antikörpers (MPA; Maus anti Metalloproteinase-Domäne) auf die Bindung der Domäne an Moleküle der Zelloberfläche untersucht. Als Negativkontrolle dienten Fibroblasten, die ohne Zugabe der Metalloproteinase-Domäne kultiviert wurden. Als weitere Kontrolle dienten in beiden Gruppen Fibroblasten, die gar nicht oder nur mit dem FITC-gekoppelten Antikörper behandelt wurden. Im Vergleich zu den

Kontrollfibroblasten wiesen die behandelten Zellen eine stärkere Intensität der Fluoreszenz auf. Eine schwache Zunahme der Fluoreszenz nach Inkubation mit dem MPA-Antikörper ist zwar auch bei den unbehandelten Fibroblasten zu erkennen, dies könnte jedoch auf unspezifische Bindung des Antikörpers an Membranassoziierte MMPs zurückzuführen sein.



**Abbildung 3.2: Bindung der Metalloproteinase-Domäne an die Zelloberfläche von humanen dermalen Fibroblasten** Fibroblasten wurden für 48 h in Gegenwart der Metalloproteinase-Domäne (1<sub>M</sub>) kultiviert (A). Als Kontrolle dienen unbehandelte Fibroblasten (B). Die Zellen werden abgelöst und mittels FACS analysiert. Dazu wurden 1ml Zellsuspension (1x10<sup>6</sup> / ml) mit den primären Antikörper gegen die Metalloproteinase-Domäne (MPA, 1:50) inkubiert. Als sekundärer Antikörper dient ein FITC konjugierter Antikörper. Rot sind Fibroblasten dargestellt, die nicht mit einem Antikörper behandelt wurden. Die blaue Kurve stellt Fibroblasten dar, die nur mit dem sek. FITC-gekoppelten Antikörper behandelt wurden, die rote Kurve die Fibroblasten, die mit beiden Antikörpern behandelt wurden.

Somit konnte durch FACS-Analysen auch für die Metalloproteinase-Domäne eine Interaktion mit der Zelloberfläche von Hautfibroblasten nachgewiesen werden. Welche Zelloberflächenrezeptoren für diese Interaktion verantwortlich sind, wurde im nächsten Abschnitt untersucht.

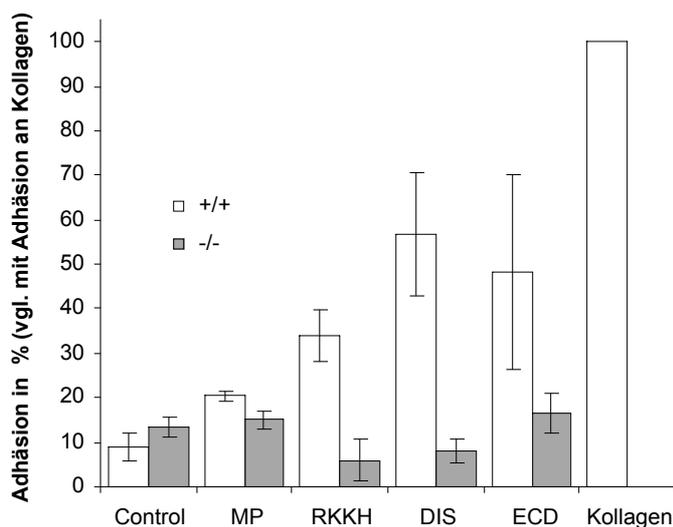
### 3.2 Bedeutung der Kollagenrezeptoren $\alpha_1\beta_1$ - und $\alpha_2\beta_1$ -Integrin für die Interaktion von SVMPs mit Fibroblasten

Für Jararhagin ist durch Adhäsionsversuche mit Zellen, die verschiedene Integrine exprimieren gezeigt worden, dass diese SVMP nur an  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin bindet. Um zu untersuchen, ob dieser Rezeptor auch für die Adhäsion an die Metalloproteinase- und

die Disintegrinartige-Domäne notwendig ist, wurden Adhäsionsassays mit  $\alpha_2$ -defizienten murinen Hautfibroblasten (Holtkötter et al., 2002) durchgeführt. Dazu wurden Mausfibroblasten auf den immobilisierten Peptiden RKKH und ECD und den beiden Domänen wie unter Material und Methoden, Abschnitt 2.2.1 beschrieben ausgesät. Kontrollsubstrate stellten BSA und Kollagen Typ I dar. Als Kontrollfibroblasten dienten wildtyp Mausfibroblasten (Abb. 3.3). Die Adhäsionsstudien zeigten, dass die murinen dermalen Fibroblasten verglichen mit der Adhäsion an Kollagen Typ I ähnlich den humanen an die Disintegrinartige Domäne (57%) und an die beiden Peptide ECD (48%) und RKKH (34%) adhäreren. Auch murine Fibroblasten können verglichen mit der Negativkontrolle BSA (9%) nicht signifikant an die Metalloproteinase-Domäne adhäreren (20%).

$\alpha_2$ -defizienten Fibroblasten konnten an keine der Domänen und keines der Peptide adhäreren. Die Adhäsion lag bei allen Substraten im Bereich der Negativkontrolle BSA (13%). Dagegen konnten  $\alpha_2$ -defiziente Fibroblasten in gleicher Weise wie Wildtyp-Fibroblasten an Kollagen Typ I adhäreren (K.Strick, 2003).

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass für die Adhäsion von Fibroblasten an SVMP-Fragmente die  $\alpha_2$ -Untereinheit notwendig ist.



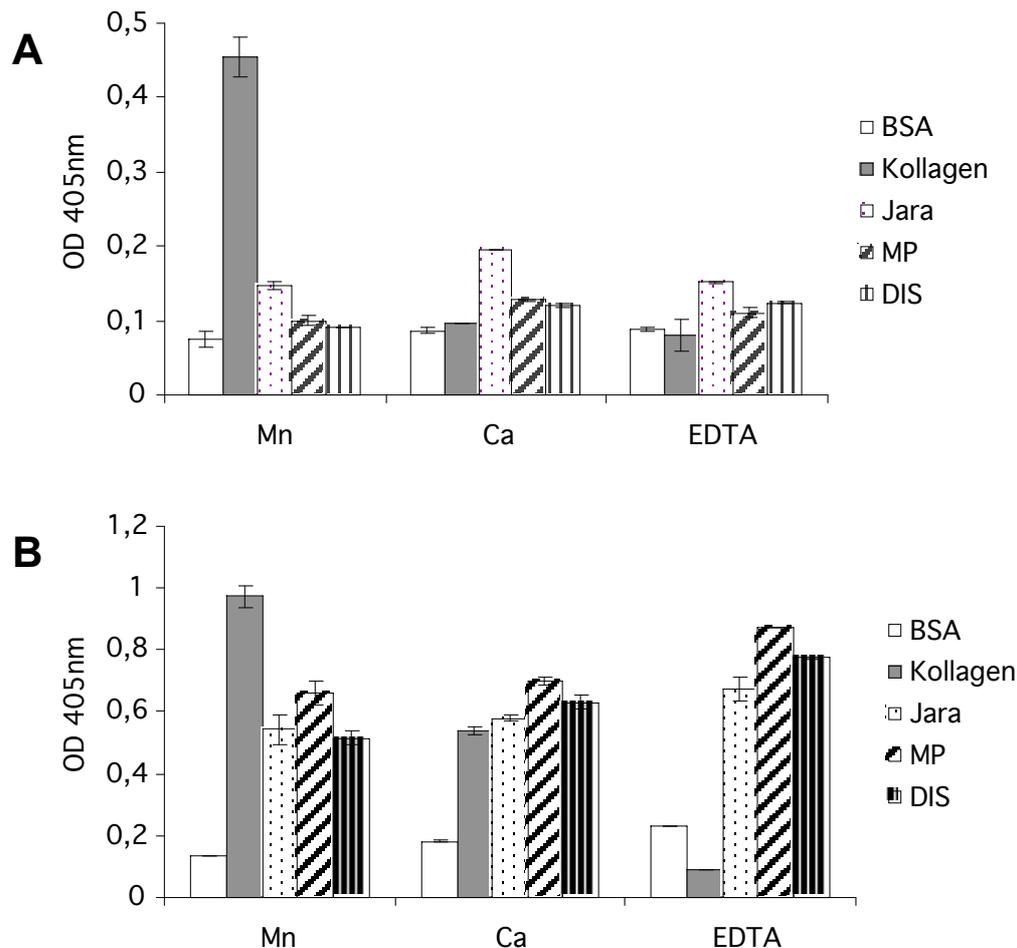
**Abbildung 3.3: Adhäsion von murinen dermalen Fibroblasten an verschiedene SVMP-Regionen** Die Disintegrinartige- (DIS), die Metalloproteinase-Domäne (MP) und die Peptide RKKH und ECD wurden auf 96-Lochplatten immobilisiert. (Dom. 1 $\mu$ M; Peptide: 100 $\mu$ M). Als Positivkontrolle diente Kollagen Typ I (100 $\mu$ g/ml). 1x10<sup>4</sup> Wildtyp (+/+) und  $\alpha_2$ -defiziente (-/-) Fibroblasten wurden auf den Substraten ausgesät und nach 90 Minuten fixiert. Die Zellen wurden mit Kristallviolett angefärbt, der Farbstoff aus den Zellen eluiert und die Extinktion bei 495nm bestimmt. Die Extinktion wurde für Kollagen als 100% definiert. Der Versuch wurde dreimal mit drei Ansätzen ausgeführt.

Wie bereits beschrieben, ist in Adhäsionsassays gezeigt worden, dass Jararhagin ausschließlich an  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin bindet (Moura-da-Silva et al., 2001). Auch Bindungsstudien mit löslichen Ektodomänen von  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin konnten zeigen, dass Jararhagin mit diesem Integrin interagiert (Zigrino et al., 2002). In weiteren

Bindungsstudien sollte nun untersucht werden, ob auch die Metalloproteinase-Domäne aus Atrolysin und die Disintegrinartige-Domäne aus Catrocallostatin mit  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin interagieren und ob Interaktionen mit dem Kollagenrezeptor  $\alpha_1\beta_1$ -Integrin nachgewiesen werden können. In diesen Bindungsstudien wurden lösliche Integrinrezeptoren verwendet, die aus den Ektodomänen der beiden Untereinheiten, die über ein jun/fos Motiv miteinander verbunden sind bestehen. Dadurch liegen sie auch ohne Integration in der Zellmembran als Dimere vor. 96-Lochplatten wurden mit Jararhagin und den beiden Domänen wie in Material und Methoden, Abschnitt 2.2.3 beschrieben beschichtet. Als Negativkontrolle dienten BSA-beschichtete Vertiefungen. CB-3, ein Fragment von Kollagen Typ IV, und bCol1, Kollagen Typ I, stellten die Positivkontrollen dar. Nach Inkubation mit den Ektodomänen von  $\alpha_1\beta_1$ -Integrin und  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin in Lösungen, die unterschiedliche Mengen an Kationen enthalten wurde durch Antikörperreaktionen die Menge an gebundenen Integrinen bestimmt (Abbildung 3.4). In Gegenwart von  $Mn^{2+}$ -Ionen band  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin an das Kollagen Typ I (Abbildung 3.4.A). Auch Jararhagin zeigte Bindung an  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin, aber in sehr viel geringeren Maß als von Zigrino et al., (2002) in der Gegenwart von  $Mg^{2+}$ -Ionen beschrieben. Die Metalloproteinase- und die Disintegrinartige-Domäne zeigten Bindung an  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin, aber nur sehr geringe. Auch in Gegenwart von  $Ca^{2+}$ -Ionen war die Bindung Jararhagins, der Metalloproteinase- und der Disintegrinartigen-Domäne gering, wobei Jararhagin etwas stärker bindet. Auch Kollagen stellte keinen guten Bindungspartner für  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin dar. In Abwesenheit von bivalenten Kationen, durch Inkubation mit einer EDTA-haltigen Lösung war die Bindung des Integrins an alle Substrate kaum verändert. Da auch die Bindung der Positivkontrolle Kollagen schwach war, konnten aber kaum Aussagen zur Kationenabhängigkeit gemacht werden.

Bindungsstudien mit löslichen  $\alpha_1\beta_1$ -Integrin ergaben starke Bindung an Kollagen, Jararhagin und die Disintegrinartige- und Metalloproteinase-Domäne (Abb.3.4.B). In Gegenwart von  $Ca^{2+}$ -Ionen war die Bindung an die SVMPs genauso hoch wie die an Kollagen. Im Gegensatz zu der Bindung von Kollagen an  $\alpha_1\beta_1$ -Integrin war diese aber unabhängig von divalenten Kationen. In Gegenwart von EDTA konnte das Integrin nur schwach an Kollagen binden, aber unverändert an Jararhagin und die beiden Domänen.

Somit zeigten diese Versuche, dass entgegen der bisherigen Annahme Jararhagin auch an  $\alpha_1\beta_1$ -Integrin binden kann. Auch die beiden Domänen können mit diesem Integrin interagieren und dies im Gegensatz zu Kollagen unabhängig von bivalenten Kationen.



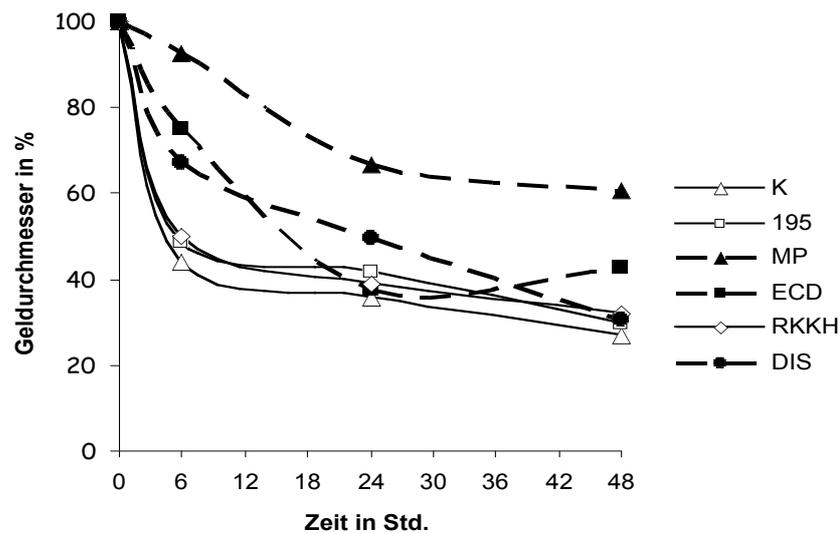
**Abbildung 3.4: Bindung von Jararhagin, der Disintegrinartigen- und der Metalloproteinase-Domäne an rekombinante  $\alpha_1\beta_1$ - und  $\alpha_2\beta_1$ -Integrinectodomänen** 100nm Jararhagin (Jara) und 1\_M der Disintegrinartigen- (DIS) und der Metalloproteinase-Domäne (MP) wurden auf 96-Lochplatten immobilisiert. Als Negativkontrolle diente BSA (1% in TBS/MgCl<sub>2</sub>), als Postivkontrolle CB3, ein Kollagen Typ IV Fragment oder bCol1. Nach Bindung der Integrinectodomänen (100nM) in Gegenwart von Mn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> oder EDTA wurde der Anteil der gebundenen Integrine mittels einer Substratfärbereaktion mit dem primären Antikörper (Kaninchen anti humanes  $\alpha_1$ -Integrin-Untereinheit Serum, 1:400) und dem sekundären Antikörper (AP-konjugiert anti-Kaninchen IgG, 1:600) im ELISA-reader bei 405nm bestimmt. (A) Bindung an  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin (mit bCol1) (B) Bindung an  $\alpha_1\beta_1$ -Integrin (mit CB3)

### 3.2 Einfluss der Domänen und Peptide auf die Interaktion von Hautfibroblasten mit Kollagen Typ I

In den bisherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Metalloproteinase- und die Disintegrinartige-Domäne mit beiden Typ I Kollagenrezeptoren,  $\alpha_1\beta_1$ - und  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin interagieren können und die Interaktion mit der  $\alpha_2$ -Untereinheit notwendig für

die Adhäsion von Fibroblasten an verschiedene SVMP-Regionen ist. Desweiteren können auch die Integrin-bindenden Peptid-Sequenzen, ECD und RKKH an die Zelloberfläche von Hautfibroblasten binden.

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob diese Interaktion mit der Kollagen/Integrin-Wechselwirkung interferieren können. Für Jararhagin konnte ein Einfluss auf die Kontraktion von Typ I Kollagengelen gezeigt werden, was auf eine Inhibition der Integrin-Kollagen-Wechselwirkungen hinweist (Zigrino et al., 2002). Eventuell kompetitiert Jararhagin mit Kollagen um die Bindungsstellen im  $\alpha_2\beta_1$ -Integrinrezeptor. Möglicherweise blockieren auch die einzelnen Domänen und deren Integrinbindungssequenzen die Integrin-Kollagen-Wechselwirkungen und inhibieren so die Gelkontraktion. Zur Untersuchung des Einflusses auf die Gelkontraktion wurden Fibroblasten in Gegenwart der SVMP-Domänen und der Peptide ECD und RKKH im Kollagengel kultiviert. Als Kontrolle wurden unbehandelte Fibroblasten benutzt und Fibroblasten, die mit dem Kontrolpeptid 195 inkubiert wurden. Während der Kultivierung über 48 Stunden wurde zu verschiedenen Zeitpunkten der Geldurchmesser bestimmt (Abb.3.5). Verglichen mit Kontrollgelen, die nach 6 Stunden auf 44% (+-15,3%) ihrer ursprünglichen Größe kontrahiert sind, liegt die Kontraktion in Gegenwart der Metalloproteinase-Domäne bei 92,3% (+- 6,7%) und bei der Disintegrinartigen-Domäne bei 72,5% (+- 8,6%). Nach 48 Stunden ist nur mit der Metalloproteinase-Domäne eine Minderung der Gelkontraktion zu beobachten. Die Gele sind zu 64,5% (+-14%) kontrahiert. Die Disintegrinartige-Domäne hat zu diesem Zeitpunkt keinen Effekt mehr, die Größe der Gele (30,3%, +- 4,7%) entspricht der der Kontrollgele (26,8%, +- 8,4%). Unter den untersuchten Peptiden zeigt nur das ECD-Peptid einen Einfluss auf die Gelkontraktion. Besonders zu frühen Zeitpunkten konnte durch das ECD-Peptid deutlich die Reduktion des Geldurchmessers inhibiert werden. Nach 6 Stunden kontrahieren die Gele zu 74,5% (+- 12,5%) (Kontrolle: 44%, +- 15,3%). Nach 48 Stunden kontrahieren die Gele (42,7%, +- 3,8%) im gleichen Maße wie die Kontrollgele (26,8%, +- 8,4%). Das RKKH-Peptid hatte zu keinem Zeitpunkt Einfluss auf die Gelkontraktion.



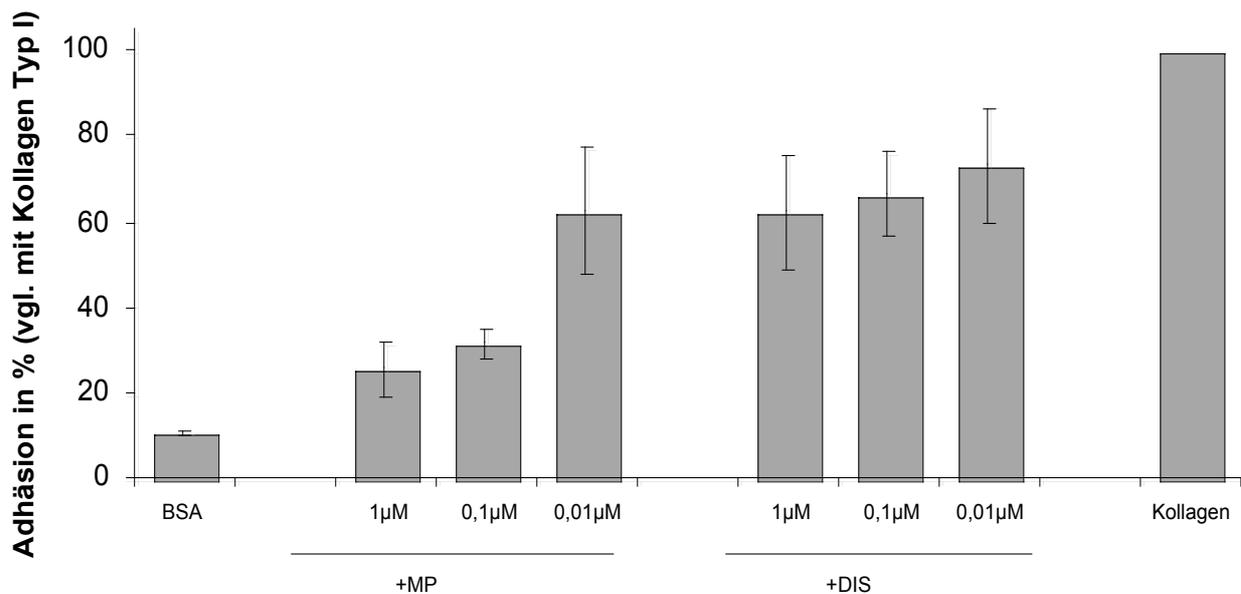
**Abbildung 3.5: Kontraktion von Kollagengelen in Gegenwart verschiedener Bereiche der SVMPs** Humane Fibroblasten wurden in Gegenwart der Disintegrinartigen- (DIS), der Metalloproteinase Domäne (MP), der Peptide ECD und RKKH, und dem Kontrollpeptid 195 für 48 Stunden in Kollagengel kultiviert. (Domänen: 1 $\mu$ M; Peptide: 100 $\mu$ M). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Geldurchmesser bestimmt und so der Verlauf der Gelkontraktion ermittelt. Der Versuch wurde dreimal mit drei Parallelansätzen durchgeführt. Die Standardabweichungen sind im Text angegeben.

Somit kann die Metalloproteinase-Domäne die Gelkontraktion auch nach 48 Stunden inhibieren. Das RKKH-Peptid innerhalb der Metalloproteinase-Domäne von Jararhagin hat dagegen keinen Einfluss auf die Gelkontraktion. Die Disintegrinartige-Domäne und ihre Integrinbindungssequenz ECD verzögern die Kontraktion zu frühen Zeitpunkten und haben nach 48 Stunden keinen blockierenden Effekt mehr.

Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass beide Domänen die Interaktion der Integrinrezeptoren mit Kollagen Typ I zumindest teilweise kompetieren. Um dies näher zu überprüfen wurden Adhäsionsversuche durchgeführt, bei denen die Adhäsion von Hautfibroblasten an Kollagen Typ I in Gegenwart der beiden SVMP-Domänen untersucht wurde. Dazu wurde Kollagen Typ I auf 96-Lochplatten immobilisiert und Fibroblasten in der Gegenwart abnehmender Konzentration der Metalloproteinase- und Disintegrinartigen Domäne darauf kultiviert. Unbehandelte Fibroblasten dienten auf Kollagen Typ I als Positivkontrolle, auf BSA als Negativkontrolle. Nach 90 Minuten wurde die Anzahl von adhärenenten Fibroblasten bestimmt und mit der Positivkontrolle verglichen (Abb.3.6).

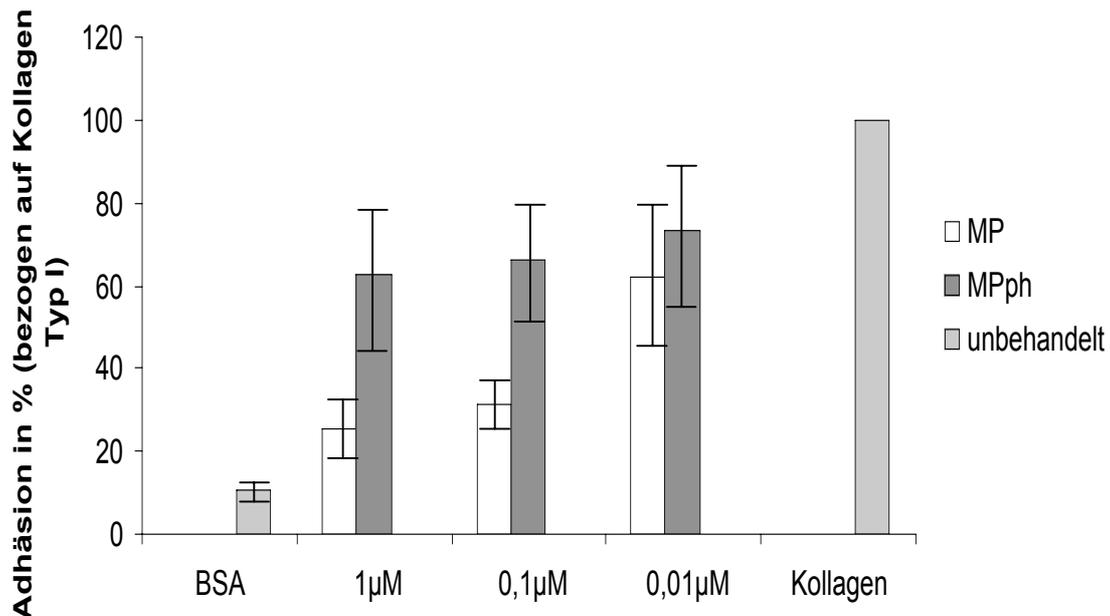
Die Disintegrinartigen-Domäne kann die Adhäsion an Kollagen Typ I verglichen mit unbehandelten Fibroblasten auf bis zu 65% reduzieren. Auch die Metalloproteinase-Domäne blockiert die Interaktion von Fibroblasten mit Kollagen Typ I. In konzentrationsabhängiger Weise reduziert es die Adhäsion auf bis zu 30%.

Somit können beide Domänen auch in Adhäsionsversuchen die Interaktion der Fibroblasten mit Kollagen Typ I teilweise inhibieren.



**Abbildung 3.6: Die Metalloproteinase- und die Disintegrinartige-Domäne inhibieren die Adhäsion von Fibroblasten an Typ I Kollagen** 96-Lochplatten wurden mit Kollagen Typ I (100µg/ml) beschichtet und  $1 \times 10^4$  Fibroblasten/Loch darauf ausgesät. Die Fibroblasten wurden mit verschiedenen Konzentrationen (0,01-1µM) der Disintegrinartigen- und der Metalloproteinase-Domäne inkubiert. Nach 90 Minuten wurden die Fibroblasten fixiert, mit Kristallviolett angefärbt und der Farbstoff aus den Membranen der Zellen extrahiert. Die Intensität der Färbung wurde bei 595nm gemessen. Als Positivkontrolle diente die Adhäsion unbehandelter Fibroblasten an Kollagen Typ I, als Negativkontrolle die Adhäsion an BSA. Die Adhäsion an Kollagen wurde als 100% definiert. Der Versuch wurde dreimal mit drei parallelen Ansätzen durchgeführt.

Möglicherweise degradiert die Metalloproteinase-Domäne Zelloberflächenrezeptoren, die für die Adhäsion an Kollagen Typ I notwendig sind oder andere Proteine, die die Adhäsion von Zellen vermitteln und verhindert so die Adhäsion. Um dies zu überprüfen wurden weitere Adhäsionsversuche mit Kollagen Typ I in der Gegenwart von inaktiver Metalloproteinase-Domäne durchgeführt (Abb.3.7.). Die Metalloproteinase-Domäne wurde durch 30-minütige Inkubation in 10mM 1,10-Phenanthrolin inaktiviert. 1,10-Phenanthrolin ist ein Chelator, der  $Zn^{2+}$ -Ionen komplexiert. Inaktiviert man die Proteaseaktivität mit 1,10-Phenanthrolin (Kamiguti et al., 1997), führt dies zu einem weitgehenden Verlust der Inhibition.



**Abbildung 3.7: Die Metalloproteinaseinhibiert die Kollagenbindung von Fibroblasten durch ihre proteolytische Aktivität** 96-Lochplatten wurden mit Kollagen Typ I (100µg/ml) beschichtet und  $1 \times 10^4$  Fibroblasten/Loch darauf ausgesät. Die Fibroblasten wurden mit verschiedenen Konzentrationen (0,01-1µM) der aktiven (MP) und mit 10mM 1,10-Phenanthrolin inaktivierter Metalloproteinase-Domäne (MPph) inkubiert. Nach 90 Minuten wurden die Fibroblasten fixiert, mit Kristallviolett angefärbt und der Farbstoff aus den Membranen der Zellen extrahiert. Die Intensität der Färbung wurde bei 595nm gemessen. Als Positivkontrolle diente die Adhäsion un behandelter Fibroblasten an Kollagen Typ I, als Negativkontrolle die Adhäsion an BSA. Die Adhäsion an Kollagen wurde als 100% definiert. Der Versuch wurde dreimal mit drei parallelen Ansätzen durchgeführt.

Die Versuche wurden entsprechend den vorhergegangenen Adhäsionsversuchen durchgeführt. Dazu wurden Fibroblasten in Gegenwart abnehmender Konzentrationen an inaktivierter Metalloproteinase-Domäne auf Kollagen Typ I ausgesät und ihre Adhäsion bestimmt (Abb.3.7.).

In Gegenwart der inaktivierten Metalloproteinase Domäne adhären die Fibroblasten in gleicher Weise an Kollagen wie un behandelte Kontrollfibroblasten. Somit kann nur die aktive Form der Metalloproteinase-Domäne die Adhäsion an Kollagen inhibieren.

### 3.4 Einfluss verschiedener Bereiche der SVMPs auf die MMP-Synthese

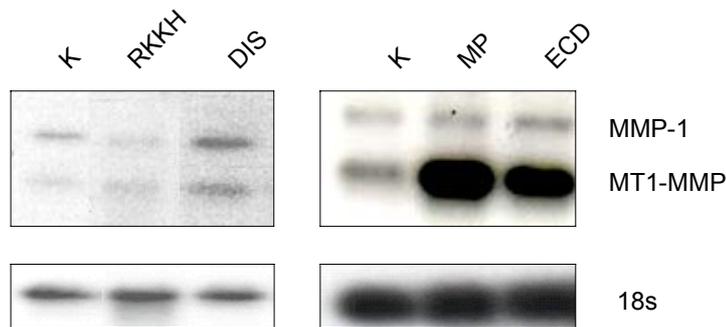
Um zu untersuchen, ob die Metalloproteinase- und die Disintegrinartige-Domäne, sowie die Peptide, die mit den Fibroblasten interagieren, auch die MMP-Synthese beeinflussen können, analysierten wir die Synthese und Aktivierung der MMP-1, MMP-2

und MT1-MMP auf mRNA- und Proteinebene. Der Einfluss dieser Domänen und Peptide wurde in zwei verschiedenen Kultursystemen analysiert: auf der einen Seite bei der Kultivierung auf Plastik im Monolayer, in welchem Fibroblasten nur geringe Mengen an MMPs synthetisieren, aber große Mengen an Kollagen Typ I, und auf der anderen Seite im Kollagengel, in dem in Fibroblasten die Synthese von MMP-1 und MT1-MMP induziert und die Synthese von Kollagen Typ I reduziert wird (Mauch et al., 1988; Mauch et al., 1989; Mauch et al., 1992; Seltzer et al., 1994; Tomasek et al., 1997; Zigrino et al., 2001).

### **3.4.1 Analyse der MMP-Synthese im Monolayer**

Fibroblasten, die im Monolayer kultiviert werden, synthetisieren nur geringe Mengen an MMP-1 und MT1-MMP und MMP-1 liegt wie MMP-2 nur in der Proform vor (Zigrino et al., 2001, Mauch et al., 1989; Tomasek et al., 1997). Zur Analyse der Expression von MMP-1 und MT1-MMP wurden Fibroblasten für 48 Stunden in Gegenwart der Disintegrinartigen- bzw. Metalloproteinase-Domäne und den Peptiden im Monolayer kultiviert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Fibroblasten. Nach Isolierung der mRNA wurde diese mittels Northern Blot Analyse auf die Induktion der MMP-mRNA-Synthese untersucht.

Die Analyse ergab verstärkte Transkriptmenge an MMP-1 und MT1-MMP-mRNA nach Inkubation der Fibroblasten mit der Disintegrinartigen- und der Metalloproteinase-Domäne (Abb. 3.8). Die Peptide ECD und RKKH, die die Integrin-Bindungssequenzen der einzelnen Domänen enthalten, haben dagegen unterschiedliche Wirkungen auf die MMP-Synthese. Nur die Inkubation der Fibroblasten mit dem ECD-Peptid führt zu einer Induktion der mRNA-Synthese von MMP-1 und MT1-MMP. Für das RKKH-Peptid dagegen konnte kein Einfluss auf die mRNA-Mengen beobachtet werden. Da die Abbildung zwei unterschiedliche Membranen darstellt, können keine Aussagen zu quantitativen Unterschieden in der Wirkung der einzelnen Domänen und Peptide gemacht werden.



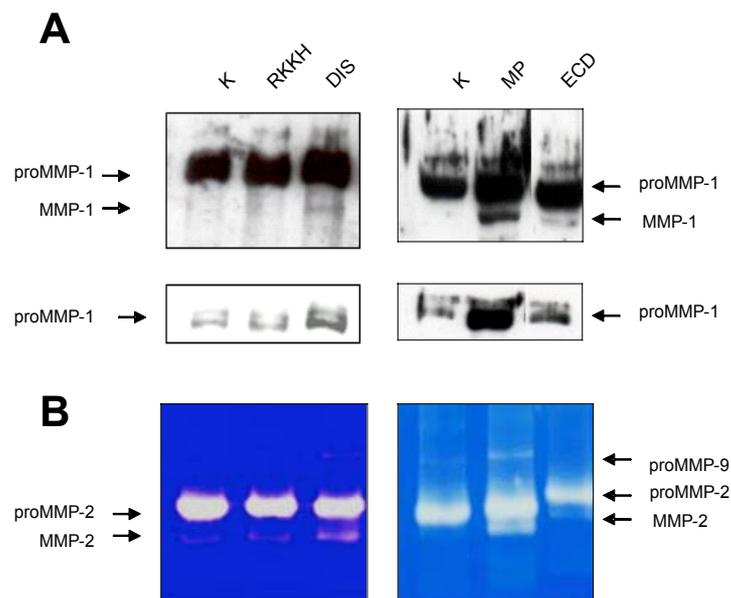
**Abbildung 3.8: Induzierender Effekt der verschiedenen Regionen der SVMPs auf die Synthese von MMP-1 und MT1-MMP mRNA im Monolayer.** Fibroblasten wurden mit beiden Domänen (DIS und MP; 1 $\mu$ M) und den Peptiden (RKKH und ECD; 100 $\mu$ M) für 48 Stunden ohne Mediumwechsel im Monolayer kultiviert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert, 5 $\mu$ g auf einem 1%-igen Formaldehyd-Agarose Gel aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran transferiert. Die mRNA Menge von MMP-1 (2.1kB) und MT1-MMP (4,5kB) wurde durch Hybridisierung mit  $^{32}$ P-markierten cDNA-Sonden bestimmt. Als Beladungskontrolle dient die Hybridisierung der 18S-rRNA.

Auch für die Analyse auf Proteinebene wurden Fibroblasten für 48 Stunden in Gegenwart der Domänen und Peptide im Monolayer kultiviert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Fibroblasten. Zur Gewinnung von konditioniertem Fibroblastenmedium (vgl. Material und Methoden, Abschnitt 2.2.1) wurden die Zellen für weitere 24 Stunden in serumfreiem Medium ohne Zugabe von SVMP-Regionen kultiviert. Das konditionierte Medium wurde mittels Western Blot Analyse und Gelatine-Zymographie auf die Proteinmengen bzw. Aktivierung der MMP-1 und MMP-2 untersucht (Abb.3.9). Die Western Blot Analysen zeigten bei den Proben der Fibroblasten, die mit der Metalloproteinase-, der Disintegrinartigen-Domäne und dem ECD-Peptid behandelt wurde, eine verstärkte Menge an proMMP-1 (Abb. 3.9A). Neben der 57kDa-Bande wurde noch eine zweite Bande (59kDa) mit dem verwendeten Antikörper detektiert, die eine anders glykolysierte Form der proMMP-1 darstellt. Daneben wurde auch die 41kDa Bande der aktivierten Form der MMP-1 sichtbar. Nach Inkubation mit dem RKKH-Peptid waren dagegen keine verstärkten Mengen an proMMP-1 und MMP-1 sichtbar.

Gelatine-Zymogramme zeigten, dass in Fibroblasten die mit beiden Domänen und dem ECD-Peptid inkubierten neben der Proform (72kDa) der MMP-2 auch die aktivierte Form (62kDa) sichtbar wird. (Abb.3.9B). Das RKKH-Peptid führt dagegen in Fibroblasten nicht zum Auftreten von aktivierter MMP-2.

Durch den Einfluss der beiden verschiedenen Domänen in Fibroblasten traten in einigen Zymogrammen auch verstärkte Mengen an MMP-9 (92kDa) auf. Diese MMP konnte dagegen nicht in mit den Peptiden behandelten Proben detektiert werden.

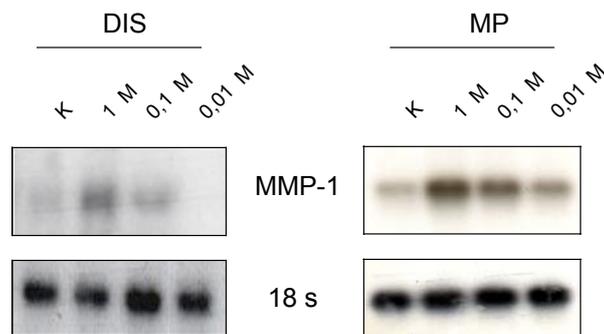
Diese Daten legen nahe, dass der Einfluss der vollständigen SVMP Jararhagin auf die MMP-Synthese in Fibroblasten durch die Disintegrinartige- und durch die Metalloproteinase-Domäne vermittelt wird. Dabei zeigt sich, dass auch das ECD-Peptid, das die  $\alpha_2$ -Integrin-Bindungsstelle der Disintegrinartigen-Domäne darstellt, die Regulation der MMP-1, MT1-MMP und MMP-2 beeinflussen kann. Die Bindungsstelle innerhalb der Metalloproteinase-Domäne (RKKH) hat dagegen keinen Einfluss auf die MMP-Synthese.



**Abbildung 3.9: Induktion und Aktivierung von MMP-1 und Aktivierung von MMP-2 durch Inkubation der Fibroblasten mit verschiedenen Regionen von SVMPs.** Humane Hautfibroblasten wurden für 48 Stunden mit den Domänen (DIS und MP; 1 $\mu$ M) und den Peptiden (RKKH und ECD; 100 $\mu$ M) inkubiert. Danach wurden die Zellen für weitere 24 Stunden in serumfreien Medium kultiviert. Die Überstände wurden auf SDS-Proteingelen aufgetrennt und mittels Western Blot Analyse und Gelatine-Zymographien untersucht. (A) Die Western Blot Analyse mit Kaninchen anti hMMP-1 Serum zeigt in der oberen Abbildung neben der Proform (57kDa/59kDa) auch die aktivierte Form der MMP-1(41kDa). Darunter ist die gleiche Membran mit einer kürzeren Exposition des Filmes gezeigt. Man kann hier die Unterschiede in den Proteinmengen der proMMP-1 erkennen. (B) Gelatine Zymogramme zeigen die Proform (72kDa) und die aktivierte Form (62kDa) der MMP-2. Außerdem ist die proMMP-9 (92kDa) zu erkennen.

Weitere Northern Blot Analysen wurden durchgeführt, um die Dosisabhängigkeit der Effekte der beiden Domänen zu untersuchen (Abb. 3.10). Diese Untersuchungen bezüglich der Transkriptmengen an MMP-1-mRNA aus Fibroblasten nach Inkubation mit der Metalloproteinase- und der Disintegrinartigen Domäne in verschiedenen Konzentrationen (0,1-1 $\mu$ M) zeigen, dass 1 $\mu$ M der Domänen die Transkription der MMPs

am stärksten induziert. Mit geringerer Konzentration der Domänen nimmt auch die Transkriptmenge an MMP-1 mRNA ab. Im Gegensatz zur Disintegrinartigen Domäne sieht man bei der Metalloproteinase Domäne bei einer Konzentration von 0,01\_M noch eine Induktion der MMP-1. Die Abbildung zeigt zwei unterschiedliche Membranen, daher können diese quantitativen Unterschiede nicht signifikant gewertet werden.



**Abbildung 3.10: Die Induktion der MMP-1 Synthese durch die Disintegrinartige und die Metalloproteinase Domäne ist dosisabhängig** Fibroblasten wurden für 48 Stunden mit abnehmenden Konzentrationen (1-0,01\_μg) der Disintegrinartigen (DIS) und der Metalloproteinase Domäne (MP) kultiviert. Die mRNA wurde isoliert und 5\_μg Gesamt-mRNA Menge auf einem Formaldehydgel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und mit <sup>32</sup>P markierten DNA-Sonden analysiert. Die Abbildung zeigt das MMP-1 mRNA Transkript (2,1 kB). Als Beladungskontrolle diente die Hybridisierung der 18s-RNA.

Um sicherzugehen, dass die einzelnen Domänen und Peptide nicht toxisch auf die Fibroblasten wirken und darauf hin eine erhöhte MMP-Expression zeigen, führten wir Viabilitätstests mit Trypanblau durch, bei denen keine Schädigung der Zellen erkennbar ist (Ergebnisse nicht dargestellt)

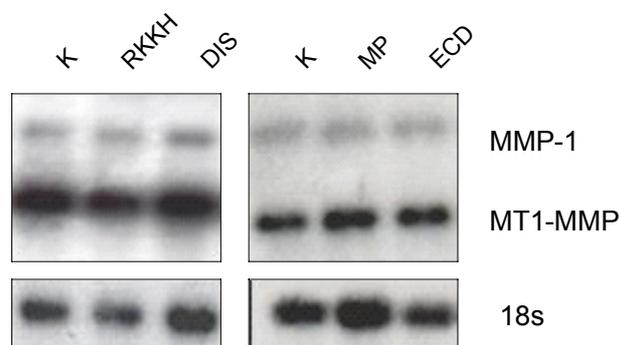
### 3.4.2 Analyse der MMP-Synthese im Kollagengel

Im Abschnitt 3.1.2. wurde gezeigt, welche Domänen und Peptide der SVMPs an der Induktion der MMP-Synthese beteiligt sein können. Die Disintegrinartige- und die Metalloproteinase Domäne, sowie das ECD-Peptid zeigten einen Einfluss auf die Synthese und Aktivierung von MMP-1, MMP-2 und MT1-MMP, das RKKH-Peptid dagegen nicht. Im nächsten Schritt sollte deshalb untersucht werden, ob die im Kollagengel beobachtete Induktion der MMP-Synthese durch die SVMP-Domänen und Peptide verändert wird. Diese MMP-Synthese beinhaltet die Induktion der MMP-1 und

MT1-MMP (Mauch et al., 1989; Tomasek et al., 1997, Zigrino et al., 2001). Außerdem kommt es zu einer Aktivierung der MMP-1 und MMP-2 (Seltzer et al., 1994; Tomasek et al., 1997; Zigrino et al., 2001).

Zur Untersuchung der MMP-Regulation wurden Fibroblasten in Gegenwart der beiden Domänen und der Peptide wie in Material und Methoden beschrieben für 48 Stunden im Kollagengel kultiviert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Fibroblasten.

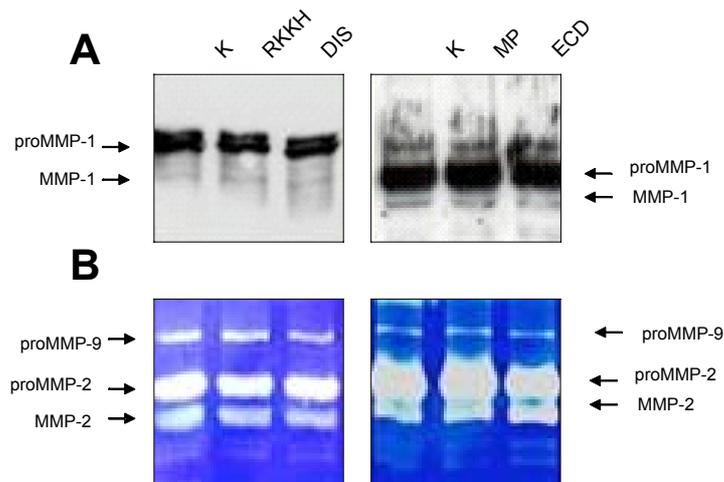
Die Northern Blot Analyse der nach 48 Stunden isolierten mRNA zeigt, dass in allen Proben keine Änderung in den Mengen an MMP-1 und MT1-MMP mRNA-Transkripten auftritt (Abb.3.11).



**Abbildung 3.11: Die verschiedenen Regionen der SVMPs inhibieren nicht die Synthese von MMP-1 und MT1-MMP mRNA in Kollagengelen.** Fibroblasten wurden mit den beiden Domänen (DIS und MP; 1µM) und den Peptiden (RKKH und ECD100µM) für 48h in Kollagengelen kultiviert. Anschließend wurde die RNA präpariert und 5µg auf einem 1%-igen Formaldehyd-Agarose Gel aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran transferiert. Die mRNA Menge von MMP-1 (2.1kB) und MT1-MMP (4,5kB) wurde durch Hybridisierung mit 32P-markierten cDNA-Sonden bestimmt. Als Beladungskontrolle dient die Hybridisierung mit der 18S-rRNA.

Zur Untersuchung auf Proteinebene wurden die wie oben beschrieben kultivierten Fibroblasten für weitere 24 Stunden in serumfreien Medium gehalten und die Überstände dann mittels Western Blot Analyse und Gelatine-Zymographie analysiert (Abb.3.12).

Western Blot-Analysen der MMP-1 zeigten in allen untersuchten Proben unveränderte Mengen an proMMP-1 (57kDa/59kDa) und MMP-1 (42kDa) (Abb.3.12A). Auch in Gelatine-Zymographien konnte in allen Proben neben der 72kDa-Bande der proMMP-2 die 62kDa-Bande der aktivierten MMP-2 detektiert werden (Abb.3.12B). Auch die MMP-9 ist deutlich als 92kDa Bande zu erkennen. Daneben erkennt man weitere Banden, die eventuell andere gelatinolytisch aktiven Proteine oder Komplexe von Gelatinasen darstellen.



**Abbildung 3.12: Die verschiedenen Regionen der SVMPs inhibieren nicht die Induktion und Aktivierung von MMP-1 und die Aktivierung von MMP-2 in Kollagengelen** Humane dermale Fibroblasten wurden für 48 Stunden mit den Domänen (DIS und MP; 1 $\mu$ M) und den Peptiden (RKKH und ECD; 100 $\mu$ M) im Kollagengel inkubiert. Für weitere 24 Stunden wurden die Gele in serumfreien Medium kultiviert. 15 $\mu$ g Gesamtprotein-Menge der Überstände wurden auf 10%-igen SDS-Proteingelen aufgetrennt und mittels Western Blot und Gelatine-Zymographie untersucht. (A) Immunoblotting mit Kaninchen anti hMMP-1 Serum zeigt in der oberen Abbildung neben der Proform (57 kDa) auch die aktivierte Form der MMP-1 (41kDa). Darunter ist der gleiche Blot gezeigt, mit einer kürzeren Exposition des Filmes. Man kann hier die Unterschiede in den Proteinmengen der proMMP-1 erkennen. (B) Zymogramme zeigen die Proform (72kDa) und die aktivierte Form (62kDa) der MMP-2. Außerdem ist proMMP-9 (92 kDa) zu erkennen.

Die Untersuchungen auf RNA- und Proteinebene bezüglich der Synthese und Aktivierung von MMP-1, MT1-MMP und MMP-2 zeigen, dass durch die verschiedenen SVMP-Regionen keine Veränderungen im Kollagengel ausgelöst werden können. Die Disintegrinartige- und Metalloproteinase-Domäne und das ECD-Peptid können in diesem System, in dem durch einen Überschuss an Kollagen Typ I alle Integrinbindungsstellen besetzt sind, die MMP-Synthese nicht verstärken. Das RKKH-Peptid hat keinen blockierenden Effekt bezüglich der MMP-Regulation.

### 3.4.3 Bedeutung der Kollagenrezeptoren $\alpha_1\beta_1$ - und $\alpha_2\beta_1$ -Integrin für die Regulation der MMP-Synthese durch SVMPs

Es ist gezeigt worden, dass die Kollagen Typ I induzierte MMP-1-Synthese durch  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin vermittelt wird (Langholz et al., 1995). Auch Jararhagin und die beiden funktionalen Domänen der SVMPs binden an diesen Rezeptor (De Luca et al., 1995,

Kamiguti et al., 1996b). Die in dieser Arbeit durchgeführten Bindungsstudien (vgl. Abb. 3.4) zeigten Bindung von Jararhagin, der Metalloproteinase- und der Disintegrinartigen-Domäne an  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin. Desweiteren wurde durch Adhäsionsversuche mit  $\alpha_2$ -defizienten Mausfibroblasten deutlich, dass  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin für die Adhäsion an SVMP-Regionen notwendig ist (Abb.3.3). In weiteren Versuchen sollte untersucht werden, ob die Wirkung der SVMP-Domänen auf die Induktion bzw. Aktivierung der MMP-1 und MMP-2 abhängig von  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin ist, wie es für die induktive Wirkung von Kollagen Typ I gezeigt wurde.

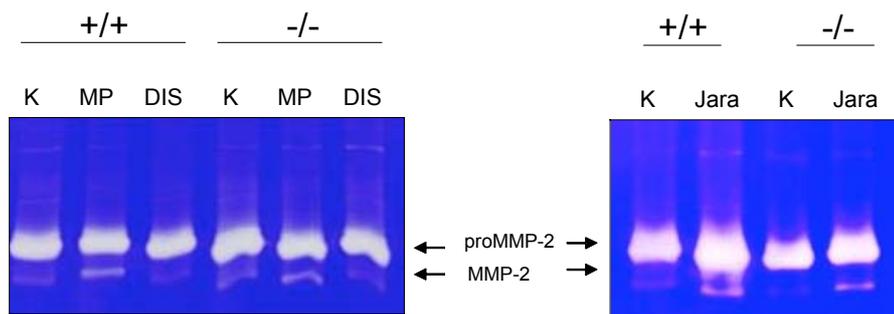
Dazu wurden  $\alpha_2$ -defiziente murine Hautfibroblasten bezüglich der MMP-Synthese untersucht (Abbildung 3.13). Gelatine-Zymographien wurden mit konditioniertem Medium von  $\alpha_2$ -defizienten Hautfibroblasten durchgeführt, die mit der Disintegrinartigen- und Metalloproteinase-Domäne inkubiert wurden. Als Kontrolle dienten Wildtyp Fibroblasten, die mit beiden Domänen behandelt wurden und unbehandelte Wildtyp und  $\alpha_2$ -defiziente Fibroblasten. In beiden unbehandelten Kontrollen sind neben der proMMP-2 geringe Mengen an MMP-2 zu detektieren. Möglicherweise traten diese durch autokatalytische Prozesse auf.

In Wildtyp-Fibroblasten traten nach Behandlung mit der Metalloproteinase-Domäne neben der Proform von MMP-2 verstärkte Mengen an der aktivierten Form auf. Die Disintegrinartige-Domäne induzierte keine verstärkte Aktivierung der proMMP-2 in murinen Fibroblasten.

Auch in  $\alpha_2$ -defizienten Fibroblasten führt die Inkubation mit der Metalloproteinase-Domäne zu einer verstärkten Aktivierung der proMMP-2. Deutlich ist die Bande der MMP-2 zu erkennen.

Ähnliche Ergebnisse ergaben Gelatine-Zymographien, die in gleicher Weise mit Jararhagin behandelten murinen Fibroblasten durchgeführt wurden (Abb. 3.13). Durch Inkubation mit Jararhagin konnten sowohl in Wildtyp als auch in  $\alpha_2$ -defizienten Fibroblasten neben der proMMP-2 die aktivierte Form der MMP-2 detektiert werden.

Um sicherzustellen, dass die Metalloproteinase-Domäne nicht direkt auf die proMMP-2 wirkt und diese selbst aktiviert, inkubierten wir Überstände der murinen Fibroblasten mit der Metalloproteinase-Domäne und analysierten diese mittels Gelatine-Zymographie. Die Metalloproteinase-Domäne kann die MMP-2 nicht direkt aktivieren (Ergebnisse nicht gezeigt).



**Abbildung 3.13: Jararhagin und die Metalloproteinase-Domäne induzieren die Aktivierung der MMP-2 in Wildtyp und  $\alpha_2$ -defizienten Maus-Fibroblasten** Maus-Fibroblasten wurden mit der Metalloproteinase- (MP; 0,5 $\mu$ M), der Disintegrinartigen Domäne (DIS; 1 $\mu$ M) und Jararhagin (Jara; 100nM) für 48 Stunden inkubiert. Für weitere 24 Stunden wurden die Zellen in serumfreien Medium gehalten. Die Überstände (Gesamtproteinmenge=10 $\mu$ g) der Zellen wurden mittels Gelatine Zymographie auf die Aktivierung der MMP-2 untersucht.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Metalloproteinase-Domäne und Jararhagin unabhängig von der  $\alpha_2$ -Untereinheit die Aktivierung der proMMP-2 induzieren können. Somit scheinen beide anders als Kollagen Typ I auf die Fibroblasten zu wirken.

In weiteren Versuchen wurden funktionsblockierende Antikörper gegen die  $\alpha$ -Untereinheiten von  $\alpha_1\beta_1$ - und  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin in humanen dermalen Fibroblasten eingesetzt. Neben der oben erwähnten Interaktion mit  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin konnten Bindungsstudien auch Interaktion der beiden SVMP-Domänen und Jararhagins mit dem zweiten Kollagenrezeptor  $\alpha_1\beta_1$ -Integrin zeigen (vgl. Abschnitt 3.2). Daher wurde der Einfluss beider Integrine auf die MMP-1-Synthese und MMP-2-Aktivierung untersucht. Zum einen sollten durch diese Versuche die in murinen Fibroblasten gewonnenen Ergebnisse in humanen Zellen überprüft werden. Zum anderen sollte auch die Bedeutung der Integrine für die Wirkung der Disintegrinartigen-Domäne untersucht werden.

Die Antikörper binden an die I-Domänen der  $\alpha$ -Untereinheiten. Zigrino et al., (2002) haben gezeigt, dass durch  $\alpha_2$ I-Domänen-blockierende Antikörper die Adhäsion von Fibroblasten an Jararhagin reduziert werden kann. Neben dem Antikörper gegen die  $\alpha_2$ I-Domäne wurde auch ein Antikörper gegen die  $\alpha_1$ I-Domäne eingesetzt.

Hautfibroblasten wurden in Gegenwart der beiden Antikörper in der Disintegrinartigen- und der Metalloproteinase-Domäne inkubiert. Als Kontrolle dienten Fibroblasten, die nicht mit den Domänen behandelt wurden und gänzlich unbehandelte Fibroblasten.

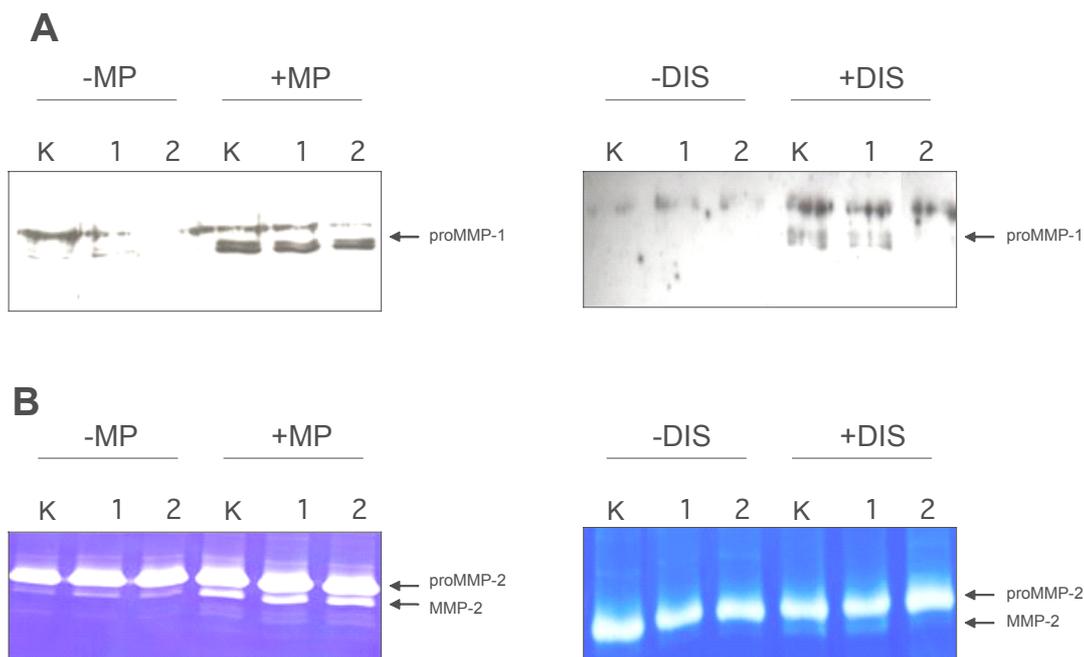
Konditionierte Medien (vgl. Material und Methoden, Abschnitt 2.2.1) dieser behandelten Fibroblasten wurden mittels Western Blot Analyse und Gelatine-Zymographie untersucht (Abb. 3.14). Die Kontrollen in Western Blot Analyse zeigten, dass durch die Antikörper in humanen dermalen Fibroblasten keine verstärkten Mengen an MMP-1 auftreten (Abb. 3.14A). Somit aktivieren die Antikörper nicht die Integrine. Fibroblasten, die mit der Metalloproteinase-Domäne behandelt wurden, wiesen verstärkte Mengen an proMMP-1 auf. Auch in den Proben, die zusätzlich mit den blockierenden Antikörpern behandelt wurden, war die proMMP-1 deutlich zu detektieren.

Auch die Inkubation mit der Disintegrinartigen-Domäne induzierte verstärkte Proteinmengen an proMMP-1. In Anwesenheit des  $\alpha_1$ -blockierenden Antikörpers wurden gleiche Mengen an proMMP-1 detektiert. Nach Inkubation mit dem  $\alpha_2$ -blockierenden Antikörper verringerte sich die Menge an proMMP-1.

In allen Proben ist oberhalb der Banden für die proMMP-1 eine unspezifische Bande zu erkennen.

Mit den gleichen Proben wurden Gelatine-Zymographien durchgeführt (Abb. 3.14B). In unbehandelten Fibroblasten führte die Anwesenheit der Antikörper nicht zum vermehrten Auftreten von aktivierter MMP-2. Die Metalloproteinase Domäne induziert wie schon beschrieben die Aktivierung der proMMP-2. Auch in Anwesenheit der beiden Antikörper trat in gleicher Weise die 62 kDa Bande der MMP-2 auf.

Nach Behandlung mit der Disintegrinartige-Domäne traten neben der proMMP-2 verstärkte Mengen an MMP-2 auf. Auch in Anwesenheit des  $\alpha_1$ -blockierenden Antikörpers war die aktivierte Form detektierbar, nicht aber in Anwesenheit des  $\alpha_2$ -blockierenden Antikörpers.

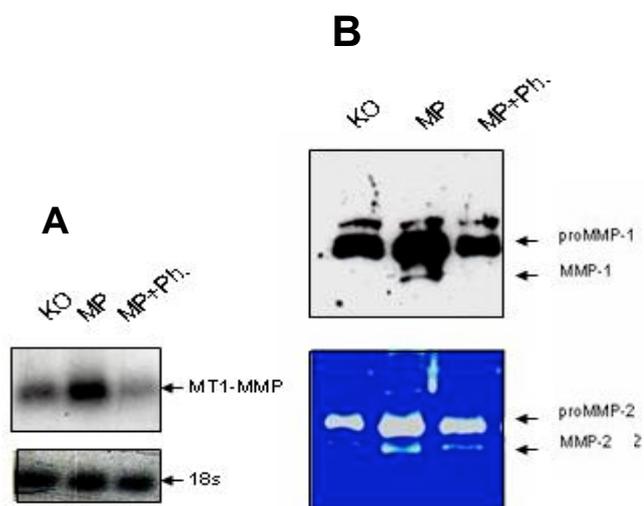


**Abbildung 3.14: Abhängigkeit der durch SVMPs induzierten proMMP-1-Synthese und proMMP-2-Aktivierung von  $\alpha_2$ - und  $\alpha_1$ -Integrin** Humane dermale Fibroblasten wurden für 48 Stunden in Gegenwart von  $\alpha_2$  und  $\alpha_1$ -Integrin blockierenden Antikörpern (3,3\_g/ml) mit der Metalloproteinase und der Disintegrinartigen-Domäne (MP und DIS; 1 $\mu$ M) im Monolayer inkubiert. Für weitere 24 Stunden wurden die Zellen in serumfreien Medium kultiviert. Die Gesamtprotein-Menge in den Überständen wurde bestimmt und 10 $\mu$ g auf SDS-Proteingelen aufgetrennt und mittels Western Blot und Gelatine-Zymographie untersucht. (A) Immunoblotting mit Kaninchen anti hMMP-1 Serum zeigt die Proform der MMP-1 (B) Zymogramme zeigen die Proform (72kDa) und die aktivierte Form (62kDa) der MMP-2.

### 3.4.4 Bedeutung der Proteaseaktivität der Metalloproteinase-Domäne für die Induktion und Aktivierung von MMPs

Um zu untersuchen, ob die induzierende Wirkung der Metalloproteinase-Domäne auf ihre proteolytische Aktivität zurückzuführen ist, inaktivierten wir die Domäne durch 30-minütige Inkubation mit 10mM 1,10-Phenanthrolin. 1,10-Phenanthrolin ist ein Chelator mit einer hohen Affinität für  $Zn^{2+}$ -Ionen und inaktiviert so die  $Zn^{2+}$ -abhängige proteolytische Aktivität (Ward, 1991). Versuche, bei denen die Proteaseaktivität von Jararhagin mit 1,10-Phenanthrolin inaktiviert wurde, führten zu der Vermutung, dass die proteolytische Aktivität für die Induktion der MMP-1 und MT1-MMP-Synthese nicht notwendig ist (Zigrino et al., 2002).

Die Induktion der MMP-Synthese mit der 1,10-Phenanthrolin inaktivierten Metalloproteinase-Domäne wurde auf RNA- und auf Proteinebene mit humanen dermalen Fibroblasten untersucht. Diese wurden für 48 Stunden mit der aktiven oder inaktivierten Metalloproteinase-Domäne behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Fibroblasten (Abb.3.15). Northern Blot Analysen zeigten den Einfluss auf die Synthese der MT1-MMP (Abb.3.15A). Die Inkubation der Fibroblasten mit der Metalloproteinase-Domäne führte zu einer erhöhten Menge an MT1-MMP-Transkripten. Nach Inaktivierung der proteolytischen Aktivität kann die Metalloproteinase Domäne diese Transkriptmenge nicht induzieren.

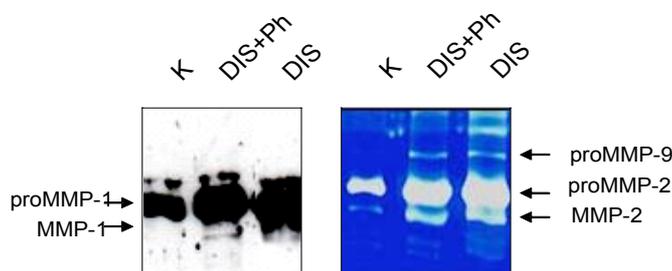


**Abbildung 3.15: Die Metalloproteinase-Domäne benötigt zur Induktion der MT1-MMP-Synthese ihre proteolytische Aktivität** Die Metalloproteinase-Domäne wurde mit 10mM 1,10-Phenanthrolin inaktiviert. Nach Zugabe der inaktivierten Domäne (1 $\mu$ M) zu Fibroblasten im Monolayer betrug die Endkonzentration an 1,10-Phenanthrolin 0,2mM. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Fibroblasten, als Positivkontrolle Fibroblasten, die mit aktiver Metalloproteinase-Domäne (1 $\mu$ M) inkubiert wurden. (A) Nach 48 Stunden wurde die RNA aus den Fibroblasten isoliert und durch Northern Blot Analyse und Hybridisierung mit  $^{32}$ P markierten cDNA-Sonden auf MT1-MMP-mRNA Mengen untersucht. Als Beladungskontrolle diente die Hybridisierung der 18S-rRNA. (B) Überstände der Zellen wurden auf SDS-Proteingelen aufgetrennt und mittels Western Blot Analysen auf die Induktion und Aktivierung der proMMP-1 oder mittels Gelatine-Zymographie auf die Aktivierung der MMP-2 untersucht.

Zur Analyse auf Proteinebene wurden konditionierte Medien der entsprechenden Fibroblasten mittels Western Blot Analyse und Gelatine Zymographie untersucht (Abb. 3.14.B). Die Western Blot Analyse zeigte die Induktion und Aktivierung der MMP-1. Nach Inkubation mit der Metalloproteinase-Domäne trat neben der 57kDa Bande der proMMP-1 die 41kDa Bande der aktivierten Form auf. Bei den Proben die mit der

inaktivierten Domäne behandelt wurden, waren keine erhöhte Menge der Proform und der aktivierten MMP-1 zu detektieren. Gelatine-Zymographien wiesen die Aktivierung der proMMP-2 durch die Metalloproteinase Domäne nach. Neben der Proform (72kDa) war die aktivierte Form (62kDa) sichtbar. Nach Inkubation mit der inaktiven Form traten nur geringe Mengen an MMP-2 auf.

1,10-Phenanthrolin ist ein Chelator mit einer hohen Affinität für  $Zn^{2+}$ -Ionen, wirkt also nicht nur spezifisch auf die Proteaseaktivität der SVMPs, sondern auch auf die der zu untersuchenden MMPs (Ward, 1991). Es muss daher davon ausgegangen werden, dass 1,10-Phenanthrolin die Aktivierung von proMMP-1 und proMMP-2 indirekt durch eine Inhibition von deren Aktivatoren, MMP-3 bzw. MT1-MMP, und nicht durch die Inaktivierung der Metalloproteinase-Domäne bewirkt. Um dies zu prüfen, wurde die Induktion der MMP-Aktivierung durch die Disintegrinartige Domäne in Anwesenheit von 1,10-Phenanthrolin untersucht (Abb. 3.16). Hier inhibiert 1,10-Phenanthrolin die Aktivierung der MMP-2 und MMP-1 nicht. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die verwendeten Mengen an 1,10-Phenanthrolin die Aktivierung von MMP-1 und MMP-2 nicht inhibiert.



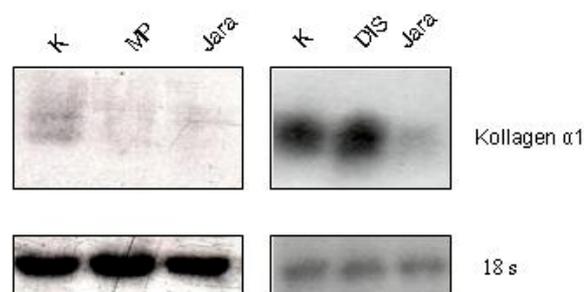
**Abbildung 3.16: 1,10-Phenanthrolin inhibiert nicht die MMP-Aktivierung durch die Disintegrinartige Domäne**  
Fibroblasten wurden für 48 Stunden mit der Disintegrinartigen Domäne (DIS) oder mit der Disintegrinartigen-Domäne und 0,2mM 1,10-Phenanthrolin inkubiert. Für weitere 24 Stunden wurden die Zellen in serumfreien Medium kultiviert und 10 $\mu$ g Gesamtproteinmenge dieser Überstände auf SDS-Proteingelen aufgetrennt und mittels Westernblotanalyse auf MMP-1 Aktivierung und mittels Gelatine-Zymographie auf die MMP-2 Aktivierung untersucht.

### 3.5 Regulation der Typ I Kollagensynthese durch SVMPs

Wie in der Einleitung beschrieben, kommt es bei Fibroblasten, die im Kollagengel kultiviert werden, durch die Interaktionen zwischen Kollagen Typ I und dem  $\alpha_1\beta_1$ -

Integrinrezeptor zu einer Reduktion der Kollagen Typ I Synthese (Langholz et al., 1995). Auch die Inkubation von Fibroblasten im Monolayer mit Jararhagin führt zu einer verminderten Kollagen Typ I Synthese (P.Zigrino, 2000).

Zur Analyse der Kollagen Typ I Synthese wurden Fibroblasten 48 Stunden im Monolayer in Gegenwart von Jararhagin, der Metalloproteinase- und der Disintegrinartigen-Domäne kultiviert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Fibroblasten. Die Kollagensynthese wurde auf RNA-Ebene mittels Northern Blots analysiert (Abb.3.17). Die Abbildung zeigt die Ergebnisse von zwei unterschiedlichen Membranen. In den Kontrollfibroblasten sind auf der ersten Membran zwei Transkripte zu erkennen, deren biologische Funktion unklar ist (Mauch et al., 1988). Auf der zweiten Membran sind beide Transkripte nur schwer voneinander zu unterscheiden. Wie bereits von Zigrino (2000) gezeigt, kann Jararhagin die Synthese von  $\alpha_1$ (I) reduzieren. Analysen der Kollagen mRNA Expression von Fibroblasten im Monolayer zeigen, dass Jararhagin sowie die verwendete Metalloproteinase-Domäne aus Atrolysin die Expression von Kollagen Typ I verringern können. Dagegen hat die Disintegrinartige-Domäne keinen Effekt auf die Kollagen-mRNA-Menge.



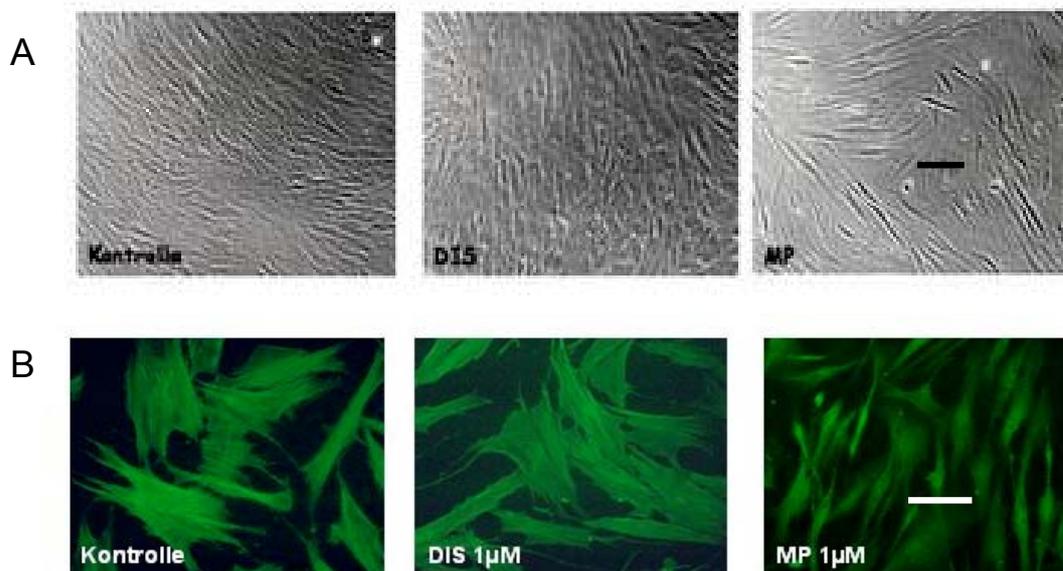
**Abbildung 3.17: Jararhagin und die Metalloproteinase-Domäne können die  $\alpha_1$ (I)-Kollagensynthese reduzieren**  
Fibroblasten wurden mit den beiden Domänen (DIS und MP; 1 $\mu$ M) und Jararhagin (Jara; 100nM) für 48h als Monolayer kultiviert. Anschließend wurde Gesamt-RNA präpariert und 5 $\mu$ g auf einem Formaldehyd-Agarose Gel aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran transferiert. Die mRNA-Menge von  $\alpha_1$ (I) Kollagen wurde durch Hybridisierung mit einer  $^{32}$ P-markierten cDNA-Sonde bestimmt. Als Beladungskontrolle diente die Hybridisierung der 18S-rRNA. Es wurden zwei Transkripte nachgewiesen, deren biologische Funktion unklar ist (Mauch et al., 1988)

### 3.6 Zellmorphologie

Neben einem veränderten Stoffwechsel kommt es bei Fibroblasten im Kollagengel zu einer veränderten Zellmorphologie (Übersicht: Grinnel, 1994). Die Zellen bilden

verstärkt Fortsätze und werden motiler. Auch Jararhagin kann die Zellmorphologie der Fibroblasten beeinflussen. Ähnlich wie durch die Bindung der Zellen an fibrilläres Kollagen im Kollagengel bilden sich Fortsätze, die Zellen erscheinen bipolar (Zigrino et al., 2002).

Die Zellmorphologie wurde an Fibroblasten untersucht, die für 48 Stunden mit der Disintegrinartigen- und der Metalloproteinase Domäne im Monolayer behandelt wurden (Abb. 3.18).



**Abbildung 3.18: Die Morphologie von humanen dermalen Fibroblasten wurde durch die Metalloproteinase- aber nicht durch die Disintegrinartige Domäne modifiziert** Fibroblasten wurden für 48 Stunden mit jeweils 1 µM der Disintegrinartigen- (DIS) und der Metalloproteinase-Domäne (MP) inkubiert. (A) zeigt die Morphologie der Fibroblasten durch das Lichtmikroskop. (B) Die Fibroblasten wurden zur genaueren Analyse der Zellmorphologie mit Aceton fixiert und das Aktinzytoskelett mit FITC-gekoppelten Phalloidin (0,5 µg/ml) angefärbt. Der Balken entspricht 50 µm.

Die Analyse der Zellmorphologie der Fibroblasten nach Inkubation mit den beiden Domänen zeigte, dass die Fibroblasten nach Behandlung mit der Metalloproteinase-Domäne spindelförmig vorliegen (Abb.3.18A). Ihre Morphologie entspricht der, die für Jararhagin beschrieben wurde (Zigrino et al., 2002). Außerdem erschien die Zelldichte geringer als in den Schalen mit unbehandelten Fibroblasten. Zur genaueren Analyse der Zellmorphologie wurde das Zytoskelett der Fibroblasten wie in Material und Methoden unter Abschnitt 2.2.1 beschrieben durch Anfärbung des Zytoskelettproteins Aktin mit Phalloidin dargestellt Die Ergebnisse zeigten, dass die Fibroblasten nach

Behandlung mit der Metalloproteinase-Domäne weniger gespreitet sind als Kontrollfibroblasten und bipolar erscheinen (Abb. 3.18B). Fibroblasten, die mit der Disintegrinartigen Domäne behandelt wurden, zeigten dagegen eine Morphologie, die mit der von unbehandelten Kontrollzellen vergleichbar ist.

Die Veränderung der Zellmorphologie war abhängig von der Proteaseaktivität, wie durch Inkubation der Fibroblasten mit der Metalloproteinase-Domäne, deren Enzymaktivität durch 1,10-Phenanthrolin inhibiert wurde, gezeigt werden konnte. In inaktiverter Form konnte die Zellmorphologie nicht beeinflusst werden. Die Morphologie entsprach der von Kontrollfibroblasten (Abb.3.18).

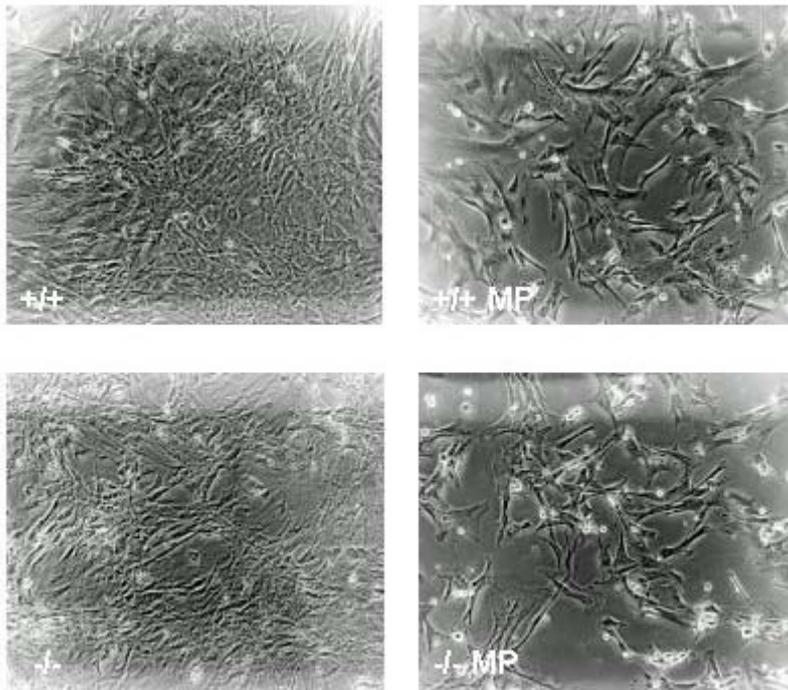


**Abbildung 3.18: Die Metalloproteinase-Domäne benötigte für die Beeinflussung der Zellmorphologie ihre Proteaseaktivität** Fibroblasten wurden für 48 Stunden mit der aktiven und der 1,10-Phenanthrolin inaktivierten Metalloproteinase-Domäne (1 $\mu$ M) inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Fibroblasten. Die Zellmorphologie wurde lichtmikroskopisch untersucht. Der Balken entspricht 50 $\mu$ M.

### 3.6.1 Bedeutung der $\alpha_2$ -Integrinuntereinheit für die veränderte Zellmorphologie

Wie schon beschrieben, konnte die Metalloproteinase-Domäne auch in  $\alpha_2$ -defizienten Mausfibroblasten die Aktivierung der proMMP-2 induzieren (vgl. Abschnitt 3.4.3). Zur Analyse der Bedeutung der  $\alpha_2$ -Integrin Untereinheit für die Veränderung der Zellmorphologie wurden  $\alpha_2$ -defiziente Fibroblasten mit der Metalloproteinase-Domäne inkubiert (Abb.3.19). Murine wildtyp Fibroblasten zeigen daraufhin ähnlich wie humane Fibroblasten eine bipolare, spindelförmig Morphologie. Somit kann die Metalloproteinase-Domäne auch in Mausfibroblasten die Zellmorphologie beeinflussen. Auch in  $\alpha_2$ -defizienten Fibroblasten wird die Morphologie durch diese Domäne verändert. Darüber hinaus scheint in beiden Fibroblastentypen durch den Einfluss der Metalloproteinase-Domäne die Zelldichte geringer zu sein. Möglicherweise adhären die Fibroblasten nicht mehr gut an den Schalenboden.

Anscheinend kann die Metalloproteinase-Domäne ihre Wirkung bezüglich der Morphologie unabhängig vom  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin vermitteln.



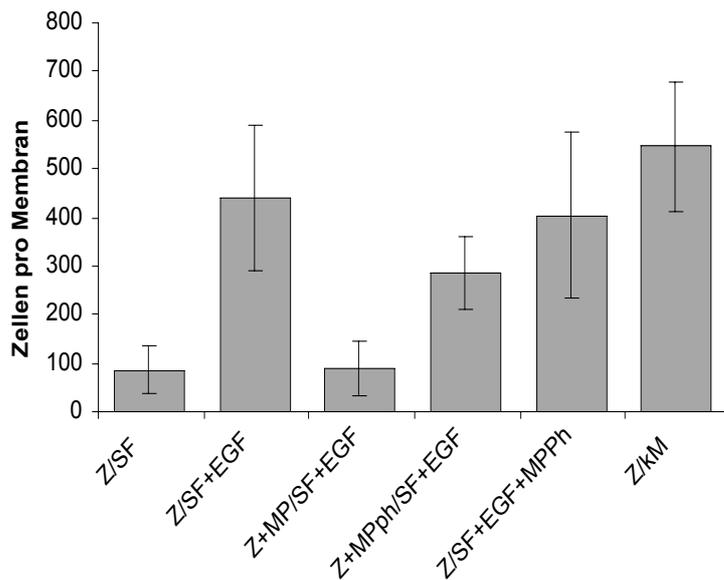
**Abbildung 3.19: Die Metalloproteinase-Domäne bewirkt auch in Abwesenheit der  $\alpha_2$ -Integrinuntereinheit eine Morphologieänderung in murinen dermalen Fibroblasten** Murine dermale wildtyp (+/+) und  $\alpha_2$ -defiziente Fibroblasten wurden für 48 Stunden in der Gegenwart der Metalloproteinase-Domäne (MP; 1\_M) kultiviert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Fibroblasten. Die Morphologie der Zellen wurde an einem Lichtmikroskop ausgewertet.

### 3.7 Migration

Es wurde postuliert, dass die veränderte Morphologie der Fibroblasten nach der Behandlung mit Jararhagin auf einen motilen Phänotyp hinweist (Zigrino, 2000). Da durch die Metalloproteinase-Domäne ähnliche Änderungen der Morphologie induziert werden können, sollte die Motilität von humanen dermalen Fibroblasten nach Inkubation mit dieser Domäne genauer untersucht werden. In Migrationsversuchen mit Boyden Kammern wurde gezeigt, dass humane dermale Fibroblasten durch permeable Membranen in Richtung von konditioniertem Fibroblastenmedium (vgl. Material und methoden, Abschnitt 2.2.1) wandern (Mensing et al., 1983). In diesem Medium

enthaltende Proteine, hauptsächlich das Matrixprotein Fibronectin, wirken auf die Fibroblasten als Chemoattraktans (Mensing et al., 1983). Es sollte untersucht werden, ob diese Migration nach Inkubation mit der Metalloproteinase-Domäne verstärkt ist, diese Domäne somit die Migration erhöht. Dazu wurden Migrationsversuche durchgeführt, bei denen  $5 \times 10^3$  Fibroblasten in serumfreiem Medium im oberen Kompartiment kultiviert wurden (Abb.3.20). Nach sechs Stunden wurden die Zellen, die durch die Poren der Membranen auf deren Unterseite gewandert waren, ausgezählt. Im unteren Kompartiment befand sich konditioniertes Fibroblastenmedium (Positivkontrolle, Z/kM) oder serumfreies Medium (Negativkontrolle, Z/SF). In Richtung des konditionierten Mediums wanderten  $\pm 572$  Zellen, in der Negativkontrolle nur  $\pm 99$  Zellen. Da die Metalloproteinase-Domäne Fibronectin degradieren kann (vgl. Abschnitt 3.8) konnte nicht ausgeschlossen werden, dass diese Domäne die Migration in diesem Versuch indirekt durch die Degradation des Chemoattraktans im konditionierten Medium beeinflussen könnte. Es ist gezeigt worden, dass EGF (epidermal growth factor) als Chemoattraktans auf humane dermale Fibroblasten wirkt (Adelmann-Grill et al., 1990). Daher diente serumfreies Medium, das EGF enthält, als weitere Positivkontrolle (Z/SF+EGF), bei der  $\pm 454$  Fibroblasten migrieren. Fibroblasten wurden mit der Metalloproteinase-Domäne (Z+MP/SF+EGF) oder der mittels 1,10-Phenanthrolin inaktivierten Metalloproteinase-Domäne (Z+MPph/SF+EGF) inkubiert, bevor diese über EGF-haltigen Medium kultiviert wurden, um den Einfluss der Metalloproteinase-Domäne auf die Migration und die Bedeutung ihrer proteolytischen Aktivität zu untersuchen. Die aktive Metalloproteinase-Domäne reduziert die Migration auf  $\pm 98$  Zellen pro Membran. Nach Inaktivierung der Protease-Aktivität migrieren dagegen  $\pm 276$  Zellen.

Um auszuschließen, dass die Metalloproteinase-Domäne, die durch Diffusion ins untere Kompartiment gelangen kann, einen degradierenden Effekt auf EGF ausübt, wurde ein Kontrollversuch durchgeführt, bei dem EGF für sechs Stunden mit der Metalloproteinase Domäne vorinkubiert wurde, bevor es als Chemoattraktans eingesetzt wurde. Dann wurde 1,10-Phenanthrolin zugegeben, um die Metalloproteinase-Domäne zu inaktivieren (Z/ST+EGF+MPph). Es wanderten  $\pm 413$  Zellen durch die Membran. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Metalloproteinase-Domäne keinen degradierenden Effekt auf EGF hat.



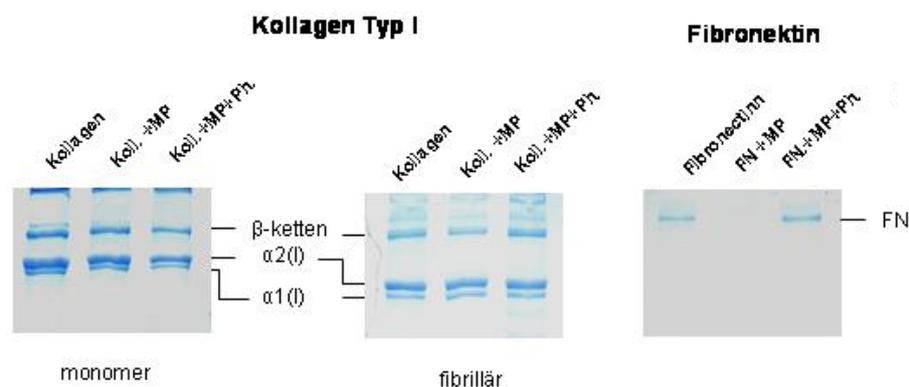
**Abbildung 3.20: Die Metalloproteinase verringert die Migration von humanen dermalen Fibroblasten  $5 \times 10^3$**  humane dermale Fibroblasten wurden im oberen Kompartiment von Boyden Kammern in serumfreiem Medium inkubiert. Im unteren Kompartiment befand sich serumfreies Medium (SF), SF-Medium mit dem Chemoattraktans EGF (SF+EGF;  $10 \mu\text{M}$ ) oder konditioniertes Fibroblasten Medium (kM) als Chemoattraktans. Die Zellen wurden mit der Metalloproteinase-Domäne ( $1 \mu\text{M}$ ) (Z+MP/SF+EGF) oder der 1,10-Phenanthrolin inaktivierte Metalloproteinase-Domäne (Z+MPph/SF+EGF) inkubiert. Als Kontrolle wurde EGF mit der Metalloproteinase-Domäne vorinkubiert und die Domäne dann mit 1,10 Phenanthrolin ( $10 \text{mM}$ ) inhibiert (Z/SF+EGF+MPph). Nach 6 Stunden wurden die Zellen auf den Membranen zwischen beiden Kompartimenten fixiert und mittels einer DIFF Färbung angefärbt. Am Lichtmikroskop wurden die Zellen auf den Membranen ausgezählt. Die Versuche wurden dreimal mit drei Parallelansätzen durchgeführt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Metalloproteinase-Domäne die Motilität der Fibroblasten bzw. deren Migrationsfähigkeit nicht erhöht, sondern verringert.

### 3.8 Einfluss der Metalloproteinase-Domäne auf die Matrix der Fibroblasten

Durch Adhäsions- und Migrationsversuche konnte gezeigt werden, dass die Metalloproteinase-Domäne einen direkten Einfluss auf die Zellen hat, der abhängig von der proteolytischen Aktivität dieser Domäne ist (Abschnitt 3.1.1 und 3.1.6).

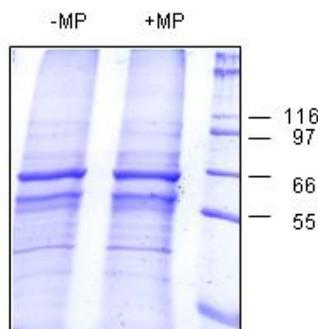
Wie einleitend erwähnt, ist eine Funktion der SVMPs die Degradation der extrazellulären Matrix an den Gefäßwänden (Hati et al., 1999; Kamiguti et al., 1996). Für Atrolysin, dessen Metalloproteinase-Domäne in diesen Untersuchungen verwendet wurde, ist gezeigt worden, dass es Fibronectin, aber nicht Kollagen Typ I degradieren kann (Baramova et al., 1989). Die Metalloproteinase-Domäne wurde auf ihre Fähigkeit getestet, Fibronectin und Kollagen Typ I zu degradieren (Abb.3.21). Dazu wurde 1 $\mu$ g in Essigsäure gelöstes Kollagen Typ I oder Fibronectin über Nacht mit 1 $\mu$ M der Metalloproteinase-Domäne in PBS inkubiert. Im Gegensatz zu dem monomeren Kollagen sollte auch die mögliche Degradation fibrillären Kollagens untersucht werden. Dazu wurde der gleiche Ansatz mit 50mM NaOH neutralisiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Matrixproteine oder Proteine, die mit der 1,10-Phenanthrolin inaktivierten Metalloproteinase-Domäne behandelt wurden. Die Proben wurden am nächsten Tag auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Gele mit Coomassieblau-Lösung angefärbt (Abb.3.21).



**Abbildung 3.21: Die Metalloproteinase-Domäne degradiert Fibronectin, aber nicht Typ I Kollagen** 1 $\mu$ g monomeres oder fibrilläres Kollagen Typ I und Fibronectin wurden über Nacht bei 37°C mit der aktiven (MP) oder der 1,10-Phenanthrolin (10mM) inaktivierten (MP+Ph) Metalloproteinase-Domäne (1 $\mu$ M) verdaut. Diese Ansätze wurden auf einem 8%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie Blau angefärbt. Man erkennt die  $\alpha$ -Ketten des Kollagens bei die zwei  $\alpha$  Ketten ( $\alpha$ 1(I);  $\alpha$ 2(I)). Fibronectin ist als einzelne Bande zu erkennen.

Die Polyacrylamidgele zeigen, dass auch in Anwesenheit der Metalloproteinase-Domäne die  $\alpha$ -Ketten des Kollagens erkennbar sind. Daneben traten auch die  $\alpha$ -Ketten auf, die heterotrimeren Formen der  $\alpha$ -Ketten. Fibronectin ist im Proteingel als 225 kDa Bande zu erkennen. Nach Inkubation mit der aktiven Metalloproteinase-Domäne ist diese Bande nicht mehr zu detektieren. Dagegen hat die inaktivierte Metalloproteinase-Domäne keinen Effekt auf Fibronectin.

Schwieriger ist es, für die Matrix, die direkt von den Fibroblasten gebildet wurde, eine Degradation durch die Metalloproteinase-Domäne nachzuweisen. Konfluente Fibroblasten, die im Monolayer kultiviert wurden, wurden mittels EDTA-Lösung vom Schalenboden abgelöst. Die auf dem Schalenboden verbliebenen Matrixproteine wurden in PBS abgekratzt und über Nacht mit der Metalloproteinase-Domäne inkubiert. Der Ansatz wurde auf einem SDS-Proteingel aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie-Blau angefärbt. Als Kontrolle dient die unbehandelte Matrix. Die Analysen der Matrix nach Inkubation mit der Metalloproteinase-Domäne ergaben keine Hinweise auf eine Degradation der Matrixproteine. Die Coomassie-Blau Färbungen von SDS-Proteingelen zeigten keine Änderung im Protein-Bandenmuster (Abb.3.22).



**Abbildung 3.22: Matrixbestandteile nach Inkubation mit der Metalloproteinase-Domäne** Fibroblasten auf einer 10cm Schale werden mit EDTA (2% v/v in PBS) abgelöst und die Matrix wird in 1ml PBS abgekratzt. Die Proteine werden mit TCA ausgefällt und mit der Metalloproteinase-Domäne (1\_M) über Nacht bei 37 °C degradiert. Die Proteine werden auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie Blau angefärbt.

Somit konnte durch diesen Versuch kein Einfluss der Metalloproteinase-Domäne auf die Matrix der Fibroblasten nachgewiesen werden.

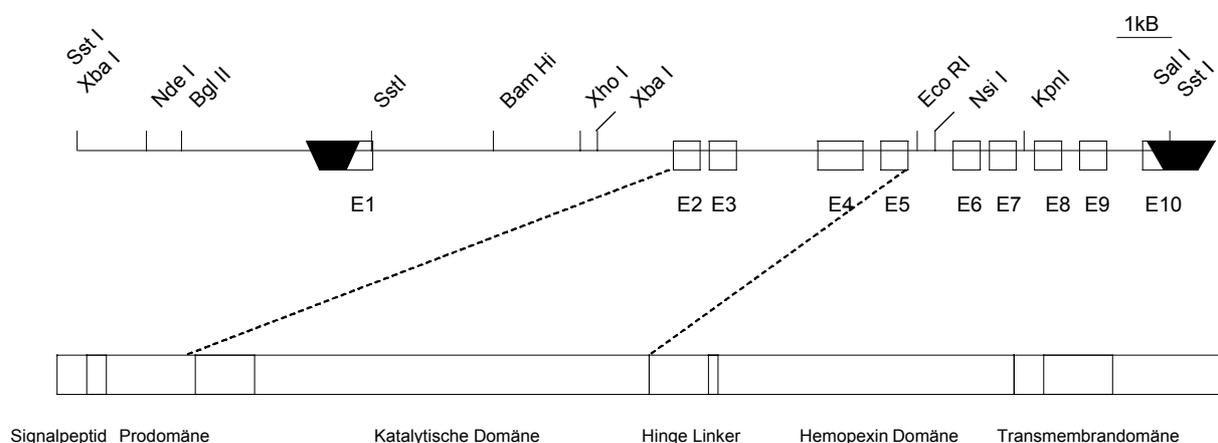
### 3.9 Etablierung eines Mausstammes mit einem konditional inaktivierbaren MT1-MMP Gen

Wie einleitend erwähnt, nehmen die MT-MMPs eine Sonderstellung unter den MMPs ein, da sie nicht nur Bestandteile der extrazellulären Matrix degradieren können, sondern auch an der Aktivierung anderer MMPs beteiligt sind (Sato et al., 1994, Seiki, 1999; Cowell et al., 1998). Die vorhergehenden Untersuchungen zur Induktion der MMP-Synthese und Aktivierung durch Schlangengift Metalloproteinasen haben ähnlich wie für die Induktion durch Kollagen Typ I gezeigt, dass durch die Aktivierung des

Integrinrezeptors die Expression von MT1-MMP induziert wird und durch diese vermittelt die MMP-2 aktiviert wird (Zigrino et al., 2001; 2002). Daher sollte in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Mauch die Funktion der MT1-MMP genauer in einem *in vivo* System untersucht werden. Deshalb wurde im Verlauf der bisher dargestellten Arbeiten auch damit begonnen, einen Mausstamm zu generieren, mit dem die Inaktivierung des MT1-MMP Genes nur in der Haut erzielt werden kann. Diese Vorgehensweise war nötig, da komplette Defizienz der MT1-MMP zu einer frühen Letalität der Mäuse führt (Holmbeck et al., 1999; Zhou et al., 2000). Somit sind mit diesen Mäusen keine Experimente wie zum Beispiel Wundheilungsversuche im adulten Tier möglich.

### 3.9.1. Die Strategie zur Inaktivierung des *MMP-14* Gens

Das murine Gen der MT1-MMP (*MMP-14*) liegt auf Chromosom 14 und überspannt eine Länge von 11 kB (Apte et al., 1997; vgl. Abb. 3.23). Es besteht aus 10 Exons, wobei vom ersten und letzten Exon nur die kodierenden Bereiche bekannt sind.

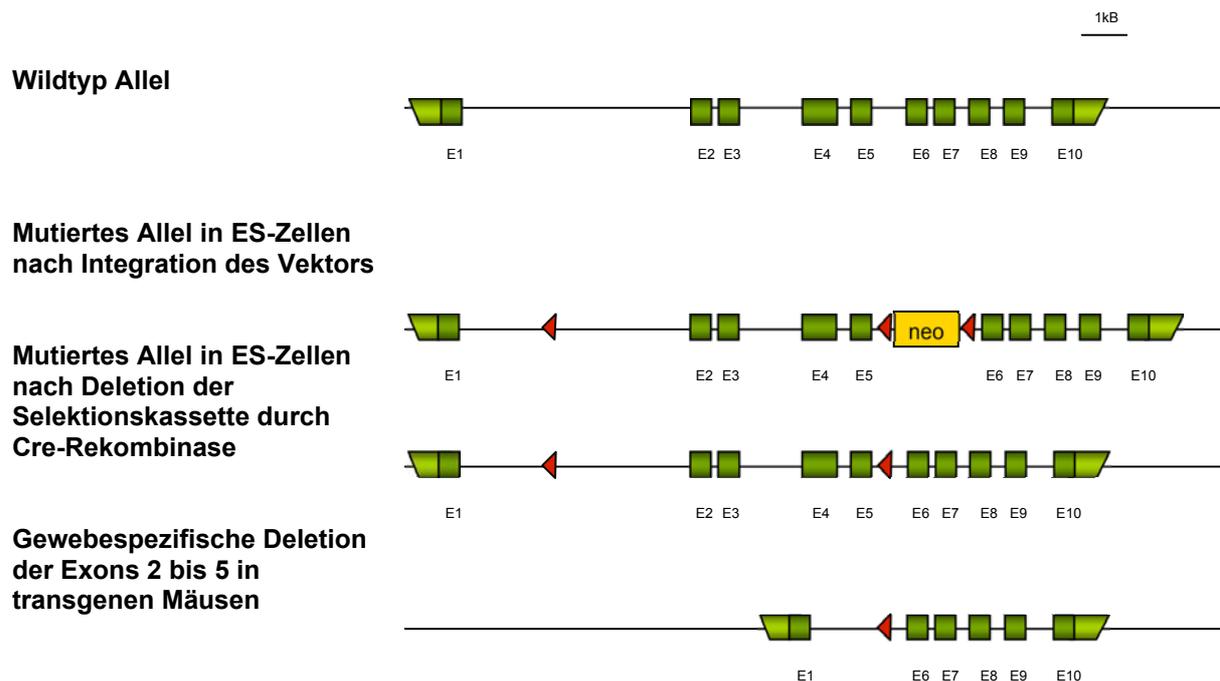


**Abbildung 3.23: Die Exons des MT1-MMP Gens und Domänen der MT1-MMP** Die Abbildung zeigt, welche Exons des MT1-MMP genes für die katalytische Domäne kodieren

Das murine MT1-MMP Gen (*MMP-14*) sollte so verändert werden, dass dieses Gen hautspezifisch inaktiviert werden kann. Die Strategie dazu ist eine Deletion der Exons 2 bis 5 mittels des „Cre-loxP“-Systems (Sauer and Henderson, 1988) herbeizuführen

(Abb. 3.24). Diese Exons codieren für die Prodomäne und die katalytische Domäne der MT1-MMP (Apte et al., 1997; vgl. Abb.3.24). Durch Verschiebungen der Codonphasen kann nach Deletion der Exons 2 bis 5 kein Restprotein mehr synthetisiert werden (Apte et al., 1997).

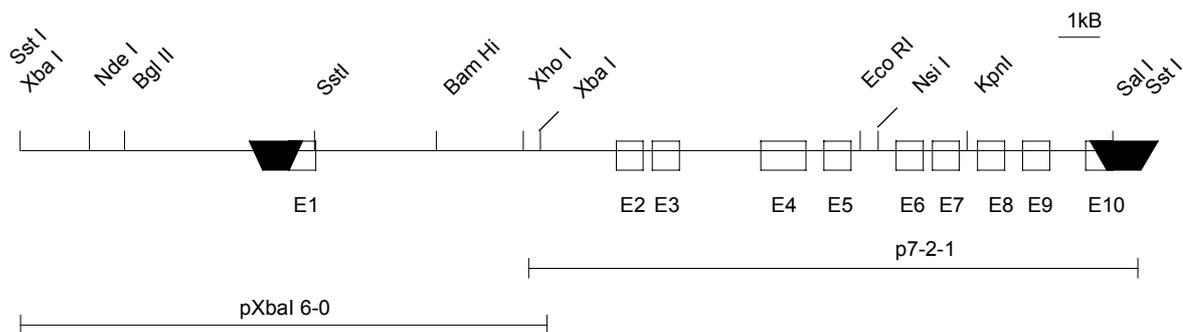
Zur Deletion dieser Exons sollten pluripotente embryonale Stammzellen (ES-Zellen) generiert werden, in denen im Intron 1 des MMP-14 Gens eine *loxP* Sequenz und im Intron 5 ein Selektionskassette, die für das Neomycin Resistenz Gen (*neo<sup>r</sup>*) kodiert, flankiert von 2 *loxP* Sequenzen („gefloxt“) liegen. Dieses Resistenzgen dient später der Selektion transfizierter embryonaler Stammzellen, soll aber dann wieder aus den ES-Zellen entfernt werden, da die Expression des Resistenzgenes die Transkription des *MMP-14* Genes stören könnte. Dazu müssen die ES-Zellen transient mit einem Es sollte zum einen eine Epidermis spezifische Deletion durch die Verpaarung mit K14Cre-Mäusen herbeigeführt werden, bei denen die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Keratinozyten spezifischen Promotors K14 steht.



**Abbildung 3.24: schematische Darstellung der Strategie zur Generierung einer gewebespezifischen MT1-MMP defizienten Maus.** Oben ist das Wildtyp Allel dargestellt, wie es in der Maus und in den ES-Zellen vorliegt. Die mutierten Allele darunter entstehen durch Transfektionen der ES Zellen mit dem Ersatzvektor MT Neolox 5 und anschließend mit dem Plasmid pIC Cre. Durch homologe Rekombination wurde zwischen Exon 1 und 2 eine *loxP* Sequenz und zwischen Exon 5 und 6 eine gefloxt Selektionskassette eingeführt. Diese wird durch Cre Rekombinase deletiert. Die entstandenen ES-Zellen werden zur Generierung einer Mauslinie benutzt. In denen wird durch die Expression der Cre Rekombinase die Exons 2 bis 5 deletiert, wobei noch eine *loxP* Sequenz im Genom verbleibt, wie unten dargestellt.

### 3.9.2 Klonierung des Austauschvektors MT-Neolox5

Zur Klonierung des Austauschvektors wurden 2 Fragmente des MT1-MMP Genes benutzt (Holmbeck et al. 1999, Abb.3.25). Beide genomischen DNA-Fragmente wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Birkedahl-Hansen (National Institute of Dental and Craniofacial Research, Bethesda, USA) zur Verfügung gestellt.



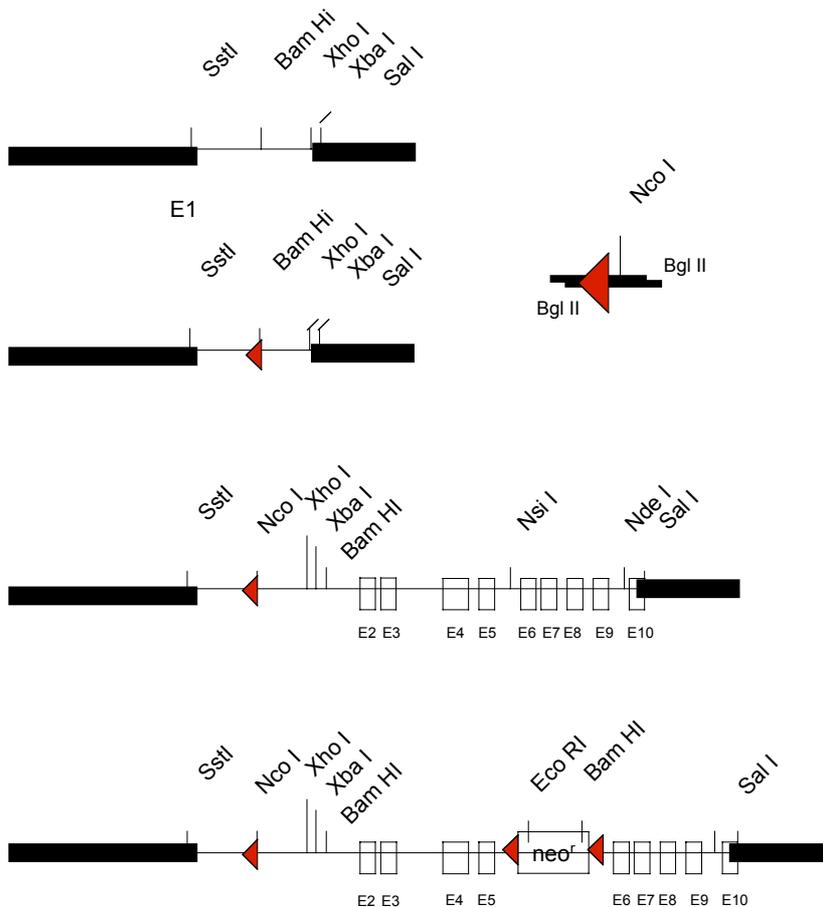
**Abbildung 3.25: Restriktionskarte der MT1-MMP Fragmente** Die Abbildung zeigt die 10 Exons des MMP-14 Gens und wichtige Restriktions-Sequenzen. Darunter sind die beiden Vektoren dargestellt die für die Klonierung des Austauschvektors eingesetzt wurden.

Die Klonierung des Austauschvektors umfasst vier Klonierungsschritte (Abb. 3.26).

Zuerst wurde ein 2.8 kB langes SstI/XbaI Fragmentes aus pXba I 6.0 in die multiple Klonierungs Region des pGem4 Vektors kloniert. In dieses Fragment wurde die erste *loxP* Sequenz eingebracht. Dazu wurde ein doppelsträngiges Oligonukleotid synthetisiert, der die *loxP* Sequenz, eine NcoI-Restriktionsstelle und kompatible 3' und 5' Enden für Bgl II Überhänge enthält. Der modifizierte pGem4 Vektor wurde mit Bam HI verdaut, um dort den *loxP* Linker hinein zu klonieren. Die Bgl II Überhänge des Oligonukleotids sind mit den Bam HI Überhängen des geschnittenen Vektors kompatibel. Mittels der neu eingebrachten NcoI Restriktionsstelle kann die erfolgreiche Klonierung überprüft werden. Außerdem wird die Bam HI Restriktionsstelle durch den Einbau dieses Oligonukleotides zerstört. Die Orientierung der *loxP* Sequenzen wurde über Sequenzierungen ermittelt.

Im nächsten Schritt wurde ein 7kB großes Sal I/Xho I Fragment aus dem Plasmid p7-2-1 herausgeschnitten und mit dem Austauschvektor ebenfalls mit Sal I und Xho I linearisiert ligiert. Der letzte Schritt war das Einbringen der von zwei *loxP* Sequenzen flankierten Neomycin Kasette zwischen dem fünften und sechsten Exon. Dazu wurde der Vektor mit Nsi I verdaut, und die 5'-Überhänge mittels Klenow-Polymerase

aufgefüllt. Die „geflochte“ Neomycin Kasette wurde mit XbaI und NotI aus dem Plasmid Neoflox 8 (Dr. W.Müller, GBF Braunschweig) herausgeschnitten und die 5'-Überhänge mittels Klenow Enzym aufgefüllt. Über eine „blunt end“-Ligation wurde dieses Fragment in den Austauschvektor hineinkloniert. Mittels Eco RI Verdau wurde überprüft, dass auch die beiden *loxP* Sequenzen, die die Neomycin Kasette flankieren in 3'-5' Richtung liegen. Der fertige Austauschvektor hat eine Größe von 13,2 kB.



**Abbildung 3.26: schematische Darstellung der Klonierung des Ersatzvektors MT-Neolox5** Die Abbildung zeigt die vier Schritte der Klonierung und den Linker, der die erste *loxP* Sequenz enthält. Oben ist der pGem4 Vektor nach Einfügen des ersten MMP-14 Fragmentes dargestellt. Darunter ist die erste *LoxP* Sequenz 1400 bp hinter dem ersten Exons hineinkloniert worden. Durch Einfügen des zweiten MT1-MMP Fragmentes wurden die übrigen Exons in den Vektor eingebracht. Unten ist der vollständige Ersatzvektor MTNeolox5 mit der *LoxP* Sequenz zwischen dem ersten und zweiten Exon und mit der geflochten Neo-Kassette zwischen 5. und 6. Exon dargestellt (400 bp stromabwärts des Exon 5).

### 3.9.3 Transfektion der ES-Zellen mit dem Ersatzvektor

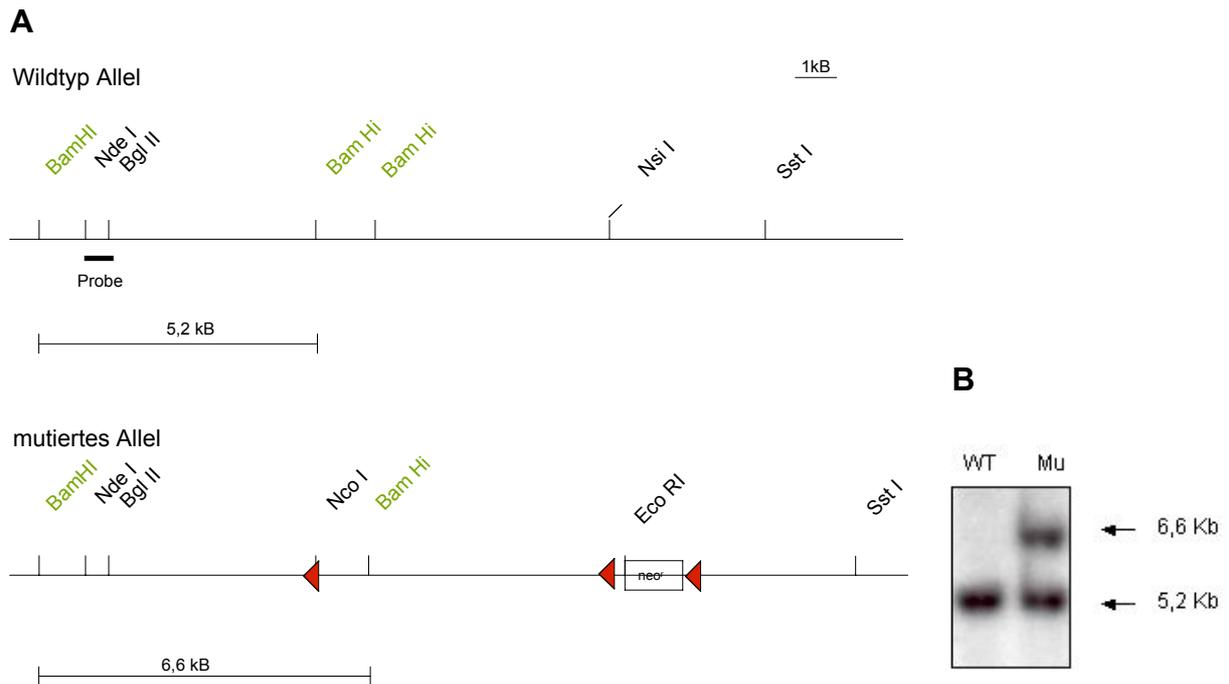
Murine embryonale Stammzellen (ES-Zellen) der Zelllinie IB10 (Dr. Neil Smyth, Institut für Biochemie II; Universität zu Köln) wurden wie unter Material und Methoden, Abschnitt 2.2.1 beschrieben mit dem mit Sal I linearisiertem Austauschvektor MT-Neolox 5 durch Elektroporation transfiziert.

Die transfizierten Zellen wurden auf embryonalen Fibroblasten („Feeder Cells“) mittels G418 (Neomycin) selektioniert. Resistente Klone wurden gepickt, kultiviert und ein Teil jedes ES-Zellklons eingefroren. Der andere Teil der Zellen wurde zur Analyse genutzt.

### 3.9.4. Analyse der transfizierten ES-Zellen

Die genomische DNA der ES-Zellklone wurde mit Bam HI verdaut, auf einem Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen, wie unter Abschnitt 2.2.1 in Material und Methoden beschrieben. Die Membranen wurden dann mit einem radioaktiv markierten Nde I/Bgl II Fragment hybridisiert, das als externe 5'-Probe dient, da es nicht im transfizierten Teil des Gens liegt und so die Integration des Vektors untersucht werden kann (vgl. Abb. 3.27). Durch homologe Rekombination des veränderten MMP-14 Genfragmentes verändert sich die Länge der Bam HI Restriktionsfragmente in dem von der Sonde detektierten Bereich des Gens. Die Sonde detektiert im Fall einer homologen Rekombination ein 6,6kB langes Fragment zusätzlich zu dem 5,2 kB langen Wildtyp Fragment. Integriert der Vektor zufällig in das Mausgenom detektiert die Sonde nur das 5,2 kB große Fragment.

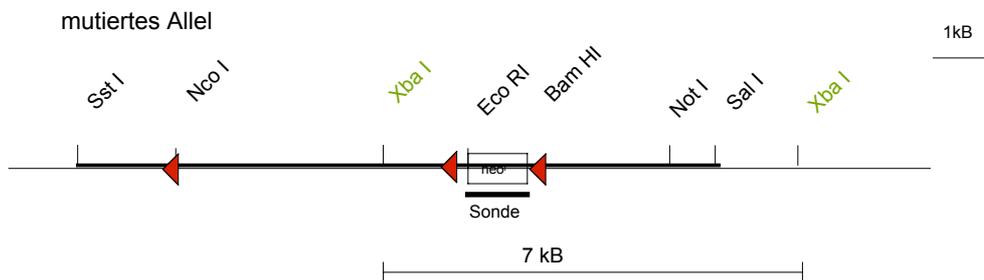
In zwei unabhängig voneinander durchgeführten Transfektion wurden insgesamt 534 Klone isoliert. Davon wurden 266 Klone analysiert, da die übrigen Klone wegen Kontaminationen nicht weiter verwendet werden konnten und 9 Klone zeigten homologe Rekombination mit dem mutierten MMP-14 Fragment. Damit ergibt sich eine Rekombinationsfrequenz von 3,4%.



**Abbildung 3.27: Analyse der ES-Zellklone nach Transfektion mit MT-Neolox5** (A) zeigt das Wildtyp Allel und das mutierte Allel nach Transfektion und homologer Rekombination mit dem Austauschvektor MT-Neolox5. Nach Verdau der genomischen DNA mit Bam HI und Transfer auf eine Nylonmembran wird durch Hybridisierung mit der externen radioaktiv markierten Sonde ein 5,2 kB großes Fragment detektiert. Die Restriktion des mutierten Allels ergibt eine zusätzliche Bande von 6,6kB. (B) Ein repräsentativer Blot, auf dem die homologe Rekombination durch das Auftreten der zwei radioaktiv markierten Banden nachgewiesen wird.

### 3.9.5 Weitere Strategie zur Generierung von geflochten ES-Zellen

In weiteren Experimenten soll untersucht werden, ob es in den ES-Zellen, in denen durch homologe Rekombination der Austauschvektor integriert wurde, zu weiterer zufälliger Integration des Austauschvektors gekommen war. Dazu wird die DNA mit Xba I verdaut und mittels Southern Blot und einer Sonde (Neo-Sonde) gegen das Neomycin-Resistenzgen auf weitere Integration untersucht werden (vgl. Abb.3.28). Bei homologer Rekombination sollte die Hybridisierung mit der Neo-Sonde eine 7 Kb große Bande markieren. Ist es zu weiterer zufälliger Integration des Austauschvektors in das Genom gekommen, werden weitere unterschiedlich große Banden auftreten.



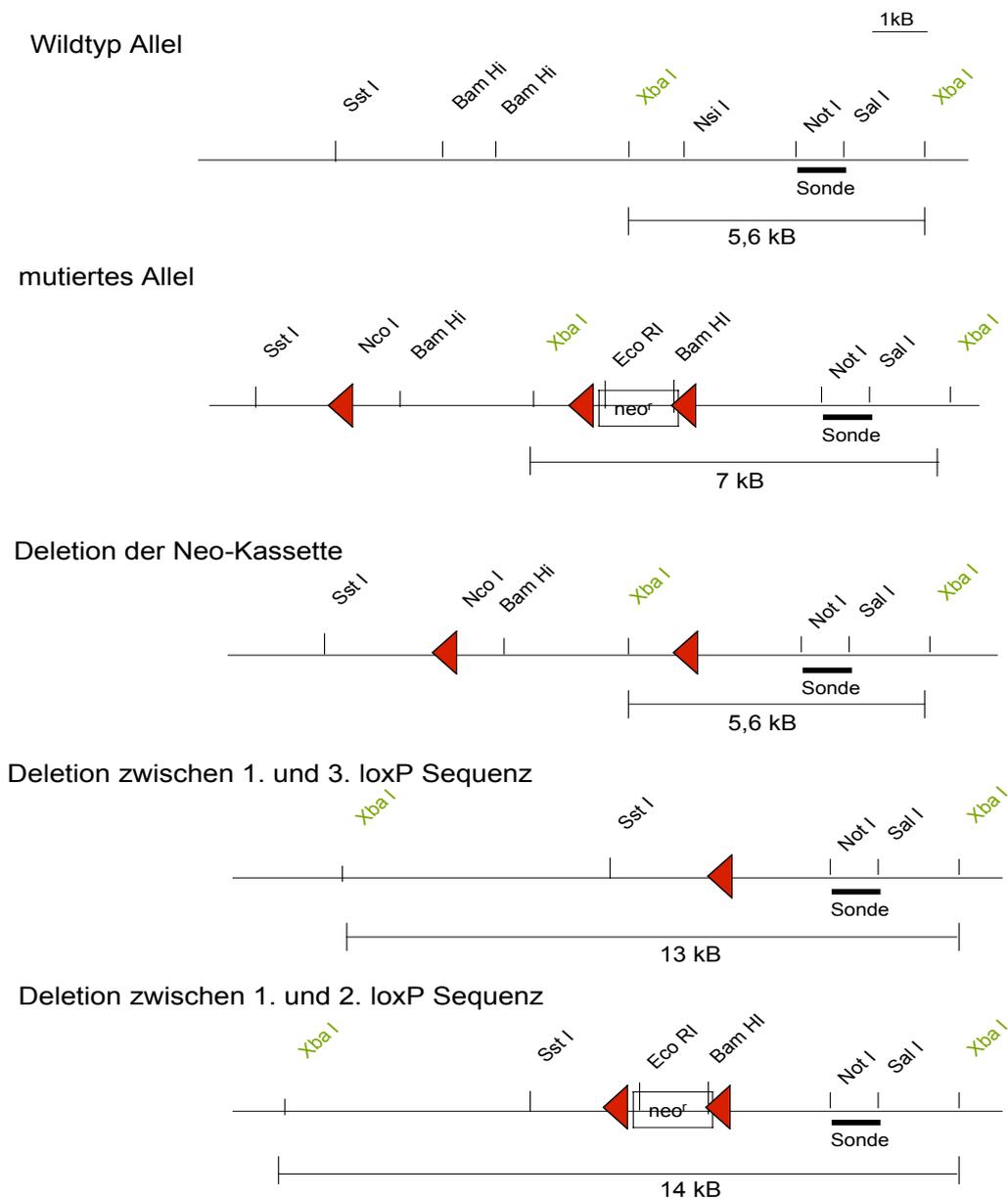
**Abbildung 3.28: Strategie zur Analyse der ES-Zellklone nach Transfektion mit MT-Neolox5 auf das Vorhandensein zufälliger Integration** Die Abbildung zeigt das mutierte Allel nach homologer Rekombination mit dem Austauschvektor MT-Neolox5 (fetter Balken). Nach Verdau der genomischen DNA mit Xba I und Transfer auf eine Nylonmembran wird durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde (Eco RI/Bam HI) gegen das Neomycin-resistenz genes wird ein 7 kB großes Fragment zwischen einer internen und einer externen Xba I Restriktions-Sequenz detektiert.

Die Zellen, in denen der Austauschvektor im richtigen Locus integriert ist, werden dann mit dem Plasmid pIC Cre, das für die bakterielle Cre-Rekombinase kodiert, transient transfiziert werden. Cre-Rekombinase führt zur Deletion von DNA-Bereichen zwischen zwei *loxP*-Sequenzen (Sauer et al., 1988). Die Expression der Cre-Rekombinase soll zur Deletion des geflochten Neomycin-Resistenzgens führen. Daneben kann es aber auch zu Deletionen zwischen der ersten *loxP* Sequenz und den *loxP* Sequenzen des geflochten Neomycin-Resistenzgens kommen. Um die Zellklone mit einer Deletion des Neomycin-Resistenzgenes von anderen Zellklonen zu unterscheiden, wird die DNA mit Xba I geschnitten und mittels Southern Blot und einer internen NotI/Sal I-Sonde analysiert werden.

Neben der Wildtyp-Bande bei 5.6 kB wird bei ES-Zellen, in denen es zu keiner Deletion gekommen war, eine 7 kB Bande zu erkennen sein. Bei einer Deletion des Neomycin-Resistenzgenes wird nur eine 5.6 kB Bande zu detektieren sein. Die komplette Deletion zwischen der ersten und dritten *loxP* Sequenz wird zum Auftreten einer 13 kB Bande führen, bei einer Deletion zwischen erster und zweiter *loxP* Sequenz wird eine 14 kB Bande auftreten.

ES-Zellen, bei denen eine Deletion des Neomycin-Resistenzgenes nachgewiesen wurde, können dann zur Generierung eines „geflochten“ Mausstammes eingesetzt werden. Durch dessen Verpaarungen mit verschiedenen Mausstämmen, die die Cre-

Rekombinase gewebsspezifisch exprimieren können verschiedene Mauslinien etabliert werden, bei denen die MT1-MMP zum Beispiel hautspezifisch deletiert ist.



**Abbildung 3.30: Strategie zum Nachweis der Deletion der Neo-Kassette nach transienter Transfektion mit pIC Cre (Cre-Rekombinase)** Nach Transfektion mit pIC Cre wird die DNA der ES-Zellen mit Xba I verdaut und mittels Southern Blot und einer internen Not I/Sal I Sonde analysiert werden. Neben der wildtyp-Bande (5,6kB) wird eine 7kB große Bande auftreten, wenn es zu keiner Deletion gekommen ist. Nach Deletion der geflochten Neo-Kassette kann nur eine 5,6 kB Bande detektiert werden. Andere Deletionen führen zum Auftreten von 13kB bzw. 14kB großen Banden.

## 4. Diskussion

Die Interaktion von Zellen mit Proteinen der extrazellulären Matrix wie Kollagen und Laminin spielt, wie in der Einleitung beschrieben, eine wichtige Rolle bei verschiedenen Prozessen, wie zum Beispiel der Wundheilung und Tumorinvasion. Spezifische Rezeptoren, die Integrine vermitteln diese Interaktion und zahlreiche Untersuchungen belegen, dass Integrine durch ihre Funktion als Adhäsionsproteine an physiologischen und pathophysiologischen Prozessen wie der Tumorinvasion und Angiogenese beteiligt sind und auch als Signalmoleküle wirken (Mizejewski, 1999). So spielt die Typ I Kollagen/ $\alpha_2\beta_1$ -Integrin vermittelte Induktion der Synthese von Matrix Metalloproteinasen (MMP) in humanen dermalen Fibroblasten eine wichtige Rolle bei der Invasion und Metastasierung von Tumoren (Kähäri und Saarialho-Kere, 1999; Overall und Lopez-Otin, 2002).

Die MMPs sind eine Gruppe von  $Zn^{2+}$ -abhängigen Endopeptidasen, die unterschiedliche Matrixproteine degradieren können. Untersuchungen des Bindegewebsstoffwechsels im dreidimensionalen Zellkultursystem von Fibroblasten in Kollagengelen ergaben, dass durch die  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin vermittelte Interaktion von Zellen mit Typ I Kollagen die Synthese von MMP-1 und MT1-MMP induziert wird. Darüber hinaus wurde eine verringerte Synthese von Kollagen Typ I beobachtet, die durch den Kontakt mit  $\alpha_1\beta_1$ -Integrin vermittelt wird. Des Weiteren verändert sich die Morphologie der Fibroblasten. Im Vergleich zu den artifiziellen Bedingungen der Monolayerkultur stellt die dreidimensionale Umgebung eines Typ I Kollagengels eine Annäherung an die *in vivo* Situation dar. Allerdings ist die Verwendung dieses Systems für viele molekulare Untersuchungen, insbesondere der von Protease-sensitiven Oberflächenrezeptoren mit Schwierigkeiten verbunden, da die Zellen enzymatisch aus der Matrix gelöst werden müssen. Darüber hinaus sind Untersuchungen zur Motilität der Zellen, wegen der Kontraktion zu einem dichten Gel schwierig.

Für diese Untersuchungen ist ein experimentelles System notwendig, in dem in Fibroblasten während der Kultivierung im Monolayer die Integrinrezeptoren aktiviert werden und so ähnliche Effekte wie im Kollagengel induziert werden können.

Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Mauch (Dermatologische Klinik, Universität zu Köln) haben gezeigt, dass die Regulation bezüglich der MMP- und Kollagen-Synthese auch durch die Schlangengift-Metalloproteinase (SVMP) Jararhagin, einem Kollagenimitierenden Liganden des  $\alpha_2\beta_1$ -Integrinrezeptor, induziert werden kann

(Zigrino et al., 2002; Zigrino, 2000). Jararhagin zählt zu den PIII Klasse SVMPs, die aus einer Metalloproteinase-, einer Disintegrinartigen- und einer Cysteinreichen Domäne bestehen (Paine et al., 1992; Bjarnason and Fox, 1994). Die pathophysiologische Wirkungsweise des Jararhagins besteht in der Inhibition der  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin vermittelten Aggregation der Blutplättchen durch Bindung an diesen Kollagenrezeptor (Kamiguti et al., 1996; Hati et al., 1999). Diese Bindung an  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin scheint auch in Hautfibroblasten ähnliche Effekte wie die Kollagenbindung an diesen Rezeptor zu induzieren. Mittels Jararhagin könnten somit Fibroblasten im Monolayer genauer bezüglich der Integrin-vermittelten MMP- und Kollagen-Synthese und Änderungen der Morphologie untersucht werden. Da Jararhagin aber nur als isolierte und nicht als rekombinante Form enzymatisch aktiv ist, sollten in dieser Arbeit Alternativen innerhalb der Gruppe der SVMPs gefunden werden. Des Weiteren sollten die Mechanismen, die der Integrinaktivierung durch SVMPs zugrunde liegen genauer untersucht werden.

Verschiedene funktionale rekombinante Bereiche von SVMPs, von denen gezeigt wurde, dass sie mit  $\alpha_2\beta_1$ -Integrinrezeptoren interagieren, wurden genutzt, um die  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin vermittelte MMP-Expression und andere durch Jararhagin induzierbare Effekte zu untersuchen. Zwei Fragmente verschiedener SVMPs, die große Homologien zu Jararhagin wurden eingesetzt: die Metalloproteinase-Domäne aus Atrolysin und ein Fragment bestehend aus der Disintegrinartigen- und Cysteinreiche-Domäne von Catrocollastatin (Shimokawa et al., 1997; Bjarnason and Fox, 1987). Diese Domänen können rekombinant hergestellt werden und sind daher im Gegensatz zu Jararhagin in größeren Mengen verfügbar. Desweiteren wurden zyklische Peptide verwendet, die zu verschiedenen Integrinbindungssequenzen in Jararhagin und anderen SVMPs korrespondieren (Ivaska et al., 1999, Pentikäinen et al., 1999;). Die RKKH-Sequenz ist in der Metalloproteinase-Domäne Jararhagins enthalten und blockiert die Wechselwirkung von Kollagen mit rekombinanten  $\alpha_2$ -Domänen durch Bindung an diese (Ivaska et al., 1999; Pentikäinen et al., 1999). Da in der Metalloproteinase Domäne aus Atrolysin, keine RKKH Sequenz enthalten ist, wurde diese als Peptid eingesetzt. Von der gut untersuchten ECD-Sequenz in der Disintegrinartigen-Domäne ist gezeigt worden, dass sie an den  $\alpha_2\beta_1$ -Integrinrezeptor bindet und die Aggregation von Thrombozyten inhibiert (Kamiguti et al., 1998; Jia et al., 1997).

Ivaska et al., 1999 konnten für das von ihnen verwendete ECD-Peptid keine Interaktion mit rekombinanten  $\alpha_2$ -Domänen nachweisen. Möglicherweise war das auf

Konformationsunterschieden zu anderen ECD-Peptiden zurückzuführen, von denen gezeigt wurde, dass sie mit der Thrombozyten Aggregation interferieren (Jia et al., 1997). Auch in dieser Arbeit konnten keine Interaktion der Fibroblasten mit einem ECD enthaltendem Peptid, das nach Ivaska et al., 1999 synthetisiert wurde, beobachtet werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu konnte durch das ECD-Peptid, das von Jia et al. (1997) beschrieben wurde, zelluläre Effekte ausgelöst werden.

In Adhäsionsversuchen konnte eine Bindung von humanen dermalen Fibroblasten an die Disintegrinartigen-Domäne und die Peptide ECD und RKKH nachgewiesen werden. Möglicherweise wird die Bindung der Disintegrinartigen Domäne über die Interaktion zwischen deren ECD Sequenz und  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin vermittelt. Aber auch andere Bereiche der Disintegrinartigen und der Cysteinreichen Domäne, die in dem verwendeten Fragment vorhanden sind, könnten mit Zelloberflächenmolekülen interagieren. Für die Cysteinreiche Domäne von Atrolysin wurde eine Kompetition der Kollagenbindung von MG-63 Zellen nachgewiesen und Peptide aus dieser Domäne können die Adhäsion von Zellen vermitteln (Jia et al., 2000; persönliche Mitteilung J.Fox, University of Virginia, Charlottesville, USA).

Fibroblasten adhären unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht an die Metalloproteinase-Domäne. Mit Hilfe von FACS-Analysen konnte jedoch eine Interaktion der Fibroblasten mit dieser Domäne gezeigt werden. Diese Diskrepanz könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Bindungsstellen der immobilisierten Metalloproteinase-Domäne verdeckt und so nicht für die Adhäsion der Fibroblasten verfügbar sind. Eventuell ist die Adhäsion der Fibroblasten an die Metalloproteinase-Domäne zu schwach, um im Adhäsionsassay detektiert werden zu können. Dies könnte damit zusammenhängen, dass die Zellen zwar an diese Domäne binden, aber kein „Spreading“ der Zellen erfolgt, wie dies für die Adhäsion an andere Schlangengift-Bestandteile beschrieben wurde. So konnte beispielsweise für Rhodocetin, einem Disintegrin aus dem Gift der malayischen Viper *Calloselasma rhodostoma*, gezeigt werden, dass dieses Protein *in vitro* an rekombinante  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin-Ektodomänen bindet und die Adhäsion von Fibrosarkom-Zellen an  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin inhibiert (Eble et al., 2001). Gleichzeitig konnten die Autoren zeigen, dass die Adhäsion dieser Zellen an immobilisiertes Rhodocetin schwach ist und dass die Zellen sich auf diesem Substrat nicht ausbreiten und keine Zellfortsätze ausbilden (Eble et al., 2002; persönliche Mitteilung Dr. J.Eble, Institut für physiologische Chemie, Universität Münster). Da

Rhodocetin nicht in der Lage ist, das „Clustering“ des  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin in Fokalkontakten zu induzieren, nimmt der Autor an, dass dadurch die Adhäsion der Zellen an Rhodocetin nicht stark ist. Dies könnte auch für die Adhäsion von Fibroblasten an die Metalloproteinase Domäne zutreffen. Diese Domäne würde sich dann von der Disintegrinartigen Domäne in der Fähigkeit unterscheiden Fokalkontakte zu induzieren. Auf der anderen Seite unterscheidet sich die Adhäsion an die Metalloproteinase-Domäne Jararhagins von der von Atrolysin, da die Metalloproteinase-Domäne des Jararhagin-Moleküls die adhäsive RKKH-Sequenz enthält, die in den Adhäsionsversuchen dieser Studie ein Substrat für Hautfibroblasten darstellt. Diese Sequenz könnte für die Stabilisierung der SVMP/Integrin Interaktion notwendig sein. So diskutieren Pentikäinen et al. (1999) mehrere Möglichkeiten der Interaktion zwischen dem RKKH-Peptid und dem  $\alpha_2\beta_1$ -Integrinmolekül, welche die Bindungseigenschaften der sogenannten MIDAS Region innerhalb der  $\alpha_2$ I-Domäne beeinflussen könnten. Durch die Bindung des RKKH-Peptides könnte zum Beispiel eine Konformationsänderung induziert werden, die der durch  $Mg^{2+}$ -Bindung ähnlich ist und die den Integrinrezeptor in die aktive Form überführt (vgl. Lee et al, 1995; Plow et al., 2000).

Bindungsstudien mit rekombinanten, löslichen Ektodomänen von  $\alpha_1\beta_1$ - und  $\alpha_2\beta_1$ -Integrinen zeigten Wechselwirkungen Jararhagins mit beiden Integrinproteinen. Die Untersuchungen zeigten, dass neben der bereits von Zigrino et al. (2002) beschriebenen Bindung von Jararhagin an  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin diese Protease auch mit  $\alpha_1\beta_1$ -Integrin interagieren kann. Dabei war die Bindung an  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin schwächer als die von Zigrino et al., (2002) beschriebene. Möglicherweise ist dies auf die Verwendung verschiedener Kationen-haltigen Lösungen zurückzuführen, die in den unterschiedlichen Arbeiten verwendet wurden. Zigrino et al. (2002) testeten die Bindung in Gegenwart von  $Mg^{2+}$ -Ionen. In dieser Arbeit wurden  $Ca^{2+}$ - und  $Mg^{2+}$ -Ionen-haltige Lösungen eingesetzt. Auch unterschiede in der Präparation des löslichen Integrins könnten für die Variationen verantwortlich sein (persönliche Mitteilung Dr. J. Eble, Institut für physiologische Chemie, Universität Münster). Auch die Disintegrinartige- und die Metalloproteinase-Domäne zeigten in diesen Bindungsstudien eine Interaktion mit  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin. Da die Bindung in diesem Versuch insgesamt sehr gering war, sind auch keine vergleichenden Aussagen zur Bindung in Gegenwart von EDTA möglich.

$\alpha_1\beta_1$ Integrin zeigte eine deutliche Bindung an Jararhagin und die beiden Domänen. Diese Bindungen waren unabhängig von  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mn}^{2+}$ - Kationen und konnten nicht durch EDTA inhibiert werden. Im Gegensatz dazu ist die Integrin/Kollagen-Interaktion abhängig von divalenten Kationen, wie dies auch in früheren Arbeiten beschrieben wurde (Emsley et al., 2000).

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass SVMPs zwar wie Kollagen Typ I an die 11kDa große I-Domäne der  $\alpha$ -Untereinheit binden, aber an räumlich voneinander getrennten Bindungsstellen, die sich in ihre Kationenabhängigkeit voneinander unterscheiden. Auch für MMP-1 ist eine Kationen-unabhängige Bindung an die I-Domäne beschrieben worden (Stricker et al., 2001). Möglicherweise binden auch SVMPs an diese Bindungsstellen im Bereich der I-Domäne.

Dagegen nehmen aber Smith et al., (2000) an, dass es zu Kationen-unabhängiger Kollagenbindung durch die  $\alpha_2$ I-Domäne kommen kann. Somit könnten SVMPs über diesen Mechanismus wie Kollagen binden und so dessen Bindung imitieren.

Die Interaktion Jararhagins und den funktionalen SVMP-Domänen mit beiden Typ I Kollagenrezeptoren standen im Gegensatz zu anderen Studien, die gezeigt haben, dass Jararhagin exklusiv an den  $\alpha_2\beta_1$ -Integrinrezeptor bindet (Moura-da-Silva et al., 2001). Möglicherweise spielt auch hier eine Rolle, dass diese Ergebnisse auf Adhäsionsversuchen beruhen. Wie in unseren Adhäsionsversuchen wurde die Adhäsion verschiedener Zellen an auf Plastik immobilisiertes Substrat, hier Jararhagin, bestimmt. Eventuell ist nur die Adhäsion von  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin exprimierenden Zellen stark genug, um in den Versuchen von Moura-da-Silva et al. (2001) detektiert zu werden. Aber es kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere untersuchte Integrine an Jararhagin binden, wenn auch weniger stark. Unklar ist, welche Regionen der Integrin-Untereinheiten mit den SVMP-Domänen interagieren können. Möglicherweise können Bereiche der SVMPs, die an die  $\alpha_2$ -Untereinheit bzw. deren I-Domäne binden, auch an die I-Domäne der  $\alpha_2$ -Untereinheit binden. Crystal-Strukturanalysen haben gezeigt, dass die I-Domänen von  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$ , verglichen mit den I-Domänen anderer  $\alpha$  Untereinheiten eine zusätzliche helikale Struktur an der Oberfläche der I-Domäne aufweisen (Pentikäinen et al., 1999).

Eventuell ist auch die  $\alpha$ -Untereinheit bei der Bindung Jararhagins und der SVMP-Domänen involviert. Wie einleitend beschrieben, nimmt man an, dass auch die  $\alpha_1$ -Untereinheit eine I-Domäne I enthält (Loftus and Liddington, 1997; Xiong et al., 2001). Analysen der Bindung des RKKH- und des ECD-Peptides haben demonstriert, dass sie

mit der  $\alpha_2$ -Untereinheit bzw. deren I- Domäne interagieren können (Jia et al., 1997; Kamiguti et al., 1998; Ivaska et al., 1999; Pentikäinen et al., 1999). Somit ist es denkbar, dass SVMPs mittels dieser Sequenzen auch an die I-Domäne der  $\alpha_1$ -Integrin Untereinheit binden. Für diese Hypothese sprechen auch Ergebnisse von Zigrino et al., 2002, die gezeigt haben, dass die Adhäsion von Hautfibroblasten an Jararhagin durch integrinblockierende Antikörper inhibiert werden kann. Die  $\alpha$ -Integrin blockierenden Antikörper binden an die I-Domänen der  $\alpha_2$ -Untereinheiten. Dabei hatten Kombinationen aus  $\alpha_2$ - und  $\alpha_1$ -Integrin blockierenden Antikörpern eine stärkere inhibitorische Wirkung als der  $\alpha_2$ -Integrin blockierende Antikörper alleine. Auch der  $\alpha_1$ -blockierende Antikörper alleine konnte die Adhäsion inhibieren. Somit ist es wahrscheinlich, dass die  $\alpha_1$ -Untereinheit der Fibroblasten direkt oder indirekt an der Adhäsion an Jararhagin beteiligt ist. Möglicherweise sind zusätzlich andere Regionen und Sequenzen für die Bindung an Integrine verantwortlich, wie die bereits erwähnte Cysteinreiche Domäne.

Auch für die Metalloproteinase-Domäne wurden Interaktionen mit beiden rekombinanten, löslichen Integrinen beobachtet. Da die Metalloproteinase-Domäne des Atrolysin nicht die für Jararhagin beschriebene RKKH-Sequenz enthält, ist davon auszugehen, dass andere Regionen bei der Bindung an Integrine involviert sind. Die Homologien innerhalb der Metalloproteinase-Domäne verschiedener SVMPs sind gering, daher scheint es keine konservierte Integrin Bindungssequenz in dieser Domäne zu geben. Wie oben diskutiert dient die RKKH-Sequenz in Jararhagin möglicherweise zur Stabilisierung der Adhäsion oder erleichtert die Ligandenbindung des Integrins

Unter den Domänen und Peptiden, für die eine Interaktion mit Fibroblasten gezeigt wurde, wiesen die Disintegrinartige-, die Metalloproteinase-Domäne und das ECD-Peptid einen Einfluss auf die Kontraktion von Kollagengelen auf, die durch den Typ I Kollagenrezeptor  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin vermittelt wird (Klein et al., 1991; Seltzer et al., 1994; Langholz et al., 1995). Diese reduzierte Gelkontraktion weist darauf hin, dass die Domänen an den  $\alpha_2\beta_1$ -Integrinrezeptor binden und die Interaktion mit Typ I Kollagen kompetitieren. Dabei konnten quantitative Unterschiede in der Inhibition der Kollagengel-Kontraktion beobachtet werden. Während die Disintegrinartigen-Domäne und das ECD-Peptides die Kontraktion verzögern, die Gele nach 48 Stunden jedoch vergleichbar mit den Kontrollen kontrahiert sind, zeigte die Metalloproteinase-Domäne dagegen eine signifikante Inhibition der Gelkontraktion auch nach 48 Stunden.

Langholz et al. (1995) konnten durch neutralisierende Antikörper gegen  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin auch die Gelkontraktion inhibieren. Die Autoren nehmen an, dass nach einiger Zeit die Inhibition abnimmt, da es zu endozytotischen Vorgängen kommt, bei denen der Integrinrezeptor und die gebundenen Antikörper internalisiert werden. Andere Integrin-Liganden dagegen, wie das Disintegrin Rhodocetin können eine langfristige Inhibition der Gelkontraktion induzieren (Eble et al., 2002). Der Autor erklärt diese langanhaltende Inhibition mit der geringen Größe Rhodocetins von 31kDa, wodurch es auch zu späteren Zeitpunkten in die dichte Kollagenmatrix des Gels eindringen kann. Die von uns verwendeten Domänen sind 30kDa (Disintegrinartige Domäne) und 21kDa (Metalloproteinase Domäne) groß. Die Größenunterschiede untereinander und zu dem Disintegrin Rhodocetin sind gering, weshalb die Unterschiede in der Inhibition nicht durch die Größen der zugegebenen Proteine erklärt werden könnten. Auch die kleinste untersuchte Region der SVMP, das ECD-Peptid verzögerte die Gelkontraktion nicht dauerhaft. Somit ist es unwahrscheinlich, dass die Unterschiede bezüglich der Inhibition der Gelkontraktion auf die Größe der Inhibitoren zurückzuführen ist. Möglicherweise werden die Integrinliganden, die die Interaktion mit Kollagen blockieren durch Endozytose der Integrine internalisiert und können folglich die Gelkontraktion nur verzögern. Der langanhaltende Einfluss der Metalloproteinase-Domäne auf die Gelkontraktion könnte demzufolge nicht durch die Bindung an Integrine und der daraus resultierenden Inhibition der Kollagenbindung erklärt werden. Wie sie diese Wirkung ausübt ist unklar. Im Falle einer Proteolyse von Integrinmolekülen könnte dies jedoch zu einer dauerhaften Reduktion der integrin-Kollagen Wechselwirkungen führen.

Das RKKH-Peptid hat keine Auswirkung auf die Gelkontraktion, kann somit in Fibroblasten nicht die  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin-Kollagen Interaktion inhibieren. Daher scheint die Bindung dieses Peptides an die  $\alpha_2$ -Domäne in Fibroblasten die Interaktion mit Kollagen nicht zu hemmen, wie für rekombinante  $\alpha_2$ -Domänen gezeigt wurde (Pentikäinen et al., 1999).

Die Konkurrenz der Metalloproteinase- und Disintegrinartigen-Domäne mit der Kollagen-Integrin-Interaktion wurde darüber hinaus in Adhäsionsversuche mit Fibroblasten an immobilisiertem Typ I Kollagen überprüft. Dabei reduzierten beide Domänen die Adhäsion von Fibroblasten an Typ I Kollagen. Die Inhibition der Adhäsion durch die Disintegrinartige-Domäne kann durch Konkurrenz um den Integrinrezeptor erklären.

Die Metalloproteinase-Domäne dagegen benötigt zur Inhibition der Adhäsion ihre proteolytische Aktivität. Dies weist darauf hin, dass nicht die Bindung an den Integrinrezeptor inhibierend auf die Adhäsion an Kollagen wirkt, sondern eventuell die Proteolyse von Matrixbestandteilen oder Zelloberflächenmolekülen diese Interaktion beeinflusst wird. Unsere Versuche und auch andere Studien konnten zeigen, dass diese Domäne und Atrolysin selbst Typ I Kollagen nicht degradieren (Baramova et al., 1989). Daher ist die Degradation von Kollagen nicht für die Inhibition verantwortlich sein. In weiterführenden Untersuchungen muss geprüft werden, ob die Metalloproteinase-Domäne direkt Zelloberflächenmolekülen modifiziert und so die Integrin-Kollagen Interaktion inhibiert. Für Jararhagin ist gezeigt worden, dass es die  $\alpha_1$ -Integrin Untereinheit in Blutplättchen degradieren kann (Kamiguti et al., 1996b, Kamiguti et al., 1997b). In dermalen Fibroblasten konnte diese Degradation durch Jararhagin nicht nachgewiesen werden (Zigrino et al., 2002). Möglicherweise hat aber die verwendete Metalloproteinase Domäne aus Atrolysin einen degradierenden Effekt auf die  $\alpha_1$ -Untereinheit oder auf andere Zelloberflächenmoleküle, die an der Kollageninteraktion beteiligt sind. Dies müsste in weiteren Experimenten überprüft werden.

Die verschiedenen Domänen der SVMPs können die Expression und Aktivierung verschiedener Matrix Metalloproteinasen beeinflussen. Wie bereits am Beispiel Jararhagins gezeigt, induzieren die Disintegrinartige und die Metalloproteinase-Domäne die Expression von MMP-1 und MT1-MMP in Fibroblasten im Monolayer. Darüber hinaus kommt es zu einer Aktivierung der proMMP-1 und durch MT1-MMP vermittelt der proMMP-2.

Möglicherweise wird der induzierende Effekt der Disintegrinartigen Domäne über die Bindung der ECD-Sequenz an das  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin vermittelt, da auch dieses Peptid die MMP-Expression und Aktivierung induziert. Andere Studien unterstützen diese Beobachtung. Eble et al., 2002 haben für das RGD-unabhängige (ECD-enthaltende) Disintegrin Rhodocetin gezeigt, dass es die MMP-1 Synthese induzieren kann.

Das RKKH-Peptid, die  $\alpha_2\beta_1$ -Integrinbindungssequenz innerhalb der Metalloproteinase-Domäne von Jararhagin, zeigte dagegen keinen Einfluss auf die MMP-Expression im Monolayer. Wie in Typ I Kollagengelen gezeigt wurde, kann dieses Peptid mit der Kollagenbindung nicht interferieren. Somit scheint es keinen kollagenimitierenden Effekt bezüglich der MMP-Expression zu haben.

Die Induktion der MMP-Synthese durch die Metalloproteinase Domäne ist wahrscheinlich nicht allein durch die Bindung dieser Domäne an den  $\alpha_2\beta_1$ -Integrinrezeptor zu erklären, da die Inaktivierung der proteolytischen Aktivität der Metalloproteinase-Domäne zum Verlust der induzierenden Fähigkeit führt. Wie bereits oben geschildert, könnte diese Domäne zum einen die umgebende Matrix und deren signalinduzierende Wirkung auf die Zellen verändern. Diese Annahme wird durch die Fähigkeit der Metalloproteinase-Domäne Matrixbestandteile zu degradieren unterstützt. So spaltet diese Domäne Fibronectin, wie es auch für Atrolysin beschrieben wurde (Baramowa et al., 1989). Es kann derzeit nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Inaktivierung der Metalloproteinase-Domäne mittels 1,10-Phenanthrolin Konformationsänderungen auftreten, welche die Bindung der Metalloproteinase Domäne an Zelloberflächenproteine verhindern.

Auf der anderen Seite könnte die Metalloproteinase-Domäne durch Proteolyse von Zelloberflächenrezeptoren die Signaltransduktion beeinflussen. Wie oben beschrieben degradiert Jararhagin den  $\beta_1$ -Rezeptor in Blutplättchen (Kamiguti et al., 1996b). Möglicherweise bewirkt diese Spaltung der Rezeptor-Untereinheit eine Konformationsänderung des  $\alpha_2\beta_1$ -Integrinrezeptors, die zur Modulation intrazellulärer Signalwege und so zur Induktion der MMP-Synthese führt. Neben  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin sind auch andere Rezeptoren in die Induktion der MMP-Synthese involviert. Dazu gehören vier andere Integrine, die auch  $\beta_1$ -Untereinheiten besitzen (Lehtinen und Heino, 1996) und somit eventuell modifiziert werden könnten. Vor kurzen konnte eine weitere Integrinuntereinheit,  $\alpha_{11}$  charakterisiert werden, die in mesenchymalen Gewebe exprimiert wird (Tiger et al., 2001; Velling et al., 1999). Diese Integrin  $\alpha$ -Kette bildet mit der  $\alpha_1$ -Untereinheit ein Heterodimer, welches an Kollagen Typ I bindet. Es ist gezeigt worden, dass dieser die Kontraktion von Kollagengelen in ähnlicher Weise wie  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin vermittelt (Tiger et al., 2001). Wie oben erwähnt haben Versuche an  $\alpha_2$ -Integrin defizienten Mausfibroblasten gezeigt, dass diese Zellen weiterhin an Typ I Kollagen adhären (K.Strick, 2003). Man nimmt an, dass in diesen Fibroblasten die  $\alpha_{11}$ -Integrin-Untereinheit Funktionen von  $\alpha_2$ -Integrin übernimmt.

Neben den Integrinen sind zwei weitere Typ I Kollagenrezeptoren bekannt, DDR1 und DDR2 (discoidin domain receptor, Vogel et al, 1997). Die Autoren konnten zeigen, dass die Aktivierung von DDR2 zur Induktion der MMP-1 Synthese führt. Beide DDR-Rezeptoren werden von dermalen Fibroblasten exprimiert (Chin et al., 2001). Man

nimmt an, dass DDR2 Teil der durch Kollagen-Integrin-Wechselwirkungen induzierten Transduktionskette ist (Vogel et al., 1997; Langholz et al., 1995). Wie bereits erwähnt kann das Disintegrin Rhodocetin die MMP-1 Synthese in Fibrosarkom-Zellen induzieren (Eble et al., 2002). Da diese Zellen DDR2 nicht exprimieren, induziert zumindest dieses Disintegrin die MMP-Synthese unabhängig von DDR2. Es bleibt zu klären, ob die Disintegrinartige-Domäne aus Catrocollastatin über diesen Rezeptor induzierend auf Fibroblasten wirkt.

Neben Kollagenrezeptoren könnten auch andere Zelloberflächenmoleküle durch SVMPs modifiziert werden. Wie einleitend beschrieben sind Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 bekannte Induktoren der MMP-Synthese (Benbow and Brinckerhoff, 1997). Es ist gezeigt worden, dass Jararhagin diese Zytokine von der Zellmembran freisetzt (Moura da Silva et al., 1996; Clissa et al., 2001). Somit könnte eine vermehrte Freisetzung dieser Zytokine an eine Induktion der MMP-Synthese durch Jararhagin erklären. In unserem System mit humanen dermalen Fibroblasten konnten aber durch ELISAs keine erhöhten Mengen an aktiven TNF- $\alpha$  detektiert werden (Ergebnisse nicht gezeigt), so dass wir diesen Mechanismus für wenig wahrscheinlich halten.

Für die beiden Typ I Kollagenrezeptoren  $\alpha_1\beta_1$ - und  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin ist gezeigt worden, dass der  $\alpha_2\beta_1$ -Rezeptor die Induktion der MMP-Synthese vermittelt, während über das  $\alpha_1\beta_1$ -Integrin die Kollagen induzierte verminderte Kollagensynthese reguliert wird. (Langholz et al., 1995; Riiikonen et al., 1995). Welche Rolle die beiden Rezeptoren  $\alpha_1\beta_1$ - und  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin für die SVMP induzierte MMP-Expression spielen, zeigen Versuche mit  $\alpha_2$ -defizienten Mausfibroblasten.

$\alpha_2$ -/- Fibroblasten zeigen im Vergleich zu Wildtyp Fibroblaste eine verringerte Adhäsion an die Disintegrinartige Domäne und die Peptide ECD und RKKH. Diese Ergebnisse legen, dass  $\alpha_2$ -Untereinheit in die Adhäsion der Fibroblasten an diese Substrate involviert ist. Im Gegensatz dazu ist die Adhäsion  $\alpha_2$ -defizienter Mausfibroblasten an Typ I Kollagen mit der von Wildtyp-Fibroblasten vergleichbar (Strick, 2003). Diese Daten legen nahe, dass die Adhäsion von Fibroblasten an SVMP-Domänen und Kollagen nicht ausschließlich durch die gleichen Rezeptoren vermittelt.

Wie in humanen Hautfibroblasten wurde in Wildtyp Mausfibroblasten durch Jararhagin eine vermehrte Aktivierung der proMMP-2 induziert, während die Disintegrinartige-Domäne keinen Effekt zeigte. Dagegen konnte die Wirkung der Metalloproteinase-Domäne in Mausfibroblasten die MT1-MMP vermittelte proMMP-2-Aktivierung

induzieren. Auch in den  $\alpha_2$ -defizienten Fibroblasten konnte Jararhagin und die Metalloproteinase Domäne diese Aktivierung vermitteln. Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass der  $\alpha_2\beta_1$ -Integrinrezeptor und die Bindung der Metalloproteinase-Domäne bzw. Jararhagins als vollständige SVMP an diesen Rezeptor für die proMMP-2 Aktivierung durch Jararhagin und die Metalloproteinase Domäne nicht notwendig sind. Gleichzeitig konnte mit Hilfe  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Integrin blockierende Antikörper Unterschiede in der Modulation der MMP-1 Synthese gezeigt werden. Diese Antikörper binden an die I-Domäne der  $\alpha$ -Untereinheiten. Zigrino et al. (2002) konnten zeigen, dass Antikörper gegen die  $\alpha_2$ -Integrin Untereinheit die Adhäsion von Hautfibroblasten an Jararhagin verringern können.

In humanen dermalen Fibroblasten konnten diese Antikörper die Induktion der MMP-1 und die MT1-MMP vermittelte Aktivierung der MMP-2 durch den Einfluss der Disintegrinartigen Domäne deutlich reduzieren während der  $\alpha_1$ -Integrin blockierende Antikörper keinen Einfluß hatte. Die fehlende Bindung  $\alpha_2$ -defizienter Fibroblasten an diese Domäne und die blockierende Wirkung der anti  $\alpha_2$ -Antikörper legen nahe, dass die Disintegrinartige Domäne ihre regulative Wirkung über den  $\alpha_2$ -Integrinrezeptor vermittelt.

Bezüglich der Wirkung der Metalloproteinase Domäne auf die Induktion und Aktivierung der MMPs hatten beide Integrin blockierenden Antikörper keinen hemmenden Effekt. Diese Daten legen nahe, dass die Metalloproteinase Domäne unabhängig von den I-Domänen der beiden Integrin-Untereinheiten eine induzierende Wirkung ausübt.

Wie einleitend beschrieben, kommt es in Typ I Kollagengelen durch die Kollagen/Integrin-Wechselwirkungen zur Induktion und Aktivierung von MMPs. Diese werden durch  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin vermittelt (Langholz et al., 1995, Zigrino et al., 2001). Entsprechend der Wirkung Jararhagins haben auch die einzelnen Domänen und das ECD-Peptid keinen Einfluss auf die MMP-Expression in Kollagengelen, da in diesem System durch die dichte Matrix an Kollagen Typ I die MMP-Synthese maximal induziert wird. Auch das RKKH Peptid kann die MMP-Regulation im Kollagengel nicht beeinflussen. Möglicherweise ist seine Bindung innerhalb der I-Domäne nahe der MIDAS-Region nicht ausreichend um die Kollagen-Integrin Interaktionen vollständig zu inhibieren. Weder die oben beschriebene Kontraktion der Kollagengele wird durch das RKKH-Peptid inhibiert, noch wird die  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin vermittelte MMP-Expression induziert.

Ivaska et al. (1999) und P.Zigrino (2000) nahmen an, dass Peptide, die Bindung an den  $\alpha_2\beta_1$ -Integrinrezeptor zeigen, diesen inaktivieren können. Mittels dieser Peptide könnten zelluläre Effekte die über diesen Rezeptor vermittelt werden inhibiert werden. Für das in der Einleitung beschriebene RGD-Peptid, das eine Integrinbindende Sequenz darstellt sind solche Mechanismen beschrieben worden. RGD-Peptide können die Induktion von MMPs induzieren (Teti et al., 1998; Werb et al., 1989). Pseudopeptide die eine modifizierte Aminosäuresequenz enthalten wirken inhibierend auf die MMP-Synthese und auch auf die Metastasierung verschiedener Tumorzellen (Tsuchiya et al., 2002; Fujii et al., 1998). Auch andere Peptide können Matrix Interaktion inhibieren (Roock et al., 1998). Die hier getesteten Peptide konnten die  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin vermittelte MMP-Synthese in Kollagengelen nicht beeinflussen. Im Gegenteil, das ECD-Petid kann diese induzieren. Möglicherweise könnte aber ein ECD-Pseudopeptid ähnlich inhibierend wie RGD-Pseudopeptide wirken.

Neben der Induktion der MMP-Expression und Aktivierung wurden in Fibroblasten im Kollagengel weitere Veränderungen beobachtet. Die Zellmorphologie ändert sich, die Zellen werden motil und die Kollagensynthese wird reduziert (Übersicht: Grinnel 1994; Mauch et al., 1988; Mauch et al., 1992). Durch Jararhagin können ähnliche Effekte im Monolayer ausgelöst werden (Zigrino et al., 2002; P.Zigrino, 2000).

Die beiden funktionalen Domänen unterscheiden sich in ihrer regulativen Fähigkeit bezüglich dieser Veränderungen. Die Kollagensynthese wird durch die Bindung der Disintegrinartigen-Domäne an den Integrinrezeptor nicht reduziert. Dagegen verringert die Metalloproteinase-Domäne die Kollagensynthese in Fibroblasten im Monolayer in ähnlicher Weise wie es für Jararhagin beschrieben wurde. Wie Jararhagin und die Metalloproteinase-Domäne die Kollagensynthese beeinflussen, ist derzeit unklar. In früheren Arbeiten wurde beschrieben, dass im Kollagengel die Reduktion der Kollagensynthese über den  $\alpha_1\beta_1$ -Integrinrezeptor vermittelt wird (Langholz et al., 1995). Dagegen konnten andere Studien auch für  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin zeigen, dass über diesen die Kollagensynthese beeinflusst werden kann (Riikonen et al., 1995; Ivaska et al., 1999b). Von Jararhagin konnte bisher ausschließlich eine Bindung an  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin nachgewiesen werden (Moura da Silva et al., 2001). In dieser Arbeit aber wurde, wie oben diskutiert, gezeigt, dass auch der  $\alpha_1\beta_1$ -Integrin Rezeptor mit Jararhagin und den beiden funktionalen SVMP-Domänen interagieren kann. Basierend auf diesen

Ergebnissen ist es daher denkbar, dass auch die SVMPs die Reduktion der Kollagensynthese über den  $\alpha_1\beta_1$ -Integrinrezeptor vermitteln.

Neben dem Bindegewebsstoffwechsel zeigte auch die Zellmorphologie eine deutliche Veränderung, wenn die Fibroblasten mit der Metalloproteinase-Domäne behandelt wurde. Interessanterweise konnte unter dem Einfluss der Disintegrinartigen-Domäne keine Änderung der Zellform beobachtet werden. Fibroblasten erscheinen durch die Inkubation mit der Metalloproteinase Domäne wie mit Jararhagin bipolar. Nach Inaktivierung der proteolytischen Aktivität dagegen konnte die Metalloproteinase Domäne die Zellmorphologie nicht mehr beeinflussen. Es stellt sich daher die Frage, ob die bereits diskutierte mögliche Degradation von Zelloberflächenmolekülen, die zur Adhäsion der Fibroblasten beitragen die Zellmorphologie beeinflussen. Dadurch könnten die Zell-Matrix Kontakte reduziert und das Ausbreiten der Zellen verringert werden. Für diese Annahme spricht, dass Fibroblasten nach Inkubation mit der Metalloproteinase-Domäne weniger dicht vorliegen, einige Zellen möglicherweise die Adhäsion an den Schalenboden verloren haben.

Unklar ist derzeit, welche Bedeutung die durch die Metalloproteinase-Domäne induzierte Änderung der Zellmorphologie hat. Im Kollagengel korreliert die Änderung der Morphologie mit einer erhöhten Motilität der Fibroblasten (Grinnel, 1994). Es ist gezeigt worden, dass Integrine an der Invasion von Tumorzellen beteiligt sind (Mizejewski, 1999). Darüber hinaus könnte möglicherweise durch die erhöhte MMP-1 Synthese eine Migration von Fibroblasten ausgelöst werden, da in Keratinozyten gezeigt wurde, dass die MMP-1 die Migration benötigt wird (Pilcher et al., 1997).

Durch Migrationsversuche mit humanen dermalen Fibroblasten in Boyden-Kammern konnte jedoch gezeigt werden, dass die Migration von Fibroblasten durch die Metalloproteinase-Domäne inhibiert wird. Als Chemoattraktans wurde EGF eingesetzt, da es nicht von der Metalloproteinase-Domäne degradiert werden kann. Somit zeigen auch diese Versuche, dass diese Domäne einen direkten Einfluss auf die Fibroblasten hat. Durch Inaktivierung der Metalloproteinase Domäne mit 1,10-Phenanthrolin zeigt sich, dass dieser Effekt nicht nur abhängig von der proteolytischen Aktivität ist, da die Migration immer noch, aber in geringerem Maße inhibiert wird.

Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen konnten am Beispiel Jararhagins eine Inhibition der Migration in Tumorzelllinien nachweisen, wobei hier kein Unterschied erhalten wurde, wenn die aktive oder inaktive Form dieser SVMP verwendet wurden

(Correa et al., 2002). Auch für andere Integrin-Liganden ist gezeigt worden, dass sie mit der Migration von Zellen interferieren können. Das Disintegrin Rhodocetin kann über die Bindung an  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin die Invasion von Fibrosarkom-Zellen in eine Kollagenmatrix inhibieren (Eble et al., 2002).

Die hier dargestellten Ergebnisse legen nahe, dass verschiedene Regulations-Mechanismen in die Kollagenimitierende Wirkungsweise von Schlangengift Metalloproteinasen involviert sind. Die funktionalen Domänen von SVMPs unterscheiden sich in ihrer Wirkungsweise.

Zum einen kann durch die Bindung der Disintegrinartigen Domäne und deren beschriebenen ECD-Bindungssequenz an Fibroblasten die MMP-Synthese und Aktivierung induziert werden. Des Weiteren kann auch die zweite funktionale Domäne, die Metalloproteinase Domäne die MMP-Regulation beeinflussen. Dazu benötigt sie ihre proteolytische Aktivität, scheint also über einen anderen Mechanismus als die Disintegrinartige Domäne direkt auf die Fibroblasten zu wirken. Außerdem vermittelt sie zusätzlich andere zelluläre Effekte, wie die Änderung der Zellmorphologie und die Reduktion der Kollagensynthese, die beide nicht durch die Disintegrinartige Domäne beeinflusst werden. Somit zeigen diese Kollagenimitierenden Integrin-Liganden, dass die zellulären Veränderungen, die durch die Kollagenbindung in Fibroblasten ausgelöst werden, differentiell reguliert werden. Auch Eble et al. (2002) nehmen an, dass die Regulation der MMP-1 Synthese getrennt von anderen  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin-vermittelten zellulären Reaktionen und der Ausbildung von Fokalkontakten erfolgt.

Die Induktion zellulärer Veränderungen durch die rekombinanten SVMP-Domänen und das ECD-Peptides unter den Bedingungen der Monolayerkultur hat die Möglichkeit eröffnet Integrinvermittelte Signaltransduktionswege, morphologische Änderungen und den Metabolismus von Bindegewebe in einem vom Kollagengel unabhängigen System zu untersuchen. Dabei zeigt sich, dass Integrine durch verschiedene Mechanismen aktiviert werden können. Somit können in diesem System unterschiedliche zelluläre Effekte, die im Kollagengel verknüpft induziert werden, getrennt voneinander untersucht werden.

Neben diesem *in vitro* Modell, dass neue Aspekte der Analyse zur Regulation und Funktion von Matrix Metalloproteinasen ermöglicht, soll durch die Generierung eines

hautspezifischen MT1-MMP defizienten Mausstammes ein *in vivo* Modell etabliert werden, das die genauere Analyse der Rolle dieser Matrix Metalloproteinase während der Wundheilung und Tumorentwicklung ermöglicht. Aufbauend auf den in dieser Arbeit hergestellten Austauschvektors und stabil transfizierter embryonaler Stammzellen werden Mäuse mit gewebsspezifischer Deletion dieses Enzyms in einem fortführenden Projekt generiert werden.

## 5. Zusammenfassung

Matrix/Integrin-Interaktionen spielen eine wichtige Rolle bei verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen, wie der Embryonalentwicklung, Tumorinvasion und Wundheilung. Durch die Bindung von Kollagen Typ I an die Integrine  $\alpha_1\beta_1$  und  $\alpha_2\beta_1$  werden verschiedene zelluläre Effekte, wie die Induktion der Synthese von Matrix Metalloproteinasen (MMPs) und eine Reduktion der Kollagensynthese induziert. MMPs sind eine Familie von  $Zn^{2+}$ -abhängigen Endopeptidasen die Bestandteile der extrazellulären Matrix degradieren können. Kollagen Typ I induziert im dreidimensionalen Kollagengel die Synthese von MMP-1 und MT1-MMP die Aktivierung von MMP-1 und MMP-2 in humanen dermalen Fibroblasten. Auch im Monolayer können ähnliche Effekte durch eine kollagen-imitierende Schlangengift-Metalloproteinase (SVMP), Jararhagin ausgelöst, die an den  $\alpha_2\beta_1$ -Integrinrezeptor bindet.

In dieser Arbeit wurde der Vorgang der Integrinaktivierung mittels verschiedener Domänen von integrinbindenden SVMPs analysiert und ein Zellkultursystem etabliert in dem Kollagenimitierende Effekte im Monolayer untersucht werden können.

Zum einen wurde die Metalloproteinase-Domäne und eine darin enthaltende Integrinbindungsequenz (RKKH) genutzt, zum anderen die Disintegrinartige-Domäne und die darin enthaltende ECD-Sequenz, die an  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin binden und die Interaktion mit Kollagen Typ I inhibieren kann. Analysen der mRNA-Transkripte und Proteinmengen mittels Western Blot Analyse, Gelatine-Zymographien und Northern Blot-Analysen ergaben, dass beide Domänen die Synthese und Aktivierung von MMPs induzieren können. Dabei scheint die Disintegrinartige Domäne über die Bindung ihrer Integrinbindungssequenz ECD die MMP-Regulation zu beeinflussen. Die Wirkung der Metalloproteinase Domäne ist unabhängig von der RKKH-Sequenz und wird über die proteolytische Aktivität dieser Domäne vermittelt. Somit kann der Integrinrezeptor durch verschiedene Mechanismen aktiviert werden, um die MMP-Synthese und Aktivierung zu induzieren.

Die Metalloproteinase Domäne kann auch andere zelluläre Effekte, die durch Kollagen-Integrin-Interaktionen ausgelöst werden, induzieren, wie eine reduzierte Kollagen Typ I Synthese und eine veränderte Zellmorphologie. Die Disintegrinartige Domäne kann diese Effekte nicht auslösen. Mittels der SVMPs und verschiedener Regionen oder

Domänen aus diesen können verschiedene Effekte, die durch Kollagen induziert werden, imitiert und unabhängig von einander untersucht werden.

Darüber hinaus wurde mit der Etablierung eines *in vivo* Modells zur Untersuchung der Funktion von MMPs begonnen, indem ein Mausstamm generiert werden soll, der eine gewebsspezifische MT1-MMP Defizienz in der Haut aufweist. Dazu wurde das Cre-*loxP*-System genutzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der dazu benötigte Austauschvektor kloniert und die ersten stabilen Transfektionen von embryonalen Stammzellen mit diesem Vektor durchgeführt. In nachfolgenden Arbeiten sollen durch weitere Transfektionen embryonale Stammzellen generiert werden, die zur Etablierung transgener Mauslinien eingesetzt werden.

## 6. Summary

Interactions between integrins and the extracellular matrix (ECM) play a crucial role in several physiological and pathophysiological processes like embryonic development, tumour invasion and wound healing. The binding of integrins  $\alpha_1\beta_1$  and  $\alpha_2\beta_1$  to their ligand collagen type I induces a variety of cellular responses like reduced collagen type I synthesis and an increase in the synthesis of several matrix metalloproteinases (MMPs). MMPs are a family of  $Zn^{2+}$ -dependent endopeptidases, that are able to degrade ECM components.

Collagen type I induces the synthesis of MMP-1 and MT1-MMP and the activation of proMMP-1 and MMP-2 in fibroblasts grown in the three dimensional system of collagengels.

Similar effects can be obtained in monolayer by the effect of a snake venom metalloproteinase (SVMP), jararhagin, that can bind to  $\alpha_2\beta_1$  integrin.

In this study we analysed the activation of integrins by using distinct domains of two integrin binding SVMPs to establish a cell culture system, which can be used for investigations of collagen mimetic effects in monolayer.

We used the metalloproteinase domain and a peptide (RKKH) corresponding to a described binding site in this domain. In addition we used the disintegrinlike domain and another peptide, containing the ECD Sequence of this domain, that have been shown to bind to  $\alpha_2\beta_1$  integrin and inhibit the interaction with collagen. Analysis of mRNA-transcripts and protein levels by using western blots, gelatine zymography and northern blots could show, that both domains can induce the synthesis and activation of the investigated MMPs. The disintegrinlike domain seems to work through its integrin binding on MMP-synthesis, whereas the influence of the metalloproteinase domain seems to be independent from a putative integrin binding. This domain can act through its proteolytic activity. The results indicate that integrins can be activated by different mechanisms to mediate MMP synthesis and activation.

This finding is consistent with other results showing only the metalloproteinase domain to induce other integrin mediated cellular effects like reduced collagen type I synthesis and a change in cell morphology. The disintegrinlike domain has no effect.

Incubation of Fibroblasts grown as monolayer with SVMP-domains is a useful in vitro cell culture system to investigate different collagen mimetic effects and to analyse these effects independently from one another.

In addition we started to establish an *in vivo* model for further investigations of the role of MT1-MMP. Therefore we want to generate a conditional MT1-MMP deficient mousestrain by gene targeting using the Cre-*loxP*-System. During this study the targeting vector has been cloned and ES-cells have been successfully transfected with this vector. Further studies will continue with this project to generate a skin specific MT1-MMP deficient mouse strain.

## 7. Literaturverzeichnis

- Adelmann-Grill B.C., Wach F., Cully Z., Hein R., Krieg T. (1990) Chemotactic migration of dermal fibroblasts towards epidermal growth factor and its modulation by platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta. *European Journal of Cell Biology*, 51, 322-326
- Aimes R.T. and Quigley J.P. (1995) Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific  $\alpha$ - and  $\beta$ -length fragments. *J Biol Chem*, 270, 5872-5876
- Angel P., Baumann I., Stein B., Dellus H., Rahmsdorf H.J., Herrlich P. (1987) 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5' flanking region. *Mol Cell Biol*, 7, 2256-2266
- Apte S.S., Fukai N., Beier D.R., Olsen B.R. (1997) The matrix metalloproteinase-14 (MMP-14) gene is structurally distinct from other MMP genes and is co-expressed with the TIMP-2 gene during mouse development. *J Biol Chem*, 272, 25511-25517
- Armstrong D.G. and Jude E.B. (2002) The role of matrix metalloproteinases in wound healing. *J Am Podiatr Med Assoc*, 92, 12-18
- Aumailley M. and Gayraud B. (1998) Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J Mol Med*, 76, 253-265
- Baramova E.N., Shannon J.D., Bjarnason J.B., Fox J.W. (1989) Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. *Arch Biochem Biophys*, 275, 63-71
- Becker JW, Marcy AI, Rokosz LL, Axel MG, Burbaum JJ, Fitzgerald PM, Cameron PM, Esser CK, Hagmann WK, Hermes JD, et al. (1995) Stromelysin-1: three-dimensional structure of the inhibited catalytic domain and of the C-truncated proenzyme. *Protein Sci*, 4, 1966-76.
- Benbow U. and Brinckerhoff C.E. (1997) The AP-1 site and MMP-regulation: What is all the fuss about? *Matrix Biol*, 15, 519-526
- Bergman M.R., Cheng S., Honbo N., Piacentini L., Karliner L., Lovett D.H. (2003) A functional activating protein 1 (AP-1) site regulates matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) transcription by cardiac cells through interactions with JunB-Fra1 and JunB-FosB heterodimers. *Biochem J*, 369, 485-96.
- Birnboim HC. (1983) A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol*;100:243-55
- Bjarnason J.B. and Fox J.W. (1987) Characterization of two hemorrhagic zinc proteinases, toxin c and toxin d, from western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. *Biochim Biophys Acta*, 911, 356-63
- Bjarnason J.B. and Fox J.W. (1994) Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacol Ther*, 62, 325-372
- Bode W. (1995) A helping hand for collagenases: the hemopexin like domain. *Structure*, 2, 527-530
- Bode W., Fernandez-Catalan C., Grams F., Gomis-Rüth F.-X., Nagase H., Tschesche H., Maskos K. (1999) Insights into MMP-TIMP Interactions. *Ann N Y Acad Sci*, 878, 73-91

- Bode W., Gomis-Ruth F.X., Stockler W. (1993) Astacins, serralyins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the "metazincins". *FEBS Lett*, 331, 134-140
- Brenneisen P., Wenk J., Klotz L.O., Wlaschek M., Briviba K., Krieg T., Sies H., Scharffetter-Kochanek K. (1998) Central role of ferrous/ferric iron in the ultraviolet B irradiation-mediated signalling pathway leading to increased interstitial collagenase (matrix-degrading metalloprotease (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) mRNA levels in cultured human dermal fibroblasts. *J Biol Chem*, 273, 5279-5287
- Brenner C.A., Adler R.R., Rappolee D.A., Pedersen R.A., Werb Z. (1989) Genes for extracellular matrix-degrading metalloproteinases and their inhibitor, TIMP, are expressed during early mammalian development. *Genes Develop*, 3, 848-859
- Brooks P.C., Stromblad S., Sanders L.C., von Schalscha T.L., Aimes R.T., Stetler-Stevenson W.G., Quigley J.P., Cheresch D.A. (1996) Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by the interaction with integrin  $\alpha_v\beta_3$ . *Cell*, 85, 683-693
- Burridge K. and Chrzanowska-Wodnicka M. (1996) Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 12, 463-518
- Butler G.S., Butler M.J., Atkinson S.J., Will H., Tamura T., Schade van Westrum S., Crabbe T., Clements J., d'Ortho, Murphy G. (1998) The TIMP-2 membrane type I metalloproteinase "receptor" regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study. *J Biol Chem*, 273, 871-880
- Carlson S.G., Fawcett T.W., Bartlett J.D., Bernier M., Holbrook N.J. (1993) Regulation of the C/EBP-related gene gadd153 by glucose deprivation. *Mol Cell Biol*, 13, 4736-4744
- Chan B.M.C., Matsuura N., Takada Y., Zetter B.R., Hemler M. (1991) In vitro and in vivo consequences of VLA-2 expression on rhabdomyosarcoma cells. *Mol Cell Biol*, 13, 4736-4744
- Chin GS, Lee S, Hsu M, Liu W, Kim WJ, Levinson H, Longaker MT (2001) Discoidin domain receptors and their ligand, collagen, are temporally regulated in fetal rat fibroblasts in vitro. *Plast Reconstr Surg*, 107, 769-76.
- Chu M.L., Myers J.C., Bernard M.P., Ding J.F., Ramirez F. (1982) Cloning and characterization of five overlapping cDNAs specific for the human pro $\alpha$ 1(I) collagen chain. *Nucleic Acids Res*, 10, 5925-5934
- Clissa P.B., Laing G.D., Theakston R.G.D., Mota I., Taylor M.J., Moura-da-Silva A.M. (2001) The effect of jararhagin, a metalloproteinase from bothrops jararaca venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. *Toxicon*, 39, 1567-1573
- Collen A., Hanemaaijer R., Lupu F., Quax P.H.A., van Lent N., Grimbergen J., Peters E., Kollwijk P., van Hinsbergh V.W.M. (2003) Membrane-type matrix metalloproteinase-mediated angiogenesis in a fibrin-collagen matrix. *Blood*, 101, 1810-1817
- Collier I.E., Bruns G.A.P., Goldberg G.I., Gerhard D.S. (1991) On the structure and chromosome location of the 72- and 92-kDa human type IV collagenase genes. *Genomics*, 9, 429-434
- Corcoran M.L., Hewitt R.E., Kleiner D.E. Jr., Stetler-Stevenson W.G. (1996) MMP-2: expression, activation and inhibition. *Enzyme Protein*, 49, 7-19

- Correa M.C., Durvanei A.M., Moura-da-Silva A.M., Pizzocaro K.F., Ruiz I.R.G. (2002) Inhibition of melanoma cells tumorigenicity by the snake venom toxin jararhagin. *Toxicon*, 40, 739-748
- Cowell S., Knauper V., Stewart M.-L., d'Ortho M., Stanton H., Hembry R.M., Lopez-Otin C., Reynolds J.J., Murphy G. (1998) Induction of matrix metalloproteinase activation cascades based on membrane-type 1 matrix metalloproteinase: associated activation of gelatinase A, gelatinase B and collagenase 3. *Biochem J*, 331, 453-458
- Crabbe T, Zucker S, Cockett MI, Willenbrock F, Tickle S, O'Connell JP, Scothern JM, Murphy G, Docherty AJ. (1994) Mutation of the active site glutamic acid of human gelatinase A: effects on latency, catalysis, and the binding of tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *Biochemistry*, 33, 6684-90.
- 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 metalloproteinase 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases. *Eur J Biochem*, 250, 2446-2451
- Damsky C, Tremble P, Werb Z. (1992) Signal transduction via the fibronectin receptor: do integrins regulate matrix remodeling? *Matrix Suppl*, 184-91.
- De Luca M., Ward C.M., Ohmori K., Andrews R.K., Berndt M.C. (1995) Jararhagin and Jaracetin, novel snake inhibitors of the integrin collagen receptor,  $\alpha_2\beta_1$ . *Biochem Biophys Res Commun*, 206, 570-576
- De Melker A.A. and Sonnenberg A. (1999) Integrins: alternative splicing as a mechanism to regulate ligand binding and integrin signaling events. *Bioessays*, 21, 499-509
- De Roock I.B., Pennington M.E., Sroka T.C., Lam K.S., Bowden T.G., Bair E.L., Cress A.E. (2001) Synthetic peptides inhibit adhesion of human tumor cells to extracellular matrix proteinases. *Cancer Res*, 61, 3308-3313
- Dumin J.A., Dickeson S.K., Stricker T.P., Bhattacharyya-Pakrasi M., Roby J.D., Santoro S.A., Park W.C. (2001) Pro-collagenase-1 (matrix metalloproteinase-1) binds the  $\alpha_2\beta_1$  integrin upon release from keratinocytes migrating on type I collagen. *J Biol Chem*, 276, 29368-29374
- Eble J.A., Beermann B., Hinz H.-J., Schmidt-Hederich A. (2001)  $\alpha_2\beta_1$  integrin is not recognized by rhodocytin but is the specific, high affinity target of rhodocetin, an RGD-independent disintegrin and potent inhibitor of cell adhesion to collagen. *J Biol Chem*, 276, 12274-12284
- Eble J.A., Niland S., Dennes A., Schmidt-Hederich A., Bruckner P., Brunner G. (2002) Rhodocetin antagonizes stromal tumor invasion in vitro and other  $\alpha_2\beta_1$  integrin-mediated cell functions. *Matrix Biol*, 21, 547-558
- Eckes B., Zigrino P., Kessler D., Holtkötter O., Shephard P., Mauch C., Krieg T. (2000) Fibroblasts-matrix interactions in wound healing and fibrosis. *Matrix Biology*, 19, 325-332
- Egeblad M. and Werb Z. (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Rev Cancer*, 2, 163-175
- Elices M.J. and Hemler M.E. (1989) The human integrin VLA-2 is a collagen receptor on some cells and a collagen/laminin receptor on others. *Pro Natl Acad Sci USA*, 86, 9906-9910
- Emsley J, King SL, Bergelson JM, Liddington RC. (1997) Crystal structure of the I domain from integrin  $\alpha_2\beta_1$ . *J Biol Chem*, 272, 28512-7

- Emsley J., Knight CG, Farndale RW, Barnes MJ, Liddington RC. (2000) Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1. *Cell*, 101, 47-56
- Erb EM, Tangemann K, Bohrmann B, Muller B, Engel J. (1997) Integrin alpha11b beta3 reconstituted into lipid bilayers is nonclustered in its activated state but clusters after fibrinogen binding. *Biochemistry*, 36, 7395-402.
- Feinberg A.P. and Vogelstein B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem*, 132, 6-13
- Fujii H, Nishikawa N, Komazawa H, Suzuki M, Kojima M, Itoh I, Obata A, Ayukawa K, Azuma I, Saiki I. (1998) A new pseudo-peptide of Arg-Gly-Asp (RGD) with inhibitory effect on tumor metastasis and enzymatic degradation of extracellular matrix. *Clin Exp Metastasis*, 16, 94-104
- Fujimura Y, Kawasaki T, Titani K. (1996) Snake venom proteins modulating the interaction between von Willebrand factor and platelet glycoprotein Ib. *Thromb Haemost*, 76, 633-9
- Giancotti FG, Ruoslahti E. (1999) Integrin signaling. *Science*, 285, 1028-32
- Gibbins J, Asselin J, Farndale R, Barnes M, Law CL, Watson SP. (1996) Tyrosine phosphorylation of the Fc receptor gamma-chain in collagen-stimulated platelets. *J Biol Chem*, 271, 18095-9
- Grinnel F. (1994) Fibroblasts, myofibroblasts and wound contraction. *J Biol Chem*, 269, 401-404
- Gulberg D., Gehlsen K.R., Turner D.C., Ahlen K., Zijehna L.S., Barnes M.J., Rubin K. (1992) Analysis of  $\alpha_1\beta_1$  and  $\alpha_2\beta_1$  integrins in cell-collagen interactions: identification of conformation dependent  $\alpha_1\beta_1$  binding sites in collagen type I. *EMBO J*, 11, 3865-3873
- Gullberg D, Velling T, Sjöberg G, Sejersen T. (1995) Up-regulation of a novel integrin alpha-chain (alpha mt) on human fetal myotubes. *Dev Dyn*, 204, 57-65
- Gullberg D.E. and Lundgren-Akerlund E. (2002) Collagen-binding I domain integrins-what do they do? *Progr. Histochem. Cytochem*, 1, 3-54
- Hati R., Mitra P., Sarker S., Bhattacharyya K.K. (1999) Snake venoms hemorrhagins. *Crit Rev Toxicol*, 29, 1-19
- Heino J. (1996) Biology of tumor cell invasion: interplay of cell adhesion and matrix degradation. *Int J Cancer*, 65, 717-722
- Henriett P., Blavier L., Declerck Y.A. (1999) Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) in invasion and proliferation. *APMIS*, 107, 111-119
- Holmbeck K., Bianco P., Caterina J., Yamada S., Kromer M., Kuznetsov S.A., Mangani M., Robey P.G., Poole A.R., Pidoux I., Ward J.M., Birkedal-Hansen H. (1999) MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell*, 99, 81-92
- Holtkötter O., Nieswandt B., Smyth N., Müller W., Hafner M., Schulte V., Krieg T., Eckes B. (2002) Integrin  $\alpha_2$ -deficient mice develop normally, are fertile, but display partially defective platelet interactions with collagen. *J Biol Chem*, 277, 10789-10794
- Howard E.W., Bullen E., Bande M.J. (1991) Regulation of the autoactivation of human 72-kDa progelatinase by tissue inhibitor of metalloproteinase-2. *J Biol Chem*, 266, 13064-13069

- Huang T.F. and Niewiarowski S. (1994) The naturally-occurring antagonists of platelet fibrinogen receptor. *J Toxicol Toxin Rev*, 13, 253-273
- Hughes P.E., Diaz-Gonzalez F., Leong L., Wu C., McDonald J.A., Shattil S.J., Ginsberg M.H. (1996) Breaking the integrin hinge. A defined structural constraint regulates integrin signaling. *J Biol Chem*, 271, 6571-6574
- Huhtala P, Humphries MJ, McCarthy JB, Tremble PM, Werb Z, Damsky CH. (1995) Cooperative signaling by alpha 5 beta 1 and alpha 4 beta 1 integrins regulates metalloproteinase gene expression in fibroblasts adhering to fibronectin. *J Cell Biol*, 129, 867-79
- Humphries M.J. (2000) Integrin structure. *Biochem Soc Trans*, 28, 311-339
- Huttenlocher A, Werb Z, Tremble P, Huhtala P, Rosenberg L, Damsky CH. (1996) Decorin regulates collagenase gene expression in fibroblasts adhering to vitronectin. *Matrix Biol*, 15, 239-50
- Hynes R.O. (1992) Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69, 11-25
- Hynes R.O (1999) Cell adhesion: old and new questions. *Trends Cell Biol*, 9, 33-37
- Hynes R.O. (2002) Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110, 673-687
- Itoh T., Ikeda T., Gomi H., Nakao S., Suzuki T., Itohara S. (1997) Unaltered secretion of beta-amyloid precursor protein in gelatinase A (matrix metalloproteinase 2)-deficient mice. *J Biol Chem*, 272, 22389-22392
- Ivaska J., K pyla J., Pentikäinen O., Hoffren A.M., Hermonen J., Huttunen P., Johnson M.S., Heino J. (1999a) A peptide inhibiting the collagen binding function of integrin  $\alpha_2$  domain. *J Biol Chem*, 274, 3513- 3521
- Ivaska J., Reunanen H., Westermarck J., Koivisto L., Kähäri V.M., Heino J. (1999b) Integrin  $\alpha_2\beta_1$  mediates isoform specific activation of p38 and upregulation of collagenase gene transcription by a mechanism involving the  $\alpha_2$  cytoplasmic tail. *J Cell Biol*, 147, 401-416
- Jia L.G., Wang X.M., Shannon J.D., Bjarnason J.B., Fox J.W. (1997) Function of Disintegrin-like/Cysteine-rich Domains of Atrolysin A. *J Biol Chem*, 272, 13094-13102
- Jia L.-G., Wang X.-M., Shannon J.D., Bjarnason J.B., Fox J.W. (2000) Inhibition of platelet aggregation by the recombinant cysteine-rich domain of the hemorrhagic snake venom metalloproteinase, Atrolysin A. *Arch Biochem Biophys*, 373, 281-286
- Kähäri V.-M. and Saarialho-Kere U. (1999) Matrix Metalloproteinases and their inhibitors in tumor growth and invasion. *Ann Med*, 31, 34-45
- Kamiguti A.S., Hay C.R.M., Theakston, R.D.G., Zuzel M. (1996a) Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. *Toxicon*, 34, 627-642
- Kamiguti A.S., Hay C.R.M., Zuzel M. (1996b) Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of  $\alpha_2\beta_1$ -integrin by the snake venom metalloproteinase jararhagin. *Biochem J*, 320, 635-641
- Kamiguti AS, Moura-da-Silva AM, Laing GD, Knapp T, Zuzel M, Crampton JM, Theakston RD. (1997a) Collagen-induced secretion-dependent phase of platelet aggregation is inhibited by the snake venom metalloproteinase jararhagin. *Biochim Biophys Acta*, 1335, 209-17

- Kamiguti A.S., Markland F.S., Zhou Q., Laing G.D., Theakston R.D.G., Zuzel M. (1997b) Proteolytic cleavage of the  $\beta_1$  subunit of platelet  $\alpha_2\beta_1$  integrin by the metalloproteinase jararhagin compromises collagen-stimulated phosphorylation of pp72<sup>syk</sup>. *J Biol Chem*, 51, 32599-32605
- Kamiguti A.S., Zuzel M., Theakston R.D.G. (1998) Snake venom metalloproteinases and disintegrins: interaction with the cells. *Braz J Med Biol Res* 31, 853-862
- Kheradmad F., Rishi K., Werb Z. (2001) Signalling through the EGF receptor controls ling morphogenesis in part by regulating MT1-MMP-mediated activation of gelatinase A/MMP2. *J Cell Sci*, 115, 839-848
- Kheradmad F., Werner E., Tremble P., Symons M., Werb Z. (1998) Role of Rac1 and oxygen radicals in collagenase-1 expression induced by cell shape. *Science*, 280, 898-902
- Kieffer N. and Phillipps D.R. (1990) Platelet membrane glycoproteins: functions in cellular interactions. *Annu Rev Cell Biol*, 6, 329-57
- Kinoh H., Sato H., Tsunozuka Y., Takino T., Kawashima A., Okada Y., Seiki M. (1996) MT-MMP, the cell surface activator of proMMP-2 (pro-gelatinase A), is expressed with its substrate in mouse tissue during embryogenesis. *J Cell Sci*, 109, 953-959
- Kirchhofer D, Languino LR, Ruoslahti E, Pierschbacher MD. (1990) Alpha 2 beta 1 integrins from different cell types show different binding specificities. *J Biol Chem*, 265, 615-618
- Klein C.E., Dressel D., Steinmeyer T., Mauch C., Eckes B., Krieg T., Bankert R.B., Weber L. (1991) Integrin  $\alpha_2\beta_1$  is upregulated in fibroblasts and highly aggressive melanoma cells in three-dimensional collagen lattices and mediates the reorganization of collagen I fibrils. *J Cell Biol*, 115, 1427-1436
- Krane S., Bryne M.H., Lemaitre V., (1996) Different collagenase gene products have different roles in degradation of type I collagen. *J Biol Chem*, 271, 28509-28515
- Kubota S., Ito H., Ishibashi Y., Seyama Y. (1997) Anti- $\alpha_3$  integrin antibodies induces the activated form of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) with concomitant stimulation of invasion through matrigel by human rhabdomyosarcoma cells. *Int J Cancer*, 70, 106-111
- Kueng W., Silber E., Eppenberger U. (1989) Quantification of cells cultured on 96 well plates. *Anal Biochem*, 182, 16-19
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685
- Langholz O., Roeckel D., Mauch C., Kozłowska E., Bank I., Eckes B., Krieg T. (1995) Collagen and collagenase gene expression in three-dimensional collagen lattices are differential regulated by  $\alpha_1\beta_1$  and  $\alpha_2\beta_2$  integrins. *J Cell Biol*, 131, 1903-1915
- Larjava H, Lyons JG, Salo T, Makela M, Koivisto L, Birkedal-Hansen H, Akiyama SK, Yamada KM, Heino J. (1993) Anti-integrin antibodies induce type IV collagenase expression in keratinocytes. *J Cell Physiol* 1993 Oct;157(1):190-200
- Lark M.W., Bayne E.K., Flanagan J., Harper C.F., Hoerrner L.A., Hutchinson N.I., Singer I.I., Donatelli S.A., Weidner J.R., Williams H.R., Mumford R.A., Lohmander L.S. (1997) Aggrecan degradation in human cartilage Evidence for both matrix metalloproteinase and aggrecanase activity in normal, osteoarthritic, and rheumatoid joints. *J Clin Invest*, 100, 93-106

- Lee J.O., Bankstom L.A., Arnaout M.A., Liddington R.C. (1995) Two conformations of the integrin A-domain (I-domain): a pathway for activation? *Structure*, 3, 1333-1340
- Lehtinen T. and Heino J. (1999) Integrins as regulators of collagenase gene expression. In "Collagenases", Ed. Hoeffler W., R.G. Landes company, Austin, Texas, USA, 127-146
- Liaw Y.S., Yu C.J., Shun C.T., Lee Y.C., Kuo S.H., Luh K.T., Yang P.C. (2001) Expression of integrins in human endothelial cells: the roles in cell-to-extracellular matrix adhesion and inhibition by RGD-containing peptide. *Resp Med*, 95, 221-226
- Loftus J.C. and Liddington R.C. (1997) New insights into integrin-ligand interactions. *J Clin Invest*, 99, 2302-2306
- Lohi J., Lehti K., Valtanen H., Parks W.C., Keski-Oja J. (2000) Structural analysis and promotor characterization of the human membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) gene. *Gene*, 242, 75-86
- Lu C., Takagi C., Springer T.A. (2001) Association of the membrane proximal regions of the  $\alpha$  and  $\beta$  subunit cytoplasmic domains constrains an integrin in the inactive state. *J Biol Chem*, 276, 14642-14648
- Madlener M., Parks W.C., Werner S. (1998) Matrix metalloproteinases (MMPs) and their natural inhibitors are differentially expressed during excisional skin wound repair. *Exp Cell Res*, 242, 201-210
- Masson R., Lefebvre O., Noel A., Fahime M.E., Chendard M.P., Wendling C., Kebers F., LeMeur M., Dierich A., Foidart J.M., et al. (1998) In vivo evidence that the stromelysin-3 metalloproteinase contributes in a paracrine manner to epithelial cell malignancy. *J Cell Biol*, 140, 1535-1541
- Mauch C, Aumailley M, Paye M, Lapiere CM, Timpl R, Krieg T. (1986) Defective attachment of dermatosaractic fibroblasts to collagens I and IV. *Exp Cell Res*. 163, 294-300.
- Mauch C., Hatamochi A., Scharffetter K., Krieg T. (1988) Regulation of collagen synthesis in fibroblasts within a three-dimensional collagen gel. *Exp Cell Res*, 178; 493-503
- Mauch C., Adelman-Grill C.B., Hatamochi A., Krieg T. (1989) Collagenase gene expression in fibroblasts is regulated by a three-dimensional contact with collagen. *FEBS Lett.*, 250, 301-305
- Mauch C., Kozłowska E., Eckes B., Krieg T. (1992) Altered regulation of collagen metabolism in scleroderma fibroblasts grown within three-dimensional collagen gels. *Exp Dermatol*, 1, 185-190
- Mauch C. and Krieg T. (1993) Collagens: Their structure and metabolism. In "Connective tissue diseases of the skin". Ed. Lapiere C.M. and Krieg T., Marcel Dekker Inc., New York, USA, 325-343
- McKaig B.C., McWilliams D., Watson S.A., Mahida Y.R. (2003) Expression and Regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinases by intestinal myofibroblasts in inflammatory bowel disease. *Am J Pathol*, 162, 1355-60
- Mensing H., Pontz B., Müller P.K. (1983) A study on fibroblasts chemotaxis using fibronectin and conditioned medium as chemoattractants. *Eur J Biol*, 29, 268-273

- Miyamoto S, Teramoto H, Coso OA, Gutkind JS, Burbelo PD, Akiyama SK, Yamada KM. (1995) Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J Cell Biol*, 131, 791-805.
- Mizejewski G.J. (1999) Role of integrins in cancer: survey of expression patterns. *PSEBM*, 222, 124-138
- Morgunova E, Tuuttila A, Bergmann U, Isupov M, Lindqvist Y, Schneider G, Tryggvason K. (1999) Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: activation mechanism revealed. *Science*, 284, 1667-70
- Moura-da-Silva A.M., Laing G.D., Paine M.J.I., Politi V., Crampton J.M., Theakston R.D.G. (1996) Processing of pro- tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) by venom metalloproteinases: a hypothesis explaining local tissue damaging following snake bite. *Eur J Immunol*, 26, 2000-2005
- Moura-da-Silva A.M., Marcinkiewicz C., Marcinkiewicz M., Niewiarowski S. (2001) Selective recognition of  $\alpha_2\beta_1$  integrin by jararhagin, a metalloproteinase/disintegrin from bothrops jararaca venom. *Thrombosis Res*, 102, 153-159
- Mudgett J.S., Hutchinson N.I., Chartrain N.A., Forsyth A.J., McDonnell J., Singer I.I., Bayne E.K., Flanagan J., Kawka D., Shen C.F., Stevens K., Chen H., Trumbauer M., Visco D.M. (1998) Susceptibility of stromelysin 1-deficient mice to collagen-induced arthritis and cartilage destruction. *Arthritis Rheum*, 41, 110-121
- Murphy G, Cockett MI, Stephens PE, Smith BJ, Docherty AJ. (1987) Stromelysin is an activator of procollagenase. A study with natural and recombinant enzymes. *Biochem J*, 248, 265-8.
- Murphy G, Stanton H, Cowell S, Butler G, Knauper V, Atkinson S, Gavrilovic J. (1999) Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. *APMIS*, 107, 38-44
- Nagase H., Enghild J.J., Suzuki K., Salvesen G. (1990) Stepwise activation mechanisms of the precursor of matrix metalloproteinase-3 (stromelysin 1) by proteinases and (4-amino-phenyl) mercuric acetate. *Biochemistry*, 29, 5783-5789
- Nagase H. (1997) Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*, 378, 151-160
- Ohuchi E., Imai K., Fujii Y., Sato H., Seiki M., Okada Y. (1997) Membrane type I matrix Metalloproteinases digests interstitial collagens and other extracellular matrix molecules. *J Biol Chem*, 272, 2446-2451.
- Okada A, Bellocq JP, Rouyer N, Chenard MP, Rio MC, Chambon P, Basset P. (1995) Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene is expressed in stromal cells of human colon, breast, and head and neck carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 2730-4.
- Olson M.W., Gervasi D.C., Mobashery S., Fridman R. (1997) Kinetic analysis of the binding of human matrix metalloproteinases-2 and -9 to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2. *J Biol Chem*, 272, 29975-29983
- Overall C.M. (1995) Repression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase expression by all trans-retinoic acid in rat bone cell populations: comparisons with transforming growth factor- $\beta_1$ . *J Cell Physiol*, 164, 17-25

- Overall CM, King AE, Sam DK, Ong AD, Lau TT, Wallon UM, DeClerck YA, Atherstone J. (1999) Identification of the tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) binding site on the hemopexin carboxyl domain of human gelatinase A by site-directed mutagenesis. The hierarchical role in binding TIMP-2 of the unique cationic clusters of hemopexin modules III and IV. *J Biol Chem*, 274, 4421-9.
- Overall C.M. (2002) Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity. *Mol Biotechnol*, 22, 51-86
- Overall C.M. and Lopez-Otin C. (2002) Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nature Rev Cancer*, 2, 657-672
- Pei D. and Weiss S.J. (1995) Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature*, 375, 244-247
- Pei D. and Weiss S.J. (1996) Transmembrane-deletion mutants of the membrane-type matrix metalloproteinase-1 process progelatinase A and express intrinsic matrix-degrading activity. *J Biol Chem*, 271, 9135-9140
- Pei D., Kang T., Qi H. (2000) Cysteine array matrix metalloproteinase is a type II transmembrane matrix metalloproteinase regulated by a single cleavage for both secretion and activation. *J Biol Chem*, 275, 33988-33997
- Pentikäinen O., Hoffren A.-M., Ivaska J., Käpylä J., Nyrönen T., Heino J., Johnson M.S. (1999) „RKKH“ peptides from the snake venom metalloproteinase of *bothrops jararaca* bind near the metal ion dependent adhesion site of the human integrin  $\alpha_2$  I-domain. *J Biol Chem*, 274, 31493-31505
- Pilcher B.W., Dumin J.A., Sudbeck B.D., Krane S.D., Welgus H.D., Parks W.C. (1997) The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on type I collagen matrix. *J Cell Biol*, 137, 1445-1457
- Plow E.F., Haas T.A., Zhang L., Loftus J., Smith J.W. (2000) Ligand binding to integrins. *J Biol Chem*, 275, 21785-21788
- Riikonen T., Westermarck J., Koivisto L., Broberg A., Kähäri V.-M., Heino J. (1995) Integrin  $\alpha_2\beta_1$  is a positive regulator of collagenase (MMP-1) and collagen  $\alpha_1(I)$  gene expression. *J Biol Chem*, 270, 13548-13552
- Rouslahti E. and Pierschbacher M.D. (1987) New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*, 238, 491-497
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sato H., Takino T., Okada Y., Cao J., Shinagawa A., Yamamoto E., Seiki M. (1994) A matrix metalloproteinase expressed on the matrix of invasive tumor cells. *Nature*, 370, 55-61
- Sato H., Okada Y., Seiki M. (1997) Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in cell invasion. *Thromb and Haemostas*, 78, 497-500
- Sauer B. and Henderson N. (1988) Site specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase in bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 5166-5170.

- Seiki M. (1999) Membrane type matrix metalloproteinases. *APMIS* 107, 137-143
- Seltzer J.L., Lee A.Y., Akers K.T., Sudbeck B., Southon E.A., Wayner E.A., Eisen A.Z. (1994) Activation of 72-kDa type IV collagenase/gelatinase by normal fibroblasts in collagen lattices is mediated by integrin receptors but is not related to lattice contraction. *Exp Cell Res*, 213, 365-374
- Shannon J.D., Baramova E.N., Bkarnason J.B., Fox J.W. (1989) Amino acid sequence of a crotalus atrox venom metalloproteinase which cleaves type IV collagen and gelatin. *J Biol Chem*, 264, 11575-11583
- Shimo 3kawa K., Shannon J.D., Jia L., Fow J.W. (1997) Sequence and biological activity of Catrocollastatin-C: a disintegrin-like/Cysteine-rich two-domain protein from *Crotalus atrox* venom. *Arch Biochem Biophys*, 343, 35-4
- Shiple J.M., Wesselschmidt R.L., Kobayashi D.K., Lay T.J., Shapiro S.D. (1996) Metalloelastase is required for macrophage-mediated proteolysis and matrix invasion in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 3942-3946
- Smith C, Estavillo D., Emsley J., Bankston L.A., Liddington R.C., Cruz M.A. (2000) Mapping of the collagen-binding site in the I domain of the glycoprotein Ia/IIa (Integrin  $\alpha 2\beta 1$ ). *J Biol Chem*, 275, 4205-4209
- Smith J.W. (1994) The structural basis of integrin-ligand (RGD) interaction. In "Integrins" Ed. Cheres D.A. and Mecham R.P., Academic Press Inc., London, UK, 1-32
- Sounni N.E., Janssen M., Foidart J.M., Noel A. (2003) Membrane-type-1 matrix metalloproteinase and TIMP-2 in tumor angiogenesis. *Matrix Biol*, 22, 55-61
- Southern E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, 98, 503-517
- Springer T.A. (1997) Folding of the N-terminal, ligand-binding region of integrin alpha-subunits into a beta-propeller domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 94,65-72
- Springman E.B., Angleton E.L., Birkedal-Hansen H., Van Waart H.E. (1990) Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine-switch" mechanism for activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87, 364-368
- Steffensen B.J., Wallon U.M., Overall C.M. (1995) Extracellular matrix binding properties of recombinant fibronectin type II modules of human 72-kDa gelatinase/type IV collagenase. High affinity binding to native type I collagen but not native type IV collagen. *J Biol Chem*, 270, 11555-11566
- Strick K. (2003) Funktionelle Analyse von Integrin  $\alpha 2\beta 1$ -defizienten Zellen der Haut. (Diplomarbeit) Fachhochschule Aachen
- Stricker T.P., Dumin J.A., Dickeson S.K., Chung L., Nagase H., Park W.C., Santoro S.A. (2001) Sructural analysis of the 2 integrin I domain/procollagenase-1 (matrix metalloproteinase-1) interaction. *J Biol Chem*, 276, 29375-29381
- Strongin A.Y., Collier I., Bannikov G., Marmer B.L., Grant G.A., Goldberg G.I. (1995) Mechanism of cell surface activation of the 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloproteinase. *J Biol Chem*, 270, 5331-5338

- Takino T., Sato H., Tsunozuka Y., Okada Y., Kawashima M., Seiki M. (1996) MT-MMP, the cell surface of proMMP-2 (pro-gelatinase A), is expressed with its substrate in mouse tissues in embryogenesis. *J Cell Sci*, 109, 953-959
- Tam E.M., Wu Y.I., Butler G.S., Stack M.S., Overall C.M. (2002) Collagen binding properties of the membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) hemopexin C domain. *J Biol Chem*, 277, 39005-39014
- Teti A., Farina A.R., Villanova I., Tiberio A., Tacconelli A., Sciortino G., Chambers A.F., Gulino A., Mackay A.R. (1998) Activation of MMP-2 by human GCT23 giant cell tumour cells induced by osteopontin, bone sialoprotein and GRGDSP peptides is RGD and cell shape dependent. *Int J Cancer*, 77, 82-93
- Thomas K.R. and Capecchi M.R. (1987) Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo derived stem cells. *Cell*, 51, 503-512
- Tiger CF, Fougere F, Grundstrom G, Velling T, Gullberg D. (2001) alpha11beta1 integrin is a receptor for interstitial collagens involved in cell migration and collagen reorganization on mesenchymal nonmuscle cells. *Dev Biol*, 237, 116-29.
- Timpl R. (1996) Macromolecular organization of basement membranes. *Curr Opin Cell Biol*, 8, 618-624
- Tomasek J.J., Halliday N.L., Updike D.L., Ahern-Moore J.S., Vu T., Liu R.W., Howard E.W. (1997) Gelatinase A activation is regulated by the organization of the polymerized actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 272, 7482-7487
- Torres R.M. and Kühn R. (1997) Laboratory Protocols for Conditional gene targeting. Oxford University Press
- Tremble P., Chiquet-Ehrismann R., Werb Z. (1996) The extracellular matrix ligands fibronectin and tenascin collaborate in regulating collagenase gene expression in fibroblasts. *Mol Biol Cell*, 5, 439-453
- Tsuchiya Y, Sawada S, Tsukada K, Saiki I. (2002) A new pseudo-peptide of Arg-Gly-Asp (RGD) inhibits intrahepatic metastasis of orthotopically implanted murine hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol*, 20, 319-24.
- Uria J.A., Jimenez M.G., Balbin M., Freije J.M.P., Lopez-Otin C. (1998) Differential effects of transforming growth factor- $\beta$  on the expression of collagenase-1 and collagenase-3 in human fibroblasts. *J Biol Chem*, 264, 1860-1869
- Van der Flier A. and Sonnenberg A. (2001) Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res*, 305, 285-298
- Van Wart H.E. and Birkedal-Hansen H. (1990) The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87, 5578-5582
- Velasco G, Cal S, Merlos-Suarez A, Ferrando AA, Alvarez S, Nakano A, Arribas J, Lopez-Otin C. (2000) Human MT6-matrix metalloproteinase: identification, progelatinase A activation, and expression in brain tumors. *Cancer Res*, 60, 877-82

- Velling T, Kusche-Gullberg M, Sejersen T, Gullberg D. (1995) cDNA cloning and chromosomal localization of human alpha(11) integrin. A collagen-binding, I domain-containing, beta(1)-associated integrin alpha-chain present in muscle tissues. *J Biol Chem*, 274, 25735-42.
- Vinogradova O., Haas T., Plow E.F., Qin J. (2000) A structural basis for integrin activation by the cytoplasmic tail of the alpha5-subunit. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 1450-1455
- Vogel W., Gish G.D., Alves F., Pawson T. (1997) The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Mol Cell*, 1, 13-23
- Vu T.H., Shipley J.M., Bergers G., Berger J.E., Helms J.A., Hanahan D., Shapiro S.D., Senior R.M., Werb Z. (1998) MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell*, 93, 411-422
- Wallon U.M. and Overall C.M. (1997) The hemopexin-like domain (C domain) of human gelatinase A (matrix metalloproteinase-2) requires Ca<sup>2+</sup>-for fibronectin and heparin binding. Binding properties of recombinant gelatinase A C domain to extracellular matrix and basement components. *J Biol Chem*, 272, 7473-7481
- Ward R.V, Atkinson S.J., Slocombe P.M., Docherty A.J.P., Reynolds J.J., Murphy G. (1991) Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits the activation of 72 kDa progelatinase by fibroblasts membranes. *Biochem Biophys Acta*, 1079, 242-246
- Werb Z, Tremble PM, Behrendtsen O, Crowley E, Damsky CH. (1989) Signal transduction through the fibronectin receptor induces collagenase and stromelysin gene expression. *J Cell Biol*, 109, 877-89.
- Werb Z (1997) ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell*, 91, 439-442
- Werb Z. and Chin R.C. (1998) Extracellular matrix remodeling during morphogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1998, 857, 110-118
- Westermarck J. and Kähäri V.-M. (1999) Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J*, 13, 781-792
- Whittaker C.A. and Hynes R.O. (2002) Distribution and evolution of von willebrand/integrin alpha domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol Biol Cell*, 13, 3369-87.
- Wilson C.L., Heppner K.J., Labosky P.A., Hogan B.L., Matrisian L.M. (1997) Intestinal tumorigenesis is suppressed in mice lacking the metalloproteinase matrilysin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 1402-1407
- Windsor L.J., Bodden M.K., Birkedal-Hansen B., Engler J.A., Birkedal-Hansen H. (1994) Mutational analysis of residues in and around the active site of human fibroblasts-type collagenase. *J Biol Chem*, 269, 26201-26207
- Wolfsberg T.G. and White J.M. (1996) ADAMs in fertilization and development. *Dev Biol*, 308, 182-191
- Xiong J.P., Stehle T., Diefenbach B., Zhang R., Dunker R., Scott D.L., Joachimiak A., Goodman S.L., Arnaout M.A. (2001) Crystal structure of the extracellular segment of integrin alphaV beta3. *Science*, 294, 339-345

- Xu J. and Clark R.A. (1997) A three-dimensional collagen lattice induces protein kinase C-zeta activity: role in alpha2 integrin and collagenase mRNA expression. *J Cell Biol*, 136, 473-83
- Yu Q. and Stamenkovic I. (2000) Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev*, 14, 163-76
- Zhang D. and Brodt P. (2003) Type I insulin-like growth factor regulates MT1-MMP synthesis and tumor invasion via PI3-kinase/Akt signalling. *Oncogene*, 22, 974-982
- Zhou Z., Apte S.S., Soininen R., Cao R., Baaklini G.Y., Rauser R.W., Wang J., Cao Y., Tryggvasson K. (2000) Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase I. *PNAS*, 97, 4052-4057
- Zigrino P. (2000) Regulation of expression and activation of matrix metalloproteinases in human dermal fibroblasts by cell-matrix interactions (Doktorarbeit). Universität zu Köln.
- Zigrino P., Drescher C., Mauch C. (2001) Collagen-induced proMMP-2 activation by MT1-MMP in human dermal fibroblasts and the possible role of alpha2beta1 integrins. *EJCB*, 80, 68-77
- Zigrino P., Kamiguti A.S., Eble J., Drescher C., Nischt R., Fox J.W., Mauch C. (2002) The reprotolysin Jararhagin, a snake venom metalloproteinase functions as a fibrillar collagen agonist involved in fibroblast cell adhesion and signaling. *J Biol Chem*, 277, 40528-40535
- Zucker S., Drews M., Conner C., Foda H.D., DeClerk Y.A., Langley K.E., Bahou W.F., Docherty A.J.P., Cao J. (1998) Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) binds to the catalytic domain of the cell surface receptor, membrane type 1-metalloproteinase 1 (MT1-MMP). *J Biol Chem*, 273, 1216-1222

## **Erklärung**

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen - die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. H.W. Klein betreut worden.

Köln, den 22. Juli 2003

## Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Professor Dr. Dr. T. Krieg für die Möglichkeit in der dermatologischen Klinik der Universität zu Köln zu arbeiten.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. Dr. C. Mauch für die Überlassung des Themas und die Betreuung des Projektes. Ihre Diskussionsbereitschaft und ihre Unterstützung beim Verfassen dieser Arbeit haben entscheidend zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Vielen Dank an Herrn Professor Dr. H.W. Klein, der freundlicherweise die Begutachtung dieser Arbeit übernommen hat und an Herrn Professor Dr. J. Brüning für die Übernahme des Prüfungsvorsitz.

Ganz herzlichen Dank an Frau PD Dr. R. Nischt für die Bereitschaft als Ko-Gutachter diese Arbeit zu beurteilen und mit ihrer Diskussionsbereitschaft zu unterstützen. Sie und ihre Arbeitsgruppe haben in besonderem Maße diese Arbeit mitgeprägt. Dabei haben Frau Marion Reibetanz und Herr Dr. Monzur Murshed mich unermüdlich in die Grundlagen der Molekularbiologie und ES-Zellkultur eingeweiht.

Auch Herrn Dr. Olaf Holtkötter und Frau Kerstin Elias aus der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Eckes gebührt nicht nur in diesem Bereich besonderer Dank. Außerdem möchte ich mich bei Dr. Neill Smyth für die Bereitstellung der ES-Zellen bedanken.

Bei Frau Claudia Ochsmann möchte ich mich ganz besonders herzlich für ihren Einsatz, ihren Überblick und ihre Unterstützung nicht nur in beruflichen Bereichen bedanken.

Desweiteren gilt mein Dank Herrn Dr. Peter Kurschat und Herrn Ralf Denhöfer, die mich bei vielen technischen Problemen beraten haben und immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Frau Renate Knaupp danke ich für die Unterstützung bei den FACS-Analysen.

Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen, ohne die Hilfe und Unterstützung von Dr. J.W. Fox und Dr. A. Kamiguti. Hier sei auch Dr. J. Eble gedankt, dessen Bindungsstudien entscheidende Einsichten in diesem Projekt ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Stephanie Baudler und Herrn Dr. Frank Michaelsen, die mir beim Verfassen dieser Arbeit eine große Hilfe waren und nicht zuletzt durch ihre Freundschaft es fertig gebracht haben, mich immer wieder zu motivieren.

Für meinen Vater

Ich bin nicht in diese Welt gekommen um sie zu verspotten  
sondern um alles Lebende mit Leidenschaft zu lieben.  
Ich bin nicht gekommen um die Menschen zu verspotten  
sondern um mit ihnen die Abenteuer dieser Erde zu bestehen.

(aus *Beruf auf Erden*,  
Jorge Carrera Andrade)

# Lebenslauf

## Persönliche Angaben:

Name: Kristina Grimm  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Geburtsdatum: 19. März 1972  
Geburtsort: Essen

## Ausbildung:

1978-1980 Grundschole „am Krausen Bäumchen“, Essen  
1980-1982 Grundschole „Ardeyschole“, Essen  
1982-1991 Stadtwaldgymnasium in Essen  
1991 Allgemeine Hochschulreife

1991-1994 Studium der Biologie, Studienziel Diplom an der Westfälischen Wilhelms Universität, Münster

1994 Diplom-Vorprüfung: Gesamtnote gut

1994-1998 Studium der Biologie an der Universität zu Köln

1997 Diplom-Prüfung mit den Fächern  
Zoologie: sehr gut  
Entwicklungsbiologie: sehr gut  
Biochemie: sehr gut (-)

1997-1998 Diplomarbeit bei PD Dr. Winklbauer,  
Zoologisches Institut der Universität zu Köln  
„Untersuchungen zum Involutionsverhalten von *Xenopus laevis* mit besonderer Berücksichtigung der Cadherin vermittelten Zell-Zell-Adhäsion“  
Note: sehr gut (-)

2000-2003 wissenschaftliche Mitarbeiterin an der dermatologischen Klinik der Universität zu Köln bei Frau Prof. Dr. Dr. Mauch

Köln, den 22. Juli 2003