

**Untersuchungen zur biologischen
Rolle der Matrixmetalloproteinase
MMP-19**

**Analysen zur Genexpression, Zelloberflächenassoziation
und zu Protein-Protein-Interaktionen**

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der Naturwissenschaften
an der Universität Konstanz
Fakultät für Biologie**

**vorgelegt von
Simon Mauch**

Konstanz, im Mai 2000

Dissertation der Universität Konstanz

Tag der mündlichen Prüfung: 1. September 2000

1. Referent: Prof. Dr. W. Hofer
2. Referent: Prof. Dr. H.H. Peter

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 1996 bis März 1999 unter der Anleitung von Prof. Dr. Ulrich Krawinkel am Lehrstuhl für Immunologie, Fakultät für Biologie der Universität Konstanz angefertigt.

Mein Dank und meine Erinnerung gelten Ulrich. Ich hab ihn sehr schätzen gelernt und werde ihn nicht vergessen!

Zu großem Dank verpflichtet bin ich auch Herrn Prof. Dr. Hofer und Herrn Prof. Dr. Peter, die sich nach Ulrichs Tod bereit erklärt haben, die Korrektur meiner Arbeit zu übernehmen.

Außerdem gilt mein Dank den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Immunologie, die mich während dieser drei Jahre begleitet, geärgert, erfreut oder was auch immer haben...: Birgit, Justine, Jutta, Katja (extra großer Dank für die Unterstützung bis zum Schluß!), Markus, Micha, Mona, Nela, Radek, Stephan, Uli und Zane - Es war eine wirklich gute Zeit!

Weiterhin danke ich den Graduiertenkollegiaten, die mich als molekularbiologischen Fremdkörper in die Pharmakologie aufnahmen und mit denen ich viel Spaß hatte. Besonders erwähnen möchte ich hier Birgit, Gerald, Markus und Werner.

Großen Dank schulde ich Herrn Prof. Dr. Wendel, der mir das GK (und damit auch mein Stipendium) ermöglichte. Vor allem danke ich ihm aber dafür, dass er immer ein offenes Ohr hatte und seine Antworten und Ratschläge jederzeit ehrlich und damit sehr wertvoll für mich waren.

Absolut gute Erinnerungen verbinden mich mit dem happy hour- und Kickerteam: Ohne Leppi wär der Unialltag des öfteren öde gewesen, dafür manche Nächte weniger kurz und der Kopf entsprechend weniger dick. Ebenso unvergeßlich sind Martin "Trauma" Bullenschluck, Kallodri Stolpertasche und natürlich die Moni ... Marianne schulde ich mehrfachen Dank: für viele supernette happy hours, aber auch für technische Hilfe in Antikörper- und anderen Fragen.

Die Arbeit im Labor wär nur halb so gut gewesen, wenn mein restliches Leben in Konstanz nicht so schön gewesen wäre. Und das verdanke ich in erster Linie der besten WG von allen, insbesondere Klaus, Gesine und Bini.

Besonderen Dank möchte ich meinen Eltern und Geschwistern zukommen lassen. Sie haben mich immer in jeder Hinsicht unterstützt!

Am allermeisten danke ich Silvi für sehr sehr vieles!

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
BLAST	basic local alignment search tool
Bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
D	Dalton
DIG	Digoxigenin
DDW	doppelt destiliertes Wasser
DDT	Dithiothreitol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Ig	Immunglobulin
M	molar
L	Liter
min	Minute
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	messenger RNA
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
rRNA	ribosmale RNA
RA	Rheumatoide Arthritis
sek	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TIMP	Tissue inhibitor of MMP
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
V	Volt

Aminosäuren

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

Nukleotide

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymidin

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	DIE EXTRAZELLULÄRE MATRIX.....	1
1.1.1	<i>Die Bestandteile der extrazellulären Matrix</i>	<i>2</i>
1.2	METABOLISCHER UMBAU DER EXTRAZELLULÄREN MATRIX.....	2
1.3	MATRIXMETALLOPROTEINASEN	3
1.3.1	<i>Domänenstruktur der Matrixmetalloproteinasen.....</i>	<i>4</i>
1.3.2	<i>Untergruppen der Matrixmetalloproteinasenfamilie</i>	<i>6</i>
1.3.3	<i>Die Substrate der einzelnen Matrixmetalloproteinasen</i>	<i>7</i>
1.3.4	<i>"Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases" (TIMPs).....</i>	<i>10</i>
1.3.5	<i>Physiologische und pathologische Bedeutung der Matrixmetalloproteinasen.....</i>	<i>11</i>
1.3.6	<i>Pathophysiologie am Beispiel der Tumorprogression</i>	<i>14</i>
1.4	DIE MATRIXMETALLOPROTEINASE RASI (MMP-19).....	15
1.4.1	<i>Isolierung des Autoantigens RASI (MMP-19).....</i>	<i>15</i>
1.4.2	<i>RASI ist die Matrixmetalloproteinasen-19.....</i>	<i>17</i>
2	MATERIAL UND METHODEN.....	19
2.1	CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN.....	19
2.1.1	<i>Zellkulturreagenzien und Gefäße.....</i>	<i>19</i>
2.1.2	<i>Enzyme und Reagenzien für die Molekularbiologie.....</i>	<i>19</i>
2.1.3	<i>Antikörper</i>	<i>19</i>
2.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE STANDARDTECHNIKEN.....	20
2.2.1	<i>Plasmidpräparation</i>	<i>20</i>
2.2.2	<i>Hocheffiziente Transformation von E.coli.....</i>	<i>20</i>
2.3	RNA-ISOLIERUNG	21
2.4	REVERSE TRANSKRIPTION UND POLYMERASE-KETTENREAKTION.....	21
2.4.1	<i>Semiquantitative RT-PCR zur MMP-19 Genexpressionsanalyse.....</i>	<i>22</i>
2.4.3	<i>Direkte PCR zum Nachweis von Plasmiden in bakteriellen Kolonien</i>	<i>22</i>
2.4.4	<i>Klonierung von PCR-Produkten</i>	<i>23</i>
2.5	DNA-SEQUENZANALYSE.....	23
2.6	BIOINFORMATIK	24
2.7	SODIUMDODECYLSULFAT-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE	24
2.7.1	<i>Schnelle Coomassie-Blau-Färbung von Proteingelen.....</i>	<i>25</i>
2.7.2	<i>Silberfärbung von Proteingelen</i>	<i>25</i>
2.8	ZWEIDIMENSIONALE GELELEKTROPHORESE.....	25
2.9	IMMUNOBLOTS	25
2.10	DETEKTION BIOTINYLIERTER PROTEINE.....	26
2.11	IN VITRO ³⁵ S-MARKIERUNG VON PROTEINEN	26
2.12	IMMUNPRÄZIPITATION.....	26
2.13	KONSTRUKTION EUKARYONTISCHER EXPRESSIONSVEKTOREN	27

2.13.1	<i>HA-getagte MMP-19 Fragmente</i>	27
2.14	YEAST TWO-HYBRID SYSTEM	29
2.14.1	<i>Konstruktion des Yeast Two-Hybrid-Expressionsplasmids</i>	29
2.14.2	<i>Vorversuche und Kontrollen</i>	30
2.14.3	<i>Durchmustern der cDNA Bank nach MMP-19-interagierenden Proteinen</i>	30
2.14.4	<i>Spezifitätskontrollen</i>	31
2.15	IN SITU PLAQUE HYBRIDISIERUNG	31
2.16	REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG MONOKLONALER ANTIKÖRPER	32
2.17	ZELLKULTUR	32
2.17.1	<i>Isolierung von peripheren mononukleären Blutzellen</i>	32
2.17.2	<i>Isolierung von Makrophagen</i>	32
2.17.3	<i>Isolierung humaner vaskulärer Zellen</i>	33
2.17.4	<i>Transfektion eukaryontischer Zellen</i>	33
2.17.5	<i>In vitro Markierung von Proteinen in Zellkultur</i>	33
2.17.6	<i>Oberflächenmarkierung von Proteinen in Zellkultur</i>	34
2.18	FLUORESCENZ AKTIVIERTER ZELLSCANNER	34
3	ERGEBNISSE	35
3.1	DIE EINORDNUNG VON MMP-19 IN DIE MATRIXINFAMILIE	36
3.2	MMP-19 GENEXPRESSION	42
3.2.1	<i>Etablierung einer MMP-19 RT-PCR Expressionsanalyse</i>	42
3.2.2	<i>MMP-19 mRNA in verschiedenen Zelllinien</i>	44
3.2.3	<i>Ist die MMP-19 Expression an den Differenzierungsstatus myeloider Zellen gekoppelt?</i>	46
3.2.4	<i>MMP-19 in peripheren mononukleären Blutzellen</i>	46
3.2.5	<i>MMP-19 Expression in Zellen des Blutgefäß Systems</i>	50
3.3	ZELLOBERFLÄCHEN BINDUNG VON MMP-19	53
3.3.1	<i>Mechanismus der MMP-19 Oberflächenbindung</i>	57
3.3.2	<i>Welche Domäne ist für die MMP-19 Oberflächenassoziation verantwortlich?</i>	62
3.4	DAS YEAST TWO-HYBRID SYSTEM ZUR SUCHE NACH MMP-19 INTERAKTIONSPARTNERN	64
3.4.1	<i>Prinzip des Yeast Two-Hybrid Systems</i>	64
3.4.2	<i>Suche von MMP-19-Interaktionspartner mit dem Yeast Two-Hybrid System</i>	65
3.5	RAPA-14 INTERAGIERT MIT MMP-19	69
3.6	IST DIE BINDUNG VON RAP A-14 AN MMP-19 BIOLOGISCH RELEVANT?	69
3.7	ISOLIERUNG DER VOLLSTÄNDIGEN CDNA FÜR RAP A-14	71
3.8	RAP A-14-33	73
3.8.1	<i>cDNA Sequenz</i>	73
3.8.2	<i>Das Protein Rapa-14-33</i>	73

4	DISKUSSION	77
4.1	EINORDNUNG VON MMP-19 IN DIE MATRIXINFAMILIE	77
4.2	RNA EXPRESSION	82
4.3	ZELLOBERFLÄCHENVERANKERUNG VON MMP-19.....	91
4.4	DIE WECHSELWIRKUNG VON MMP-19 MIT RAPA-14.....	95
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	98
6	LITERATURVERZEICHNIS	100
7	ANHANG	116
7.1	DIE VOLLSTÄNDIGE RAPA-14-33 SEQUENZ	116

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1 DOMÄNENSTRUKTUR DER MATRIXMETALLOPROTEINASEN..... 4

ABBILDUNG 2 AKTIVIERUNGSMECHANISMUS DER MATRIXMETALLOPROTEINASEN ("CYSTEINE SWITCH")..... 5

ABBILDUNG 3 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER KLONierten MMP-19-FRAGMENTE 29

ABBILDUNG 4 MULTIPLER SEQUENZVERGLEICH INNERHALB DER FAMILIE DER MATRIXMETALLOPROTEINASEN . 36

ABBILDUNG 5 PHYLOGENETISCHE ABSTAMMUNG VON MMP-19 40

ABBILDUNG 6 MMP-19 RT-PCR UNTER VARIIERENDEN BEDINGUNGEN..... 43

ABBILDUNG 7 MMP-19 EXPRESSION IN HUMANEN ZELLINIEN 45

ABBILDUNG 8 EXPRESSION VON MMP-19 WÄHREND DER MYELOIDEN DIFFERENZIERUNG 46

ABBILDUNG 9 MMP-19 INDUKTION IN LEUKOZYTEN DURCH AUTOLOGES SERUM 47

ABBILDUNG 10 MMP-19 EXPRESSION IN CD14⁺-ZELLEN 48

ABBILDUNG 11 ADHÄSIONSINDUZIERTER MMP-19 EXPRESSION IN PERIPHEREN MONONUKLEÄREN BLUTZELLEN 49

ABBILDUNG 12 EXPRESSION VON MMP-19 IN ZELLEN DES BLUTGEFÄßES 51

ABBILDUNG 13 ANALYSE DER MMP-19 OBERFLÄCHENEXPRESSION IN HUMANEN BLUTZELLINIEN..... 54

ABBILDUNG 14 ANALYSE DER MMP-19 EXPRESSION IN MONONUKLEÄREN BLUTZELLEN IM FACSCAN 55

ABBILDUNG 15 GPI-VERANKERUNG VON MMP-19..... 57

ABBILDUNG 16 DER MONOKLONALE ANTIKÖRPER CK 8/4 PRÄZIPITIERT MMP-19 58

ABBILDUNG 17 ZWEI OBERFLÄCHENPROTEINE KOPRÄZIPITIEREN MIT MMP-19..... 59

ABBILDUNG 18 MMP-19 IST NICHT-KOVALENT AN DIE ZELLMEMBRAN GEBUNDEN..... 60

ABBILDUNG 19 MMP-19 ZELLOBERFLÄCHENASSOZIATION: FUNKTION DER HÄMOPEXIN-ÄHNLICHEN UND DER KATALYTISCHEN DOMÄNE 62

ABBILDUNG 20 REKONSTITUTION MODULARER TRANSKRIPTIONSFAKTOREN ALS BASIS DES YEAST TWO-HYBRID SYSTEMS 64

ABBILDUNG 21 FLUSSDIAGRAMM ZUR DARSTELLUNG DES DURCHFÜHRTEN YEAST TWO-HYBRID SCREENS NACH INTERAKTIONSPARTNERN VON MMP-19..... 66

ABBILDUNG 22 KOIMMUNPRÄZIPITATION VON RAPA-14 MIT MMP-19 69

ABBILDUNG 23 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG VON RAPA-14..... 70

ABBILDUNG 24 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG ALLER ISOLIERTEN RAPA-14 KLONE 72

ABBILDUNG 25 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES VOLLSTÄNDIGEN PROTEINS RAPA-14-33..... 74

ABBILDUNG 26 DIE STRUKTUR DER MATRIXMETALLOPROTEINASEN 78

ABBILDUNG 27 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER MMP-19 mRNA INDUKTION IN BLUTZELLEN 86

ABBILDUNG 28 MT-1-MMP VERMITTELTE ZELLOBERFLÄCHENBINDUNG UND AKTIVIERUNG DER MMP-2 93

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1 MITGLIEDER DER MATRIXMETALLOPROTEINASENFAMILIE 7

TABELLE 2 DIE PHYSIOLOGISCHE UND PATHOLOGISCHE BEDEUTUNG VON MATRIXMETALLOPROTEINASEN 11

TABELLE 3 ÜBERSICHT ÜBER ALLE MHRFACH ISOLIERTEN UND IN HEFEN SPEZIFISCH MIT MMP-19 INTERAGIERENDEN PROTEINE 68

1 Einleitung

1.1 Die extrazelluläre Matrix

Höhere Organismen sind aus einer Vielzahl verschiedener und zum Teil hoch spezialisierter Zellen aufgebaut. Diese Zellen sind in Organen, bzw. Gewebeverbänden aufgebaut. Diese biologischen Gewebe bestehen jedoch nicht nur aus Zellen. Einen erheblichen Teil des Gewebevolumentums nimmt der Extrazellularraum ein. Dieser wird von einem komplexen Makromolekülgeflecht, der sogenannten extrazellulären Matrix, ausgefüllt. Die extrazelluläre Matrix besteht aus einer Vielzahl unterschiedlicher Polysaccharide und Proteine, die von dafür spezialisierten Zellen gebildet und sezerniert werden und sich zu einem strukturierten Maschenwerk zusammen lagern (Labat-Robert *et al.*, 1990; Scott, 1995).

Im Bindegewebe, welches bei Wirbeltieren das Strukturgerüst des Körpers bildet, nimmt die extrazelluläre Matrix oftmals mehr Raum ein als die Zellen, die sie von allen Seiten umgibt (Leonhardt, 1990). Sie bestimmt damit die physikalischen Eigenschaften des jeweiligen Gewebes. Der Anteil des Bindegewebes am Gesamtgewebe variiert je nach Organtyp sehr stark: Knochen und Haut bestehen fast ausschließlich aus Bindegewebe, das Gehirn weist dagegen sehr wenig dieses Strukturgewebes auf (Ruoslahti, 1996; Piez, 1997).

Auch die zum Aufbau der extrazellulären Matrix verwendeten Makromolekültypen variieren bezüglich ihrer Zusammensetzung und Strukturierung je nach Gewebetyp sehr stark. Insgesamt finden sich in der extrazellulären Matrix weit über 100 verschiedene Makromolekültypen, die eine sehr große funktionelle Varianz ermöglichen (Woessner, 1998; Ayad *et al.*, 1998). So gibt es zum Beispiel die durch Kalzifizierung sehr harten Matrixstrukturen von Knochen und Zähnen, die durchsichtige Matrix der vorderen Augenhornhaut oder die sehr zugfesten, seilartigen Sehnenstrukturen (Ayad *et al.*, 1998). Eine Sonderform der extrazellulären Matrix, die sogenannte Basalmembran, findet sich an allen Grenzflächen zwischen Epithelzellschichten und den darunter liegenden Bindegeweben. Sie dient der Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität des Gewebes und erfüllt eine Vielzahl weiterer wichtiger Funktionen (Übersicht in Leblond und Inoue, 1989; Merker, 1994): So kann sie zum Beispiel im Nierenglomerulus oder in den Lungenbläschen als hochselektiver Substanzfilter dienen. Des Weiteren bestimmt sie die Polarität der angrenzenden Zellen. Sie beeinflusst damit den Zellstoffwechsel, die Proteinzusammensetzung in benachbarten Plasmamembranen und die Differenzierung dieser Zellen. Zusätzlich hat sie eine sehr wichtige Rolle in der Kontrolle der Auswanderung von Leukozyten aus dem Blut inne (Ratner, 1992; Pakianathan, 1994; Hunt *et al.*, 1996).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Aufrechterhaltung der Integrität der extrazellulären Matrix für die Struktur und Funktion eines lebenden Organismus absolut notwendig ist.

1.1.1 Die Bestandteile der extrazellulären Matrix

Die Makromoleküle der extrazellulären Matrix lassen sich in zwei Hauptklassen einteilen: Glycosaminoglykane und Faserproteine (Scott, 1995; Ayad *et al.*, 1998).

Glycosaminoglykane sind Polysaccharide, die meist gekoppelt an Proteine, also als Proteoglykane, vorliegen. Sie bilden aufgrund ihrer Ladungseigenschaften eine stark wasserhaltige, gelartige Grundsubstanz, in der die Faserproteine eingebettet sind und durch die Ionen, Nährstoffe, Metabolite und Botenstoffe diffundieren können (Oldberg *et al.*, 1990).

Die Klasse der Faserproteine lässt sich nochmals in Strukturproteine, wie Kollagen und Elastin, und in Adhäsionsmoleküle, wie Fibronectin und Laminin, unterteilen: Kollagenfasern, die den Hauptproteinbestandteil der extrazellulären Matrix darstellen, tragen zur Struktur und Widerstandsfähigkeit, Elastinfasern zur Elastizität bei (Rosenbloom *et al.*, 1993). Die Adhäsionsmoleküle vermitteln den Kontakt zwischen der extrazellulären Matrix und den in sie eingebetteten, bzw. den umgebenden Zellen (Sechler *et al.*, 1998).

1.2 Metabolischer Umbau der extrazellulären Matrix

Die geschilderte Komplexität der extrazellulären Matrix setzt ein aufwendiges System, welches für den zeitlich und räumlich koordinierten Auf-, Um- und Abbau der Matrixkomponenten sorgt, voraus. Die Makromoleküle der extrazellulären Matrix werden von den in sie eingebetteten Zellen sezerniert. Oft sind das spezialisierte fibroblastenartige Zellen, wie zum Beispiel die Chondroblasten im Knorpelgewebe oder die Osteoblasten im Knochen (Mosher *et al.*, 1992). Diese Aufbauprozesse sind eng verflochten mit dem Um- und Abbau der Matrixkomponenten. Die abbauenden Prozesse sind nicht weniger wichtig für die Entwicklung, Homöostase und Reparatur des Organismus. Die extrazelluläre Matrix stellt also kein statisches Gebilde dar, sondern ist Teil eines lebendigen Gewebes, das sich in dauerndem Umbau befindet.

Für die Reorganisation und Degradation der extrazellulären Matrix sind bislang fünf Wege bekannt. So können strukturelle Makromoleküle des interstitiellen Bindegewebes über einen Matrixmetalloproteinase-abhängigen, einen Plasmin-abhängigen oder über einen Leukozyten Serinproteinasen-abhängigen Stoffwechselweg abgebaut werden (Übersicht in Birkedal-Hansen *et al.*, 1993). In manchen Fällen kommt hier ein weitgehend von den anderen Prozessen abgekoppelter phagozytotischer Weg hinzu. Dieser beruht auf dem intrazellulären Verdau internalisierten Materials durch lysosomale Cathepsine (Melcher und Chan, 1981). Mineralisierte Matrices der Knochen-substanzen werden hingegen durch einen völlig anderen Mechanismus umgesetzt: Dieser sogenannte osteoklastische Stoffwechselweg basiert auf der Aktivität saurer Thiolproteinasen in einer abgeschlossenen Mikroumgebung auf der Matrixoberfläche (Vaes *et al.*, 1992).

Welcher der erwähnten Mechanismen beim Abbau eines spezifischen Makromoleküls zum Tragen kommt, hängt von mehreren Faktoren ab, die in erster Linie in der Struktur der Matrix begründet sind.

In jedem Fall erfordert der proteolytische Abbau der großen und soliden Matrixkomponenten zumindest einen initialen extrazellulären Fragmentierungsschritt (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993).

Da diese extrazelluläre Proteolyse jedoch in einer Umgebung stattfindet, in der ein molarer Überschuss an Plasma- und zellulären Proteinaseinhibitoren herrscht, ist die Kompartimentalisierung dieser Prozesse unumgänglich. Das bedeutet, dass das zu zerstörende Areal von der Umgebung abgegrenzt werden muß, bzw., dass die als aktive Komponenten beteiligten Proteinase selektiv an ihren Wirkungsort transportiert und dort auch gebunden werden müssen. Die Wichtigkeit dieser Kompartimentbildung wird am einfachsten verständlich im Falle des erwähnten osteoklastischen Knochenabbaus: Hier wird durch eine transiente Versiegelung der Knochenoberfläche ein abgeschlossene Umgebung geschaffen, innerhalb derer die Aktivität von sauren Thiolproteinase möglich ist (Vaes, 1988). Solche lokalen Kompartimentalisierungen werden dadurch unterstützt, dass die meisten Zellen die Abgabe der aktiven Komponenten durch vektorielle Transportmechanismen selektiv steuern können (Unemori *et al.*, 1990).

Ein weiterer Kontrollmechanismus ist die räumliche Fixierung der am Matrixumbau beteiligten Enzyme an ihrem Wirkungsort. So findet man oftmals sehr selektive Bindung von Proteinase an ihre Substrate. Beispiele hierfür sind die Bindung von Plasmin an Fibrin oder die sehr spezifische und von der katalytischen Aktivität unabhängige Wechselwirkung der Gelatinase mit Kollagen (Allen *et al.*, 1995; Banyai *et al.*, 1996). Weiterhin spielt bei solchen Lokalisierungsprozessen oftmals die Rezeptorvermittelte Affinität zu Zelloberflächen eine Rolle: So findet man zum Beispiel den Urokinasetyp-Plasminogenaktivator und auch verschiedenen Matrixmetalloproteinase lokalisiert auf der Oberfläche von Zellen (Plow *et al.*, 1986; Vassalli *et al.*, 1985; Vasalli und Pepper, 1994; Knäuper und Murphy, 1998).

1.3 Matrixmetalloproteinase

Die wahrscheinlich wichtigsten Prozesse, die zum Ab- und Umbau der extrazellulären Matrix führen, werden vermittelt durch die Gruppe der Matrixmetalloproteinase (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993; Woessner, 1998). Diese ständig wachsende Gruppe umfaßt zur Zeit mehr als zwanzig Enzyme, die aufgrund ihrer gemeinsamen funktionellen und strukturellen Eigenschaften in die eigenständige Familie der Matrixine eingeordnet werden (Jiang und Bond, 1992; Woessner, 1994).

Alle Matrixine enthalten das konservierte Aminosäuremotiv HexxHxxGxxH, welches der Komplexierung eines Zinkatoms im aktiven Zentrum dient und dem der sogenannte Met-turn folgt (siehe unten). Sie werden daher in die Überfamilie der Metzinkine eingeordnet, die wiederum eine Untergruppe der Metalloproteinase bilden (Bode *et al.*, 1994; Stöcker *et al.*, 1995, Bode *et al.*, 1996). Zu den Metzinkinen gehören außer den Matrixmetalloproteinase die Serralysine (bakterielle Protease aus *Serratia sp.*, *Pseudomonas sp.* und *Erwinia sp.*), die Adamlysine (auch Reprolysine oder ADAMs genannt) und die Astacine ("hatching enzymes", Meprine, Tolloide) (Woessner, 1994; Rawlings und Barret, 1995, Barret *et al.*, 1998, Woessner, 1998).

1.3.1 Domänenstruktur der Matrixmetalloproteinasen

Aufgrund ihres strukturellen Aufbaus können die bekannten Matrixmetalloproteinasen in verschiedene Typen eingeteilt werden: Es gibt die Minimaldomänen-Matrixmetalloproteinase(n), die Matrixmetalloproteinasen mit Hämoexin-ähnlicher Domäne, die Matrixmetalloproteinasen mit Transmembrandomäne und die Matrixmetalloproteinasen mit Fibronectin-ähnlicher Domäne. Eine schematische Darstellung dieses Aufbaus und eine Übersicht über alle Matrixmetalloproteinasentypen findet sich in Abbildung 1.

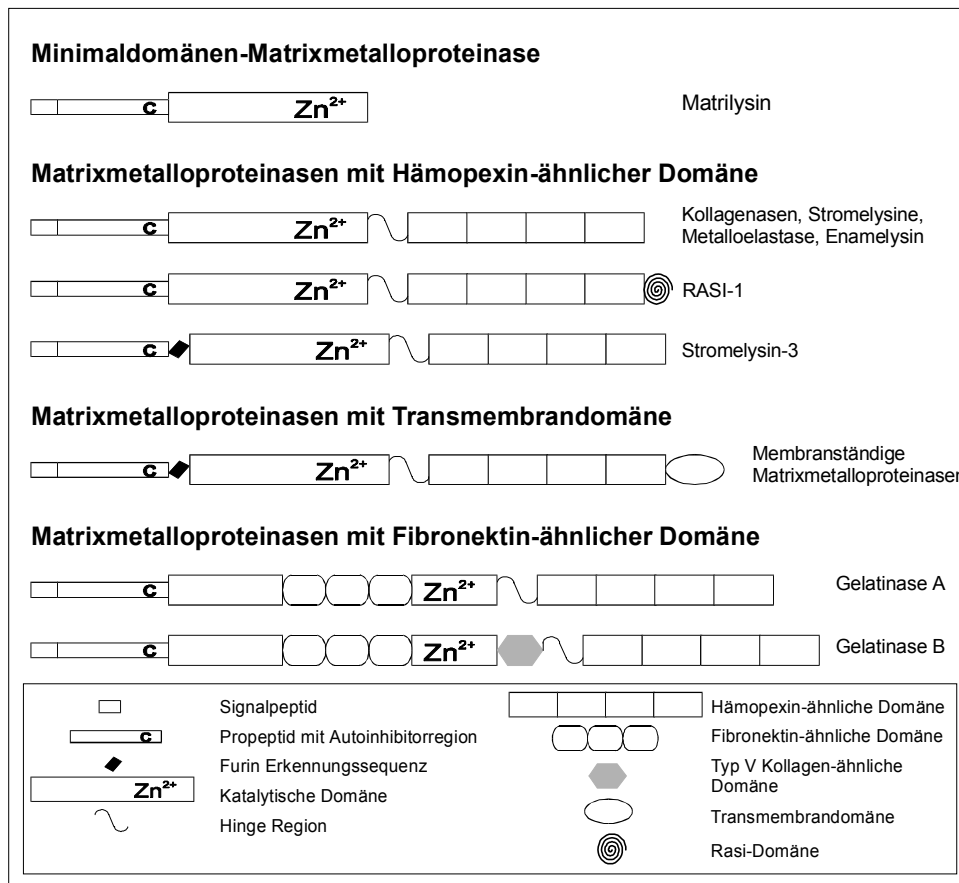


Abbildung 1 Domänenstruktur der Matrixmetalloproteinasen

Die Abbildung zeigt die Domänenstruktur der bekannten Mitglieder der humanen Matrixmetalloproteinasenfamilie. Die Funktion der einzelnen Domänen ist im Text beschrieben. (Abbildung adaptiert nach Tschesche und Farr, 1998).

Matrilysin repräsentiert die Minimalstruktur der Matrixmetalloproteinasen. Diese beinhaltet das N-terminale hydrophobe Signalpeptid, welches das inaktive Proenzym für den Transport in den Extrazellularraum markiert. Es umfaßt bei allen Matrixmetalloproteinasen 17 bis 20 Aminosäuren und wird während des Exports abgespalten. Die Autoinhibitorregion im nachfolgenden, aus etwa 80 Resten bestehenden Propeptid erhält über einen weiter unten beschriebenen Mechanismus die Latenz

des enzymatisch inaktiven Proenzym. Die proteolytische Abspaltung dieser Domäne bewirkt die physiologische Aktivierung der jeweiligen Matrixmetalloproteinase (Nagase, 1997).

Die 160 bis 170 Aminosäuren lange Katalytische Domäne komplexiert ein Zinkatom im aktiven Zentrum, indem die drei Histidine der hochkonservierten Sequenz "HExxHxxGxxHS/T" Bindungsstellen für dieses Zinkatom darstellen (Bode *et al.*, 1993). Eine vierte Ligandenbindungsstelle wird entweder durch ein für die Katalyse notwendiges H₂O-Molekül oder durch die Thiolgruppe eines einzelnen ungepaarten Cysteins vermittelt (Salowe *et al.*, 1992). Dieses Cystein befindet sich ca. 100-150 Aminosäuren N-terminal entfernt in der konservierten, Autoinhibitor genannten Propeptidsequenz PRCGVPD. Die Cystein-Zink-Bindung bewirkt die Verdrängung des katalytisch notwendigen H₂O-Moleküls. Außerdem führt sie zur Rückfaltung des Propeptids über die Katalytische Domäne und somit zur Blockade des Substratzugangs in das aktive Zentrum. Dieser in Abbildung 2 dargestellte Mechanismus wird mit dem Begriff "cysteine switch" umschrieben (Springman *et al.*, 1990, Van Wart und Birkedal-Hansen, 1990).

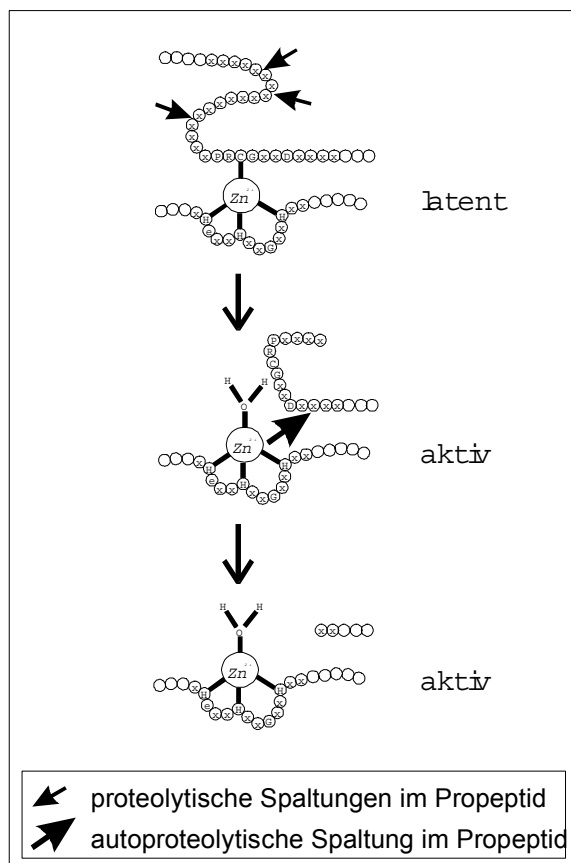


Abbildung 2 Aktivierungsmechanismus der Matrixmetalloproteinasen ("cysteine switch")

Erläuterung siehe nebenstehender Text.

Während der Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen wird das Propeptid meist schrittweise in sogenannten "bait"-Regionen gespalten (Pfeile in Abbildung 2). Dadurch wird die Interaktion zwischen dem Cystein und dem Zinkatom fortlaufend destabilisiert. Dies ermöglicht weitere proteolytische Spaltungen, bevor der letzte, oftmals autoproteolytische Schritt das gesamte autoinhibitorische Propeptid entfernt (Nagase, 1997). Welche Proteinase diese Aktivierungsschritte *in vivo* durchführen ist nicht in jedem Fall vollständig geklärt. Es wird hier von einer komplexen, sehr strikt regulierten Aktivierungskaskade ausgegangen, bei der mehrere lösliche und membrangebundene Proteasen, Proteaserezeptoren und -inhibitoren beteiligt sind. Zu den potentiell involvierten Proteinase gehören unter anderem der Urokinasetyp-Plaminogenaktivator, Plasmin, verschiedene Serinproteasen und Cathepsine. Des weiteren sind hier oftmals auch bereits aktivierte Matrixmetalloproteinase beteiligt (Vassalli und Pepper, 1994; Knäuper und Murphy, 1988).

Von den Membranständigen Matrixmetalloproteinasen (MT-MMPs) wird angenommen, dass sie eine zentrale Rolle in diesem Aktivierungsgeschehen spielen (Sato *et al.*, 1994). Außerdem wird spekuliert, dass bei Entzündungen ausgeschüttete bakterielle Proteasen diesen "cysteine switch" und damit die Aktivierung von endogenen Matrixmetalloproteinasen induzieren können (Matsumoto *et al.*, 1992; Burns *et al.*, 1996, Maeda *et al.*, 1998).

Außer der Minimaldomänen-Matrixmetalloproteinase Matrilysin verfügen alle anderen Enzyme dieser Familie über eine 200 Aminosäuren lange und aus vier Wiederholungen bestehende Hämopexin-ähnliche Domäne. Dieser Sequenzabschnitt spielt sowohl eine wichtige Rolle bei der Inhibitorbindung, als auch bei der Wechselwirkung mit den jeweiligen Substraten: Wird die Hämopexin-ähnliche Domäne künstlich entfernt, so bleibt zwar die katalytische Aktivität erhalten, die Substratspezifität wird allerdings in den meisten Fällen verändert (Sanchez-Lopez *et al.*, 1993; Murphy und Knäuper, 1997). Die Hämopexin-ähnliche Domäne ist über die 0 bis 75 Aminosäurereste umfassende Hingeregion mit der Katalytischen Domäne verknüpft.

Charakteristisch für die Membranständigen Matrixmetalloproteinasen ist eine zusätzliche C-terminale Transmembranhelix von 80 bis 110 Aminosäuren, die der Verankerung in der Zellmembran dient (Cao *et al.*, 1995).

Hinzu kommen sowohl bei den eben erwähnten, oberflächenassoziierten MT-MMPs, als auch bei Stromelysin-3 eine Furin Erkennungssequenz RXKR am Übergang vom Propeptid zur Katalytischen Domäne. Diese ermöglicht die Aktivierung der genannten Enzyme schon während des Sekretionsprozesses durch im Golgi Apparat lokalisierten Proproteinkonvertasen, wie zum Beispiel Furin (Smeekens, 1993; Pei und Weiss, 1995 und 1996; Sato *et al.*, 1996). Die physiologische Relevanz dieses Aktivierungsweges ist jedoch noch umstritten (Knäuper und Murphy, 1998).

Die beiden Gelatinasen zeichnen sich durch einen in die Katalytische Domäne eingeschobenen, ca. 170 Aminosäuren langen Sequenzabschnitt aus, der aus drei Wiederholungen einer Fibronectin Typ II ähnlichen Sequenz besteht. Dieser ist für die Bindung an Gelatin und damit für die Substratspezifität mitverantwortlich (Collier *et al.*, 1992; Strongin *et al.*, 1993).

Die Bedeutung der Typ V Kollagen-ähnlichen Domäne innerhalb der Hingeregion von Gelatinase B (MMP-9) ist bislang unklar. Sie scheint jedoch weder für die enzymatische Aktivität, noch für die Substratspezifität wichtig zu sein (Pourmotabbed, 1994).

Die Funktion der C-terminalen RASI Domäne ist noch ungeklärt.

1.3.2 Untergruppen der Matrixmetalloproteinasefamilie

Alle Mitglieder der Matrixmetalloproteinasefamilie besitzen neben ihrem Trivialnamen jeweils eine sogenannte MMP-Nummer. Diese systematische Nummerierung nach Nagase *et al.* (1992) wurde 1997 in der Gordon Konferenz als die gültige Bezeichnung für die Mitglieder der Matrixfamilie bestimmt. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die meisten bekannten Familienmitglieder. Die Einteilung in Untergruppen erfolgt nach mehreren Kriterien, zu welchen eine verwandte

Domänenstruktur (siehe Abbildung 1) , ähnliche Substratspezifitäten, sowie Sequenzhomologien zählen.

Bezeichnung	MMP-Nr.	M _r latent/aktiv	Anmerkungen / weitere Bezeichnungen
Kollagenasen			
Kollagenase 1	MMP-1	52000 / 42000	Interstitielle Kollagenase
Kollagenase 2	MMP-8	85000 / 64000	Neutrophilen Kollagenase
Kollagenase 3	MMP-13	52000 / 42000	Interstitielle Kollagenase der Nagetiere
Kollagenase 4	MMP-18	53000 / 42000	
Gelatinasen			
Gelatinase A	MMP-2	72000 / 66000	Typ IV Kollagenase
Gelatinase B	MMP-9	92000 / 84000	Typ V Kollagenase
Stromelysine			
Stromelysin-1	MMP-3	57000 / 45000	Transin
Stromelysin-2	MMP-10	54000 / 44000	Transin-2
Membranständige			
			Transmembrandomäne und RRKR Furin Spaltsequenz
MT1-MMP	MMP-14	66000 / 54000	
MT2-MMP	MMP-15	72000 / 60000	
MT3-MMP	MMP-16	64000 / 53000	
MT4-MMP	MMP-17	57000 / 53000	
Andere			
Matrilysin	MMP-7	28000 / 19000	Ohne Hämapexin-ähnliche Domäne
Stromelysin-3	MMP-11	64000 / 46000	RXKR Furin Spaltsequenz
Metalloelastase	MMP-12	54000 / 22000	Makrophagenelastase , verliert während der Aktivierung die Hämapexin-ähnliche Domäne
RASI	MMP-19	57000 / 46000	
Enamelysin	MMP-20	54000 / 22000	
Nicht Säuger			
Xenopus XMMP		70000 / 53000	Cystein in Katalytischer Domäne
Envelysin		63000 / 48000	Seeigel
Sojabohnen MMP		? / 19000	Proteinsequenzierung

Tabelle 1 Mitglieder der Matrixmetalloproteinasefamilie

Übersicht über die Mitglieder der Matrixmetalloproteinasefamilie. Die erste kürzlich isolierten Matrixmetalloproteinase 21-23 wurden nicht in die Tabelle aufgenommen. Die angegebenen Molekulargewichte beziehen sich auf die von der cDNA Sequenz abgeleiteten Proteinsequenz, Glykosylierung kann diese Werte erhöhen. Fett gedruckte Namen entsprechen denen, die die Internationale Vereinigung für Biochemie und Molekularbiologie (IUBMB) vorgeschlagen hat. Tabelle adaptiert nach Birkedal-Hansen *et al.* (1993) und Woessner (1998).

1.3.3 Die Substrate der einzelnen Matrixmetalloproteinasen

Tabelle 1 zeigt keine Auflistung der von den einzelnen Matrixmetalloproteinasen erkannten Substrate, wie sie sich zum Beispiel in Chandler *et al.* (1997) findet. Dafür gibt es zwei Gründe: Zum einen sind die Listen der *in vitro* erkannten und gespaltenen Matrixsubstrate für die meisten Matrixmetalloproteinase mittlerweile so lang, dass es nicht sinnvoll erscheint, diese Listen als relevant für die *in vivo* Situation zu betrachten, zum anderen gibt es nur sehr wenige Untersuchungen, die zeigen, dass ein bestimmtes Substrat *in vivo* wirklich von der jeweiligen Metalloproteinase gespalten wird.

Hinzu kommt, dass die *in vitro* analysierten Substrate nur einen Auszug aus den *in vivo* relevanten Molekülen darstellen, da die Auswahl dieser Substanzen oftmals durch ihre Verfügbarkeit limitiert wurde und auch immer noch wird. Des Weiteren gibt es oftmals große Diskrepanzen zwischen der konkreten Spaltungsstelle eines Matrixsubstrates *in vitro* und den beobachteten Spaltprodukten *in vivo*. Ein gutes Beispiel hierfür ist die Spaltung des Knorpel Proteoglycans Aggrecan. Der Abbau dieses Makromoleküls ist einer der wichtigen pathologischen Degradationsprozesse bei Osteo- und Rheumatoider Arthritis (Lark *et al.*, 1997). Es wurde gezeigt, dass Stromelysin-1 Aggrecan sehr schnell umsetzen kann und dass der Gehalt dieser Metalloproteinase im arthritischen Knorpel erhöht ist (Dean *et al.*, 1989; Gravallese *et al.*, 1991; Walakovits *et al.*, 1992). Aus diesem Grunde wurde lange angenommen, dass Stromelysin-1 eine zentrale Rolle bei der Pathologie der Osteoarthritis zukommt. In späteren Analysen wurde jedoch gezeigt, dass auch andere Matrixmetalloproteinasen genau dieselbe Reaktion durchführen können (Forsang *et al.*, 1996). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass die *in vivo* Spaltprodukte von Aggrecan nicht denen entsprechen, die nach *in vitro* Proteolysen mit Stromelysin-1 oder einer der anderen Matrixmetalloproteinasen auftraten (Sandy *et al.*, 1992, Flannery *et al.*, 1992; Forsang *et al.*, 1996) Daher wird heute davon ausgegangen, dass eine noch unbekannte Aggrecanase existieren muss.

Dieses Beispiel soll zeigen, wie schwierig es ist, die wirklich relevanten Substrate für einzelne Mitglieder der Matrixinfamilie zu ermitteln. Manche Autoren gehen heute sogar so weit, zu sagen, dass über die natürlichen Substrate der Matrixmetalloproteinasen nahezu nichts bekannt ist (Woessner, 1998).

Trotz der eben erläuterten Einschränkungen gibt es dennoch viele indirekte Hinweise in welchem Zusammenhang die einzelnen Matrixmetalloproteinasen eine physiologische, bzw. pathophysiologische Bedeutung haben (siehe auch Kapitel 1.3.4) und welche Molekülgruppen in diesem Zusammenhang als potentielle Substrate betrachtet werden können.

So geht man davon aus, dass die Kollagenasen natives, fibrilläres, tripelhelikales Kollagen spalten: Die von der interstitiellen Kollagenase (MMP-1) erkannte Spaltsequenz im Kollagen des Interstitiums scheint auch *in vivo* von keiner anderen Protease erkannt zu werden (Woessner *et al.*, 1998). Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass rekombinant ohne Hämopexin-ähnliche Domäne dargestellte neutrophile Kollagenase (MMP-8) zwar noch denaturiertes, jedoch kein natives Kollagen mehr spalten kann (Murphy und Knäuper, 1997).

Die Gelatinasen binden über ihre Fibronectin-ähnliche Domäne an Typ IV Kollagen, welches einen wesentlichen Bestandteil der Basalmembranen darstellt. Man geht davon aus, dass diese beiden Enzyme bei Umbauprozessen dieser extrazellulären Matrixschicht eine zentrale Rolle einnehmen (Yu *et al.*, 1998, Vu und Werb, 1998). So wurde zum Beispiel gezeigt, dass der Expressionslevel und die Aktivität beider Gelatinasen während der Transmigration von T-Zellen, bzw. eosinophilen Granulozyten durch die Basalmembran erhöht wird und dass diese Durchwanderung mit Metalloproteinaseinhibitoren gehemmt werden kann (Leppert *et al.*, 1995; Madri *et al.*, 1996; Okada

et al., 1997). Ähnliches gilt für die Invasion von Tumorzellen (Stetler-Stevenson, 1994; Yu *et al.*, 1998).

Die beiden sehr nahe verwandten Stromelysine -1 und -2 verdauen *in vitro* eine Vielzahl von Matrixkomponenten, jedoch kein tripelhelikales Kollagen. Beide Enzyme weisen ein sehr ähnliches Substratrepertoire auf, jedoch ist die katalytische Effizienz von Stromelysin-1 meist höher als von Stromelysin-2 (Nagase, 1998). Die Liste der erkannten Substrate umfaßt Proteoglykane und Glycoproteine wie Fibronectin, Tenascin, Vitronectin, Perlecan, Versican, Ovostatin, Nidogen, Substanz P, Insulin β Kette, sowie verschiedene andere Metalloproteinasen und vieles andere mehr (Übersicht in Nagase, 1998).

Der Name Stromelysin-3 für MMP-11 ist irreführend, da es keinen Anlass gibt dieses Enzym etwa aufgrund einer verwandten Domänenstruktur, Aminosäuresequenz oder überlappender Substratspezifitäten den beiden anderen Stromelysinen zuzuordnen. Dieser Name wurde von den Erstbeschreibern (Basset *et al.*, 1990) aufgrund eines Missverständnisses vergeben (Paul Basset, Straßburg, persönliche Mitteilung). Bisher konnte für Stromelysin-3 keine enzymatische Aktivität gegenüber Matrixkomponenten nachgewiesen werden (Parks und Mecham, 1998).

Der Name Matrilysin für MMP-7 soll verdeutlichen, dass diese verkürzte Matrixmetalloproteinase imstande ist, nahezu alle Matrixkomponenten zu spalten ("lysiere") (Wilson und Matrisian, 1998). In dieser Hinsicht gleicht Matrilysin am ehesten den beiden Stromelysinen-1 und -2.

Die Makrophagenelastase (MMP-12) wurde als nahezu ausschließlich von Makrophagen produziertes, Elastin abbauendes Enzym entdeckt (Shapiro *et al.*, 1992 und 1993). Mittlerweile hat es sich jedoch gezeigt, dass diese Matrixmetalloproteinase auch andere Substrate, wie zum Beispiel verschiedene Komponenten der Basalmembran spalten kann (Gronski *et al.*, 1997).

Den Mitgliedern der ständig wachsende Gruppe der MT-MMPs wird eine zentrale Rolle in der Aktivierungskaskade der anderen Matrixine zugewiesen (Knäuper und Murphy, 1998). MT1-MMP wurde als der lange gesuchte, von invasiven Tumorzellen exprimierte, membranständige Aktivator der Gelatinase A isoliert (Sato *et al.*, 1994). Auch den anderen MT-MMPs werden ähnliche Aufgaben zugewiesen. Neben dieser sehr wichtigen Rolle zeigen die MT-MMPs auch proteolytische Aktivität gegen Matrixkomponenten wie Gelatin, Typ I Kollagen und Fibronectin (Polette und Birembaut, 1998).

Enamelysin wird nur in den Zahnschmelz-bildenden Zellen (engl.: enamel organ) produziert und setzt Amelogenin, die Hauptprotein Komponente des Zahnschmelzes um (Bartlett *et al.*, 1996; Llano *et al.*, 1997).

Neben den genannten Molekülen der extrazellulären Matrix wurden in den letzten Jahren immer mehr Substratmoleküle für Matrixmetalloproteinasen gefunden, die keine Strukturkomponenten der extrazellulären Matrix darstellen. Dazu gehören Serinproteinaseinhibitoren, wie α_1 -Proteinase Inhibitor und α_1 -Antichymotrypsin oder Bindeproteine für Wachstumsfaktoren, wie das IGF Bindeprotein 3 (Desrochers *et al.*, 1992; Pei *et al.*, 1994; Gronski *et al.*, 1997; Ohuchi *et al.*, 1997).

Des Weiteren gibt es Hinweise, dass die proteolytische Bildung des sehr selektiv wirkenden Angiogeneseinhibitors Angiostatin von Matrixmetalloproteinasen katalysiert wird (Dong *et al.*, 1997; Patterson und Sang, 1997, Cornelius *et al.*, 1998). Der parakrin, bzw. autokrin auf die Expression von Kollagenase-1 wirkende Akutphasereaktant Amyloid A wird ebenfalls von Matrixmetalloproteinasen, wie Kollagenase-1 und Stromelysin-1 umgesetzt (Mitchell *et al.*, 1993). Die Gelatinasen schließlich werden für die Hydrolyse des Zelloberflächen Kohlenhydrat-Bindeproteins Galectin-3 verantwortlich gemacht, welches Zellwachstum und Differenzierung beeinflusst (Ochieng *et al.*, 1994).

Die physiologische Relevanz der genannten Spaltung von nicht-Matrixmolekülen durch Matrixine ist noch weitgehend unklar. Sie zeigt jedoch, dass den Matrixmetalloproteinasen höchstwahrscheinlich eine weitergehende Bedeutung zukommt, als noch vor wenigen Jahren angenommen wurde. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass die meisten dieser neuen Substrate regulatorische Moleküle in Prozessen darstellen, die schon zuvor mit Matrixmetalloproteinase Aktivität korreliert wurden. Bisher wurde jedoch angenommen, dass sich diese Aktivität hauptsächlich auf die Umsetzung von Struktur-molekülen beschränkt. Ein Prozess, der in diesem Zusammenhang im Augenblick sehr viel Beachtung erfährt, ist die Angiogenese, die in Kapitel 1.3.4 noch einmal dargestellt werden wird.

1.3.4 "Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases" (TIMPs)

Betrachtet man die Rolle der Matrixmetalloproteinasen beim Umbau der extrazellulären Matrix, so ist es genauso wichtig, auf eine Klasse ubiquitär vorkommender natürlicher Inhibitoren dieser Proteinasen einzugehen. Die sogenannten "Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases" (TIMPs), stellen eine Familie von mittlerweile vier verwandten Proteinen dar, die je nach Glykosylierung 20 bis 30 kDa groß sind. Ihre inhibitorische Wirkung entfalten sie über einen dem "cysteine switch" analogen Mechanismus: Die Carbonyl- und Aminogruppe der N-terminalen Aminosäure der TIMPs komplexiert das Zinkion im aktiven Zentrum der Matrixmetalloproteinasen und verhindert damit die Bindung des für die Katalyse wichtigen Wassermoleküls (Tschesche, 1998b). Der C-terminale Abschnitt der TIMP-Moleküle geht gleichzeitig eine Bindung mit der Hämopexin-ähnlichen Domäne der Matrixmetalloproteinasen ein, was die schon im nanomolekularen Bereich liegenden Dissoziationskonstanten um eine weitere Größenordnung verkleinert (Kleine *et al.*, 1993).

TIMPs werden oftmals von denselben Zelltypen exprimiert, die auch die Matrixmetalloproteinasen produzieren (Overall, 1994).

Die Wechselwirkung der Matrixine mit den TIMPs fügt der Regulation der enzymatischen Aktivität dieser Proteinasen eine weitere Stufe hinzu: Neben der Kontrolle der Genexpression und der proteolytischen Aktivierung der Proenzyme kann auch die Aktivität bereits aktivierter Enzyme durch Hemmung kontrolliert werden. Wobei auch die Produktion der Inhibitoren wiederum einer transkriptionellen Regulation unterliegt. Die schlussendliche proteolytische Degradation der extrazellulären Matrix ist also immer ein Produkt vieler Faktoren innerhalb eines fein abgestuften

Equilibriums zwischen aktivierten Proteinase und ihren Inhibitoren (Overall, 1994; Birkedal-Hansen, 1995; Gomez *et al.*, 1997).

Analog den Matrixmetalloproteinasen selbst, werden den TIMPs in jüngster Zeit neben der Hemmung der proteolytischen Aktivität immer mehr neue Aufgaben zugewiesen. So scheinen sie unter anderem mitogene und antiangiogene Aktivität zu besitzen (Takigawa *et al.*, 1990; Bertaux *et al.*, 1991; Hayakawa *et al.*, 1992; Moses, 1997). Dabei ist jedoch nicht klar, in wie weit diese Aktivitäten auf die Inhibition von Matrixmetalloproteinasen zurückgeführt werden können (Bodden *et al.*, 1994; Moses, 1997).

1.3.5 Physiologische und pathologische Bedeutung der Matrixmetalloproteinasen

Normal	Pathologisch
Entwicklung	Gewebezerstörung
Blastozysten Implantation	+ Rheumatoide Arthritis
Embryonalentwicklung	+ Osteoarthritis
Nervenwachstum	+ Tumorwachstum
Knorpelabbau in Wachstumsplatten	+ Metastasierung
Knochenwachstum	+ Decubitus Geschwür
Zahnschmelzreifung	+ Cornea Geschwür
Zahnbildung	+ Magengeschwür
	+ Zahnerkrankungen
Reproduktion	Fibrotische Erkrankungen
Endometrischer Zyklus	+/- Leberzirrhose
Ovulation	- Fibrotische Lungenerkrankungen
Luteolyse	- Otosclerose (Mittelohrverknöcherung)
Cervix Dilatation	+/- Arteriosklerose
Postpartum Uterusrückbildung	+ Multiple Sklerose
Morphogenese der Brustdrüse	+ Cystische Fibrose
Rückbildung der Brustdrüse	
Umbau fötaler Membranen	
Erhaltung	Schwächung der Matrix
Knochenumbau	+ Erweiterte Kardiomyopathien
Haarfollikelwachstum	+ Epidermolysis Bullosa
Wundheilung	+ Aortische Aneurysmen
Angiogenese	
Apoptose	
Nervenregeneration	
Makrophagenfunktion (z.B. Migration)	
Neutrophilenfunktion (z.B. Migration)	

Tabelle 2 Die physiologische und pathologische Bedeutung von Matrixmetalloproteinasen

Ein vorgestelltes "+" bedeutet, dass die jeweilige Erkrankung mit einer Erhöhung der proteolytischen Aktivität verbunden ist, ein "-" mit einer Erniedrigung. "+/-" bedeutet, dass diese Zusammenhänge nicht geklärt sind, bzw. dass eine Abhängigkeit vom Krankheitsstadium festgestellt wurde oder dass für einzelne Matrixmetalloproteinasen unterschiedliches Verhalten gezeigt wurde. Adaptiert und ergänzt nach Woessner (1998).

Wie in Kapitel 1.3.3 dargestellt, gibt es viele Unklarheiten bezüglich der natürlichen Substrate der einzelnen Matrixmetalloproteinasen. Trotz dieser Einschränkung steht die große physiologische und pathophysiologische Bedeutung dieser Proteinfamilie außer Frage.

Tabelle 2 zeigt eine Übersicht der biologischen und pathologischen Prozesse, bei denen von einer wichtigen oder sogar zentralen Rolle der Matrixmetalloproteinasen ausgegangen wird.

Wie oben erwähnt sind die Beweise für, bzw. Hinweise auf die Aktivität der einzelnen Matrixine bei diesen Prozessen meist nur indirekt. So wurde in vielen Fällen über *in situ* Hybridisierung oder Immunhistochemie die Expression der jeweiligen Proteinasen mit dem jeweiligen Vorgang, bzw. Krankheitsverlauf korreliert. Auch wurden vielfach spezifische Degradationsprodukte, wie z.B. bestimmte Kollagenfragmente als Hinweis auf eine Beteiligung der Matrixmetalloproteinasen herangezogen (Dodge *et al.*, 1991).

Analysen, die die Rolle einer spezifischen Matrixmetalloprotease in einem bestimmten Prozess detailliert und zweifelsfrei aufzeigen, sind relativ selten. Krane (1994) hat verschiedene Kriterien vorgeschlagen, nach denen der Beitrag einer einzelnen Matrixmetalloprotease in einem Umbauprozess belegt werden könnte. Neben spezifischen Inhibitoren und inhibitorischen Antikörpern wird hier unter anderem auch die Verwendung von transgenen und von knockout Mäusen genannt. Jedoch haben selbst solche Ansätze bisher nicht die in sie gesetzten Hoffnungen erfüllen können, da sie nur sehr selten klare Aussagen zuließen, bzw. nicht zu klar definierten Phänotypen führten.

1.3.5.1 Anwendung von Metalloproteinaseninhibitoren

Ein spezielles Problem, dass mit der Verwendung von artifiziellen Inhibitoren der Matrixmetalloproteinasen zusammenhängt, ist die Tatsache, dass die bisher verwendeten und auf Hydroxamat basierenden Hemmstoffe (Übersicht in Beckett und Whittaker, 1998) ungeeignet sind, zwischen den einzelnen Familienmitgliedern zu unterscheiden und zudem sogar neben den anvisierten Matrixmetalloproteinasen auch die Aktivität der erst viel später entdeckten Adamalysine inhibieren. Es ist somit unklar, ob die bei Verwendung solcher Inhibitoren beobachtete Reduktion der arthritischen Gelenkerzstörung (Conway *et al.*, 1995) oder die positiven Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf bei EAE-Mausmodellen der multiplen Sklerose (Gijbels *et al.*, 1994; Hewson *et al.*, 1995; Clements *et al.*, 1997) alleine auf die Inhibition der Matrixmetalloproteinasen zurückgeführt werden kann. Die eingesetzten Hemmstoffe haben in diesen Untersuchungen mit sehr großer Wahrscheinlichkeit auch zur Hemmung der damals noch nicht isolierte TNF α -Konvertase geführt (Moss *et al.*, 1997; Black *et al.*, 1997; Amour *et al.*, 1998). TNF α spielt jedoch eine zentrale Rolle im arthritischen Entzündungsgeschehen (Feldman *et al.*, 1996) und scheint auch an der Pathogenese der EAE beteiligt zu sein (Raine, 1995). Die beobachteten Effekte auf die Verläufe der beiden Erkrankungen könnten also zumindest zum Teil auch auf die Hemmung der TNF α -Konvertase zurückgeführt werden.

Trotz dieser Einschränkungen wird im Augenblick sehr viel Hoffnung in die Entwicklung neuer Inhibitoren gesetzt, wobei versucht wird eine neue Generation von Hemmstoffen zu entwickeln, die

spezifisch gegen einzelne Matrixmetalloproteinasen gerichtet sind. Solche Substanzen würden einen sehr großen Fortschritt für die Matrixmetalloproteinasen Forschung bedeuten. Die Hauptmotivation für die Entwicklung dieser Inhibitoren liegt jedoch in der erwarteten klinischen Anwendbarkeit. Im Augenblick werden verschiedene klinische Studien durchgeführt, die zeigen sollen, ob der Krankheitsverlauf bei Corneageschwüren, bei Osteo- und Rheumatoider Arthritis und bei verschiedenen Tumorerkrankungen durch die systematische Inhibition von Matrixmetalloproteinasen verbessert werden kann (Übersicht in Johnson *et al.*, 1998).

1.3.5.2 "Transgene und Knockout" Mäuse

Die bisher hergestellten transgenen und knockout Mäuse für Matrixmetalloproteinasen waren für viele in diesem Feld tätigen Wissenschaftler enttäuschend (Übersicht in Shapiro, 1997). Bei den vielfältigen Aufgaben, die diese Enzyme schon während der Embryonalentwicklung inne haben, wurden sehr dramatische Phänotypen, bis hin zur Letalität, vor allem bei den knockout Mäusen erwartet. Auch wurde angenommen, dass Matrixmetalloproteinasen knockout Mäuse aufgrund ihrer Aufgaben im weiblichen Reproduktionszyklus steril sein sollten. Jedoch sind Metalloelastase-, Matrilysin-, Stromelysin-1-, Gelatinase A- und Gelatinase B-negative Mäuse sowohl fertil als auch phänotypisch normal (Shipley *et al.*, 1996; Wilson *et al.*, 1997; Itoh *et al.*, 1997; Mudgett *et al.*, 1998; Vu *et al.*, 1998). Hierfür gibt es zwei Deutungen: Entweder besitzen die Matrixmetalloproteinasen nicht die angenommene Relevanz für Entwicklungsprozesse oder die von ihnen erfüllten Aufgaben sind so bedeutend, dass sie von "Backup-Prozessen" gesichert werden. Für die zweite Hypothese der funktionellen Redundanz spricht, dass weitergehende Untersuchungen der knockout Mäuse gezeigt haben, dass es durchaus zu Störungen in Entwicklungsprozessen kommt: So ist zum Beispiel die Wachstumsrate in Gelatinase A-negativen Mäusen um 15% erniedrigt (Itoh *et al.*, 1997). Es liegt also nahe anzunehmen, dass die entwicklungspezifischen Funktionen dieser Matrixmetalloproteinase durchaus vorhanden sind, aber durch andere Enzyme kompensiert werden können. Die Etablierung dieses kompensatorischen Prozesses resultiert in der beobachteten Verminderung der Wachstumsrate. Sehr gut ist das am Beispiel der Gelatinase B knockout Maus zu verfolgen (Vu *et al.*, 1998): Die Knochen des adulten Tiers sind phänotypisch weitgehend normal. Betrachtet man aber die embryonale Knochenbildung, so findet man hier sehr starke Defekte, die zu einem fehlerhaften Aufbau der Knochen führen. Diese Fehlentwicklungen sind jedoch schon drei Wochen postnatal nicht mehr sichtbar. Noch nicht weiter untersuchte Enzymsysteme scheinen hier eine Reparatur des Knochenaufbaus zu ermöglichen. In diesem Zusammenhang werden mit Spannung die ersten Mäuse erwartet, bei denen mehr als ein Matrixingen deletiert ist

Für das Verständnis der pathologischen Rolle der Matrixmetalloproteinasen haben die hergestellten knockout und zum Teil auch die transgenen Mäuse jedoch einen wertvollen Beitrag geleistet. Die analysierten Mäuse erkrankten zwar im Regelfall nicht spontan, jedoch findet man bei geeigneter Stimulierung durchaus pathologische Merkmale, die der jeweiligen vermuteten Rolle der

Matrixmetalloproteinasen entsprechen (Shapiro, 1997). So wurde gezeigt, dass Wildtypmäuse entsprechend dem Menschen als Reaktion auf Zigarettenrauch Lungenemphyse bilden, Metalloelastase knockout Mäuse zeigen dieses Krankheitsbild jedoch nicht (Hautakami *et al.*, 1997). Eine Erhöhung der pulmonären Emphyse wurde jedoch nach Überexpression der Kollagenase-1 in der Lunge beobachtet (D'Armiento *et al.*, 1992).

Viele dieser Untersuchungen stehen noch am Anfang, so dass der Ansatz der genetischen Manipulation der Matrixexpression höchstwahrscheinlich erst in den nächsten Jahren viele neue Ergebnisse liefern wird, vor allem auch, wenn wie erwähnt mehrere Mitglieder dieser oder auch verwandter Proteinasefamilien gleichzeitig manipuliert werden.

1.3.6 Pathophysiologie am Beispiel der Tumorprogression

Neben der Rolle der Matrixmetalloproteinasen bei der fortschreitenden Gelenk- und Knochenzerstörung in arthritischen Erkrankungen wird im Augenblick der Beitrag dieser Enzyme zum Wachstum und der Metastasierung von Tumoren sehr intensiv untersucht..

Die aktuellen Techniken der Tumorthherapie, wie Operation, Bestrahlung, Chemo- und Hormontherapie basieren auf Konzepten, die vor über 10 bis 20 Jahren entwickelt wurden. Innerhalb dieser Ansätze gab es immer wieder Verbesserungen, ein wirklicher Durchbruch konnte jedoch nicht erreicht werden. Im Augenblick existieren jedoch drei experimentelle Bereiche, aus denen grundlegend neue Therapieformen entwickelt werden könnten. Diese umfassen zum einen Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren, zum anderen die Aktivität von Proteinasen bei Tumorwachstum und Metastasierung und zuletzt die Angiogenese. In den letzten beiden Bereichen scheinen Matrixmetalloproteinasen eine wichtige Rolle zu spielen. Einmal findet man Tumorprogression, also die Ausbreitung von Tumorzellen assoziiert mit der Expression dieser Proteinasen, zum zweiten wird immer mehr klar, dass Matrixmetalloproteinasen auch bei angiogenetischen Prozessen unabdingbar sind (Auerbach und Auerbach, 1994; Moses 1997; Yu *et al.*, 1997).

Das Verhalten der einzelnen Matrixmetalloproteinasen variiert sehr stark mit Tumortyp und Stadium der Tumorerkrankung. Zusammengefasst und vereinfacht aus einer Vielzahl von Publikationen ergibt sich jedoch folgendes Bild: Im Stromagewebe, welches den Tumor umgibt, findet sich eine signifikant erhöhte Expression der Kollagenasen, der Gelatinasen und von Stromelysin-3; Matrilysin hingegen wird fast ausschließlich von den neoplastischen Tumorzellen selbst exprimiert. Die Lokalisierung der ebenfalls stark erhöht exprimierten MT-MMPs ist noch nicht eindeutig geklärt (Übersichten in Mignatti und Rifkin, 1993; Crawford und Matrisian, 1994; Yu *et al.*, 1997).

Die Prognose der Tumorerkrankung ist oftmals an den Expressionslevel der einzelnen Matrixmetalloproteinasen geknüpft: Eine hohe Expression bedeutet meist eine schlechte Prognose. Des weiteren findet man auch eine Korrelation des Metastasierungspotentials mit der Höhe der Matrixexpression (Übersicht über ein Vielzahl von Studien in Yu *et al.*, 1997).

Angiogenese ist einer der zentralen Prozesse beim Wachstum von Tumoren, da ohne die Neubildung von Blutgefäßen eine Versorgung des Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen nicht möglich ist und die Tumorgöße damit auf weniger als einen halben Millimeter beschränkt bleiben würde. Hemmung der Angiogenese stellt damit einen vielversprechenden Ansatz bei der Bekämpfung des Tumorstwachstums dar. Hinzu kommt, daß die Neubildung, bzw. das Wachstum von Blutgefäßen im adulten Organismus sehr selten ist, so daß eine Hemmung dieses Prozesses nur wenige Nebenwirkungen mit sich bringt (Hanahan und Folkman, 1996).

Der Prozess der Angiogenese ist sehr komplex (Übersichten in Auerbach und Auerbach, 1994; Cockerill *et al.*, 1995; Folkman, 1995; Folkman und D'Amore, 1996). Dabei kommt es zu einem Zusammenspiel von Adhäsionsfaktoren, wie dem $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, von Wachstumsfaktoren, wie VEGF ("vascular endothelial growth factor"), von Inhibitoren wie Angiostatin, sowie dem proteolytischen Umbau des zu vaskularisierenden Gewebes. Hier scheint die Aktivität der Matrixmetalloproteinasen einer der bestimmenden Faktoren zu sein, so dass versucht wird über synthetische Proteinaseinhibitoren die Tumorgöße zu beschränken (Moses, 1997; DeClerck *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 1997). Interessanterweise ist die Rolle der Matrixmetalloproteinasen bei der Angiogenese nicht nur auf die Proteolyse der umgebenden Extrazellulärmatrix beschränkt, sondern zumindest die Gelatinase A scheint auch in regulatorischen Prozessen während des Gefäßwachstums involviert zu sein (Brooks *et al.*, 1998).

1.4 Die Matrixmetalloproteinase RASI (MMP-19)

Die vorangegangenen Kapitel haben gezeigt, wie komplex und vielseitig und vor allem auch wie ungenügend verstanden die Rolle der Matrixmetalloproteinasen in einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen ist. Die Entdeckung eines neuen, zu keiner der bisher bekannten Untergruppen gehörenden Familienmitglieds, nämlich der Matrixmetalloproteinase RASI (MMP-19), stellte in diesem Zusammenhang eine große Überraschung dar (Mauch, Diplomarbeit 1996; Sedlacek, Dissertation 1996; Patentanmeldung (Krawinkel, Mauch und Sedlacek), 1996; ; Cossins *et al.*, 1996; Pendas *et al.*, 1997).

1.4.1 Isolierung des Autoantigens RASI (MMP-19)

RASI (MMP-19) wurde erstmals in einer Studie entdeckt, die darauf abzielte, neue mit Rheumatoider Arthritis assoziierte Autoantigene zu identifizieren und zu isolieren (Mauch, Diplomarbeit 1996; Sedlacek, Dissertation 1996; Patentanmeldung (Krawinkel, Mauch und Sedlacek), 1996; Sedlacek *et al.*, 1998).

Rheumatoide Arthritis (RA) stellt mit einer Prävalenz von einem Prozent weltweit und einer jährlichen Inzidenz von drei pro 10.000 erwachsenen Personen eine relativ häufige Erkrankung dar und die Mortalität der RA-Patienten ist gegenüber der Normalbevölkerung deutlich erhöht (Linos *et al.*, 1980, Fye und Sack, 1994). Die Ursache der RA ist immer noch unbekannt. Man geht heute von der

Koinzidenz genetischer, infektiöser und hormoneller Faktoren aus, welche zur Krankheitsentstehung beitragen (Feldmann *et al.*, 1996b). Die genetische Komponente bezieht sich in erster Linie auf bestimmte HLA-Klasse-II-Gene, nämlich die HLA DR1 und DR4 β -Ketten. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass sie ein bestimmtes Sequenzmotiv, das sogenannte shared epitope (QK/RRAA), innerhalb der dritten hypervariablen Region tragen (Nepom, 1991; Winchester, 1994). Das Vorhandensein dieser Allele ist zwar weder zwingend noch hinreichend für die Entwicklung der RA, die Wahrscheinlichkeit an RA zu erkranken und vor allem auch die Schwere der Erkrankung nimmt jedoch mit dem Vorhandensein dieser HLA-Typen zu (Fye und Sack, 1994). Des Weiteren scheinen auch Gene, die für bestimmte T-Zellrezeptoren oder für bestimmte Allotypen von Immunglobulinketten kodieren, an der Entstehung, bzw. am Verlauf der RA beteiligt (Hillert und Olerup, 1992, Gold, 1994, Zarnowski *et al.*, 1986). Zusammen mit dem Vorkommen einer spezifischen Klasse von Autoantikörpern gegen die Fc-Region der Immunglobuline, den sogenannten Rheumafaktoren, bei 75% der RA Patienten, zeigen alle diese genetischen Komponenten eine wichtige Rolle des Immunsystems bei der Pathogenese der RA auf (Fye und Sack, 1994). Man geht deswegen davon aus, dass zumindest einem Teil der pathologischen Vorgänge bei der RA Autoantigen-getriebene Prozesse zugrunde liegen. Trotz vieler Versuche, war es jedoch bisher nicht möglich, Autoantigene zu isolieren, die für die RA spezifisch waren.

In unserer Arbeitsgruppe wurde versucht, neue, RA-assoziierte Autoantigene zu isolieren, indem eine Expressions-cDNA-Bank aus Zellen der Synovialmembran einer RA-Patientin erstellt und mit gereinigten IgG-Antikörpern derselben Patientin durchsucht wurde (Sedlack *et al.*, 1998). Einer der isolierten cDNA Klone kodierte für ein 144 Aminosäuren großes Proteinfsegment, welches Homologien zu Hämapexin aufwies. Aus einer cDNA Bank, erstellt aus peripheren mononukleären Blutzellen, wurden vollständige cDNAs von 2223, bzw. 3222 Basenpaaren isoliert. Beide kodieren für dasselbe, bis dahin unbekanntes 508 Aminosäuren umfassende Protein RASI (Simon Mauch, Diplomarbeit 1996). Sequenzvergleiche mit bekannten Proteinen ergaben eine signifikante Ähnlichkeit mit den Mitgliedern der Matrixinfamilie, in welche RASI als MMP-19 eingeordnet wurde (siehe Kapitel 1.4.2). Die Frage, ob RASI (MMP-19) als ein für die RA spezifisches Autoantigen betrachtet werden kann, ist noch nicht abschließend geklärt. Sie ist Teil einer im Augenblick laufenden Promotionsarbeit in unserer Arbeitsgruppe. Bislang konnte jedoch schon gezeigt werden, dass Seren von RA-Patienten RASI (MMP-19) erkennen. Das heißt, dass diese neue Matrixmetalloprotease also zumindest ein RA-assoziiertes Autoantigen darstellt (Sedlacek, 1998; Patentanmeldung (Krawinkel, Mauch und Sedlacek), 1996).

RASI (MMP-19) ist die erste Proteinase und vor allem auch die erste Matrixmetalloproteinase, die als Ziel der arthritischen Immunantwort beschrieben wurde. Es wird davon ausgegangen, dass Mitglieder dieser Enzymfamilie wichtige Mitverursacher der arthritischen Gelenkzerstörung sind (Johnson *et al.*, 1998). Das heißt, dass RASI (MMP-19) also einerseits als Autoantigen eine Art "Opfer" der pathologischen Vorgänge bei RA darstellt, auf der anderen Seite ist die Matrixmetalloproteinase RASI

(MMP-19) gleichzeitig ein potentieller "Täter", der unter Umständen direkt zur arthritischen Gelenkerstörung beiträgt. Dieser Dualismus lässt interessante Arbeitshypothesen über die Rolle der Autoimmunantwort bei der RA zu: Vielleicht ist die Autoimmunantwort in diesem Fall eine Abwehr des Organismus gegen schädliche, bzw. fehlregulierte körpereigene Enzyme, stellt also eine sinnvolle Reaktion auf einen vorgeschalteten Krankheitsprozess dar. Um eine solche Arbeitshypothese zu überprüfen, ist es unabdingbar, die biologische und damit auch potentielle pathologische Rolle der Matrixmetalloproteinase RASI (MMP-19) zu verstehen.

1.4.2 RASI ist die Matrixmetalloproteinase-19

Obwohl RASI (MMP-19) nur etwa 30% Sequenzidentität, bzw. 50% Ähnlichkeit zu den anderen Matrixmetalloproteinasen zeigt und damit relativ weit entfernt von anderen Familienmitgliedern steht, konnte dieses 508 Aminosäuren umfassende Enzym eindeutig der Matrixinfamilie zugeordnet werden. Die Einordnung als MMP Nummer 19 wurde von Pendas *et al.* (1997) vorgenommen und entspricht der nach der Gordon Konferenz (1997) gültigen Zählweise (Woessner, 1998). Der Name RASI bezieht sich auf das ursprünglich entdeckte Autoantigen und es ist bisher nicht klar, ob sich dieser Name als Trivialname für MMP-19 durchsetzen wird. Aus diesem Grunde wird die Bezeichnung der Metalloproteinase RASI im folgenden MMP-19 lauten.

Wie in Abbildung 1 schematisch dargestellt wurde, besitzt MMP-19 die für Matrixmetalloproteinasen typische Domänenstruktur, bestehend aus Signalpeptid, Propeptid, Katalytischer Domäne, Hingeregion und Hämopexin-ähnlicher Domäne. Zusätzlich zu den bekannten Domänen weist MMP-19 eine C-terminale Sequenz von 30 Aminosäuren auf. Diese leicht hydrophobe RASI-Domäne zeigt weder signifikante Homologie zu Mitgliedern der Matrixinfamilie, noch zu anderen bekannten Proteinstrukturen. Die Funktion dieser Domäne ist bisher noch unbekannt.

Als weiteres auffälliges Strukturmerkmal besitzt MMP-19 eine markante Sequenzabweichung innerhalb der Autoinhibitor Region. Wie in Kapitel 1.3.1 dargestellt, ist diese Sequenz wichtig, um durch Maskierung des aktiven Zentrums die sezernierten Proenzyme inaktiv zu halten. Die bisherige Konsensussequenz wurde mit PRCGVPD beschrieben. MMP-19 zeigt zwei Abweichungen innerhalb dieser Region: PRCGLED - Valin ist ersetzt durch Leucin und Prolin durch Glutamat. Die Konsequenzen dieser Substitution sind noch unklar, da bisher noch keine Daten zur enzymatischen Aktivität, bzw. zur Aktivierung von MMP-19 vorliegen. Es konnte jedoch für andere Matrixmetalloproteinasen gezeigt werden, dass Aminosäure Substitutionen in diesem Bereich zum Teil sehr drastische Auswirkungen auf die Latenz haben und zur Aktivierung der Proenzyme führen können (Sanchez-Lopez *et al.*, 1988; Windsor *et al.*, 1991; Park *et al.*, 1991). Es ist also durchaus möglich, dass diese Substitutionen bei MMP-19 einen Einfluss auf die Aktivierung dieses Enzyms haben. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang eine spontane autoproteolytische Aktivierung.

Die Hingeregion, die den Übergang von der Katalytischen zur Hämopexin-ähnlichen Domäne darstellt und die Rückfaltung dieser Domäne auf die Katalytische erlaubt (Woessner, 1994), weist ein negativ

geladenes Cluster von sechs Glutamatresten und einem Aspartatrest auf (VIRDEEEEETEL), welches in dieser Form bei keiner der anderen Matrixmetalloproteinasen anzutreffen ist. Auch dieser Abschnitt konnte bisher noch keiner speziellen Funktion zugeordnet werden.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass MMP-19 zwar eindeutig zur Matrixinfamilie gerechnet werden kann, aber neben einer relativ geringen Ähnlichkeit zu den anderen Familienmitgliedern einige strukturelle Besonderheiten aufweist, wie auch in dieser Arbeit noch einmal ausführlich dargelegt werden wird.

Ziel der hier vorliegenden Doktorarbeit war es, erste Daten über die Expression, die subzelluläre Lokalisierung und über mögliche Interaktionspartner von MMP-19 zu erstellen, um Ansatzpunkte zu finden, wie MMP-19 in das komplexe Bild der Matrixinfamilie in ihrer Rolle im Umbau der extrazellulären Matrix einzuordnen ist.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Die verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Lösungsmittel waren von p.A. Qualität oder von der jeweils kommerziell höchst erhältlichen Reinheit. Die Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Roth, Sigma, ICN oder Merck bezogen. Doppelt destilliertes Wasser (DDW) wurde durch zweistufige Destillation gewonnen. Kunststoffreaktions- und Zentrifugationsgefäße stammten von den Firmen Biozym (Hess. Oldendorf), Eppendorf (Hamburg) und Greiner (Frickenhausen). Radiochemikalien wurden von den Firmen ICN ($\alpha^{35}\text{S}$ -dATP, Tran ^{35}S -label) und Pharmacia-Amersham ($\alpha^{35}\text{S}$ -Methionin) bezogen. Röntgenfilme stammten von Kodak (BioMax Light) oder von Pharmacia-Amersham (Freiburg) (Hyperfilm MP).

2.1.1 Zellkulturreagenzien und Gefäße

Zellkulturmedien und Zusätze wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Bibco BRL (Standardmedien und Zusätze), Sigma (Zusätze) und ICN (Serumfreie Medien und Zusätze) bezogen. Zellkulturgefäße stammten von der Firma Greiner. Ultra Low Attachment Platten wurden von Costar bezogen.

2.1.2 Enzyme und Reagenzien für die Molekularbiologie

Die verwendeten Enzyme stammten, wenn nicht anders angegeben, von NEB (Schwalbach). Taq-DNA-Polymerase war von Appligene-Oncor (Heidelberg), Pfu- und Turbo-Pfu-DNA-Polymerase von Stratagene (Heidelberg), SuperscriptII™ Reverse Transkriptase von Bibco BRL. DNA- und Protein-Größenstandards stammten von Bibco BRL, bzw. Pharmacia-Amersham (Freiburg). Desoxynukleotidtriphosphate und Nukleotidtriphosphate waren von AGS (Heidelberg), bzw. von Pharmacia-Amersham.

ProteinA-Sepharose war von Pharmacia-Amersham.

Bestandteile für Bakterien- und Hefemedien waren von Difco (Heidelberg).

Oligonukleotide stammten von MWG-Biotech (München), BIG-Biotech (Freiburg) oder von Pharmacia-Amersham (Freiburg).

Die verwendeten *E.coli* Stämme XL1- und XL2-blue MRF^c, sowie SOLR und XLOR waren von Stratagene.

2.1.3 Antikörper

Peroxidase, Cy3, PE und FITC gekoppelte anti-Kaninchen und anti-Maus IgG stammten von Dianova (Hamburg). Anti-HA-Antikörper wurden von Boehringer Mannheim (Mannheim) bezogen. Kaninchen anti-LexA Antikörper wurden freundlicherweise von Dr. Erika Golemis (Fox Chase Cancer Center,

Philadelphia, U.S.A.) zur Verfügung gestellt. Hybridomzellen die den Maus monoklonalen anti-MMP-19-Antikörper produzieren und der Kaninchen anti-MMP-19 Antikörper (Kolb *et al.*, 1997) wurde von Dr. Cornelia Kolb und Dr. Radislav Sedlacek (Universität Konstanz) zur Verfügung gestellt.

2.2 molekularbiologische Standardtechniken

Zur Manipulation und Analyse von Nukleinsäuren, Proteinen, *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* kamen Standardtechniken zum Einsatz, die ausführlich unter Ausubel *et al.* (1993) und Maniatis *et al.* (1982) beschrieben sind. Dort sind auch die verwendeten Lösungen und Puffer aufgeführt. Im folgenden sind nur jene Techniken ausführlich aufgeführt, die von den dort beschriebenen Techniken abweichen, bzw. die eigene Weiterentwicklungen enthalten.

2.2.1 Plasmidpräparation

In *E.coli* propagierte Plasmide wurden nach Modifikationen des alkalischen Lyse Protokolls (Birnboim, 1983) isoliert.

2.2.1.1 Plasmidminipräparation aus *E.coli*

Plasmidminipräparationen wurden nach einer geringen Modifikation der TENS-Methode (Zhou, 1994) durchgeführt.

2.2.1.2 Plasmidmaxipräparation aus *E.coli*

Bei Plasmidmaxipräparationen wurden die Plasmide durch eine zweistufige alkalische Lyse isoliert und durch eine anschließende PEG-Fällung gereinigt (Ausubel *et al.*, 1993). Nach diesem Protokoll gereinigte Plasmide konnten direkt zur Transfektion eukaryontischer Zellen eingesetzt werden.

2.2.1.3 Plasmidminipräparation aus *S.Cerevisae*

In Hefe propagierte Plasmide wurden nach der Glaspartikel Prozedur isoliert (Klekamp und Weil, 1982).

2.2.2 Hocheffiziente Transformation von *E.coli*

Um die Effizienz bei Transformationen von *E.coli* XL2-blue-MRF' zu maximieren wurden ultrakompetente *E.coli* nach einer Adaption der Methode von Inoue *et al.* (1990) hergestellt und bei –70°C in Aliquoten gelagert. Zur Transformation wurden jeweils 40 µl kompetente Bakterien aufgetaut, auf 25 mM β-Mercaptoethanol eingestellt, 10 Minuten auf Eis inkubiert und mit 0,1-1 µl einer Plasmidlösung, bzw eines Ligationsansatzes versetzt. Nach einer weiteren Inkubation für 30 Minuten auf Eis folgte ein Hitzeschock von exakt 45 Sekunden bei 42°C. Nach 2 minütigem Abkühlen auf Eis wurde 400 µl LB Medium zugegeben und der Ansatz für 30-60 Minuten unter ständigem Vermischen bei 37°C inkubiert. Jeweils 10 und 200 µl dieses Ansatzes wurden anschließend auf LB Agarplatten

mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und bei 37°C inkubiert, bis Einzelkolonien sichtbar wurden.

2.3 RNA-Isolierung

Gesamt-RNA wurde je nach Gewebe oder Zelltyp nach einer Modifikation der sauren Guanidiumthiocyanat-Phenol-Chloroform Methode (Chomczynski und Sacchi, 1987) (RNAzolB, Wak Chemie) oder mithilfe einer CsCl-Zentrifugation isoliert (Ausubel *et al.*, 1993).

Die Extraktion polyadenylierter mRNA wurde mit dem Oligotex-System durchgeführt (Qiagen, Hilden).

RNA wurde je nach späterer Anwendung in DDW bei -70°C, als Ethanolpräzipitat bei -20°C oder in deionisiertem Formamid bei +4 bis -20°C gelagert. Die Lagerung in Formamid wurde bevorzugt, da eigene Versuche gezeigt haben, dass RNA unter diesen Lagerbedingungen extrem stabil war, dass sie sehr hoch konzentriert gelöst werden konnte (bis zu 4 mg/ml) und dass sie ohne Probleme direkt in Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR) Reaktionen eingesetzt werden konnte. Eine Rückgewinnung der RNA aus der Formamidlösung war jederzeit über eine einfache Ethanolpräzipitation möglich.

Die Integrität der RNA wurde im 1% Agarosegel mit denaturierendem Ladepuffer (90% Formamid) überprüft. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt und im Gel bestätigt. Alle RNA-Präparationen wurden in der PCR auf genomische DNA Rückstände überprüft, indem 100 ng RNA mit Primern spezifisch für das in mehreren Kopien im Genom vorkommenden Haushaltsgens Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) (2.4.1) einer PCR-Amplifikation über 25 Zyklen unterzogen wurde.

2.4 Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde sowohl qualitativ, als auch semiquantitativ analytisch und für cDNA-Klonierungen eingesetzt. Die verwendeten Protokolle waren Variationen des folgenden Standardprotokolls: Reaktionspuffer nach Angaben des Herstellers der Polymerase, jeweils 0,5 nM der beiden PCR-Oligonukleotidprimer, 0,2 mM aller vier dNTPs und 0,1-5 Units/100 µl der verwendeten thermostabilen Polymerase. Die Reaktionen wurden auf einem Prem Thermocycler (LEP Scientific) oder auf einem PCR System 9700 (Perkin Elmer) durchgeführt. Denaturierungs-, Primeranlagerungs- und Strangverlängerungszeiten wurden der jeweiligen Fragestellung angepasst. Die Denaturierung wurde üblicherweise bei 94-95°C und die Strangverlängerung bei 72°C durchgeführt. Die optimalen Primeranlagerungstemperaturen wurden ausgehend von den theoretischen Anlagerungstemperaturen experimentell optimiert, wobei diese nach folgender Gleichung bestimmt wurden: $TM = 81,5 + 16,6 \times \lg[J^+] + 0,41 \times (\% G+C) - (500/L) - 0,63 \times (\% FA)$

$[J^+]$ = Konzentration der monovalenten Kationen in der PCR; L = Länge des Oligonukleotidprimers; (% G+C) = G-C-Gehalt des Oligonukleotidprimers; (% FA) = Formamidanteil in der PCR.

Abweichungen vom PCR-Standardprotokoll werden im folgenden nur dann gesondert angegeben, wenn sie essentielle Veränderungen darstellen.

2.4.1 Semiquantitative RT-PCR zur MMP-19 Genexpressionsanalyse

Die MMP-19 Genexpression wurde auf Ebene der mRNA mit einer semiquantitativen zweistufigen Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) analysiert. Eine 30µl cDNA-Synthese Reaktion enthielt 1µg Gesamt-RNA, 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.5 mM aller 4 dNTPs, 20 U RNAGuard (Pharmacia-Amersham), 200 U Superscript II Reverse Transkriptase und 0.5 mg oligo(dT)₁₂₋₁₈ (Pharmacia-Amersham). Nach Erhitzen der RNA für 5 min auf 70°C, wurde sie auf Eis abgekühlt und dann nach Zugabe der restlichen Reaktionskomponenten für 50 min bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 15 minütiges Erhitzen auf 70°C abgestoppt. Die synthetisierte cDNA wurde bei 4°C oder bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Semiquantitative multiplex PCR-Reaktionen wurden in 100 µl Volumen durchgeführt. Jede Reaktion enthielt als Templat 3 µl der synthetisierten cDNA, was einem Gehalt von 100 ng Gesamt-RNA entspricht, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 0,2 mg/ml BSA, 0.2 mM aller 4 dNTPs, 2.5 U Taq-Polymerase (Appligene Oncor) und 0.5 µM MMP-19-spezifischer Oligonukleotidprimer (5'-TGCCACAGAACCCAGTCC-3' und 5'-GGTATTCCCACCTGATGGGGTAG-3'). Die Primer und die cDNA wurden von den anderen Reaktionskomponenten durch eine Paraffinwachsschicht getrennt was eine Vermischung erst beim ersten Denaturierungsschritt ermöglichte (hot start). Jeder PCR-Zyklus bestand aus einem Denaturierungsschritt bei 94°C für 45 sek, einem Anlagerungsschritt bei 62°C für 45 s und einer Strangverlängerung bei 72°C für 1 min. 5 µl des GAPDH spezifischen Primerpaars (jeweils 10 µM) (5'-ACCATCTTCCAGGAGCGAG-3' und 5'-ACGTTGGCAGTGGGGACAC-3') wurden nach 10 PCR-Zyklen zum Reaktionsgemisch zugegeben und die Reaktion wurde für weitere 19 Zyklen fortgesetzt. Jeweils 20 µl der Amplifikate wurden auf einem 2% TBE-Agarosegel aufgetrennt, im Ethidiumbromidbad gefärbt und fotografisch dokumentiert. Die erwarteten Größen der PCR-Produkte waren: 628 bp für MMP-19 und 498 pp für GAPDH. Die MMP-19-spezifischen Primer sind Intron überspannend (Daten nicht gezeigt und Markus Müller, persönliche Mitteilung).

1.4.3 Direkte PCR zum Nachweis von Plasmiden in bakteriellen Kolonien

Um die Anwesenheit und korrekte Größe von Insertionen in rekombinanten Plasmiden schon in bakteriellen Einzelkolonien zu testen, wurden analytische Kolonie-PCR Reaktionen durchgeführt. Mit einer Pipettenspitze wurde die bakterielle Kolonie direkt von der Wachstumsplatte in ein bereitstehendes PCR-Reaktionsgefäß überführt, welches bereits 20µl einer vollständigen PCR-Reaktionsmischung enthielt. Um Replikas der analysierten Kolonie zu erhalten, wurde sie anschließend mit derselben Pipettenspitze auf einer weiteren Wachstumsplatte ausgestrichen.

Die PCR-Reaktion wurde im Regelfall mit 25 Zyklen und entsprechend dem Primerpaar gewählten Temperaturen durchgeführt.

1.4.4 Klonierung von PCR-Produkten

Subklonierung des offenen Leserasters der MMP-19 cDNA, bzw. von MMP-19 Teilsequenzen wurden im Regelfall mittels PCR durchgeführt, da dieses Vorgehen das Einfügen passender Restriktionsschnittstellen oder neuer Sequenzabschnitte erlaubt, indem die entsprechenden Schnittstellen, bzw. Sequenzen in die verwendeten Oligonukleotidprimer integriert wurden.

Um die Fehleranzahl in den PCR-Produkten möglichst gering zu halten wurde die ansonsten übliche Taq-DNA-Polymerase durch die von Stratagene erhältliche Pfu Polymerase ersetzt, welche durch die inhärente 3'-5'-Exonukleaseaktivität ein Korrekturlesen des PCR-Produktes erlaubt.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden, wenn notwendig, von unspezifischen Fehlprodukten abgetrennt, indem die PCR-Produkte in der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt wurden und die Banden aus dem Gel ausgeschnitten wurden. Die PCR-Produkte wurde durch Zentrifugation über silanisierte Glaswolle von der Agarose abgetrennt. War eine Bandenpräparation zur Reinigung nicht notwendig, wurde das PCR-Produkt von den verbliebenen Oligonukleotiden, den dNTPs und weiteren Reaktionsprodukten wie Pyrophosphaten gereinigt, indem bei Raumtemperatur eine selektive Fällung in 100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCL (pH 7,5) und 10 mM EDTA nach Zugabe eines Volumens 4 M Ammoniumacetat und 2,5 Volumen Ethanol durchgeführt wurde. Das Präzipitat wurde in 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in DDW resuspendiert.

Gereinigte PCR-Produkte wurden entweder direkt in die gewünschten Plasmide oder zuerst in den pCR- Script™ Amp SK+ Vektor nach Angaben des Herstellers (Stratagene) subkloniert. Um die Klonierung von MMP-19 Fragmenten in pCR-Script zu ermöglichen, war es notwendig, die PCR mit methylierten Nukleotiden (methylation dNTP mix, Novagen) durchzuführen, da das Prinzip der pCR-Script Klonierung die Anwesenheit der SrfI-Restriktionsendonuklease während der Ligationsreaktion vorsieht, um eine Re-Ligation des "glatte Enden"-Vektors ohne Insert zu verhindern. Der Einbau von 5methyl-dCTP in die PCR-Produkte führte zu einer Maskierung und damit zum Schutz der internen SrfI Schnittstellen in der MMP-19 cDNA. Dieses Vorgehen hatte zur Konsequenz, dass die Schmelztemperatur der PCR-Produkte durch die Anwesenheit von 5methyl-dCTP sehr stark erhöht wurde und der Denaturierungsschritt bei der PCR nicht bei den ansonsten üblichen 94°C, sondern bei 100°C für eine Minute durchgeführt werden musste.

Die Ligationsprodukte aus der direkten, als auch aus der pCR-Script Klonierung wurden in ultrakompetente *E.coli* XL2-Blue transformiert und propagiert.

2.5 DNA-Sequenzanalyse

DNA Sequenzierungen wurden nach der Kettenabbruchmethode (Sanger und Coulson, 1975) durchgeführt. Hierbei kam der SequiTherm™ Sequenzierkit (Epicentre Technologies) nach Angaben

des Herstellers zum Einsatz. Die Sequenzreaktionen wurden in einer Macrophor-Elektrophoresekammer (Pharmacia-Amersham) mit Sequagel XR (National Diagnostics) aufgetrennt und durch Auflegen eines Röntgenfilmes visualisiert.

Zusätzlich zur radioaktiven Sequenzierung wurden Sequenzreaktionen mit dem ABI PRISM® Big Dye Reaction Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems) durchgeführt. Die Reaktionsprodukte dieser Sequenzierungen wurden mit einem ABI PRISM™ 377 HT DNA Sequencer (PE Applied Biosystems) bei der Firma GATC (Konstanz) aufgetrennt.

2.6 Bioinformatik

ABIPRISM-Sequenzdateien wurden mit dem Programm Chromas 1.5.5 (Technelysium Pty Ltd) editiert und in das GCG-Format umgewandelt. DNA und Proteinsequenzen wurden mit dem Wisconsin Package Version 9.0, Genetics Computer Group (GCG) (Madison, Wisc.) analysiert. Multiple Sequenzvergleiche, erstellt mit dem Programm Pileup des GCG-Paketes (Feng and Doolittle, 1987) und dem Programm ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) wurden mit dem Programm GeneDoc Version 1.1.004 (Nicholas, 1996) weiter bearbeitet. Evolutionsanalysen wurden mit den Programmpaketten PAUP (GCG, Version 9) und PHYLIP (Joseph Felsenstein, University of Wahington, U.S.A.) nach der UPGMA und der KITSCH Methode durchgeführt. Die dabei verwendeten Algorithmen und entsprechende Literaturverweise werden in den entsprechenden Unterkapiteln des Kapitel 3 (Ergebnisse) aufgeführt. Vergleiche mit Gen- und Proteindatenbanken wurden mit den Programmen BLAST 2.0 (Altschul *et al.*, 1997), PSI-BLAST (Altschul *et al.*, 1997), fasta (Pearson and Lipman, 1988) auf den Web-Servern des National Center for Biological Information (NIH) [[www.ncbi.nlm.nih.gov /BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)] und des European Bioinformatics Institute (EBI) [www2.ebi.ac.uk/fasta3/] durchgeführt. Weitergehende Proteinanalysen wurden auf Web-Servern des Swiss Institute for Experimental Cancer Research (IRSEC) [www.irsec.isb-sib.ch/], des European Molecular Biology Laboratory (EMBL) [www.embl-heidelberg.de/] und des Sanger Centers [www.sanger.ac.uk/] durchgeführt und werden jeweils in den jeweiligen Unterkapiteln des Kapitel 3 (Ergebnisse) aufgeführt und zitiert. Eine sehr gute Auflistung dieser und vieler anderer nützlicher Bioinformatik-Web-Server findet sich unter der PEDROS-homepage, gepiegelt in Deutschland unter: www.biophys.uni-duesseldorf.de/bionet/research_tools.html. Eine ausführliche Zusammenfassung der im Augenblick zur öffentlichen Verfügung stehenden Bioinformatikwerkzeuge findet sich im Trends Guide to Bioinformatics (Patterson und Handel, 1998).

2.7 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach einer Modifikation der Methode von Lämmli (1970) durchgeführt. Auftrennung sehr kleiner Proteine wurde durch die Verwendung von Tris-Tricin-Gelen ermöglicht (Schägger und Jagow, 1987).

Eine ausführliche Darstellung beider Gelsysteme findet sich in Elektrophorese-Praktikum (Westermeier1990).

2.7.1 Schnelle Coomassie-Blau-Färbung von Proteingelen

SDS-PAGE Gele wurden nach der Auftrennung der Proteine in einer 0,01% Coomassie R-250 Lösung in 10% Essigsäure und 10% Ethanol in der Mikrowelle kurz aufgeköcht. Durch fünfminütiges Schwenken in der sich abkühlenden Lösung wurden die Proteine fixiert und angefärbt. Die anschließende Entfärbung des Geles erfolgte in 10% Essigsäure und 10% Ethanol bei Raumtemperatur oder ebenfalls nach Erhitzen.

2.7.2 Silberfärbung von Proteingelen

Bei mangelnder Sensitivität der Coomassie-Blau-Färbung wurde eine Silberfärbung der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine durchgeführt. Bereits Coomassie gefärbte Gele wurden für mindestens 24 Stunden entfärbt und für mindestens eine halbe Stunde in einer 5% Na₂CO₃ Lösung umgepuffert. Anschließend wurde das Gel in einer frischen Lösung aus 27 ml 5% Na₂CO₃, 50 ml einer Wolframkieselsäurelösung (0,2% NH₄NO₃, 0,2% AgNO₃, 1% Wolframkieselsäure) und 615 µl CHO. gefärbt. Die Färbung wurde beobachtet und nach 5-10 min durch Überführung des Gels in 10% HOAc gestoppt (adaptiert nach Krausel und Elbertshagen, 1987).

Zuvor ungefärbte Gele wurden nach den sehr sensitiven Methoden von Heukesshoven und Dernick (1985) oder von Merril *et al.* (1981) silbergefärbt.

2.8 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Für massenspektrometrische Analysen am MALDI-TOF, die in Kooperation mit Markus Macht (AG Przybilski, Universität Konstanz) durchgeführt wurden, wurde eine zweidimensionale Auftrennung von Proteinmischungen vorgenommen. Für die erste Dimension (isoelektrische Fokussierung) wurde das IPG-Dalt System der Firma Pharmacia-Amersham mit immobilisierten pH-Gradienten verwendet. Als zweite Dimension wurde eine SDS-PAGE nach Schägger und Jagow (1987) durchgeführt. Eine Darstellung der verwendeten Methode findet sich in Görg *et al.* (1988). Ein sehr ausführliches und detailliertes Laborhandbuch zum IPG-Dalt System, verfasst von Görg *et al.* (1997), ist auf Nachfrage bei den Autoren oder bei Pharmacia-Amersham erhältlich.

2.9 Immunoblots

Immunoblots wurden nach Auftrennung der Proteine in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wie folgt durchgeführt: Die Proteine wurden in einer „Semidry Blotapparatur“ (Biorad, München) mittels eines kontinuierlichen Puffersystems (Towbin *et al.* 1979) vom SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran (Protran, Schleicher und Schüll) übertragen, indem für eine Stunde ein Stromfluss der Stärke 2 mA/cm² angelegt wurde. Die Transfereffizienz wurde mit einer Ponceau S

Färbung der auf die Membran übertragenen Proteine, bzw. mit einer Commassiefärbung der im SDS-Gel verbliebenen Proteine überprüft.

Freie Proteinbindungsstellen auf der Membran wurden durch einstündige Inkubation der Membran in TBS-T (10 mM Tris-HCl, pH 7,3, 150 mM NaCl, 0,1-0,5% Tween20) mit 3% fettfreiem Magermilchpulver abgesättigt, um unspezifische Antikörperbindung zu minimieren. Im Anschluss wurde die Membran mit dem jeweiligen, in PBS-T mit 1% Milchpulver verdünnten, Primärantikörper inkubiert. Dieser Schritt fand entweder für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder für 16 Stunden bei 4°C statt. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges, jeweils fünfminütiges Waschen mit TBS-T entfernt. Anschließend wurde eine einstündige Inkubation mit je nach Angaben des Herstellers in TBS-T mit 2% Milchpulver verdünnten Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern durchgeführt. Nach weiteren vier Waschschritten in TBS-T wurden die gebundenen Sekundärantikörper chemiluminometrisch nachgewiesen (SuperSignal™, Pierce, St. Augustin). Alle Schritte fanden, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur statt.

2.10 Detektion biotinylierter Proteine

Lysate, bzw. Immunpräzipitate biotinmarkierter Proteine wurden im SDS-PAGE aufgetrennt und wie unter 2.9 beschrieben auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Die Membranen wurden in TBS-T mit 5% BSA abgesättigt, anschließend dreimal in TBS-T gewaschen und für eine Stunde in einer 1:20000 Verdünnung von Streptavidin-HRP (Pharmacia-Amersham) in TBST inkubiert. Nach vier Waschschritten in TBST für je fünf Minuten wurde die gebundene Meerrettich-Peroxidase (HRP) chemiluminometrisch nachgewiesen (siehe 2.9).

2.11 *in vitro* ³⁵S-Markierung von Proteinen

³⁵S-markierte Proteine für Proteinbindungsstudien wurden durch gekoppelte *in vitro* Transkription/Translation mit dem TNT™ Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega) direkt von Plasmiden ausgehend von einem T3, T7 oder SP6 Promotor nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dasselbe Verfahren wurde verwendet, um die korrekte Expression und damit Integrität klonierter DNA-Konstrukte zu überprüfen. Die Translationsprodukte wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Autoradiographie analysiert.

2.12 Immunpräzipitation

Immunpräzipitationen wurden entweder über die Bindung der Immunkomplexe an ProteinA Sepharose oder über die Bindung durch spezifische Sekundärantikörper gekoppelt an Magnetpartikel (Dynabeads, Dynal, Hamburg) durchgeführt.

5x10⁶ THP-1 oder Jurkat Zellen wurden zwei mal in PBS gewaschen und dann in 500µl TSA (10 mM Tris-HCl, pH 8, 140 mM NaCl, 0,025% NaN₃, Complete™-Proteaseinhibitor ohne EDTA (Boehringer

Mannheim)) mit 1% Nonidet NP40 für 45 min auf Eis lysiert. Nicht lysierte Zellkerne und unlösliche Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt.

Protein A vermittelte Präzipitationen der Immunkomplexe wurden durchgeführt wie beschrieben (Ausubel *et al.*, 1993).

Die Magnetpartikel vermittelte Präzipitation wurde ohne vorherige Präabsorption durchgeführt, da Vorversuche ergaben, dass die unspezifische Bindung an die verwendeten Magnetpartikel der Firma Dynal sehr gering war. Ebenfalls wurde in Vorversuchen festgestellt, dass eine vorherige Kopplung der Antikörper an die Magnetpartikel zu reproduzierbaren Ergebnissen bei geringerem Hintergrund führte. Etwa 2 µg gereinigte monoklonale anti-MMP-19 Antikörper wurden mit 20 µl Dynabeads M-450 Rat anti-Mouse IgG1 (Dynal) in PBS, 0,1% BSA für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Primärantikörper an die Magnetpartikel zu koppeln. Anschließend wurden die Partikel zwei mal mit PBS, und einmal mit TSA, 1% NP40 im Magnetständer gewaschen und zum Zellysat gegeben. Die Lysat-Magnetpartikel-Suspension wurde unter ständigem Mischen für 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Die präzipitierten Immunkomplexe wurden im Magnetständer vom Zellysat abgetrennt und zweimal mit Lysepuffer und zweimal mit TSA, 0,5% NP40 gewaschen. Die Immunkomplexe wurden direkt in SDS-PAGE Probenpuffer aufgenommen. Die Analyse der Immunpräzipitate erfolgte über SDS-PAGE und je nach Fragestellung entweder direkt durch anschließende Silberfärbung oder indirekt durch Immundetektion, radiologisch oder durch Biotinfärbung.

War eine sehr hohe Stringenz unter Verhinderung von Koimmunpräzipitation erforderlich, so wurden die Präzipitationen in RIPA Puffer durchgeführt (Ausubel *et al.*, 1993).

2.13 Konstruktion eukaryontischer Expressionsvektoren

2.13.1 HA-getagte MMP-19 Fragmente

Für die Charakterisierung der Oberflächenbindung von MMP-19 wurden verschiedene cDNA-Konstrukte, die für Fragmente von MMP-19 kodieren, hergestellt und mit einem HA-Proteintag (YPYDVPDYA, aus dem humanen Influenza Haemagglutinin Protein) versehen. Die Methode des Epitoptagging erlaubt neu in Zellen eingeführte Proteine unabhängig von den natürlich in den Zellen vorkommenden Wildtypproteinen zu analysieren (Kolodziej und Young, 1991). Für Konstrukte mit C-terminalem HA-Tag wurde eine PCR mit flankierenden PCR-Primern durchgeführt, bei denen der 5'-Primer eine EcoRI-Schnittstelle und eine eukaryontische Translationsstartsequenz (Kozak, 1986) an das jeweilige Konstrukt und der 3'-Primer den HA-Tag, ein TGA-Stopcodon und eine XhoI-Schnittstelle anfügte.

Die Konstrukte wurden wie unter 1.4.4 in den pCR- Script™ Amp SK+ Vektor subkloniert, von den flankierenden T3 und T7-Promotersequenzen aus ansequenziert und die Integrität der Konstrukte durch eine gekoppelte in vitro Transkription/Translation überprüft. Anschließend wurden die MMP-

19-HA-Konstrukte in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3 umkloniert und danach wieder durch eine *in vitro* Transkription/Translation überprüft.

Für die Konstruktion von MMP-19 Fragmenten mit internem HA-Tag wurde auf eine im Vektor pcDNA3 zwischen EcoRI und XhoI subklonierte MMP-19-cDNA zurückgegriffen. Auf diesem Templat wurden Plasmid-umspannende PCRs durchgeführt, die identische Kopien des gesamten Plasmids mitsamt der inserierten MMP-19-cDNA erstellten und zwischen die Primersequenzen die HA-Tag-Sequenz einfügten. Mit derselben Strategie wurden auch Konstrukte erstellt, in denen einzelne Domänen von MMP-19 deletiert, bzw. durch einen HA-Tag ersetzt waren. Dazu wurden die PCR-Primer vor der PCR mit T4-Polynukleotidkinase phosphoryliert. Die PCR wurde aufgrund der Größe der gewünschten PCR-Produkte und der großen Länge der PCR-Primer mit Turbo-Pfu (Stratagene) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 45 Sek 95°C; elf Zyklen mit 45 Sek 95°C, 45 Sek 68°C-0,5°C/Zyklus, 14 Min 72°C, anschließend 16 Zyklen mit 45 Sek 95°C, 45 Sek 62°C und 18 Min 72°C. Die PCR-Produkte, die im Prinzip linearisierten Plasmiden entsprachen, wurden über Agarosegele gereinigt und isoliert und anschließend mit der Restriktionsendonuklease DpnI verdaut, um Fehlprodukte, bzw. das methylierte Plasmidtemplat zu entfernen. Die Zirkulierung der PCR-Produkte wurde wie beschrieben durchgeführt (Ausubel *et al.*, 1993) und die Ligationsprodukte in *E.coli* XL2-blue transformiert. Die Integrität der Klonierungsprodukte wurde durch Sequenzierung und *in vitro* Transkription/Translation überprüft.

Folgende Konstrukte, die schematisch in Abbildung 3 dargestellt sind, wurden mit den jeweils aufgeführten PCR-Primern konstruiert:

- 1.) pSM-R-HAct: MMP-19 mit C-terminalem HA-tag.
r-orf-5-Eco (5'-AAGAATTCCACCATGAACTGCCAGCAGCTGTGG-3');
rasi-longHA-r (5'-TTCTCGAGTCAGGCGTAGTCGGGCACGTCGTAGGGGTAGTATTCA-3')
- 2.) pSM-RH-HAct: MMP-19 C-terminal verkürzt um die Hemopexindomäne.
HA-tag C-terminal an der Hingeregion
r-orf-5-Eco (s.o.)
rasih-HA-r (5'-TTCTCGAGTCAGGCGTAGTCGGGCACGTCGTAGGGGTAAGGGTCTGGCATGG-GACTGGGTTC-3')
- 3.) pSM-RC⁻-HAint_(pro): MMP-19 ohne Katalytische Domäne.
HA-tag intern zwischen Prodomäne und Hingeregion.
Primer: proHA-r
(5'-AGGGGCGTAGTCGGGCACGTCGTAGGGGTATTTAAGGGTCTTCTGGTTGAAG-3')
hemo-f (5'-GACCCTTGCAGTAGTGAAGT-3')
- 4.) pSM-R-HAint_(hinge): MMP-19 mit HA-tag intern zwischen Hingeregion und Hemopexindomäne.
hingeHA-r
(5'-AGGGGCGTAGTCGGGCACGTCGTAGGGGTATGGCATGGGACTGGGTCTGTG-3')
hemo-f (s.o.)

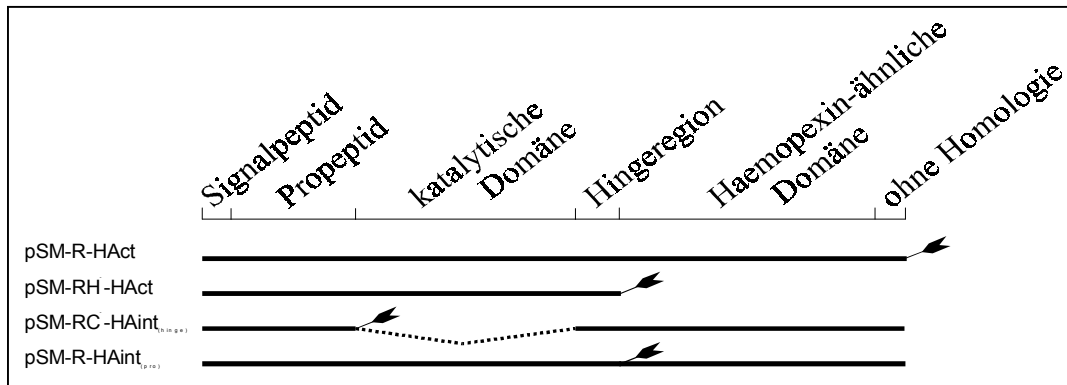


Abbildung 3 schematische Darstellung der klonierten MMP-19-Fragmente

Eine schematische Darstellung der in 2.13.1 beschriebenen MMP-19 Fragmente. Die obere, beschriftete Linie zeigt die Proteindomänen von MMP-19. Die unteren Linien die einzelnen Konstrukte. Alle Fragmente wurden mit einem Haemagglutinin-Proteintag (HA-tag) versehen, deren Positionen in der Abbildung jeweils durch die Pfeile angegeben sind, und im eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3 zwischen die Restriktionsschnittstellen EcoRI und XhoI subkloniert. Die genaue Sequenz der einzelnen Fragmente ergibt sich aus der in der Genbank niedergelegten Sequenz für Rasi-11 (MMP-19) (GenBank: locus HSU37791, accession U37791) und den im Text aufgeführten PCR-Primern.

2.14 Yeast Two-Hybrid System

Alle für das verwendete Yeast Two-Hybrid System notwendigen Vektoren, *S.cerevisiae* Stämme und der *E.coli* Stamm KC8 wurden freundlicherweise von Dr. Golemis zur Verfügung gestellt. Das auf LexA-basierende und in dieser Arbeit verwendete Yeast Two-Hybrid System wurde beschrieben (Gyuris *et al.*, 1993 Golemis *et al.* 1993). Die Methodik der Hefemanipulation findet sich in Ausubel *et al.* (1993, Kapitel 13). Eine sehr ausführliche Darstellung des Systems, aller verwendeten Plasmide, Hefestämme und der einzelnen Arbeitsschritte (Klonierung, notwendige Kontrollen, Durchmustern der Two-Hybrid Bank) findet sich in dem von Dr. Golemis verfassten Kapitel 20 "Analysis of Protein Interactions" in Ausubel *et al.* (1993). Wenn nicht anders angegeben, wurde entsprechend dieser Publikation vorgegangen. Der für die Bestimmung der β -Galactosidase verwendete Filter-Assay wurde adaptiert nach Bartel *et al.* (1993) durchgeführt. Die verwendeten Medien wurden selbst hergestellt (Ausubel *et al.*, 1993). Die durchgemusterte Jurkat cDNA Bank (Witte und Krawinkel, 1997) wurde von Stephan Witte (San Diego, U.S.A.) zur Verfügung gestellt.

2.14.1 Konstruktion des Yeast Two-Hybrid-Expressionsplasmids

Ausgehend vom humanen Klon Rasi-11 (Mauch 1996, Sedlacek *et al.* 1998) wurde mittels PCR das offene Leseraster der MMP-19 cDNA 5' mit einer EcoRI und 3' mit einer XhoI Restriktionsschnittstelle versehen. Dazu wurden folgende PCR-Primer verwendet: r1-60f-Eco (5'-AA-GAATTCACCATGAACTGCCAGCAGCTGTGGC-3') und r1-XHO-1607 (5'-TCAGCTCGAGGA-TTGTGTCTGTGGGTGAGCA-3'). Die PCR-Produkte wurden direkt in den pCR-Script™ Vektor

(Stratagene) eingefügt (siehe 1.4.4), die Übergänge sequenziert und die Integrität der Konstrukte mit einer gekoppelten *in vitro* Transkription/Translation überprüft. Die in pCR-Script subklonierte MMP-19 cDNA Sequenz wurde über die eingefügten EcoRI und XhoI Schnittstellen in das offene Leseraster des Hefe Vektors pGilda (Derivat von pEG202) umkloniert. Das so konstruierte Plasmid pSM-LexA-R exprimiert unter der Kontrolle des von Galactose abhängigen Gal1-Promotors ein Fusionsprotein, N-terminal bestehend aus der DNA bindenden Domäne des prokaryontischen Transkriptionsfaktors LexA und C-terminal aus dem vollständigen offenen Leseraster der MMP-19 cDNA.

2.14.2 Vorversuche und Kontrollen

Um einen Yeast Two-Hybrid Screen sinnvoll durchzuführen, sind im Vorfeld einige wichtige Kontrollen notwendig. Die korrekte und durch Galactose induzierbare Expression des LexA-MMP-19-Fusionsproteins in der Hefe wurde im Immunoblot nachgewiesen, wobei sowohl anti-LexA (1:5000), als auch Anti-MMP-19-Antikörper (CK8/4, 1:10000) verwendet wurden. Hierzu wurde der Hefestamm EGY48 mit dem Konstrukt pSM-LexA-R transfiziert, mit den Transfektanten eine 1,5 ml Flüssigkultur inokuliert und bei 30°C bis zu einer Dichte von $OD_{600}=1$ inkubiert. Die pelletierten Hefezellen wurden in 50 µl SDS-PAGE-Probenpuffer aufgenommen, 10 min auf 95°C erhitzt und davon 15 µl im Immunoblot analysiert.

Um zu kontrollieren, ob das in pGilda subklonierte Fusionsprotein LexA-MMP-19 für die Detektion von Protein-Protein-Wechselwirkungen in ausreichender Menge in der Hefe exprimiert wurde und ob es in der Lage war, an LexA-Operatorsequenzen zu binden, wurde ein "Repression Assay" durchgeführt (Brent und Ptashne, 1984). In einem parallel durchgeführten "Activation Assay" wurde gezeigt, dass das LexA-MMP-19 Fusionsprotein alleine nicht in der Lage war, die beiden unter der Kontrolle des LexA-Operators stehenden Reportergene β -Galactosidase und Leu2 zu aktivieren (Golemis *et al.*, 1993).

2.14.3 Durchmustern der cDNA Bank nach MMP-19-interagierenden Proteinen

Der Hefestamm EGY48 wurde mit dem Reporterplasmid pJK103 transfiziert. Der so entstandene Stamm EGY48/pJK103 trug genomisch ein LEU2-Reportergen unter der Kontrolle von 6 LexA Operator Abschnitten und vermittelt durch pJK103 ein β -Galactosidase Reportergen unter der Kontrolle von zwei LexA-Operatoren. Nach Transfektion mit dem Plasmid pSM-LexA-R wurde die Expression des Fusionsproteins LexA-MMP-19 im Immunoblot nachgewiesen. Der Hefestamm EGY48/pJK103/pSM-LexA-R wurde für das Durchmustern der Jurkat cDNA Bank in 35 Ansätzen mit jeweils 2,5 µg der cDNA Bank transfiziert. Die resultierenden $1,3 \times 10^7$ Kolonien wurden vereinigt und in Aliquoten von 1 ml einer 15% Glycerinlösung bei -70°C eingefroren. Um die Replattierungseffizienz zu testen wurde ein Aliquot aufgetaut, auf $OD_{600}=0,5$ eingestellt und in verschiedenen Verdünnungen ausplattiert. Die Replattierungseffizienz betrug 1×10^8 colony forming units (cfu) pro ml.

Auf zwanzig 15x15 cm² Wachstumsplatten defizient für Uracil, Histidin, Tryptophan und Leucin und mit Glucosefreier Galactose als einzige Kohlenstoffquelle wurden jeweils 100 µl (=1x10⁷ cfu) der eingefrorenen Hefetransfektanten ausplattiert. Diese Platten wurden drei Tage bei 30°C inkubiert. Gut sichtbare Kolonien (>1mm) wurden geerntet und auf Replikplatten überführt. Kolonien die galactoseabhängig das Leu2 Reportergen exprimierten, also weiterhin auf Leucin defizientem Medium wuchsen und zusätzlich auch das lacZ-Reportergen aktivierten zur weiteren Analyse heran gezogen. Nach der Isolierung des jeweiligen Jurkat cDNA Bank Plasmids wurden die jeweiligen Insertionen mit den flankierenden PCR-Primern BCO1 (5'-CCAGCCTCTTGCTGAGTGGAGATC-3') und BCO2 (5'-GACAAGCCGACAACCTTGATTGGA-3) über eine PCR amplifiziert und mit den Restriktionsenzymen AluI und, bzw. oder HaeIII verdaut. Die resultierenden Restriktionsmuster wurden verwendet, um die isolierten cDNAs in Restriktionsklassen einzuteilen. Restriktionsklassen, die zwei oder mehr unabhängig isolierte cDNAs enthielten und in den Spezifitätskontrollen (2.14.4) positiv waren wurden weiter analysiert.

2.14.4 Spezifitätskontrollen

Um die Spezifität der Protein-Protein-Wechselwirkung der isolierten cDNAs mit MMP-19 zu überprüfen, wurden die isolierten cDNAs in den Hefestamm EGY48/pJK103 transfiziert, der zusätzlich entweder pSM-LexA-R, pLexA-L7 (Witte und Krawinkel 1997), pRFHM1 (Gyuris et al, 1993) oder pLexA-myc (Estojak et al, 1995) enthielt. pLexA-L7 kodiert für ein Fusionsprotein aus LexA und dem humanen ribosomalen Protein L7, pRFHM1 für die Fusion LexA mit der Homeodomäne von Drosophila Bicoid, pLexA-myc enthält LexA mit dem C-Terminus des humanen c-Myc. cDNAs der Proteine, die mit LexA-MMP-19, nicht aber mit einem der anderen Proteine wechselwirkten, wurden als spezifisch bezeichnet und weiter analysiert.

2.15 In Situ Plaque Hybridisierung

Um die vollständigen cDNA Sequenzen des im Yeast Two-Hybrid Screens isolierten partiellen cDNA Klons zu erhalten, wurde eine *in situ* Plaque Hybridisierung nach Benton und Davis (1977) mit einer Digoxigenin markierten cDNA-Probe durchgeführt. Dazu wurde eine Jurkat (PMA stimuliert)-cDNA Bank in ZAP Express™ (Stratagene) nach Angaben des Herstellers und entsprechend der Methodik beschrieben in Ausubel *et al.* (1993) durchsucht. Die verwendete cDNA Sonde wurde ausgehend von zufälligen Primern in einer Klenowreaktion markiert (Feinberg und Vogelstein, 1983). Die Digoxigenin markierten dUTPs wurden nach Angaben des Herstellers (Boehringer Mannheim) in dieser Reaktion eingesetzt. Als Templat diente ein 900 bp PCR-Produkt, erstellt mit den PCR-Primern u1 (5'-ccaggtggaggaccacattc-3') und d21 (5'-tggcctgtaccactcatgtg-3'). Die Charakterisierung der markierten Probe wurde ebenfalls nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die in der ersten Durchmusterungsrunde positiven Klone wurden in zwei weiteren Runden aufgereinigt. In einer *in vivo*

Exzisions Reaktion in XLOR-Zellen (Hay and Short, 1992) wurde die isolierte cDNA aus dem Lambdagenom in den pBK-CMV Vektor (Stratagene) überführt.

2.16 Reinigung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper

Hybridomas der verwendeten Maus-monoklonalen Anti-MMP-19 Antikörper wurden von Dr. Cornelia Kolb zur Verfügung gestellt. Die Hybridomas wurden in PANSERIN-Medium (PAN systems) kultiviert. Die Medienüberstände wurden gesammelt, in einer Rührzelle (Amicon) im Verhältnis 20:1 einkonzentriert und über eine ProteinA Säule aufgereinigt. Da der Subtyp für alle verwendeten monoklonalen Antikörper im Dot Blot mit subtypspezifischen Antikörpern (Pharmacia-Amersham) als IgG1 bestimmt wurde, wurden alle nach demselben Protokoll gereinigt. Diese Methode stellt eine Modifikation von Ey *et al.* (1978) dar. Die NaCl Konzentration der Hybridomaüberstände wurde auf 3,3 M eingestellt und ein 1/10 Volumen 1 M Natriumboratlösung (pH 8,9) zugegeben. Diese alkalische und auf Hochsalz eingestellte Antikörperlösung wurde über eine mit 3 M NaCl, 50 mM Natriumborat (pH 8,9) equilibrierte ProteinA Säule gegeben. Nach zwei Waschschritten mit 3 M NaCl, 50 mM Natriumborat (pH 8,9), bzw. 3 M NaCl, 10 mM Natriumborat (pH 8,9) wurden die gebundenen Antikörper mit einer 100 mM Glycinlösung (pH 3,0) eluiert. Die Eluate wurden in 500 µl Aliquoten aufgefangen und sofort mit 50 µl 1 M Tris-HCl, pH 8,0 gepuffert. Die gereinigten Antikörper wurden in der SDS-PAGE analysiert, ihre Konzentration über die optische Dichte bei 280 nm ermittelt und ihre Funktionalität im Immunoblot mit rekombinantem MMP-19 getestet.

2.17 Zellkultur

Zellkulturversuche wurden nach Standardbedingungen durchgeführt.

2.17.1 Isolierung von peripheren mononukleären Blutzellen

Humanes Blut wurde aus der Armvene entnommen und an Polystyrenkugeln defibriniert. Erythrozyten und Granulozyten wurden von den mononukleären Leukozyten durch eine Zentrifugation über LSM® Lymphocyte Separation Medium (ICN) nach Angaben des Herstellers entfernt. Reste an LSM und Thrombozyten wurden in zwei anschließenden Waschschritten (Zentrifugation bei 250 g für 10 min) entfernt. Die verbliebenen Zellen, hauptsächlich Makrophagen, T- und B-Lymphozyten, wurden in RPMI 1640 Medium mit 0,5-50% autologem Serum resuspendiert und in Kultur genommen.

2.17.2 Isolierung von Makrophagen

Makrophagen wurden aus einer Kultur mononukleärer Zellen entweder über Adhärenz an die Kulturschale oder über positive Selektion an MACS-Säulen nach Angaben des Herstellers isoliert (Mylteni Biotech).

2.17.3 Isolierung humaner vaskulärer Zellen

Zellen der glatten Gefäßmuskulatur und makrovaskuläre arterielle, bzw. venöse Endothelzellen der Nabelschnur wurden wie beschrieben isoliert (Stopeck *et al.*, 1997). Die Zellen wurden entweder in M199 Medium (Bibco BRL) oder in entsprechenden Zelltyp-spezifischen Medien (Promocell) kultiviert.

Humane mikrovaskuläre Endothelzellen wurden direkt von abgesaugtem Fettgewebe isoliert. Das Fettgewebe mit den Zellen wurde in Dulbeccos Kationen-freiem PBS gewaschen. Anschließend wurde das Fettgewebe in DMEM/F12 Medium, supplementiert mit 2% FCS und 1 mg/ml Kollagenase aufgenommen und für 30 min bei 37°C inkubiert. Das aufgelöste Fettgewebe wurde bei 900xg für 6 min zentrifugiert und der Adipozyten enthaltende Überstand verworfen. Das Zellpellet, bestehend aus mikrovaskulären Endothelzellen und Bruchstücken von Kapillaren wurde in DMEM/F12 gewaschen und die Zellen anschließend in Low Serum EC Growth Medium MV (Promocell) kultiviert.

2.17.4 Transfektion eukaryontischer Zellen

1.4.4.1 Elektroporation von THP-1 Zellen

THP-1 Monozyten wurden per Elektroporation und anschließender Selektion stabil mit verschiedenen MMP19-Konstrukten transfiziert. Eine transiente Expression dieser Konstrukte war nicht möglich, da die Transfektionseffizienz bei dieser Zelllinie extrem gering war. Transfektion durch Lipofektion war ebenfalls nur ungenügend effizient.

1×10^7 THP-1 Zellen wurden in serumfreien RPMI 1640 gewaschen und in 800 µl RPMI aufgenommen, in Elektroporationsküvetten P/N 640 (4 mm Lücke) (AGS) überführt und 7,5 µg gereinigte Plasmid-DNA untergemischt. Nach einer 10 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen in einem Electro Cell Manipulator ECM 600 (BTX) einem Elektroschock ausgesetzt. Folgende Parameter resultierten in einer erfolgreichen Transfektion: Modus = 500 V/Capacitance & Resistance, Capacitance = 1600 µF, Set Resistance = R\$ (72 Ohm), Charging voltage = 260 V. Nach einer weiteren Inkubation auf Eis für 10 Minuten wurden die Zellen in 25 ml RPMI 1640 mit 10% FCS aufgenommen. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen einmal in RPMI gewaschen und dann in 120 ml RPM 1640, 10% FCS mit 0,5 mg/ml G418 (biologische Aktivität) aufgenommen. Diese Konzentration wurde in Vorversuchen als geringste Konzentration, welche untransfizierte THP-1 zuverlässig abtötet, ermittelt. Die Zellsuspension wurde in zwei 24 Loch Platten (1,5 ml/Vertiefung) und zwei 96 Loch Platten (200 µl/Vertiefung) verteilt und zur Selektion im Brutschrank inkubiert. Stabil transfizierte Klone wurden nach drei Wochen isoliert, weiter expandiert und analysiert.

2.17.5 *In vitro* Markierung von Proteinen in Zellkultur

Um Proteine in Zellkultur zu markieren, wurden die Zellen für 12-16 Stunden in einem ³⁵S-Methionin-Cystein-haltigen Medium kultiviert. Dieses Markierungsmedium bestand aus 90% Methionin/Cystein

freiem RPMI 1640 mit 10% FCS (Sigma) und 10% RPMI 1640 mit 10% FCS. Diesem Medium wurde 50 $\mu\text{Ci/ml}$ Tran³⁵S-label zugesetzt.

2.17.6 Oberflächenmarkierung von Proteinen in Zellkultur

Um Oberflächenproteine kultivierter Zellen selektiv mit Biotin zu markieren, wurde ein modifiziertes Protokoll nach Angaben des Herstellers (Pierce) angewandt. Zellen wurden dreimal in eiskaltem PBS gewaschen und in einer frisch angesetzten Lösung von 0,5-1 mg/ml EZ-Link™ NHS-LC-Biotin (Pierce) in PBS auf eine Dichte von bis zu 4×10^7 Zellen/ml eingestellt. Die Zellen wurden in Dunkelheit bei 4°C für 45 min rotiert und anschließend in PBS mit 0,15% Glycin viermal gewaschen. Im folgenden wurden die Zellen weiter kultiviert und stimuliert oder sofort zur Immunpräzipitation eingesetzt.

2.18 Fluoreszenz aktivierter Zellscanner

Die Analyse der Oberflächenassoziation von MMP-19 und die Typisierung von Blutzellen wurde in der Durchflußzytometrie mit einem Fluoreszenz aktivierten Zellscanner (FACScan®) der Firma Becton Dickinson Immunozytometry Systems unter Verwendung der LysisII Software durchgeführt. Suspensionen von 1×10^6 Zellen wurden für 30 min in 50 μl PBS, 2% NCS, 0.1% NaN_3 entweder mit dem affinitätsgereinigten Kaninchen anti-MMP-19 (Kolb *et al.*, 1997) Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 oder mit dem Maus monoklonalen anti-MMP-19 Antikörpern CK8/4 in einer Verdünnung von 1:500 gefärbt. Gebundene Primärantikörper wurden durch Anfärbung mit entsprechenden sekundären Antikörpern visualisiert. Hier kamen ein Cy3-konjugierter Ziege anti-Kaninchen-IgG (Dianova) und ein FITC- konjugierter Ziege anti-Maus-IgG (Dianova) zum Einsatz. Die Zellviabilität wurde über Propidiumjodidfärbung überprüft.

3 Ergebnisse

Wie in der Einleitung dieser Arbeit (Kapitel 1) dargestellt, wurde die Matrixmetalloproteinase-19 (MMP-19) als neues mit Rheumatoider Arthritis assoziiertes Autoantigen identifiziert (Mauch, Diplomarbeit 1996; Sedlacek, Dissertation 1996; Patentanmeldung (Krawinkel, Mauch und Sedlacek), 1996; Sedlacek *et al.*, 1998). Die eigentümliche Struktur von MMP-19, die sich in mehreren Merkmalen von allen anderen Mitgliedern der Matrixmetalloproteinasefamilie unterscheidet (siehe Kapitel 1), wurde als erster Hinweis auf eine Sonderrolle dieses Enzyms im komplexen Zusammenspiel dieser Proteinase gewertet. Allerdings war zu Beginn dieser Doktorarbeit über MMP-19 nur wenig mehr bekannt, als die cDNA- und damit auch die Proteinsequenz, und einige erste Daten zur Autoantigenizität.

Um einen Eindruck von den biologischen Funktionen der Matrixmetalloproteinase-19 zu bekommen, wurde zunächst ein ausführlicher Vergleich mit anderen Mitgliedern der Matrixinfamilie erstellt. Die daraus abgeleiteten und im folgenden dargestellten Erkenntnisse ermöglichen nun eine detailliertere Einordnung von MMP-19 innerhalb der verschiedenen funktionellen Untergruppen dieser Proteinasefamilie.

Der zweite Ansatz der gewählt wurde, um mehr über mögliche Funktionen von MMP-19 zu erfahren, war die Analyse der Wirkungsorte dieses Enzyms. Hierzu wurde zunächst die Expression und Regulation der MMP-19 mRNA in Zellkulturen untersucht.

Nachdem ein zuverlässiger Antikörper gegen MMP-19 zur Verfügung stand, konnten die Analysen des Wirkungsortes von MMP-19 stark ausgeweitet werden. Dazu wurde einerseits durch Dr. Cornelia Kolb das MMP-19 Expressionsmuster in Gewebeschnitten untersucht (Kolb *et al.*, 1997 und 1999). Andererseits wurde, wie in dieser Arbeit dargestellt, direkt die Lokalisierung des Enzyms auf der Ebene einzelner Zellen betrachtet. Hierbei wurde besonderes Augenmerk auf die Zelloberflächenbindung von MMP-19 gelegt.

Diese Analyse der Zelloberflächenexpression wurden fortgesetzt, indem mögliche Interaktionspartner von MMP-19 in Immunpräzipitationsanalysen und im Yeast Two-Hybrid System untersucht wurden. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse werden sicherlich als interessante Anknüpfungspunkte für nachfolgende Analysen dienen.

3.1 Die Einordnung von MMP-19 in die Matrixinfamilie

Die Zuordnung des Autoantigens RASI (=MMP-19) in die Familie der Matrixmetalloproteinasen wurde in der Erstbeschreibung dieses Enzyms ausführlich begründet und belegt (Mauch, Diplomarbeit 1996). Wie in der Einleitung kurz dargestellt, erfüllt RASI alle Kriterien für die Zuordnung in diese Proteinfamilie, wie sie von Woessner (1994) und Barret *et al.* (1998) gefordert werden. Die Klassifizierung als Matrixmetalloproteinase Nummer 19 wurde durch Pendas *et al.* (1997) vorgenommen und entspricht der während der "Gordon MMP-Konferenz 1997" vereinbarten Nomenklatur.

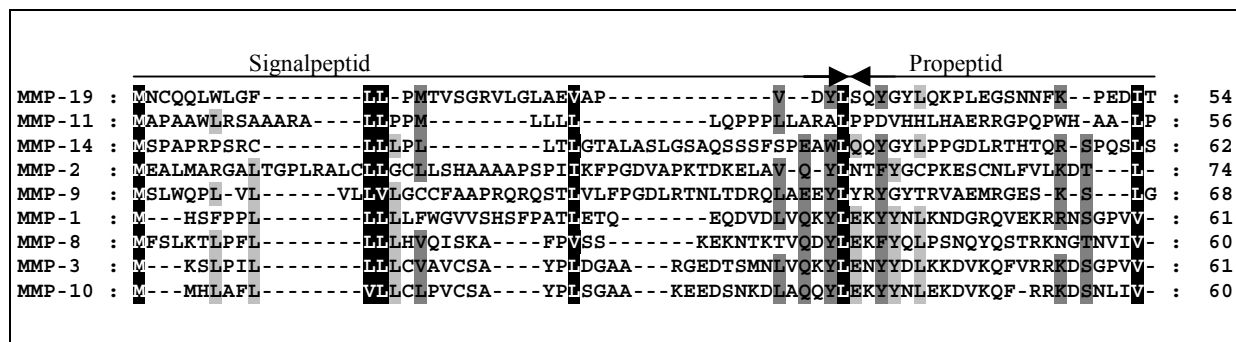
Wie unterscheidet sich MMP-19 von den anderen Matrixmetalloproteinasen?

Um diese Frage zu beantworten, wurde die MMP-19 Aminosäuresequenz mit der der anderen Familienmitglieder verglichen. Dazu wurden mit den "multiple sequence alignment" Programmen "PileUp" (Feng und Doolittle, 1987) und "ClustalX" (Thompson *et al.*, 1997) die Gesamtsequenzen der einzelnen MMPs untereinander und mit MMP-19 verglichen. Die Ausgaben dieser automatischen Sequenzanlagerungen wurden manuell optimiert und in einer zweiten Runde, wiederum bestehend aus computerunterstützter Anlagerung und nachfolgender manueller Optimierung, auf die jeweiligen Domänen der einzelnen Matrixmetalloproteinasen verfeinert. Ein Ausschnitt dieser Anlagerungen ist in Abbildung 4 dargestellt. Auf eine vollständige Darstellung des durchgeführten Vergleichs aller Familienmitglieder wurde zugunsten der Übersichtlichkeit verzichtet.

Abbildung 4 multipler Sequenzvergleich innerhalb der Familie der Matrixmetalloproteinasen

Dargestellt ist ein Auszug aus den zu Evolutionsanalysen durchgeführten multiplen Sequenzvergleichen. Die Aminosäuresequenz von MMP-19 wurden mit der anderer Mitglieder der Matrixmetalloproteinasenfamilie verglichen (Erläuterungen siehe Text). MMP-1 = Interstitielle Kollagenase; MMP-2 = Gelatinase A; MMP-3 = Stromelysin-1; MMP-8 = Neutrophilen Kollagenase; MMP-9 = Gelatinase B; MMP-10 = Stromelysin-2; MMP-11 = Stromelysin-3; MMP-14 = MT1-MMP.

Drei Schattierungsstufen sind dargestellt: **Schwarz** = 100% Sequenzkonservierung; **Dunkelgrau** = 80%; **Hellgrau** = 60%. Als Grundlage für die Schattierung wurde die Blossum 62 Matrix verwendet.



	Propeptid	Autoinhibitor PRCGXXD	Aktivierungsstellen (z.B. Furin)	Katalytische	
MMP-19	: EALRAF---QEASELPVSGQLDDATRARMROPRCGLEDPFNQ-----KTLKYLKLL-G--RWRKKHLTFRILNLPSTLPP		↓		: 122
MMP-11	: SSPAPAPATQEAEPASS-----LRPPRCGVDP-PSDGLSARNROKRFVLS-GG-RWEKTDLTYRILRFPWLQVQ		↓		: 123
MMP-14	: AATAAM---QKFGYGLQVTGKADADTMKAMRRPRCGVDPKFGAETKANVRRKRYAIQ-G-LKWQHNEITFCIONYTPKVG		↓		: 137
MMP-2	: KK---M---QKFFGLPQTGDLDQNTIETMRKPRCGNPD-VAN-----YVFFPRKPKWKNQIITRYIIGYTPDLDP		↓		: 137
MMP-9	: PALLLL---QKQLSLPETGELDSATLKAMRTPRCGVDP-LGR-----EQTFFGDLKWHHHNITYWIQYSEDLP		↓		: 134
MMP-1	: EKLKQM---QEFFGLKVTGKPDATLKVMMKQPRCGVDP-VAQ-----FVLTEGNPRWEQTHLTYRIENYTPDLPR		↓		: 127
MMP-8	: EKLKEM---QEFFGLNVTGKPNNEETLDMKKRPRCGVDP-SGG-----FMLTPGNPKWERTINLTYRIRNYTPQLSE		↓		: 126
MMP-3	: KKIREM---QKFLGLEVTGKLDSDTLEVMRKPRCGVDP-VGH-----ERTFPGIPKWRKTHLTYRIVNYTPDLPK		↓		: 127
MMP-10	: KKIQGM---QKFLGLEVTGKLDSDTLEVMRKPRCGVDP-VGH-----ESSFPGMPKWRKTHLTYRIVNYTPDLPR		↓		: 126

	Katalytische Domäne	Bindung des strukturellen Zn ²⁺ und von Ca ²⁺	
MMP-19	: HTARAALRQAFQDWSNVAPLLEQEV-----QAGAADIRLSEFHGRQSSYCSNTFDGPGRVLAAHADLPE--L-GSVHFD		: 191
MMP-11	: EQVRQTMAEALKVWSDVTPLETFTEV-----HEGRADIMIDF-ARVWDGDDLPFDGPGGLLAHAFTHREGDPVHFD		: 194
MMP-14	: YATYEAIRKAFRWESATPLRFRVVPYAYIREGHEKQADIMIFF-AEGFHGDSTPFDEGGFLAHAYFPGNIGCDTHFD		: 216
MMP-2	: ETVDDAFARAFQVWSDVTPLEFRSRI-----HDGEADIMINE-GRWEHGDGYPFDGDKGLLAHAFAPGTGVCDDSHFD		: 208
MMP-9	: AVIDDAFARAFALWSAVTPLDFTRV-----YSRDADIVIQF-GVAEHGDGYPFDGDKGLLAHAFPPGPGQCDAHFD		: 205
MMP-1	: ADVDDHAIEKAFQVWSDVTPLETKV-----SEGOADIMISF-VRGDHRDNSPFDGPGGLLAHAFQPGGICGDAHFD		: 198
MMP-8	: AEVERAIKDAFELWSVASPLDFTRI-----SQGEADIMIAF-YQRDHDGNSPFDGPGGLLAHAFQPGGICGDAHFD		: 197
MMP-3	: DAVDSAVEKALKVWEEVTPLEFRSL-----YEGEADIMISF-AVREHGDGYPFDGPGNVLAAHAYAPGPGINGDAHFD		: 198
MMP-10	: DAVDSAIKALKVWEEVTPLEFRSL-----YEGEADIMISF-AVKEHGDGFYSFDGPGHSLAHAYAPGPGLYGDIHFD		: 197

	Katalytische Domäne	aktives Zentrum (Zn ²⁺ -Bind.)	Met-Turn	Ca ²⁺ -Bindung	
		HEXGHXXGLXH ^S / _L	A ^L /M		
MMP-19	: EDEFWTEGTYR	YRGNLRLIAAHEVGHALGLGHSRYSOALMAPVVEGY--RPHFKLHPDDV			: 248
MMP-11	: YDETWTIGDDQ	GTDLLOVAAHEFGHVLGLQHTTAAKALMSAFY-TF--RYPLSPDDC			: 250
MMP-14	: SAEPWIVRNEDL	NGNDIFLVAVHELGHALGLEHSSDPSAIPAPFYQWM-DTENFVLPDDDR			: 276
MMP-2	: DDELWALGEGQVVRVKYGN	DRKWGFCPDQGYSLFLVAAHEFGHAMGLEHSDPGALMAYTY--TKNFRLSQDDI			: 438
MMP-9	: DDELWLSLGGKVVVPTFRFGN	DKKWGFCPDQGYSLFLVAAHEFGHALGLDHSVPEALMYPMYR-F--TEGPPHKKDDV			: 436
MMP-1	: EDERWVN-NFR	EYNLHRVAAHEFGHSLGLSHSTDIGALMYPSTY-TF--SGDVQLAQDDI			: 253
MMP-8	: ABETWIN-TSA	NYNLFVAAHEFGHSLGLAHSDDPGALMYPNY-AFRETSNYSLPQDDI			: 254
MMP-3	: DDEQWTK-DTT	GTNLFVAAHEFGHSLGLFHSANTEALMYPVLSLTLTRFRSQQDDI			: 256
MMP-10	: DDEKWIE-DAS	GTNLFVAAHEFGHSLGLFHSANTEALMYPVNSFTELAQFRSQQDDV			: 255

	Hingeregion	
MMP-19	: AGIQALYGGKKSFPVIR-DEEEETELETVEVPVPTPEPSM-----P--DP	: 288
MMP-11	: RGVQHLYGQWPPTVTSRT-----PALGPQAGIDTNEIAPLEPDAP-----P--DA	: 293
MMP-14	: RGIQQLYGGESGFPTKM-----PPQERTTSRPSVPDKPKNPTYG-----P--NI	: 318
MMP-2	: KGIQELYG-ASPDIDLGTG-----PT-PTLGPVT-----P--EI	: 468
MMP-9	: NGIRHLYG-PRPEPEPRPPTTTTPOETAPPTVCTGPPTVHPSERPTAGPTGPPSAGPTGPPTAGPSTATTVPLSPVDDA	: 515
MMP-1	: DGIQAIYG--RSQN-----PVQIGPQT-----P--KA	: 277
MMP-8	: DGIQAIYG--LSSN-----PIQPTGPST-----P--KP	: 278
MMP-3	: NGIQSLYG-PPDPSPET-----PLVPTPEVPPEPGT-----P--AN	: 289
MMP-10	: NGIQSLYG-PPPASTEE-----PLVPTKSVPSGSEM-----P--AK	: 288

	Hämopexin-ähnliche Domäne	
MMP-19	: CSSEL--DAMMLGPRG-KTYAFKGDYVWTV-SDSG---PGPLFRVSAWEGLEPGNLDAAVYSPRTQW-THFFKCDKVVRY	: 360
MMP-11	: CEAS--FNAVSTI-RG-ELFFFKAGFVWRLRGGQLQ--PGYPALASRHWQGLPSVDAAAFEDAQGH--IWFQCAQYVWY	: 365
MMP-14	: CDGN--EDTVAML-RG-EMFVFKRWFWRVRNNQVMD--GYMPIGQFWRGLPASINTAYERKDGKF-VE-FKCDKHVVF	: 390
MMP-2	: CKQDIVDGIQAI-RG-EIFFFKDRFIWRTVTPR-DKPMGPLLVAI-FWPPELPEKIDAVYEAPQEEKAVE-FAGNEYWYI	: 538
MMP-9	: CNVNI-EDATAEI--GNQLYLFKDGKYWRFSEGRGSRPQGFLLAD-KWPALPRKLDVFEPEPLSKK-LEFFESCROVWYI	: 585
MMP-1	: CDSKLTDAITTI-RG-EVMFFKDRFYMRT-NPFYPEVE-LNFI-SVFWPQLPNGLEAAAYEFADRDE-VRFFKGNKYWAV	: 351
MMP-8	: CDPSLTDAITTL-RG-EILFFKDRYFWR-RHPQLQRVE-MNFI-SLFWPSPLEPTGIQAAAYEDFDRDL-IELEKGNQYWAL	: 352
MMP-3	: CDPALSFDAVSTL-RG-EILFFKDRHFWR-KSLRKLEPE-LHLI-SSFWPSLPSGVDAAYEVTSKDL-VEIFKGNQFWAI	: 363
MMP-10	: CDPALSFDAISTL-RG-EYLFFKDRYFWR-RSHWNPEPE-FHLI-SAFWPSLPSYLDAAAYEVNSRDT-VEIFKGNQFWAI	: 362

Hämopexin-ähnliche Domäne	
MMP-19	: INFKMSGFPKPI-NRVE-PN---LDAALYW-PLNQVFLFKGSGWQWDELARTDFSSYPKPKGLEITGVPNQPSAAM : 433
MMP-11	: DGEKPVLG-PAPL-TELG--LVRFPVHAALVWGPEKNIYFGRGRDWRFHPSSTRRVDSPVPRR-ATDWRGVPSEIDAAF : 440
MMP-14	: DEASLEPGYPKHI-KELGRGLPTDKIDAAFWMP-NGKTYFERGNKYRFNEELRAVDSEYPKNIK-VWEGIPESPRGSF : 467
MMP-2	: SASTLERGYPKPI-TSLGLPPDVQRVDAAFNWSK-NKKTYYIFAGDKFWRVNEVKKKMDPGFPKLLADAWNAIPDNLDVAV : 621
MMP-9	: TGASVL-G-PRRI-DKLGGLGADVAQVTGAL--RSGRGMLLSRRLLWRFVKAQMVDPRSASEVDRMEPGVPLDTHDVF : 665
MMP-1	: QGQNVLHGYPKDIYSSFGFPRTVKHLDAAL-SEENTGKTYFVANKWRYDEYKRSMDPGYPKMLAHDPPGIGHKVDVAV : 430
MMP-8	: SGYDILQGYPKDI-SNYGFPSSVQAIDAAVFRYS---KTYFVNDQWRVYDNQRQFMEPGYPKSISGAFPGIESKVDVAV : 428
MMP-3	: RGNEVRAGYPRGHT-LGFPPTVRKLDAAL-SDKEKNKTYFVEDKWRVFEKRNSEMEGFPKQLAEDPPGIDSKIDAVF : 441
MMP-10	: RGNEVQAGYPRGHT-LGFPPTIKRLDAAV-SDKEKKKTYFVAADKWRVFDENSQSMEQGFPRLLIADDEPGVEPKVDVAVL : 440

Hämopexin-ähnliche Domäne	RASI-, bzw. Transmembrandomäne
MMP-19	: SWQD-GRVYFFKGVYWRNLNQQLRVEK-GYPRNISHNWMHCRPRTIDTTPSGGNTTPSGTIGTLDTTLSATETTFEY : 508
MMP-11	: QDAD-GYAYFLRGRLYWKFDPVKVKALBEGFPLVGPDEFGCAPANTFL : 488
MMP-14	: MGSDEVFTYFYKGNKYWKFNNQKLKVEPGYPKSALRDWGPCSPGRPEDEGTEETEVEVIIIEVDEEGGVAVSAAVVLPVL : 547
MMP-2	: DLQGGHHSYFFKGAAYLKLKNSLKSVK--FGSIKSDWLG : 660
MMP-9	: QY-REKA-YFCQDRFYWRVSSRSELNQVDQVGYVTYDILQCPED : 707
MMP-1	: MK-D-GFFYFHHGTRQYKFDPKTKRILTLQKAN---SWFNCRKN : 469
MMP-8	: Q--QEHFFHVSFSPRYAFDLIAQRVTRVARGN---KWLNCRYG : 467
MMP-3	: E--EFGFFYFFTGSSQLEFDPNAKKVTHLTKSN---SWLNC : 477
MMP-10	: Q--AFGFFYFFSGSSQLEFDPNARMVTHILKSN---SWLHC : 476

MMP-14	: LLLLVLAVGLAVFFERRHGTTPRRLLYCQRSLLDKV : 582
--------	--

Wie der Abbildung klar zu entnehmen ist, zeigt MMP-19 eine signifikante Ähnlichkeit zu den aufgeführten Mitgliedern der Matrixmetalloproteinasefamilie. Es gibt jedoch auch eindeutige Abweichungen, die MMP-19 von allen anderen humanen Matrixmetalloproteinase unterscheidet. Zum einen wird die schon in der Einleitung dargestellte besondere Sequenz der Autoinhibitor-domäne deutlich (PRCGLED statt PRCGVPD). Vor allem die Substitution des konservierten Prolins durch ein Glutamat ist hier sehr auffällig und könnte die Aktivierung des Proenzym ("cysteine switch") beeinflussen. Auch der Glutamat-reiche Abschnitt (VIRDEEEEETEL) innerhalb der Hingeregion weist keine Entsprechung in den anderen Sequenzen auf.

Am wichtigsten bezüglich der biologischen Rolle von MMP-19 sind die katalytische und die Hämopexin-ähnliche Domäne. Diese Abschnitte beeinflussen die Substrataffinität und Enzymlokalisierung und definieren damit weitgehend die biologischen Eigenschaften der Enzyme (Murphy und Knäuper, 1997; Imper und Van Wart, 1998). Auffällig ist, dass die innerhalb der Matrixmetalloproteinasefamilie sehr stark konservierte Bindestelle für das strukturelle, zweite Zinkatom bei MMP-19 grundlegend abweicht (Positionen 160 bis 190 in MMP-19). Der Anwesenheit dieses Zinkatoms wird zusammen mit der Bindung von wahrscheinlich mehreren Kalziumionen ein wichtiger Beitrag zum Erhalt der strukturellen Integrität des aktiven Zentrums zugeschrieben (Lovejoy *et al.*, 1994; Wetmore *et al.*, 1996; Massova *et al.*, 1998a). Folgende Konsensussequenz dieser Zinkbindestelle ist in nahezu allen 64 bekannten Matrixmetalloproteinase tierischer, pflanzlicher und bakterieller Herkunft gültig (Massova *et al.*, 1998b): HGDxx^p₅FDGxxxxLAHA^f₇xPGxxxxGDxHFD. Die drei markierten Histidinreste dienen der Koordination des Zinkions. Bei Stromelysin-3 des Menschen befindet sich an der Position des ersten Histidins ein Aspartat, von welchem jedoch angenommen wird, dass es die

Aufgabe des Histidins übernimmt (Stromelysin-3 aus Kaninchen und Maus besitzt jeweils ein Histidin an dieser Position).

MMP-19 weist nur das mittlere Histidin an der "richtigen" Stelle auf (S¹YCSNTFDGPGRVLAH²AD³IPE--L-GSV⁴HFD). Das dritte Histidin ist um drei Positionen in N-terminale Richtung verschoben. Das vordere Histidin, das bei den anderen Familienmitgliedern in einer hochkonservierten Umgebung liegt, findet sich bei MMP-19 an der Zinkbindung unfähiges Serin (S). Es ist jedoch denkbar, dass das um weitere fünf Positionen N-terminal liegende Histidin bei MMP-19 diese Zinkbindung übernimmt. Ebenfalls abweichend von der Konsensussequenz ist das nach dem zweiten Histidin liegende Aspartat (D). Alle anderen Matrixmetalloproteinasen tragen hier mit Phenylalanin oder Tyrosin (Y) einen hydrophoben Rest der die Bindungsaffinität zu Metallionen erhöht (Massova *et al.*, 1998a). MMP-19 scheint hier also ein eigenes, verändertes Motif zur Zinkkomplexierung zu besitzen.

Das aktive Zentrum von MMP-19 entspricht vollständig dem der anderen Matrixmetalloproteinasen.

Die Hämopexin-ähnliche Domäne von MMP-19 zeigt demgegenüber über ihre gesamte Länge immer wieder deutliche Abweichungen von der der anderen Familienmitglieder. Die Identität zu anderen Matrixinen, die innerhalb der Katalytischen Domäne noch knapp 50% beträgt, sinkt hier auf unter 25%. Die Ähnlichkeitswerte zwischen den anderen Matrixmetalloproteinasen sind, wie in Kapitel 4 ausführlich dargestellt werden wird, mit üblicherweise über 35% signifikant höher. Vor allem mehrere innerhalb der Matrixinfamilie hochkonservierte und geladene Aminosäuren sind in MMP-19 nicht vorhanden.

Eine Besonderheit der MMP-19 ist, dass sie C-terminal eine Verlängerung besitzt, die sich 36 Aminosäuren über das letzte konservierte Cystein-472 erstreckt, und der noch keine Funktion zugewiesen werden konnte. Vermutlich geht das erwähnte C-terminale Cystein-472 in Homologie zu den anderen Matrixmetalloproteinasen eine Schwefelbrückenbindung mit dem Cystein-289 ein, welches den Beginn der Hämopexin-ähnlichen Domäne markiert.

Phylogenetische Analyse

Auf diesem Sequenzvergleich basierend wurden die phylogenetischen Abstände zwischen den einzelnen Mitgliedern der Matrixmetalloproteinasenfamilie errechnet und für mögliche multiple Aminosäuresubstitutionen an jeder Position mithilfe der Algorithmen von Kimura (1983) und Jukes-Cantor (1996) korrigiert. Eine Übersicht über dieses Vorgehen findet sich in Lake und Moore (1998). Phylogenetische Stammbäume wurden jeweils unabhängig nach der UPGMA Methode (unweighted pair group method using arithmetic averages) (Sneath und Sokal, 1973) und der Kitsch Methode (Fitch-Margoliash and Least Squares Methods with Evolutionary Clock) mit den Programmpaketen PAUP (GCG-Programmpaket) und PHYLIP Version 3.5c (Phylogeny Inference Package) erstellt. Letzteres wurde freundlicherweise von Joseph Felsenstein (University of Washington, U.S.A.) zur Verfügung gestellt. Es wurden ausschließlich Vergleiche als relevant betrachtet, die bei Verwendung beider Algorithmen gleiche Ergebnisse lieferten. Die Verzweigungen wurden per "Bootstrapping"

(Übersicht in Lake und Moore, 1998) überprüft: Mindestens 70% Bootstrap-Unterstützung wurde für eine 95% Sicherheit der Verzweigungen vorausgesetzt. Trotz der relativ großen phylogenetischen Abstände zwischen den einzelnen Matrixmetalloproteinasen (Murphy *et al.*, 1991; de Souza und Brentani, 1993), sollte das beschriebene Vorgehen eine sinnvolle Analyse der Topologie des Matrixinstammbaums erlauben. In mehreren, getrennten Studien wurden die phylogenetischen Abstände der einzelnen Matrixmetalloproteinase Domänen (Katalytische und Hämapexin-ähnliche Domänen) ermittelt und Stammbäume erstellt. Des Weiteren wurden sowohl die Gesamtsequenzen, als auch die um die Hämapexin-ähnliche Domäne verkürzten Matrixmetalloproteinase Minimalstruktursequenzen analysiert. Alle Analysen wurden unter Ausschluss der Fibronectin-ähnlichen Domäne durchgeführt, da diese nur bei den beiden Gelatinasen vorkommt. Sie entstammt sehr wahrscheinlich einem Rekombinationsereignis eines gemeinsamen Gelatinasen Vorläufers mit Fibronectin (Collier *et al.*, 1991). Alle Untersuchungen ergaben eine ähnliche Position für MMP-19, die in Abbildung 5 dargestellt ist.

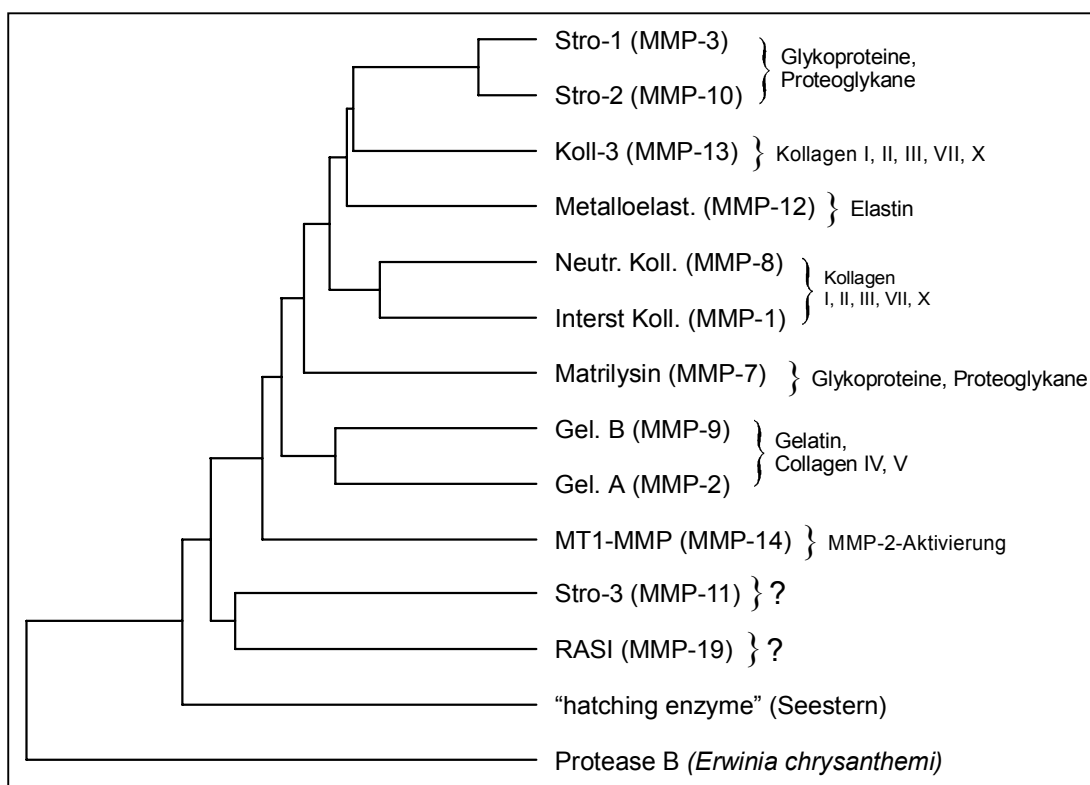


Abbildung 5 Phylogenetische Abstammung von MMP-19

Gezeigt ist die Stellung der MMP-19 innerhalb der humanen Matrixinfamilie. Zusätzlich dargestellt ist die Verwandtschaft zur Protease B von *Erwinia chrysanthemi* und dem "hatching enzyme" (Envelysin) des Seesterns, phylogenetischen Vorläufern der Matrixmetalloproteinasen. Wie im Text erläutert basiert der Stammbaum auf einen um diese beiden Vorläuferenzyme erweiterten multiplen Sequenzvergleich (entsprechend Abbildung 4). Die Berechnung der Astverzweigungen und der Astlängen wurde unter Einschluss der Möglichkeit multipler Aminosäuresubstitutionen an jeder Stelle nach der KITSCH Methode erstellt. Zur Orientierung wurden weiterhin die den einzelnen Matrixmetalloproteinasen "vorläufig" zugeordneten Substrate aufgeführt.

Abbildung 5 zeigt den ermittelten Stammbaum der Matrixinfamilie. Dieser Baum wurde basierend auf der um die Hämpexin-ähnliche Domäne verkürzten Matrixmetalloproteinase Minimalsequenzen erstellt und ist bezüglich der Stellung der bekannten Matrixmetalloproteinase mit den Ergebnissen von Murphy *et al.* (1991) und de Souza und Brentani (1993) konsistent. Entsprechende Ergebnisse wurden beim Vergleich der Gesamtsequenzen oder nur der katalytischen Domänen der einzelnen Matrixmetalloproteinase erhalten.

Phylogenetisch scheint MMP-19 am nächsten dem Stromelysin-3 verwandt zu sein, welches auf einem separaten Ast zwischen den restlichen Matrixmetalloproteinase und der phylogenetisch weiter entfernten bakteriellen Metalloendopeptidase Thermolysin, der Protease B von *Erwinia chrysanthemi* und dem "hatching enzyme" (Envelysin) des Seesternes liegt (Collier *et al.*, 1991; De Souza und Bretani, 1993). Um diese Verwandtschaft bezüglich der phylogenetischen Stellung von MMP-19 zu untersuchen, wurden die Analysen auf die sogenannten Metzinkinfamilie (Bode *et al.*, 1993) ausgeweitet und das "hatching enzyme" und die Protease B in die Sequenzvergleiche integriert (Sequenzdaten hier nicht gezeigt). Die zentralen Domänen dieser Moleküle zeigen eine relativ hohe Homologie zu den korrespondierenden Abschnitten der Matrixmetalloproteinase und im speziellen weist die katalytische Domäne von MMP-19 eine ausgeprägte Ähnlichkeit zur entsprechenden Domäne des "hatching enzymes" auf (Daten nicht gezeigt). Bezüglich der Evolution der humanen Matrixmetalloproteinase ist der erhaltene Stammbaum identisch zu den Resultaten, die auf dem Sequenzvergleich der Abbildung 4 beruhen.

MMP-19 und Stromelysin-3 gruppieren also mit keinem der anderen humanen Enzyme und stellen in der Tat einen separaten phylogenetischen Ast zwischen den humanen Matrixmetalloproteinase und den den Serralysinen, bzw. Astacinen zuzuordnenden Metalloproteinase des Seesternes und des Bakteriums *Erwinia chrysanthemi* dar. Das heißt, MMP-19 kann keiner der bisher definierten Untergruppen der Matrixinfamilie zugeordnet werden.

3.2 MMP-19 Genexpression

Wie zu Beginn des Ergebniskapitels einleitend erwähnt, ist die Analyse des Expressionsmusters ein wichtiger Ansatz, um die biologische Rolle eines neuen Enzyms zu verstehen. Hierzu wurden zunächst Northern Blotting Analysen mit mRNA aus humanem Gewebe durchgeführt. Da jedoch nur sehr wenige humane Gewebe zur Verfügung standen und diese Versuche deshalb nicht in der nötigen Ausführlichkeit durchgeführt werden konnten, werden diese Analysen hier nicht gezeigt. Mit den Publikationen von Cossins *et al.* (1996) und Pendas *et al.* (1997) liegen hierzu mittlerweile jedoch ausführliche Untersuchungen einer Vielzahl humaner Gewebe vor. Aus den Ergebnissen der beiden Publikationen und den eigenen Analysen geht hervor, dass MMP-19 mRNA in einer ungewöhnlich hohen Anzahl verschiedener adulter Gewebe des Menschen nachzuweisen ist. Dies ist für eine Matrixmetalloproteinase ungewöhnlich, da die meisten anderen Enzyme dieser Familie zwar stark während der Embryonalentwicklung und Organogenese exprimiert werden, adult jedoch nur unter ganz spezifischen Bedingungen, wie zum Beispiel während des Knochenwachstums, der Wundheilung oder verschiedener hormonell regulierter Prozesse des Reproduktionsapparates nachweisbar sind (Übersicht in Matrisian, 1992; Birkedal-Hansen *et al.*, 1993, Parks *et al.*, 1998, Fini *et al.*, 1998).

Ovarien, Lunge, Milz, Plazenta, Dünndarm und Pankreas weisen den höchsten Gehalt an MMP-19 mRNA auf. In einem geringeren Ausmaß ist MMP-19 auch im Colon, den Hoden, der Prostata, dem Thymus und sehr schwach auch im Herzen nachweisbar. Negativ in allen Analysen sind dagegen Nieren, Leber, Skelettmuskel, Gehirngewebe und periphere Leukozyten.

Dieses breite Expressionsspektrum ist, wie erwähnt, ungewöhnlich für eine Matrixmetalloproteinase und gleicht am ehesten dem der Membranständigen Matrixmetalloproteinase-1, welche eine Rolle in der Aktivierung der anderen Matrixmetalloproteinasen spielt (Will und Hinzmann, 1995; Takino *et al.*, 1995a und 1995b).

3.2.1 Etablierung einer MMP-19 RT-PCR Expressionsanalyse

Zur weiteren Untersuchung der MMP-19 Expression auf mRNA Ebene wurde eine semiquantitative RT-PCR Analyse auf Basis der sogenannten "primer dropping" Methode etabliert (Wong *et al.*, 1994). Diese zeichnet sich gegenüber Northern Blotting Analysen durch ein stark erhöhte Sensitivität aus. Damit sollte auch eine sehr geringe MMP-19 Expression zu detektieren sein. Des weiteren war es damit möglich, mit geringen Mengen an biologischem Material zu arbeiten.

Der Nachteil der RT-PCR-Analyse liegt zum einen in der sehr starken Anfälligkeit für Kontaminationen aus der Umgebung oder aus genomischen Rückständen in der aufgereinigten RNA, was oftmals zu falsch positiven Ergebnissen führt. Des weiteren ist die Amplifikation der aus der mRNA abgeleiteten cDNA bei hoher PCR-Zyklenzahl nicht mehr exponentiell. Die PCR-Reaktion geht dann in eine Sättigungsphase über, wodurch Unterschiede in der Expressionsstärke niedrig exprimierter Gene unter Umständen nicht mehr richtig wiedergegeben werden.

Aus diesem Grunde sind mehrere Kontrollschritte von Nöten, um das Verhalten der PCR-Produkte während der Amplifikation zu kontrollieren: Jede isolierte Gesamt-RNA wurde auf genomische Kontamination überprüft, indem eine PCR-Amplifikation ohne vorhergehende Reverse Transkription mit Primern spezifisch für die Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase (GAPDH) durchgeführt wurde. Die Reverse Transkription von einem Mikrogramm von genomischen Rückständen freier Gesamt-RNA wurde wie unter Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Davon wurde ein Zehntel für die PCR-Amplifikation mit MMP-19 spezifischen Primern verwendet. Nach 15 Zyklen wurden jeweils die GAPDH spezifischen Primer zugegeben und die PCR-Reaktion für weitere 15 Zyklen fortgesetzt ("primer dropping"). GAPDH diente dabei als interne Kontrolle für den erfolgreichen Reaktionsverlauf. Des weiteren wurde GAPDH als Haushaltsgen mit relativ invariantem Expressionslevel als interner Mengenstandard herangezogen. In parallel durchgeführten Kontrollreaktionen, wurde die gleiche RNA Menge amplifiziert, jedoch wurde keine Reverse Transkriptase zugegeben.

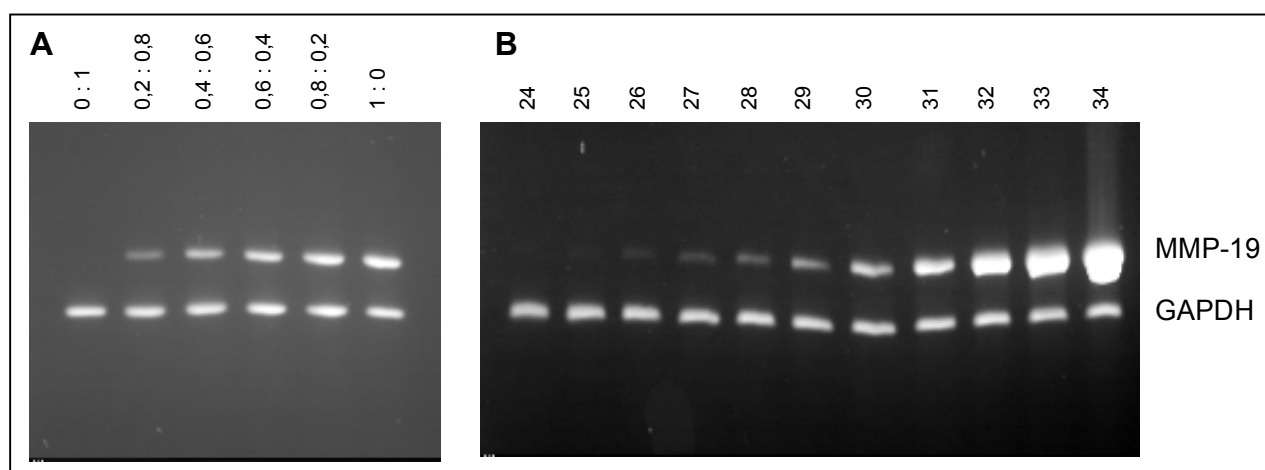


Abbildung 6 MMP-19 RT-PCR unter variierenden Bedingungen

Analysiert wurde das Amplifikationsverhalten der MMP-19 und der GAPDH mRNA in der RT-PCR. Dabei wurde getestet, in wie weit die für eine sinnvolle Analyse notwendige exponentielle Vervielfältigung der cDNAs gegeben ist und ab welcher Zyklenzahl die PCR-Reaktion in die Plateauphase einläuft. Abbildung 6 A zeigt eine RT-PCR unter den in den restlichen Versuchen verwendeten Standardbedingungen (siehe Material und Methoden). Die verwendeten Gesamt-RNAs waren eine Mischung aus SV80 mRNA (MMP-19 positiv) und HELA mRNA (MMP-19 negativ) dar und zwar in den Verhältnissen SV80:HELA = 0:1; 2:8; 4:6; 6:4; 8:2 und 1:0. Abbildung 6 B zeigt das Verhalten der PCR-Produkt Amplifikation abhängig von der verwendeten Zyklenzahl. Es wurde eine Standard RT-PCR-Reaktion mit variierenden Zyklenzahlen (siehe Beschriftung) durchgeführt. Die Anzahl der PCR-Zyklen für GAPDH sind aufgrund der späteren Zugabe der GAPDH Primer immer um 15 gegenüber der Gesamtzahl erniedrigt ("primer dropping").

Das Verhalten der PCR-Produkte während der Amplifikation wurde getestet, indem die RNA der MMP-19 positiven Lungenfibroblastenlinie SV80 und der MMP-19 RNA negativen Cervix Karzinom Zelllinie HELA (siehe unten) in verschiedenen Verhältnissen gemischt, in cDNA umgeschrieben und per PCR-Reaktion amplifiziert wurden. Ergebnisse dieser Vorversuche sind in Abbildung 6 A gezeigt. In den hier gezeigten Analysen lassen sich Unterschiede mit dem Faktor 1,5 im MMP-19 Expressionslevel detekieren.

Des Weiteren wurde untersucht, ob sich die beiden parallel vervielfältigten PCR-Produkte MMP-19 und GAPDH gegenseitig in ihrem Amplifikationsverhalten beeinflussen. Wie aus den Ergebnissen in Abbildung 6 B klar zu ersehen ist, läßt sich die MMP-19 mRNA innerhalb 34 PCR-Zyklen exponentiell amplifizieren. Das GAPDH Signal bleibt auch bei relativ hohen Zyklenzahlen weitgehend stabil. Da alle weiteren Analysen mit 30 Zyklen durchgeführt wurden, sollte also die Vervielfältigung der MMP-19 mRNA exponentiell verlaufen und damit ein Vergleich der Expressionsstärken mit dieser Methode möglich sein.

In beiden Analysen wurde auch der nur eingeschränkt lineare Bereich der Ethidiumbromid Fluoreszenz nicht überschritten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der etablierte RT-PCR-Assay zuverlässige Aussagen über die relative Expressionsstärke der MMP-19 mRNA erlaubt.

3.2.2 MMP-19 mRNA in verschiedenen Zelllinien

Dieser RT-PCR-Assay wurde zunächst angewandt, um humane Zelllinien auf die Expression von MMP-19 mRNA zu testen. Wie aus Abbildung 7 zu entnehmen ist, weisen alle betrachteten synovialen Fibroblastenlinien MMP-19 mRNA auf. Dies ist nicht ungewöhnlich, da in vielen Untersuchungen gezeigt wurde, dass synoviale Fibroblasten in Kultur eine Vielzahl verschiedener Matrixmetalloproteinasen exprimieren (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993; Cunnane *et al.* 1998; Giambernadi *et al.*, 1998). Einen signifikanten Unterschied in der MMP-19 mRNA Expression der Fibroblastenlinie einer gesunden Person und den Fibroblastenlinien von RA Patienten ist nicht auszumachen, wie es die Identifizierung von MMP-19 als RA-assoziiertes Autoantigen hätte implizieren können. Es muss allerdings angemerkt werden, dass alle drei Zelllinien durch Infektion mit SV40 immortalisiert wurden. Dies könnte die Expression von MMP-19 beeinflussen, wie schon für andere Mitglieder der Matrixmetalloproteinasenfamilie gezeigt wurde (Logan *et al.*, 1992; Logan *et al.*, 1996). Eine weitere Fibroblastenlinie, die Lungenfibroblastenlinie SV80 zeigt ebenso klare MMP-19 Expression. Dies korrespondiert mit der erwähnten starken Expression in der menschlichen Lunge.

Eine Vielzahl anderer Zelllinien sind negativ für MMP-19. Darunter findet man die Hepatocytelinie HepG2, was mit dem Fehlen von MMP-19 mRNA in der Leber korreliert.

Die Cervix Karzinomlinie HeLa zeigt, wie auch die lymphoblastoide T-Zelllinie Jurkat keine MMP-19 Expression. Da in vorangehenden Arbeiten (Sedlack, Doktorarbeit 1996) sowohl Jurkat T-Zellen als

auch primäre T-Zellen als MMP-19 mRNA positiv dargestellt wurden, war dieses Ergebnis unerwartet. Aus diesem Grunde wurde die Analyse der Jurkat T-Zellen sehr stark ausgeweitet, doch weder Jurkat, noch Molt-4 oder CEM-T-Zellen wiesen im unstimulierten Zustand MMP-19 mRNA auf (Daten nicht gezeigt). Wie weiter unten dargestellt, sind auch primäre T-Zellen MMP-19 negativ.

Die humane, venöse Endothelzelllinie ECV304 gehört ebenso in die Gruppe der MMP-19 negativen Zelllinien. Diese Beobachtung ist sehr interessant, da MMP-19 durchaus in Zellen des Blutgefäßes exprimiert wird, wie spätere Versuche gezeigt haben (siehe Kapitel 3.2.5).

Die myeloiden Zelllinien HL-60 und THP-1 sind beide MMP-19 positiv. Die myeloide Vorläuferlinie HL-60, die bezüglich ihres Differenzierungszustandes noch vor der Differenzierung zum Monozyten, bzw. Granulozyten steht (Collins *et al.*, 1979, Lyons und Ashman, 1989) zeigt eine geringe Expression von MMP-19 mRNA. Die Zelllinie THP-1, die alle Merkmale aktivierter Monozyten aufweist (Tsuchiya *et al.*, 1980, Lyons und Ashman, 1989), exprimiert MMP-19 jedoch zu einem sehr viel höheren Grad. Diese Beobachtung impliziert, dass die Expressionsstärke dieser Matrixmetalloproteinase an den Differenzierungsstatus myeloider Zellen gekoppelt sein könnte.

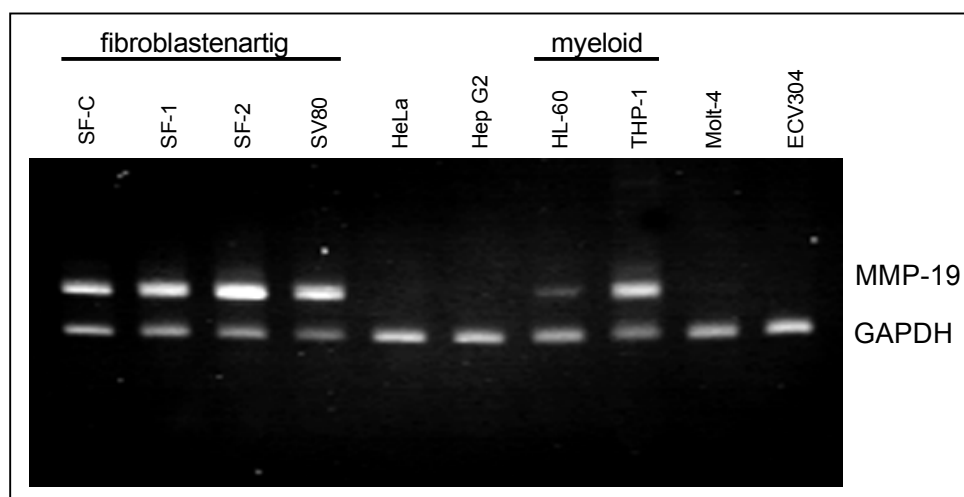


Abbildung 7 MMP-19 Expression in humanen Zelllinien

cDNA von 100 ng Gesamt-RNA wurde in einer multiplex PCR-Reaktion mit MMP-19 und GAPDH spezifischen Primern für 30, bzw. 15 Zyklen amplifiziert. Die gezeigten Zelllinien sind: SF-C, SF-1 und SF-2: SV40-immortalisierte synoviale Fibroblasten einer gesunden Person (SF-C) und zweier RA-Patienten; SV80: SV40-immortalisierte Lungenfibroblasten; HeLa: Cervix Adenokarzinomlinie; Jurkat: T Zell Lymphoblast; HL60: akute promyelotische Leukämiezellen; THP-1: akute monozytische Leukämiezellen; HepG2: Hepatoblastomlinie; ECV304: venöse Endothelzelllinie.

3.2.3 Ist die MMP-19 Expression an den Differenzierungsstatus myeloider Zellen gekoppelt?

Wie wird die Expression der MMP-19 mRNA in myeloiden Zellen reguliert? Um diese Frage zu beantworten, wurden sowohl die promyeloide HL-60, als auch die monozytischen THP-1 durch die Zugabe von Phorbolestern zu Makrophagen differenziert (Huberman *et al.*, 1982; Auwerx, 1991). HL-60 wurden für zwei Tage mit 10 ng/ml Phorbolmyristatacetat (PMA) stimuliert; THP-1 für zwölf Stunden. Die Differenzierung wurde anhand phänotypischer Veränderungen, wie der Induktion von Adhärenz an die Zellkulturschale, verfolgt.

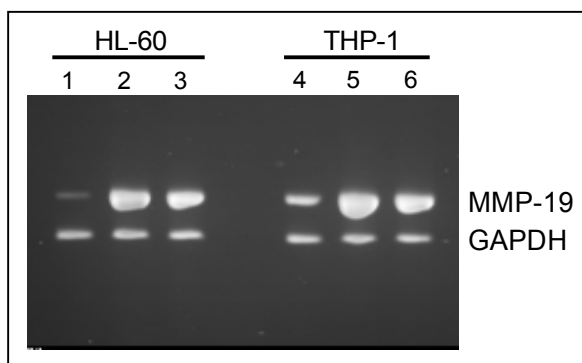


Abbildung 8 Expression von MMP-19 während der myeloiden Differenzierung

THP-1 und HL-60 wurden mit 10 ng/ml PMA für 12, bzw. 48 Stunden zu makrophagenartigen Zellen differenziert. Anschließend wurden die Zellen vier mal mit Medium ohne TPA gewaschen und für jeweils weitere zwei Tage kultiviert. Der MMP-19 mRNA Gehalt wurde zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt: Spur 1 und 4: unstimuliert; Spur 2 und 5: PMA stimuliert; Spur 3 und 6: 2 Tage nach PMA Stimulation.

Wie aus Abbildung 8 zu entnehmen ist, führt die Stimulation sowohl bei HL-60, als auch bei THP-1 Zellen zu einer starken Induktion der MMP-19 mRNA Expression (Spur 2 und 5). Selbst nach Wegnahme des Stimulus bleibt die beobachtete erhöhte MMP-19 Expression weitgehend erhalten (Spur 3 und 6). Dieses Ergebnis zeigt, dass die MMP-19 mRNA Expression in myeloiden Zellen, bzw. zumindest in kultivierten myeloiden Zelllinien an den Differenzierungsstatus gekoppelt ist. Die leichte Abnahme des Gehaltes an MMP-19 mRNA nach Entzug des Stimulus (Spur 3 und 6) ist vermutlich dem Wegfall eines direkten PMA-Effekts auf die MMP-19 Expression zuzuschreiben.

3.2.4 MMP-19 in peripheren mononukleären Blutzellen

Die vorhergehenden Analysen an Zelllinien weisen myeloide Zellen als MMP-19 Produzenten aus. Demgegenüber wurde jedoch in Northern Analysen gezeigt, dass aus dem Blut isolierte humane Leukozyten MMP-19 negativ sind. Gibt es also einen Stimulus, der MMP-19 in Leukozyten induziert oder ist die MMP-19 Expression in diesen Zelllinien als artifiziell zu betrachten?

Um dieses zu untersuchen, wurden humane mononukleäre Blutzellen aus venösem Blut über einen Ficollgradienten gereinigt und in autologem Serum kultiviert. Wie aus Abbildung 9 zu entnehmen ist, sind direkt isolierte Leukozyten erwartungsgemäß negativ für MMP-19 mRNA. Nimmt man die Zellen jedoch in Kultur, so findet eine signifikante Induktion der MMP-19 Expression statt.

Diese Expression ist schon nach 16 Stunden zu beobachten und über mindestens 10 Tage stabil (Daten nicht gezeigt). Der Gehalt an MMP-19 mRNA in den kultivierten Leukozyten korreliert direkt mit dem Gehalt an autologem Serum im Kulturmedium: Je mehr Serum eingesetzt wird, desto mehr MMP-19 mRNA ist zu detektieren.

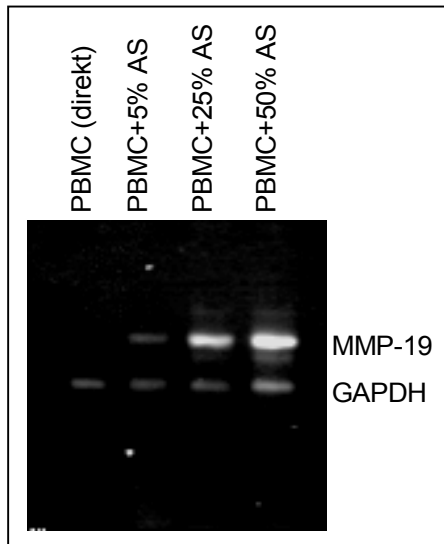


Abbildung 9

MMP-19 Induktion in Leukozyten durch autologes Serum

Humane Leukozyten (PBMC) wurden aus venösem Blut über einen Ficollgradienten gereinigt und der Gehalt an MMP-19 mRNA wurde entweder direkt (Spur 1) oder nach zweitägiger Kultur in RPMI1640, supplementiert mit dem jeweils angegebenen Gehalt an autologem Serum, (Spur 2-4) bestimmt.

Welche Zellen sind für die serumabhängige Induktion der MMP-19 Expression verantwortlich?

Die in Kapitel 3.2.2 und 3.2.3 gezeigten Untersuchungen an humanen Zelllinien lassen Monocyten und Makrophagen als mögliche Kandidaten erscheinen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden periphere mononukleäre Blutzellen isoliert und die CD14 positiven Zellen, d.h. in erster Linie Monozyten/Makrophagen mithilfe des Magnet-aktivierten Zell Sortierers (MACS) von den restlichen Zellen abgetrennt und getrennt kultiviert. Nach zweitägiger Kultivierung wurde die RNA dieser Zellen isoliert und analysiert. Parallel wurden unsortierte mononukleäre Blutzellen kultiviert. Die RNA dieser Zellen wurde nach zweitägiger Kultivierung entweder direkt oder nach Auftrennung der Zellen in (meist adhären)te CD14⁺-Zellen, bzw. CD14⁻-Zellen analysiert.

Wie aus Abbildung 10 zu entnehmen ist, sind die CD14 positiven Blutzellen für die serumabhängige Hochregulierung der MMP-19 mRNA Expression verantwortlich. Diese Induktion scheint unabhängig von kokultivierten Lymphozyten zu sein, da sie sowohl in der reinen CD14⁺-Kultur, bei der die Auftrennung in CD14⁺ und CD14⁻ schon vor der Inkulturnahme durchgeführt wurde, als auch bei gemeinsam kultivierten und erst anschließend sortierten Zellen auftritt. Die schwache MMP-19 Bande, die bei CD14⁻-Zellen zu sehen ist, stammt wahrscheinlich von kontaminierenden CD14⁺-Zellen: Wie in parallelen FACS-Analysen bestimmt wurde, betrug die Reinheit der mit MACS sortierten Zellen nur knapp mehr als 95% (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die beobachtete serumabhängige Induktion der MMP-19 Genexpression in mononukleären Blutzellen von CD14⁺-Zellen ausgeht und der dafür notwendige Stimulus sehr wahrscheinlich nicht von Lymphozyten herrührt. Das heißt, es sind in erster

Linie Monozyten und, falls eine Differenzierung in Kultur schon eingetreten ist, Makrophagen für diesen Effekt verantwortlich.

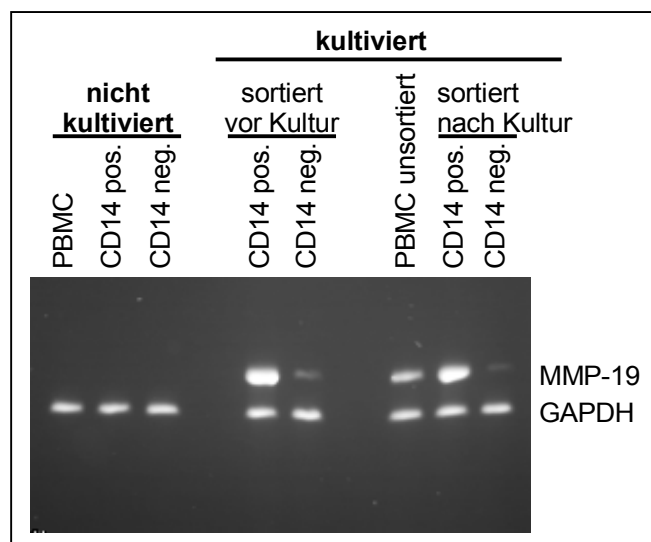


Abbildung 10 MMP-19 Expression in CD14⁺-Zellen

Humane Leukozyten (PBMC) wurden aus venösem Blut aufgereinigt und in CD14⁺- (Monozyten/Makrophagen), bzw. CD14⁻-Zellen (Lymphozyten) aufgetrennt. Der Gehalt an MMP-19 mRNA wurde in diesen Zellen entweder sofort (Spur 1-3) oder nach zweitägiger Kultur in RPMI1640 mit 25% autologem Serum bestimmt (Spur 4-8). Spur 4 und 5 zeigt die MMP-19 Expression in Zellen, die vor der Kultivierung sortiert wurden, Spur 7 und 8 wurden nach der Kultivierung sortiert. Spur 1 und 6 (PBMC) sind nicht sortierte Blutzellen.

Welcher Stimulus induziert MMP-19 in Blutzellen?

Mehrere Stimuli können für diese serumabhängige Induktion der MMP-19 Expression in CD14⁺-Zellen in Frage kommen. Ein einfacher Serumeffekt kann jedoch ausgeschlossen werden, da es sich um autologes Serum handelt, das derselben Blutspende wie die kultivierten Zellen entstammt. Die Induktion durch kontaminierende Endotoxine wäre bei Monozyten nicht ungewöhnlich und könnte im Zusammenhang mit der entzündungsabhängigen Induktion von Proteinasen auch physiologisch eingeordnet werden. Jedoch kann auch dieses mit obigem Argument ausgeschlossen werden. Auch eine an Proliferationsinduktion gekoppelte Expressionssteigerung ist unwahrscheinlich. Der Zeitraum ist hierfür zu kurz, da die erhöhte Expression schon nach wenigen Stunden zu beobachten ist (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren wird bei Monozyten unter diesen Kulturbedingungen keine Proliferation beobachtet, sondern viel mehr eine Differenzierung zu Makrophagen (Graeme und McBride, 1989). Eine möglicher Mechanismus stellt jedoch die Hochregulierung der MMP-19 Genexpression induziert durch Adhäsion an die Zellkulturschale dar: Serum enthält verschiedene Anheftungsfaktoren, die eine solche Adhäsion an die Unterlage vermitteln können. Im Blutgefäß werden diese Adhäsionsprozesse, die vor allem zwischen Blutzellen wie Monozyten und den die Gefäße auskleidenden Endothelzellen und der darunter liegenden Basalmembran stattfinden, über einen sehr komplexen Mechanismus reguliert. Eine Übersicht der hier stattfindenden Wechselwirkungen, in denen vor allem Oberflächenmoleküle der Integrin- und der Immunglobulinsuperfamilie involviert sind, findet sich in Imhof und Dunon (1995) und Hynes (1992). Im Kulturgefäß könnte jedoch schon eine relativ einfache Wechselwirkung einiger weniger zentraler Adhäsionsmoleküle mit der oberflächenbehandelten

Zellkulturschale eine solche Geninduktion bewirken. Umgekehrt sollte dann eine Verringerung der Adhäsion die beobachtete Serum-induzierte Hochregulierung der MMP-19 mRNA vermindern.

Dies wurde getestet, indem mononukleäre Blutzellen in "Ultra low attachment" Platten kultiviert wurden. Diese Platten reduzieren die Wechselwirkung der Zellen mit der Unterlage durch eine spezielle Beschichtung auf ein Minimum. Auch α -Tocopherol kann die Adhäsion bestimmter Zelltypen, unter denen sich unter anderem Monozyten, bzw. Makrophagen befinden, durch einen noch nicht völlig geklärten Proteinkinase C vermittelten Mechanismus verhindern (siehe Kapitel 4, Diskussion). Diese Adhäsionsblockade scheint unabhängig von der Wirkung von α -Tocopherol als Antioxidants zu sein, da β -Tocopherol und auch chemisch verwandte Antioxidantien diesen Effekt nicht zeigen (Angelo Azzi, Universität Bern, persönliche Mitteilung). Abbildung 11 zeigt die Zusammenfassung von Versuchen, bei denen der Zusammenhang zwischen Adhäsion und MMP-19 Genexpression in peripheren mononukleären Blutzellen und in HL-60 getestet wurde.

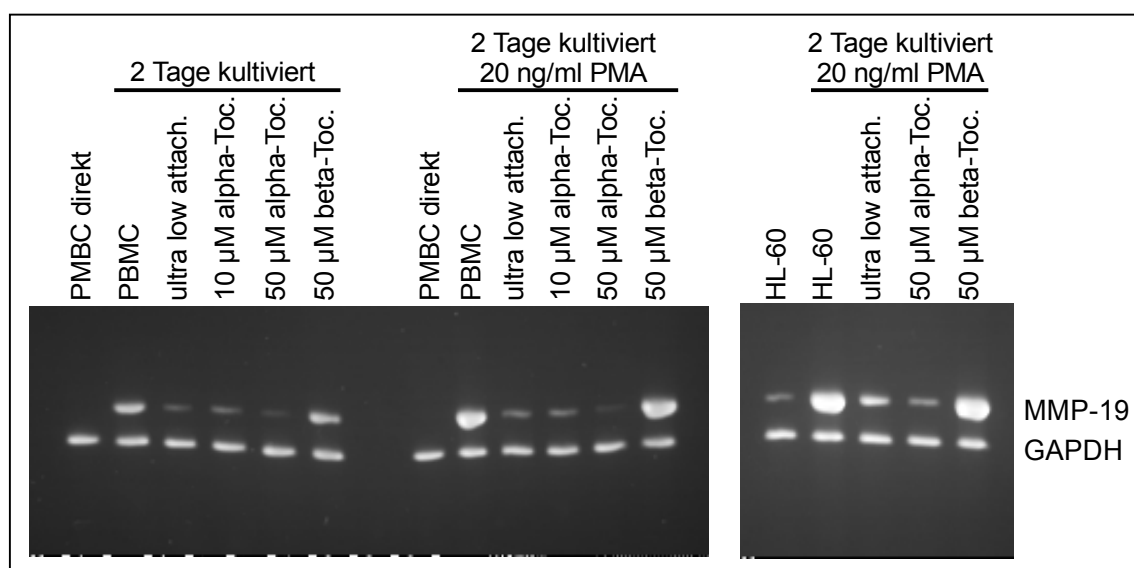


Abbildung 11 Adhäsionsinduzierte MMP-19 Expression in peripheren mononukleären Blutzellen

Mononukleäre Blutzellen wurden aus venösem Blut isoliert und entweder sofort (PBMC direkt, Spur 1 und 7) oder nach zweitägiger Kultur +/- PMA auf MMP-19 mRNA Expression getestet. Spur 2 und 8 (PBMC) zeigt die MMP-19 Expression nach zweitägiger Kultur unter Standardbedingungen +/- PMA. Spur 3 und 9 zeigt die MMP-19 mRNA nach "adhäsionsfreier" Kultur in "ultra low attachment" Platten. Spur 4, 5, 6 und 10, 11, 12 zeigen MMP-19 nach Standardkultur +/- PMA und den angegebenen Mengen an α -, bzw. β -Tocopherol.

Die rechte Abbildung zeigt die analogen Versuche mit HL-60 Zellen.

Wie aus den in Abbildung 11 gezeigten Versuchen zu entnehmen ist wird die beobachtete Induktion der MMP-19 Expression sowohl nach mechanischer, als auch nach pharmakologischer Blockade der Adhäsion stark verringert. Bei peripheren Blutzellen ist diese Inhibition unabhängig davon, ob die MMP-19 mRNA Hochregulierung nur durch die Inkulturnahme ausgelöst wurde, oder ob dieser Effekt

durch zusätzliche PMA-Stimulation gesteigert wurde. Auch die während der PMA-induzierten HL-60 Differenzierung zu beobachtende Expressionssteigerung ist sowohl durch mechanische Verhinderung der Adhäsion, als auch durch die Gabe von α -Tocopherol, aber nicht durch β -Tocopherol weitgehend zu verhindern. Dies lässt den Schluß zu, dass die seruminduzierte Hochregulierung der MMP-19 Expression höchstwahrscheinlich durch Adhäsion vermittelt wird. Auch der PMA Effekt scheint zum Teil adhäsionsabhängig zu sein. Wie Adhäsionsfaktoren dabei eine Rolle spielen könnten, und die Implikationen, die sich hieraus für eine biologische Rolle der in Makrophagen induzierten Matrixmetalloproteinase MMP-19 ergeben, werden in Kapitel 4 ausführlich diskutiert werden.

Zusammengefasst ist zu sagen, dass MMP-19 in den im Blut zirkulierenden Monozyten nicht vorhanden ist, jedoch nach Kontakt zu einer Unterlage induziert wird, das heißt übertragen auf die *in vivo* Situation, bei Adhäsionsprozessen an die Gefäßwand oder an das Gewebe. Dies spielt eine Rolle bei der Migration durch die Gefäßwand, wie zum Beispiel bei der Einwanderung in Inflammationsherde. Monozyten und Makrophagen und die von ihnen exprimierte Matrixmetalloproteinase sind zudem wichtige Spieler bei der Pathogenese von Koronarerkrankungen, wie Arteriosklerose (Galis *et al.*, 1995; Shah *et al.*, 1995; Moore *et al.*, 1998). Die beobachtete Inhibition der MMP-19 Expression durch α -Tocopherol ist in diesem Zusammenhang sehr bemerkenswert, da diese Substanz sehr wirkungsvoll gegen Arteriosklerose schützt (Suzukawa *et al.*, 1998; Chan, 1998).

3.2.5 MMP-19 Expression in Zellen des Blutgefäß Systems

Monozyten, bzw. Makrophagen sind nicht die einzigen Zelltypen, die eine Expression von MMP-19 aufweisen. In Studien, durchgeführt von Dr. Cornelia Kolb (Lehrstuhl für Immunologie, Universität Konstanz), wurde die MMP-19 Expression in humanen Gewebeschnitten, insbesondere in Zellen der Blutgefäße untersucht. Zum einen findet man eine große Menge an MMP-19 Protein in vaskulären glatten Muskelzellen (Kolb *et al.*, 1997), zum anderen scheint MMP-19 auch in Endothelzellen der Kapillaren unter bestimmten Umständen exprimiert zu werden (Kolb *et al.*, 1999). Diese Studien wurden durch die im folgenden gezeigten *in vitro* Analysen auf mRNA Ebene gestützt. Zellen der glatten Gefäßmuskulatur und makrovaskuläre Endothelzellen wurden wie beschrieben isoliert (Stopeck *et al.*, 1997). Die Isolierung mikrovaskulärer Endothelzellen aus humanem Fettgewebe ist unter Material und Methoden beschrieben.

Wie Abbildung 12 zu entnehmen ist, exprimieren venöse makrovaskuläre Endothelzellen der Nabelschnur kein MMP-19. Sowohl die Zelllinie ECV304, als auch primäre Zellen dieses Typs zeigen keine MMP-19 mRNA. Dies ist konsistent mit den erwähnten Analysen auf Proteinebene. Selbst Stimulationen mit 20 ng/ml des Phorbolesters PMA, 10 ng/ml des Wachstumsfaktors EGF oder 1 ng/ml bFGF führten zu keiner Induktion der MMP-19 Expression (Daten nicht gezeigt).

Arterielle makrovaskuläre Endothelzellen der Nabelschnur zeigen in Immunfärbungen eine granulöse, zytoplasmatische Färbung für MMP-19 Protein, die allerdings im Laufe der Kultivierung immer weiter abnimmt. Dieses Verhalten ist auch auf mRNA Ebene zu beobachten. Die hier gezeigte sehr

schwache MMP-19 mRNA Expression stammt von einer zwei Wochen alten Kultur arterieller Endothelzellen. Frische Kulturen zeigen eine etwas höhere Expression. Jedoch ist auch diese weitaus geringer als in mikrovaskulären Endothelzellen.

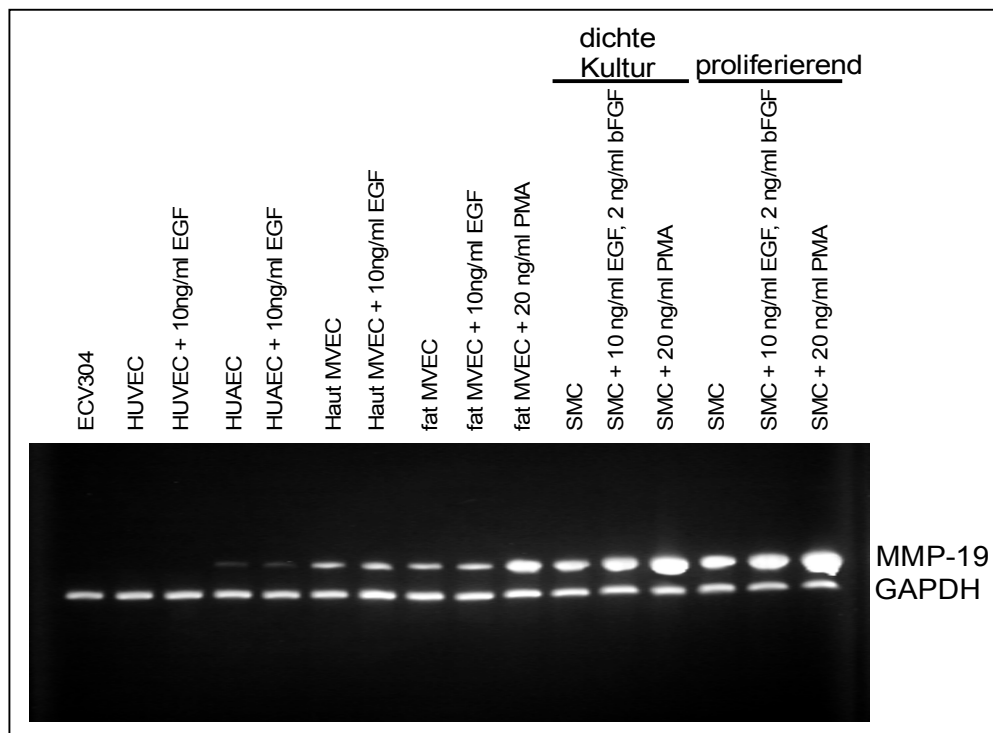


Abbildung 12 Expression von MMP-19 in Zellen des Blutgefäßes

Dargestellt ist die Analyse des MMP-19 mRNA Gehaltes verschiedener humaner Blutgefäßzellen. ECV304 ist eine spontan transformierte HUVEC-Zelllinie; HUVEC sind "humane venöse Endothelzellen", HUAEC "humane arterielle Endothelzellen", SMC sind "glatte Muskelzellen". Die zur Stimulation eingesetzten Substanzen wurden der Kultur jeweils für 18 Stunden zugesetzt.

Mikrovaskuläre Endothelzellen, die in wachsenden, neu entstehenden Blutgefäßen vorkommen, waren in jedem untersuchten Fall MMP-19 positiv: Auf mRNA Ebene findet man eine selbst nach drei Wochen noch stabile Expression von MMP-19. Diese ist sowohl in mikrovaskulären Endothelzellen der Haut, als auch des Fettgewebes nachweisbar und wird nach Stimulation mit 20 ng/ml PMA, einem potenten proangiogenetischen Induktor (Piechocki *et al.*, 1992), nochmals merklich erhöht.

Glatte Muskelzellen der Nabelschnur zeigen sowohl auf Protein-, als auch auf mRNA-Ebene die stärkste Expression für MMP-19. Diese Expression kann zudem durch Stimulation mit PMA, EGF und bFGF erhöht werden. Alle drei Substanzen werden als proangiogenetische Wachstumsfaktoren betrachtet (Iwasaka *et al.*, 1996). Zusätzlich ist auffällig, dass proliferierende glatte Muskelzellen zumindest in Kultur einen um den Faktor zwei bis drei mal höheren Gehalt an MMP-19 mRNA aufweisen als ruhende Zellen, die für zwei Tage in einer dichten Kultur gehalten wurden.

MMP-19 scheint also zum einen in der die Arterien umgebenden glatten Muskelzellschicht, zum anderen in den Endothelzellen der Kapillaren eine Rolle zu spielen.

Über die vielfältigen Funktionen von Matrixmetalloproteinasen in der glatten Muskelzellschicht der Arterien wird sehr viel diskutiert, wobei das Augenmerk insbesondere auf die Beteiligung bei pathologischen Vorgängen, wie zum Beispiel der Arteriosklerose, gelegt wird (Newby *et al.*, 1994 und 1996). Sowohl die schon starke MMP-19 Grundexpression in den glatten Muskelzellen, als auch die PMA-induzierte, bzw. die Proliferations-assoziierte Erhöhung des mRNA Gehaltes können sehr gut in die diskutierten Theorien eingefügt werden. Eine ausführliche Diskussion hierzu findet sich in Kapitel 4 wieder.

Die beobachtete differentielle Expression von MMP-19 in humanen Endothelzellen impliziert eine mögliche Rolle von MMP-19 beim Blutgefäßwachstum. Da in erster Linie mikrovaskuläre Endothelzellen positiv für MMP-19 sind, könnte diese neue Matrixmetalloproteinase ein wichtiger Spieler in grundlegenden Vorgängen der Angiogenese, bzw. der Neovaskularisierung sein. Der Themenkomplex Expression und Funktion von Matrixmetalloproteinasen während der Angiogenese gehört zu den im Augenblick am stärksten bearbeiteten Feldern der biomedizinischen Proteinaseforschung, da die Bildung neuer Blutgefäße zu den zentralen Prozessen des Tumorwachstums gehört, wie in Kapitel 1 ausgeführt wurde. In einer Vielzahl klinischer Studien wird untersucht, ob Inhibitoren der Matrixmetalloproteinasen die Versorgung von Tumoren mit Blutgefäßen unterbinden können. Wie in Kapitel 4 ausführlich diskutiert werden wird, könnte MMP-19 in diesem Zusammenhang ein neuer, sehr vielversprechender, pharmakologischer Angriffspunkt darstellen, da keine der bisher untersuchten klassischen Matrixmetalloproteinasen ein ähnliches, für mikro- aber nicht makrovaskuläre Endothelzellen spezifisches Expressionsmuster zeigt.

3.3 Zelloberflächen Bindung von MMP-19

Wo ist das Protein MMP-19 auf subzellulärer Ebene lokalisiert?

Wie in der Einleitung dargestellt, besitzen Matrixmetalloproteinasen und so auch MMP-19 ein Signalepeptid, welches den Transport in den Extrazellulärraum vermittelt. Dieser Export erfolgt meist direkt über das endoplasmatische Reticulum und den Golgi Apparat, ohne weitere grundlegende Modifikationen. Im Falle von Stromelysin-3 und den Membranständigen Matrixmetalloproteinasen kann hier jedoch ein proteolytischer Aktivierungsschritt durch Golgi-assoziierte Serinproteasen des Furintyps zwischengeschaltet sein. Eine andere Möglichkeit stellt der zeitverzögerte Export dar, bei dem die Proteine in einem intrazellulären Zwischenspeicher zurückgehalten werden, bis ein weiterer Stimulus die endgültige Abgabe nach außen vermittelt. Innerhalb der Matrixmetalloproteinasenfamilie trifft dies unter anderem für die Gelatinase B in Endothelzellen (Nguyen *et al.*, 1998) und für die Neutrophilen Kollagenase in den Granula der Neutrophilen Granulozyten zu (Devarajan *et al.*, 1991). Auch die Verteilung im Extrazellulärraum kann sehr stark zwischen den einzelnen Matrixmetalloproteinasen variieren. So sind die Membranständigen Matrixmetalloproteinasen aufgrund ihrer C-terminalen Transmembrandomänen immer in der Zelloberflächen verankert. Gelatinase A hingegen findet man sowohl Zelloberflächen-assoziiert, als auch löslich in der Extrazellulärmatrix (Yu *et al.*, 1998). Andere Matrixmetalloproteinasen scheinen ausschließlich in der Extrazellulärmatrix lokalisiert zu sein, wobei sie hier oftmals direkt an ihre Substratmoleküle wie zum Beispiel Kollagen gebunden sind (Allan *et al.*, 1991; de Souza und Brentani, 1992; Olson *et al.*, 1998).

Für MMP-19 gab es schon früh Hinweise, daß zumindest eine fakultative Zelloberflächenbindung bestehen könnte (Sedlacek *et al.*, 1998). Allerdings konnte in dieser Arbeit weder die Art der Oberflächenbindung ermittelt werden, noch die MMP-19 tragenden Zellen eindeutig identifiziert werden.

Nachdem mit dem affinitätsgereinigten, monospezifischen Kaninchen anti-MMP-19 Antikörper 511 (Kolb *et al.*, 1997; Sedlacek *et al.*, 1998), der gegen die Hingeregion von MMP-19 gerichtet ist, ein zuverlässiger Antikörper zur Verfügung stand, wurden diese Analysen neu aufgenommen.

Im Fluoreszenz-aktivierten Zellscanner (FACScan) wurden die Oberflächen verschiedener Zelltypen auf MMP-19 Expression analysiert. Wie in Abbildung 13 gezeigt, tragen sowohl die myeloiden Vorläuferzellen HL-60, als auch die THP-1 Monozyten, MMP-19 auf ihrer Oberfläche. Jurkat und Molt-4 T-Zellen sind entgegen früherer Analysen (Sedlacek, Doktorarbeit 1996) negativ für MMP-19. Dieses Ergebnis ist konsistent mit den bereits gezeigten mRNA Expressionsdaten und wurde später mit weiter unten erwähnten monoklonalen anti-MMP-19 Antikörpern nochmals verifiziert.

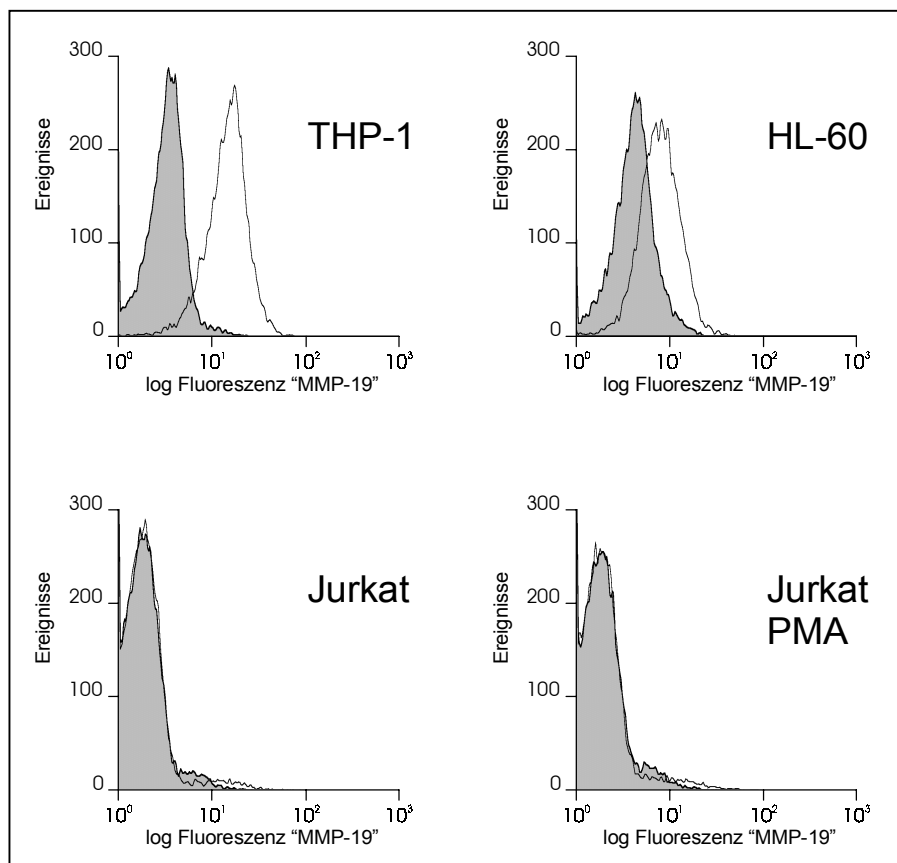


Abbildung 13 Analyse der MMP-19 Oberflächenexpression in humanen Blutzelllinien

Humane Blutzelllinien wurden mit den monospezifischen Kaninchen anti-MMP-19 Antikörper 511 oberflächengefärbt und anschließend im FACScan analysiert. Die oberen Abbildungen zeigen die myeloiden Zelllinien THP-1, bzw. HL-60. In der unteren Reihe sind Jurkat T-Zellen jeweils mit und ohne Stimulation durch 20 ng/ml Phorbol ester (PMA) für 16 Stunden dargestellt. Die grau ausgefüllten Histogramme zeigen die Kontrollfärbung mit einem Kontrollantikörper derselben Spezies, die nicht ausgefüllten Histogramme entsprechen den MMP-19 Färbungen.

Betrachtet man über Ficollgradienten gereinigte periphere mononukleäre Blutzellen (Abbildung 14), so sind diese ebenso, entgegen der früheren Daten (Sedlacek, Doktorarbeit 1996), direkt nach der Blutentnahme negativ für MMP-19 Oberflächenassoziation. Nach zweitägiger Kultur in RPMI1640 mit 20% autologem Serum teilen sich die Zellen in zwei Leukozytenpopulationen, nämlich MMP-19 negative und MMP-19 positive Zellen auf, wie durch das zweigipflige FACS Signal gezeigt wird. Die Inkulturnahme führt also analog der Hochregulierung von MMP-19 auf mRNA Ebene zu einer Induktion der MMP-19 Oberflächenexpression.

Diese beiden Leukozytenpopulationen wurden weiter analysiert, indem sie zusätzlich mit einem Antikörper für den Oberflächenmarker CD14 gefärbt und im FACScan jeweils in CD14 positive, bzw. CD14 negative Zellen aufgeteilt wurden. Dies entspricht den Zellpopulationen der Monozyten/Makrophagen ($CD14^+$), bzw. der T- und B-Lymphozyten ($CD14^-$). Es zeigt sich eine klare Zuordnung der MMP-19 Oberflächenfärbung zur CD14 positiven Monozyten/Makrophagenfraktion. Die CD14 negative Lymphozytenfraktion ist auch nach Kultivierung negativ für MMP-19.

Auch humane Gewebsmakrophagen, die aus einer Peritoneallavage gewonnen wurden und direkt, das heißt ohne Kultivierung, im FACScan untersucht wurden, tragen MMP-19 auf ihrer Oberfläche.

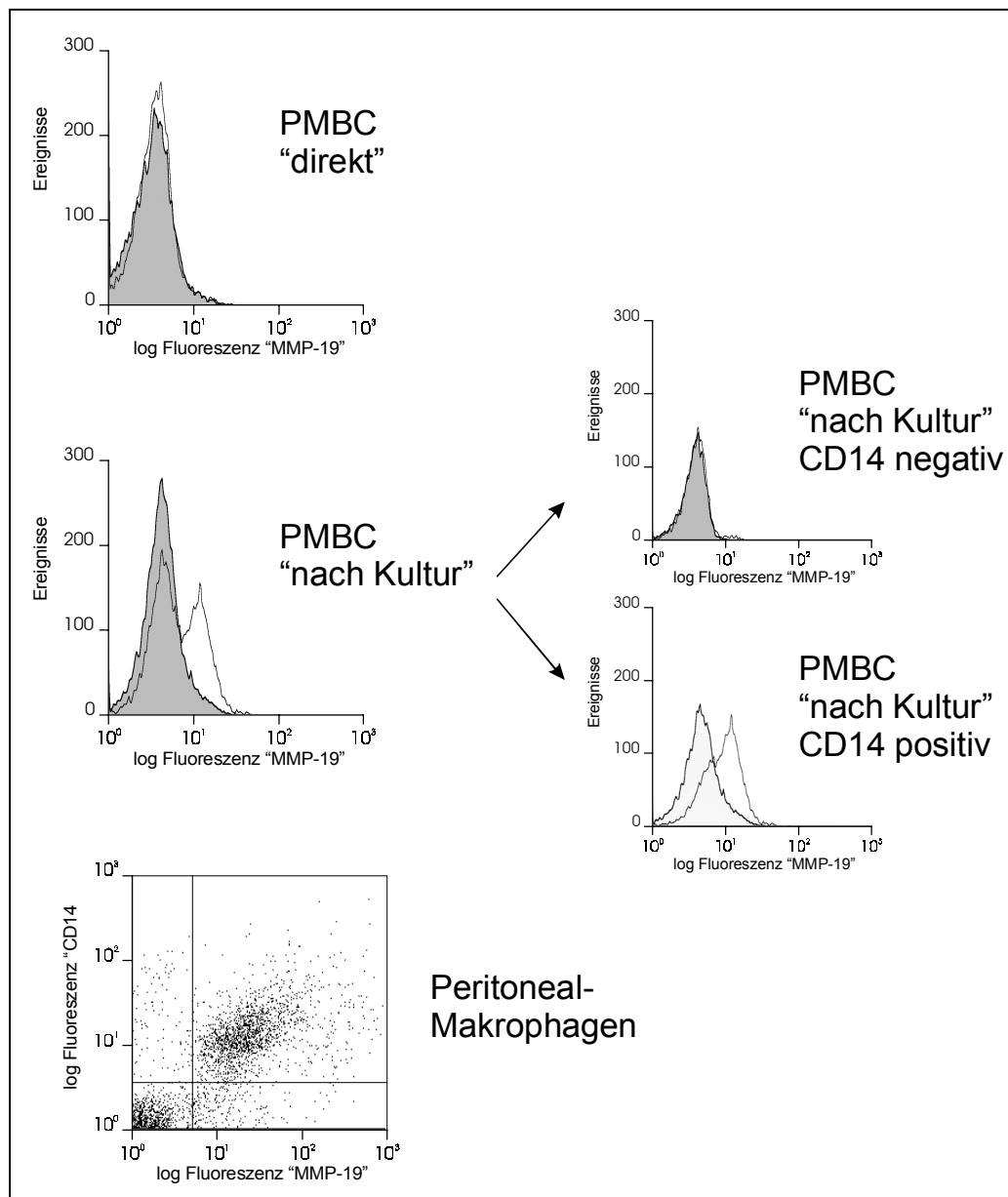


Abbildung 14 Analyse der MMP-19 Expression in mononukleären Blutzellen im FACScan

Periphere mononukleäre Blutzellen wurden mit den monosppezifischen Kaninchen anti-MMP-19 Antikörper 511 oberflächengefärbt und im Fluoreszenz-aktivierten Zellscanner analysiert. Dargestellt sind periphere mononukleäre Blutzellen direkt nach der Isolierung (PBMC direkt), bzw. nach zwei Tagen Kultivierung in RPMI1640 mit 20% autologem Serum (PBMC nach Kultur). Die kultivierten PBMC wurden durch eine zweite Färbung mit einem anti-CD14-Antikörper in CD14⁺ (Monozyten/Makrophagen) und CD14⁻ (Lymphozyten) aufgetrennt. Die untere Darstellung zeigt die Färbung humaner Peritonealzellen, welche aus einer Peritoneallavage isoliert wurden. Auch hier wurde eine Doppelfärbung für MMP-19 und CD14 durchgeführt. Die grau ausgefüllten Histogramme zeigen die Kontrollfärbung mit einem Kontrollantikörper, die nicht ausgefüllten Histogramme entsprechen den MMP-19 Färbungen.

MMP-19 ist also auf der Oberfläche der betrachteten myeloiden Blutzelltypen lokalisiert. Eine ausführliche Analyse der MMP-19 Aminosäuresequenz ergab jedoch keinen Hinweis auf eine putative Transmembransequenz. Einzig das Signalpeptid könnte eine Zelloberflächenverankerung über eine Transmembranhelix vermitteln. Jedoch erscheint es wahrscheinlicher, dass diese N-terminale Signalsequenz gleich den anderen Matrixmetalloproteinasen während des Exports abgespalten wird: Die Sequenzhomologien in diesem Bereich unterstützen die These, dass auch bei MMP-19 eine solche Abspaltung im endoplasmatischen Reticulum stattfindet.

Wie also ist MMP-19 auf der Oberfläche verankert? Die zusätzliche C-terminale Domäne von MMP-19 unterscheidet diese Matrixmetalloproteinase von allen anderen Matrixinen. Diese 30 Aminosäuren könnten als Signalsequenz für eine Verankerung mittels Glycosylphosphatidylinositol (GPI) dienen. Solche Signalsequenzen sind fast ausschließlich im C-Terminus der jeweiligen Proteine zu finden und bestehen aus 15-20 vorwiegend hydrophoben Aminosäuren (Englund, 1993). Etwa fünf bis zehn, oftmals eher hydrophile Aminosäuren weiter in N-terminaler Richtung befinden sich eine bis drei kleine Aminosäuren wie Glycin, Aspartat, Asparagin, Alanin, Serin oder Cystein. Das wichtigste Merkmal der GPI-Signalsequenz ist jedoch die starke Hydrophobizität, so dass sie strukturell einer N-terminalen Signalpeptidsequenz oder einer potentielle Transmembrandomäne ähnelt. GPI-Signalsequenzen werden bei Anhängung des GPI-Ankers entfernt (Englund, 1993).

Der C-terminale Bereich des MMP-19 Proteins weist sowohl die geforderten kleinen Aminosäuren, als auch eine eher hydrophobe Struktur auf, wie Hydrophobizitätsanalysen nach Kyte und Doolittle (1982) gezeigt haben (Daten nicht gezeigt). Somit ist ein gewisser Hinweis auf eine mögliche GPI-Verankerung von MMP-19 auf der Zelloberfläche gegeben. Hierbei muss allerdings einschränkend bemerkt werden, dass diese C-terminale Domäne auch einen großen Anteil polarer und geladener Aminosäuren aufweist. Dies wäre eher ungewöhnlich für eine echte GPI-Signalsequenz, deren hydrophobes Cluster meist ausschließlich aus den entsprechenden Aminosäuren besteht (Englund, 1993).

Um die Hypothese einer GPI-Verankerung von MMP-19 zu testen, wurden THP-1 Zellen mit Phosphatidylinosit-Phospholipase C (PI-PLC) inkubiert. Dieses aus *Bacillus cereus* isolierte Enzym sollte aufgrund der Substratspezifität gegen Phosphatidylinosit und Lysophosphatidylinosit die meisten GPI-verankerte Proteine von der Zelloberfläche ablösen (Low und Saltiel, 1988). Da dieses Enzym nach Angaben des Herstellers (Boehringer Mannheim) sehr anfällig gegen verschiedene Salze, u.a. NaCl, ist, die Analysen an intakten Zellen jedoch nicht in salzfreiem Medium durchgeführt werden können, wurde die Aktivität durch die Abspaltung eines weiteren GPI-verankerten Proteins, CD14, kontrolliert. Wie aus Abbildung 15 zu entnehmen ist, wurde das MMP-19 Oberflächensignal nicht durch die Inkubation mit PI-PLC beeinflusst. Demgegenüber wurde die Färbung für CD14 etwa um den Faktor zwei reduziert.

Unter der Voraussetzung, dass sterische Probleme bei der Abspaltung eines potentiellen GPI-Ankers hier keine Rolle spielten, weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass MMP-19 sehr wahrscheinlich nicht mittels Glycosylphosphatidylinositol auf der Zelloberfläche verankert vorliegt.

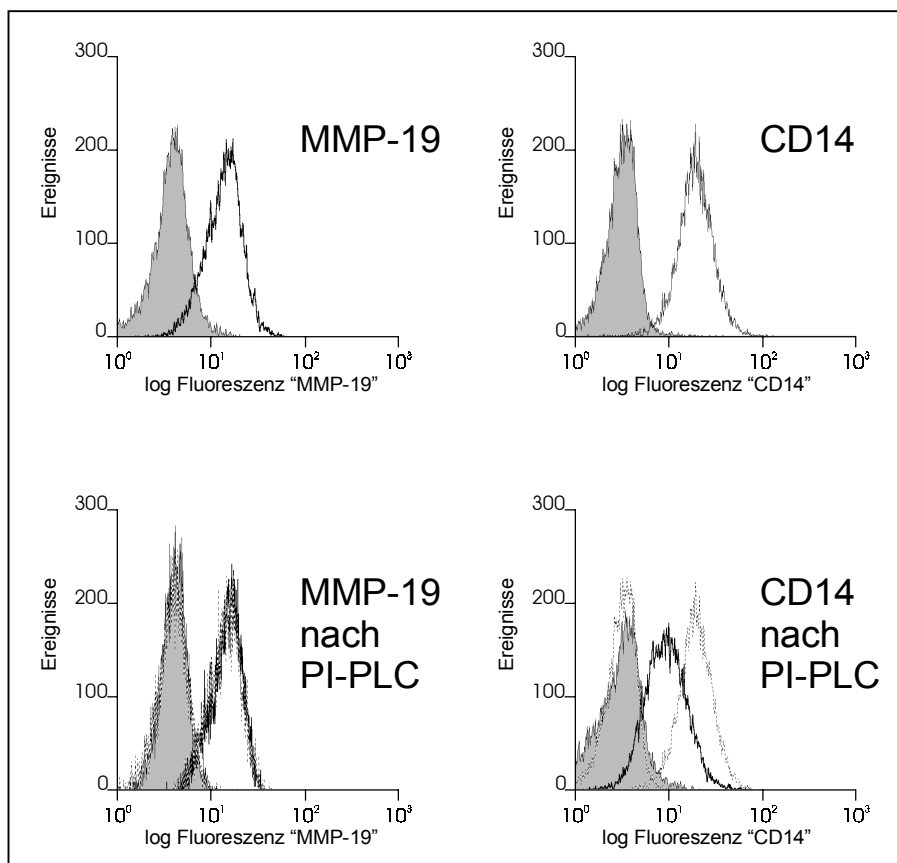


Abbildung 15 GPI-Verankerung von MMP-19

THP-1 Monozyten wurden mit Phosphatidylinosit-Phospholipase C inkubiert, um GPI-verankerte Proteine von der Zelloberfläche abzuspalten. Anschließend wurden die Zelloberflächen auf MMP-19, bzw. auf das GPI-verankerte Kontrollprotein CD14 im FACScan untersucht. Oben dargestellt ist die Oberflächenfärbung vor PI-PLC Behandlung, unten danach. Die grau ausgefüllten Histogramme zeigen die Kontrollfärbung mit einem Kontrollantikörper, die nicht ausgefüllten Histogramme entsprechen den MMP-19 Färbungen. Die gestrichelten Histogramme in den unteren Darstellungen entsprechen der obigen Färbung.

3.3.1 Mechanismus der MMP-19 Oberflächenbindung

Die gezeigte Zelloberflächenbindung von MMP-19 scheint also weder über eine echte Transmembrandomäne, noch über eine Verankerung mittels Glycosylphosphatidylinositol vermittelt zu sein.

Eine weitere sehr häufige Form der Oberflächenbindung von Proteinen ist die nicht-kovalente Wechselwirkung mit einem oder mehreren membranassoziierten Proteinen, bzw. einem spezifischen Rezeptor. Für die Gelatinase A (MMP-2) wurde gezeigt, dass sie an das Integrin $\alpha V\beta 3$ bindet und so

auf der Oberfläche invasiver Zellen verankert werden kann (Brooks *et al.*, 1996). Diese Art der Oberflächenassoziation scheint für einige der biologischen Funktionen dieser Matrixmetalloproteinase absolut notwendig zu sein, da die bloße Inhibition dieser Bindung zu dramatischen Effekten bei wichtigen physiologischen Prozessen wie der Angiogenese führt (Brooks *et al.*, 1998).

Um zu untersuchen, ob auch für MMP-19 ein ähnlicher Mechanismus besteht, also MMP-19 mit anderen Zelloberflächenmolekülen wechselwirkt, wurden Immunpräzipitationsexperimente durchgeführt. Dabei wurde untersucht, ob sich MMP-19 spezifisch von der Oberfläche von Zellen präzipitieren lässt und ob weitere Oberflächenproteine mit MMP-19 kopräzipitieren. Der in den FACS Analysen verwendete Kaninchen anti-MMP-19 Antikörper 511 erwies sich für solche Analysen als nicht affin genug, so dass diese Experimente mit dem neu erstellten monoklonalen Antikörper CK8/4 durchgeführt wurden. Dazu wurden die Antikörper produzierenden Hybridomazellen kultiviert, der Überstand gesammelt, eingengt und die Antikörper über eine Protein A Säule aufgereinigt. In mehreren FACS Analysen und Immunoblots gegen rekombinantes Protein wurde gezeigt, dass der monoklonale Antikörper dasselbe Färbemuster aufweist wie die zuvor verwendeten Kaninchen Antikörper (Daten nicht gezeigt). In diesen Analysen wurde auch nochmals bestätigt, dass die T-Zelllinien Jurkat und Molt-4 negativ für MMP-19 Oberflächenfärbung sind.

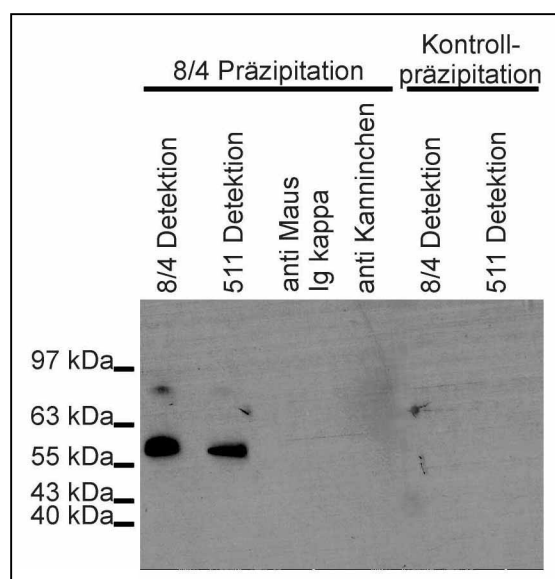


Abbildung 16 Der monoklonale Antikörper CK 8/4 präzipitiert MMP-19

MMP-19 Immunpräzipitation aus einem THP-1 Lysat. Die Präzipitation erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper CK8/4. Detektiert wurde mit CK8/4 und dem Kaninchen anti-MMP-19 Serum 511 (Spur 1 und 2). Spur 3 und 4 zeigen einen Kontrollimmunblot der CK8/4-Präzipitate, entwickelt mit den jeweiligen sekundären Antikörpern. Spur 5 und 6 zeigen eine Detektion entsprechend Spur 1 und 2, jedoch wurde die Immunpräzipitation hier mit einem Kontrollantikörper derselben Subklasse (IgG1) durchgeführt.

Wie aus Abbildung 16 zu entnehmen ist, präzipitiert der monoklonale Antikörper CK8/4 MMP-19 spezifisch aus einem THP-1 Lysat (1% NP40). Im CK8/4-Präzipitat lässt sich MMP-19 sowohl mit dem Kaninchen anti-MMP-19 Antikörper 511, als auch mit dem monoklonalen Antikörper CK8/4 selbst nachweisen.

Durch Inkubation mit Succinimidyl-6-biotinamido-Hexonat können Oberflächenmoleküle intakter Zellen selektiv markiert werden. Diese wasserlösliche Substanz ist nicht membrangängig und reagiert

in wässriger Lösung und bei neutralem pH mit primären Aminen. Da THP-1 Zellen sowohl auf mRNA Ebene als auch im FACS für MMP-19 positiv sind, sollte es möglich sein, biotinmarkiertes MMP-19 von diesen Zellen zu immunpräzipitieren. Ein potentieller Oberflächeninteraktionspartner von MMP-19 sollte unter geeigneten Bedingungen kopräzipitieren.

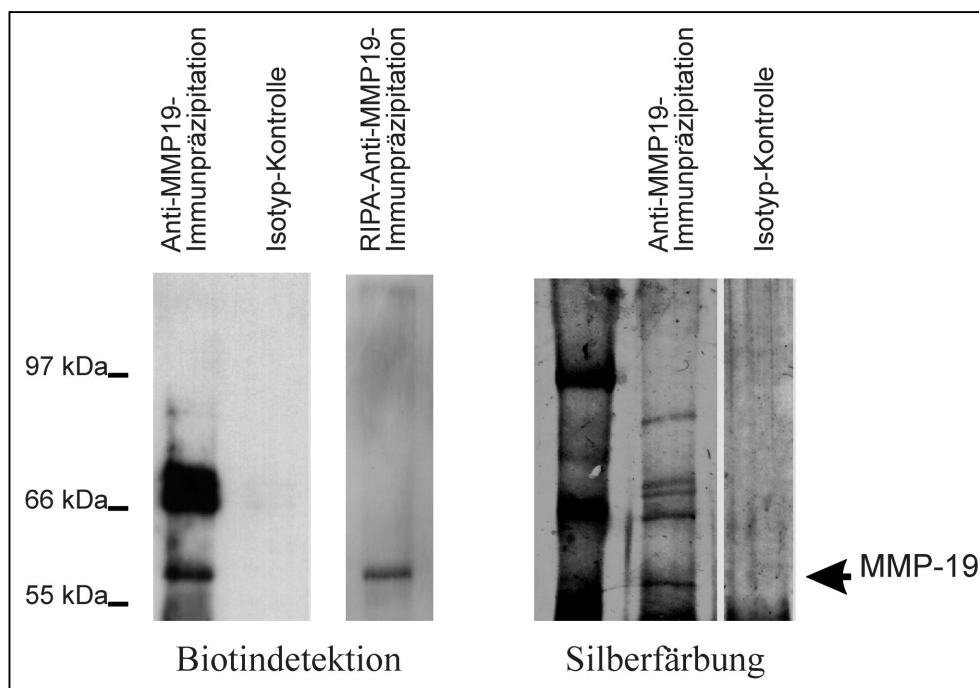


Abbildung 17 Zwei Oberflächenproteine kopräzipitieren mit MMP-19

THP-1 Zellen wurden oberflächenbiotinyliert und in einem 1% NP40 Puffer lysiert. Anschließend wurde mit dem monoklonalen anti-MMP-19-Antikörper CK8/4 immunpräzipitiert. Spur 1 und 2 zeigen die Detektion der biotinmarkierten Präzipitate mittels Streptavidin-Peroxidase. Spur 3 zeigt eine stringente Präzipitation in RIPA Puffer (1% NP40, 0,1% SDS, 0,5% Na-Deoxycholat). Spur 4 zeigt einen silbergefärbten Molekulargewichtsmarker. Spur 5 und 6 die Silberfärbung einer Immunpräzipitation entsprechend Spur 1 und 2.

Um dies zu untersuchen, wurden THP-1 Monozyten oberflächenbiotinyliert, lysiert und MMP-19 immunpräzipitiert. Anschließend wurde das in der SDS PAGE aufgetrennte Präzipitat auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und biotinylierte Proteine mittels Streptavidin-Peroxidase detektiert. Wie aus Abbildung 17 zu entnehmen ist, kopräzipitiert MMP-19 mit mindestens zwei weiteren Oberflächenproteinen. Beide weisen ein größeres Molekulargewicht als MMP-19 auf, können also keine Degradationsprodukte dieser Proteinase darstellen. Auch TIMPs können aufgrund ihres geringeren Molekulargewichts ausgeschlossen werden. Diese Kopräzipitation kann durch Erhöhung der Stringenz verhindert werden, indem zwei zusätzliche Detergentien, nämlich 0,1% Natriumdodecylsulfat und 0,5% Natriumdeoxycholat (Ripa-Puffer) zugegeben werden. Daraus kann abgeleitet werden, dass es sich nicht um eine kovalente Wechselwirkung, wie zum Beispiel vermittelt

durch Schwefelbrücken, handeln kann. Bestätigt wird diese Feststellung auch durch die weiter unten in Abbildung 18 gezeigten Versuche.

Die Silberfärbung der im SDS-PAGE aufgetrennten Präzipitate ergibt, dass neben den beiden in der Biotinfärbung sichtbaren Proteine noch eine schwache höhermolekulare Bande auftritt. Die Ko-präzipitation scheint also sehr spezifisch zu sein.

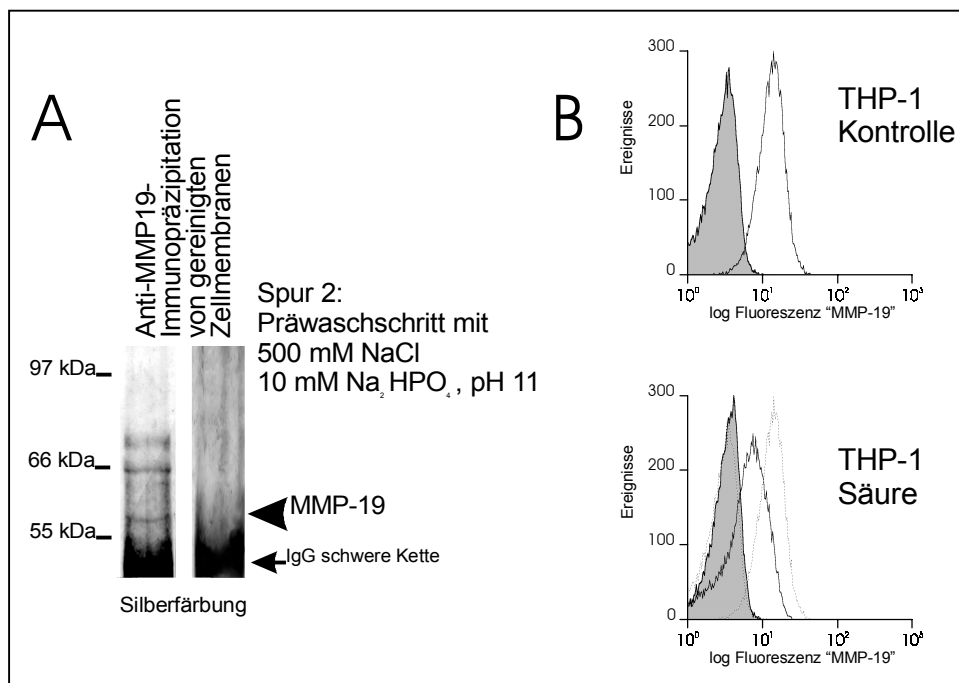


Abbildung 18 MMP-19 ist nicht-kovalent an die Zellmembran gebunden

A: THP-1 Zellmembranen wurden wie unter Material und Methoden beschrieben über Ultrazentrifugation in einem zweistufigen Saccharose Gradienten isoliert. Die Membranen wurden entweder direkt (Spur 1) oder nach kurzem Waschen in einer alkalischen Hochsalzlösung (500mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, pH 11) (Spur 2) in Lyse-, bzw. Immunpräzipitationspuffer aufgenommen. MMP-19 wurde analog zur Präzipitation aus Zelllysaten aus diesem Membranlysat isoliert und im silbergefärbten SDS-PA-Gel analysiert.

B: THP-1 Monozyten wurden entsprechend der in Kapitel 3.3 gezeigten Versuche auf MMP-19 Oberflächenexpression untersucht (THP-1 Kontrolle). Ein vorgeschalteter Waschschritt mit einem sauren Acetatpuffer verringert das MMP-19 Zelloberflächensignal deutlich (THP-1 Säure). Die grau ausgefüllten Histogramme zeigen die Kontrollfärbung mit einem monoklonalen Kontrollantikörper derselben Subklasse (anti-L7), die nicht ausgefüllten Histogramme entsprechen den MMP-19 Färbungen.

Werden die Zellmembranen der THP-1 Zellen über einen zweistufigen Saccharosegradienten präpariert, so können aus einem Lysat dieser Membranen erwartungsgemäß sowohl MMP-19, als auch die beiden höhermolekularen Proteine präzipitiert werden (Abbildung 18 A). Behandelt man die gereinigten Zellmembranen zuvor mit alkalischem Hochsalzpuffer, so wird MMP-19 von den Zellmembranen abgelöst und ist nicht mehr im Präzipitat nachweisbar. Ebenso sind nach diesem

Waschschrift auch die beiden anderen, mit MMP-19 kopräzipitierten Proteine nicht mehr im Präzipitat vorhanden.

Entsprechend kann MMP-19, zumindest teilweise, auch durch Behandlung mit einem sauren Elutionspuffer nach direkt von der Oberfläche intakter THP-1 Monozyten eluiert werden (Abbildung 18 B).

Dieses Ergebnis zeigt, dass MMP-19 nicht-kovalent an die Zellmembran gebunden ist. Kovalente Bindungen würden weder durch den Hochsalzpuffer, noch durch die Säurebehandlung angegriffen.

MMP-19 Kopräzipitationspartner

Es wird vermutet, dass verschiedene Matrixmetalloproteinasen auf der Oberfläche von Zellen miteinander interagieren (Knäuper und Murphy, 1998). Diese Interaktionen können direkt oder auch vermittelt durch andere Moleküle, wie zum Beispiel TIMPs (tissue inhibitor of metalloproteinases) stattfinden. Sie spielen einerseits eine Rolle in der spezifischen Lokalisierung der Metalloproteinaseaktivität, zum anderen aber auch in der Aktivierung der jeweiligen Proteinase selbst (Murphy *et al.*, 1992; Ward *et al.*, 1994, Strongin *et al.*, 1993 und 1995, Knäuper und Murphy, 1998).

Die THP-1 Immunpräzipitate wurden mit den vorhandenen Antikörpern gegen die membranassoziierte Matrixmetalloproteinase Gelatinase A (MMP-2) auf eine derartige Interaktion untersucht. Jedoch wurde keines der Kopräzipitate von diesem Antikörper erkannt. Ebenso war weder Gelatinase B (MMP-9), Kollagenase 1 (MMP-1) noch Stromelysin-1 (MMP-3) mittels spezifischer Antikörper in den Kopräzipitaten nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

Da leider keine Antikörper für die Membranständigen Matrixmetalloproteinasen zur Verfügung standen, konnte die interessante Hypothese der Wechselwirkung zwischen MMP-19 und einer dieser Zelloberflächenproteinasen nicht untersucht werden.

Neben diesen Versuchen der gezielten Analyse der MMP-19 Interaktionspartner, wurde in Zusammenarbeit mit Markus Macht (AG Przybylski, Universität Konstanz) versucht, die Kopräzipitate über eine MALDI-TOF Analyse bekannten Proteinen zuzuordnen. Dazu wurden die Immunpräzipitate im SDS-PAGE aufgetrennt und aus dem mit Comassie gefärbten Gel ausgeschnitten. Die Proteine wurden aus dem SDS-Gelstück eluiert und tryptisch verdaut. Die Molekülmassen der entstandenen Proteinfragmente wurden in einem MALDI-TOF Analysator der Firma Bruker bestimmt. Durch einen Vergleich mit den theoretischen tryptischen Proteinfragmentmassen bekannter Proteine wurde versucht eine Zuordnung zu bekannten Proteinen zu erreichen. Eine Übersicht über die verwendete Methode findet sich in Blüggel und Immler (1998).

Der Vergleich mit den Proteinmassen der in der Datenbank MS-Fit gespeicherten Massenfragmenten ermöglichte jedoch keine spezifische Zuordnung zu einem der dort verzeichneten Proteine.

3.3.2 Welche Domäne ist für die MMP-19 Oberflächenassoziation verantwortlich?

MMP-19 ist also nicht-kovalent auf der Oberfläche myeloider Zellen verankert. Welche Domäne vermittelt diese Bindung? Betrachtet man den modularen Aufbau der Matrixmetalloproteinasen, so scheint die Hämapexin-ähnliche Domäne ein möglicher Kandidat zu sein. Wie weiter oben schon ausgeführt, wird die Funktion dieser Domäne in der Vermittlung der Substratbindung, und damit auch zum Teil der Substratspezifität, sowie in der Lokalisierung der einzelnen Enzyme innerhalb des komplexen Makromolekülgeflechts der extrazellulären Matrix gesehen (Übersicht in Murphy und Knäuper, 1997). Des weiteren findet sich innerhalb der Hämapexin-ähnlichen Domäne eine der beiden Bindungsstellen für TIMP-Moleküle, die natürlichen Inhibitoren der Matrixmetalloproteinasen (Gomez *et al.*, 1997). Auch bei Gelatinase A scheint die Zelloberflächenbindung und Aktivierung durch deren Hämapexin-ähnliche Domäne vermittelt zu werden (Murphy *et al.*, 1992b; Ward *et al.*, 1994). Ob diese Bindung direkt über Interaktion mit Zelloberflächenmolekülen wie Integrin $\alpha V\beta 3$, oder indirekt über Linkermoleküle wie TIMP-2 stattfindet, ist noch nicht völlig geklärt (Strongin *et al.*, 1995; Emmert-Buck *et al.*, 1995; Brooks *et al.*, 1996; Knäuper und Murphy, 1998).

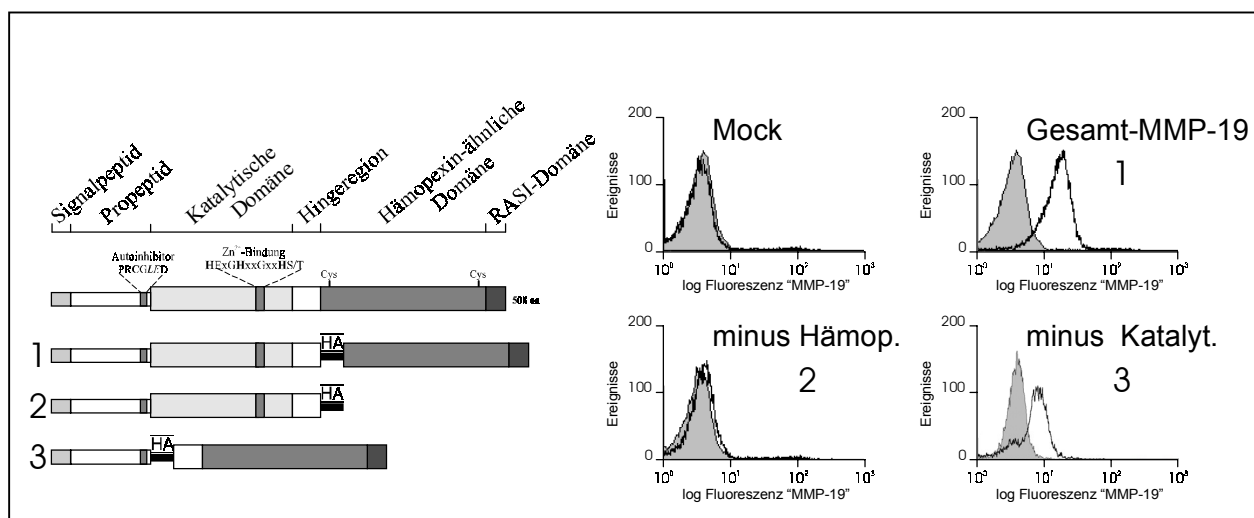


Abbildung 19 MMP-19 Zelloberflächenassoziation: Funktion der Hämapexin-ähnlichen und der Katalytischen Domäne

Um die Funktion der C-terminalen Hämapexin-ähnlichen und der Katalytischen Domäne von MMP-19 bezüglich der Zelloberflächenverankerung zu untersuchen wurden Deletionsmutanten hergestellt, in denen entweder die Hämapexin-ähnliche oder die Katalytische Domäne deletiert wurden (links schematisch dargestellt). Diese Konstrukte wurden stabil (Gesamtlänge und minus Hämap.), bzw. transient (minus Katalyt.) unter der Kontrolle des CMV-Promotors in THP-1 Zellen überexprimiert. Die Zelloberflächenassoziation der jeweils exprimierten Proteine wurde im FACSkan untersucht, indem ein anti-HA-Antikörper eingesetzt wurde. Mock Transfektanten enthielten nur Vektor ohne überexprimiertes Protein.

Um eine mögliche Funktion dieser etwa 200 Aminosäuren umfassenden Domäne bei der Zelloberflächenassoziation von MMP-19 zu analysieren, wurden rekombinante Deletionsmutanten von MMP-19 konstruiert. Die genauen Sequenzen dieser Mutanten lassen sich aus den in Material und Methoden aufgeführten Angaben ableiten. Abbildung 19 zeigt eine schematische Darstellung der klonierten Fragmente. Alle Konstrukte wurden mit einem Hämagglutinin-Proteintag (HA-tag) versehen, der die Detektion über einen spezifischen anti-HA-Antikörper ermöglichte. Die rekombinanten Proteine wurden in THP-1 Zellen entweder stabil oder transient unter der Kontrolle des CMV Promotors überexprimiert. Der HA-tag wurde jeweils in die Hingeregion eingefügt, da es sich bei der Herstellung der monoklonalen Antikörper gezeigt hat, dass dieser Sequenzabschnitt bei MMP-19 stark immunogen ist, also höchstwahrscheinlich der Umgebung exponiert dargestellt wird (unveröffentlichte Daten). Des Weiteren ist aus der Strukturanalyse anderer Matrixmetalloproteinasen bekannt, dass die Hingeregion in allen untersuchten Fällen nach außen gerichtet ist (Grams *et al.*, 1995; Pieper *et al.*, 1997; Moy *et al.*, 1998; Fernandez-Catalan *et al.*, 1998), also relativ einfach für Antikörper zugänglich sein sollte. Die Expression der rekombinanten Proteine in den THP-1 Monozyten wurde in allen Experimenten über RT-PCR bestätigt (Daten nicht gezeigt).

In FACS Analysen wurde untersucht, inwieweit die Deletion der Hämopexin-ähnlichen, bzw. der Katalytischen Domäne einen Einfluss auf die MMP-19 Oberflächenassoziation in THP-1 Monozyten hat. Wie in Abbildung 19 gezeigt, ist rekombinantes MMP-19 auf der Oberfläche stabil transfizierter THP-1 Monozyten nachweisbar. Deletiert man die Hämopexin-ähnliche Domäne, so lässt sich das Protein nicht mehr auf der Zelloberfläche nachweisen. Demgegenüber scheint eine Deletion der Katalytischen Domäne die Zelloberflächenassoziation nicht zu beeinflussen: MMP-19 ohne Katalytische Domäne ist in transient transfizierten THP-1 Monozyten immer noch oberflächen-gebunden.

Die vermutete Funktion der Hämopexin-ähnlichen Domäne für die Zelloberflächenassoziation von MMP-19 scheint sich also zu bestätigen.

3.4 Das Yeast Two-Hybrid System zur Suche nach MMP-19 Interaktionspartnern

3.4.1 Prinzip des Yeast Two-Hybrid Systems

Ein von Koimmunpräzitationen oder verwandten Methoden völlig unabhängiger Ansatz zur Isolierung unbekannter Interaktionspartner von Proteinen stellt das Yeast Two-Hybrid System dar, welches auf der Rekonstitution modularer Transkriptionsfaktoren basiert (Übersicht in Mendelsohn und Brent, 1994 und Golemis *et al.*, 1996). Eine schematische Darstellung des Funktionsprinzips des Yeast Two-Hybrid Systems findet sich in Abbildung 20.

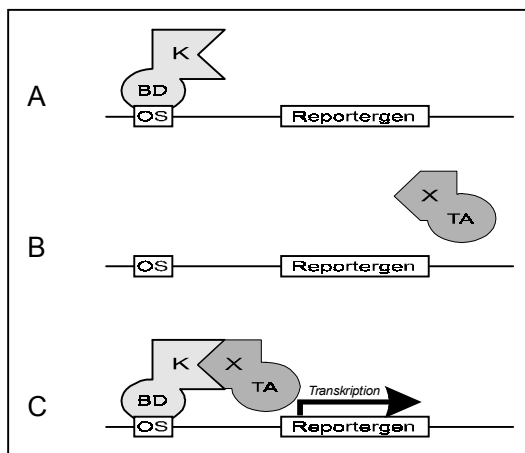


Abbildung 20 Rekonstitution modularer Transkriptionsfaktoren als Basis des Yeast Two-Hybrid Systems.

A: Im Hefezellkern wird ein Hybridprotein exprimiert, das über eine DNA-bindende Domäne (BD) an spezifische, einem Reporter gen vorgeschaltete, Promotorelemente (Operatorsequenz OS) bindet. Des Weiteren besteht das Hybridprotein aus dem zu analysierenden Köderprotein K. Da das Hybridprotein selbst keine transaktivierende Domäne besitzt, kann es das Reporter gen nicht aktivieren.

B: Ein zweites Hybridprotein, bestehend aus einer transkriptionsaktivierenden Domäne (AD) und einem potentiellen Interaktionspartner von K wird ebenfalls im Zellkern der Hefe exprimiert. Dieses Hybridprotein kann ein spezifisches, bezüglich des Köderproteins zu analysierendes Protein oder ein zufälliges, cDNA-Bank kodiertes Protein X sein. Da das zweite Hybridprotein keine DNA-Bindesequenz besitzt, kommt es nicht in die zur Genaktivierung notwendige räumliche Nähe zum Reporter gen und kann dieses alleine also nicht aktivieren.

C: Interagieren das Köderprotein K und das (cDNA-Bank kodierte) Protein X, so entsteht ein vollständiger Transkriptionsfaktor. Die transaktivierende Domäne AD kommt vermittelt durch die DNA-bindende Domäne BD in die räumliche Nähe des Reportergens, welches dadurch aktiviert wird. (Adaptiert nach Fields *et al.*, 1994).

Unabhängig davon, ob sie aus einem einzelnen Molekül oder aus einem Komplex vieler Moleküle bestehen, setzen sich Transkriptionsfaktoren aus zwei Hauptmodulen zusammen. Sie besitzen eine DNA-bindende und eine transaktivierende Domäne. Die DNA-bindende Domäne vermittelt die Spezifität der Genaktivierung, indem sie definierte DNA-Sequenzabschnitte, meist im Promotorbereich des jeweiligen Gens, erkennt. Die transaktivierende Domäne ermöglicht über Wechselwirkung mit dem Transkriptionsapparat, also der mRNA-Polymerase und den zugehörigen Hilfsproteinen, die Transkription des nachgeschalteten Gens. Diese beiden Module müssen nicht kovalent miteinander verbunden sein. Es reicht aus, dass sie durch nicht-kovalente Wechselwirkungen

in räumliche Nähe zueinander gebracht werden (Ma *et al.*, 1988). Auf der Grundlage dieser Beobachtung entwickelten Fields *et al.* (1989) ein System zur Detektion von Protein-Protein-Wechselwirkungen in der Hefe, dessen Prinzip in Abbildung 20 schematisch dargestellt ist.

Basierend auf diesem Prinzip wurden verschiedene Yeast Two-Hybrid Systeme entwickelt, die sich in den verwendeten DNA-bindenden und transaktivierenden, Domänen sowie in den Reporter genen, Hefestämmen und Kerntranslokationssignalen unterscheiden. (Chien *et al.*, 1991; Durfee *et al.*, 1993, Gyuris *et al.*, 1993, Vojitek *et al.*, 1993).

Das in dieser Arbeit verwendete System nach Gyuris *et al.* (1993) basiert auf der DNA-bindenden Domäne des Transkriptionsfaktors LexA aus *E.coli*, dem SV40-Kerntranslokationssignal und der sauren Transaktivatordomäne B42. Als Reporter gene kamen sowohl *Leu2*, dessen Genprodukt das Wachstum auf Leucin defizientem Nährboden erlaubt, als auch das für β -Galactosidase kodierende Gen *lacZ* zum Einsatz. Die Transkription des zweiten Reporter gens wurde über eine Farbereaktion nachgewiesen.

3.4.2 Suche von MMP-19-Interaktionspartner mit dem Yeast Two-Hybrid System

Das Yeast Two-Hybrid System wurde ursprünglich für die Detektion intrazellulärer Protein-Protein-Wechselwirkungen benutzt. Jedoch konnte gezeigt werden, dass auch extrazelluläre Protein-Proteinwechselwirkungen im Yeast Two-Hybrid System analysiert werden können (Ozenberger und Young, 1995).

Bezogen auf MMP-19 wurde das Durchmuster einer Yeast Two-Hybrid Bank zur potentiellen Aufklärung mehrerer Fragestellungen eingesetzt: Zum einen sollte es hilfreich auf der Suche nach extrazellulären Wechselwirkungspartner von MMP-19 sein. Darunter fallen sowohl potentielle Oberflächenrezeptoren als auch Substrate für MMP-19. Des weiteren sollte es damit auch möglich sein, intrazelluläre Wechselwirkungspartner von MMP-19 zu analysieren. Wie weiter oben erwähnt, wurde für mehrere Mitglieder der Matrixmetalloproteinasenfamilie gezeigt, dass der Export in den Extrazellularraum nicht in jedem Falle direkt, sondern auch über granuläre Vesikel stattfinden kann. Es wird angenommen, dass diese intrazellulär zwischengespeicherten Proteinasen eine Bindung zu Vesikel-assoziierten Proteinen eingehen und deswegen nicht den direkten Transportweg über die Zellmembran wählen.

Die nach Wechselwirkungspartnern für MMP-19 durchsuchte cDNA Bank repräsentierte den mRNA Pool der T-Zell-Lymphomalinie Jurkat. Diese cDNA Bank wurde zu Beginn des Projektes ausgewählt, da vorangegangene Arbeiten (Sedlacek, Doktorarbeit 1996) gezeigt hatten, dass Jurkatzellen MMP-19 exprimieren. Dieses Ergebnis wurde zwar, wie in Abschnitt 3.2 gezeigt, im Laufe dieser Arbeit relativiert, jedoch konnte auch gezeigt werden, dass mit Phorbolestern aktivierte Jurkatzellen MMP-19 mRNA aufweisen. Mögliche Interaktionspartner von MMP-19 könnten also in Jurkatzellen auffindbar sein.

3.4.2.1 Durchmustern einer Jurkat cDNA Bank nach Interaktionspartnern von MMP-19

Die durchgeführten Schritte zur Durchmusterung der Jurkat cDNA Bank nach Interaktionspartnern von MMP-19 sind in Abbildung 21 schematisch dargestellt und werden im folgenden Text erläutert.

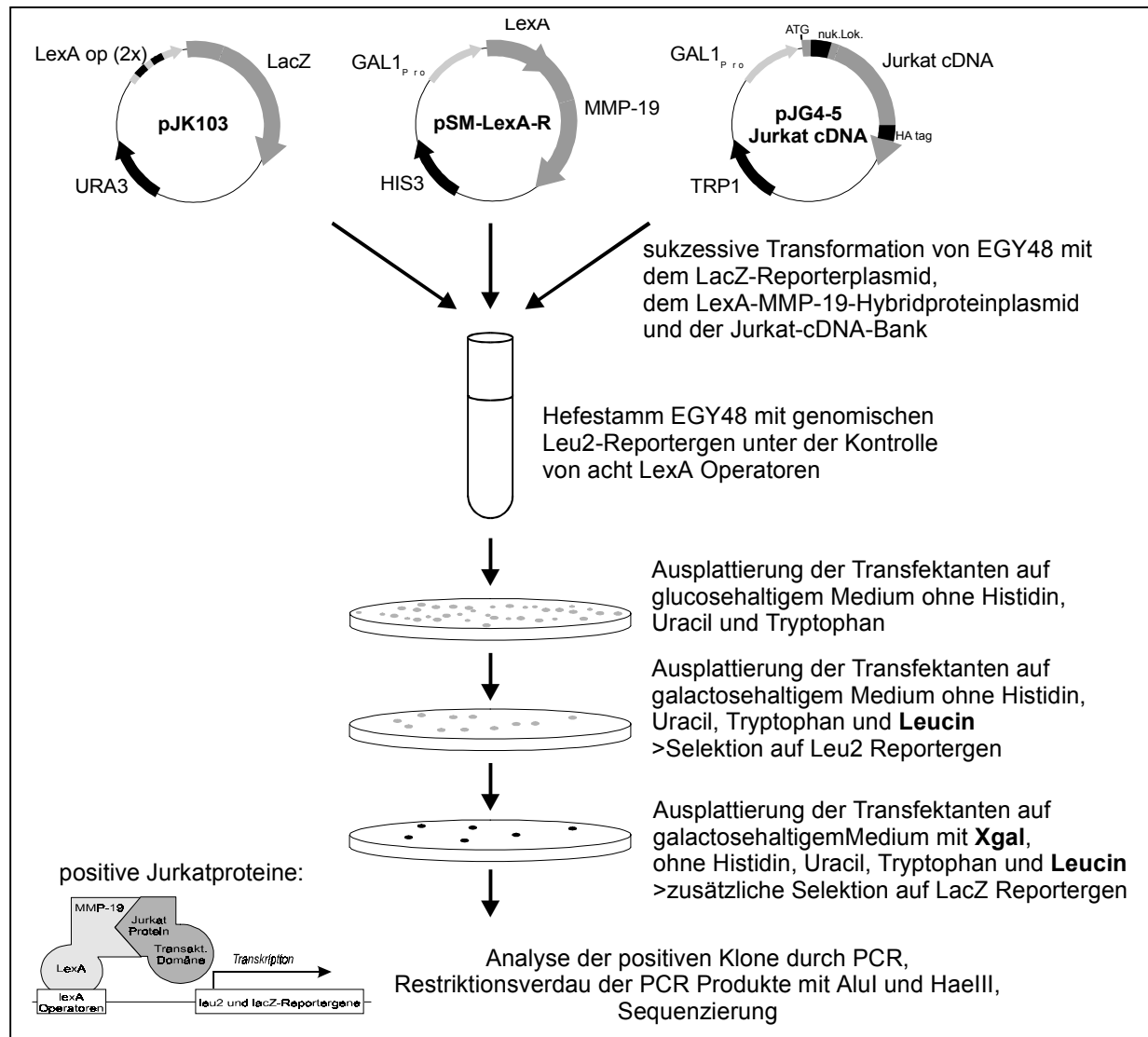


Abbildung 21 Flussdiagramm zur Darstellung des durchgeführten Yeast Two-Hybrid Screens nach Interaktionspartnern von MMP-19

Erläuterungen siehe Text.

Für die Suche nach Proteinen, die mit MMP-19 interagieren, wurde der Hefestamm EGY48, welcher das leu2 Reportergen genomisch unter der Kontrolle von acht LexA Operatoren integriert hat, sukzessive mit folgenden Konstrukten transformiert: (1) Das Plasmid pJK103 brachte das lacZ Reportergen in die Hefe ein. (2) Der durch Galaktose induzierbare Vektor pSM-LexA-R kodierte für ein LexA-MMP-19 Fusionsprotein, welches als "Köderprotein" diente. Die korrekte Expression des Fusionsproteins wurde im Immunoblot kontrolliert (Daten nicht gezeigt). Des weiteren wurden die

unter Material und Methoden geschilderten Aktivierungs- und Repressionskontrollen durchgeführt, um zu zeigen, dass das LexA-MMP-19 Fusionsprotein zwar an die LexA-Operatorsequenzen bindet, allein jedoch keine Aktivierung der beiden Reportergene bewirkt (Daten nicht gezeigt).

Im letzten Transformationsschritt (3) wurde die in pJG4-5 eingefügte Jurkat Expressionbank in die Hefen eingeführt. Dies resultierte unter Bedingungen, die für die Anwesenheit aller drei Plasmide, aber nicht für die Aktivität der Reportergene selektierten, dass heißt ausplattiert auf Medium ohne Histidin, Uracil und Tryptophan, mit Glukose als Kohlenstoffquelle, in $1,3 \times 10^7$ Kolonien. Damit war die gesamte cDNA Bank, die einen primären Titer von 2×10^6 unabhängigen cDNAs aufwies, mehr als fünf mal abgedeckt. Diese Transformanten wurden bis zur Selektion, das heißt dem eigentlichen Durchmustern der Bank in Aliquoten bei -80°C aufbewahrt.

Das lacZ Reportergen steht in pJK103 unter der Kontrolle zweier LexA Operatoren, ist also sehr viel weniger sensitiv als der genomische leu2 Reporter mit acht LexA Operatorsequenzen. Damit war es möglich, eine zweistufige Selektion durchzuführen. Im ersten Schritt wurden 52 Yeast Two-Hybrid-Kolonien isoliert, die nach Expressionsinduktion der cDNA-Bank-Proteine und des Köderproteins LexA-MMP-19 in der Lage waren, das sehr empfindliche leu2 Reportergen zu aktivieren. Das heißt, sie zeigten Wachstum auf Leucin negativem Nährboden. Diese Klone wurden auf X-Gal-haltige Wachstumsplatten überführt und damit auf die galaktoseinduzierte Expression des sehr viel insensitiveren lacZ Reportergens getestet. Von den verbliebenen 29 Klonen wurden die cDNA-Bank-Plasmide isoliert und die cDNA Einschübe mittels PCR und anschließendem Restriktionsverdau der PCR-Produkte mit den Restriktionsendonukleasen AluI und HaeIII charakterisiert. cDNA Klone, deren Einschübe dieselbe Größe und zusätzlich dasselbe Restriktionsmuster aufwiesen, wurden als identisch gewertet und in Restriktionsklassen eingeteilt. Nur Klone, die mehr als einmal unabhängig voneinander isoliert wurden und deren Reportergeninduktion sich in den unten beschriebenen Spezifitätsanalysen als hochspezifisch erwies, wurden weiter analysiert.

Spezifität der Wechselwirkung

Um die Spezifität der Wechselwirkung der isolierten Jurkatproteine mit MMP-19 zu kontrollieren, wurden die im Yeast Two-Hybrid Screen positiven cDNAs zusammen mit dem LacZ-Reporterplasmid pJK103 in naive EGY48-Hefen transformiert. In die erhaltenen Transformanten wurden in getrennten Ansätzen jeweils auf dem Expressionsvektor pEG202 basierende Kontrollplasmide, bzw. der für LexA-MMP-19 kodierende Expressionsvektor pSM-LexA-R eingebracht. Die Kontrollplasmide kodierten für Fusionsproteine bestehend jeweils aus der DNA-bindenden Domäne von LexA und entweder dem ribosomalen Protein L7, der Homeodomäne des Drosophila Proteins Bicoid oder der Helix-Loop-Helix Domäne des humanen Transkriptionsfaktors c-Myc.

cDNA-Klone, die in Kombination mit dem Köderprotein LexA-MMP-19 eine spezifische, durch Galaktose induzierbare Aktivierung des LacZ-Reporters zeigten, jedoch nicht in der Lage waren, mit

einem der irrelevanten Köderproteine zu interagieren, wurden als im Yeast Two-Hybrid Screen positive Klone betrachtet und weiter bearbeitet.

3.4.2.2 Analyse der für MMP-19-Interaktionspartner kodierenden cDNAs

Alle Proteine, die einerseits mehrmals unabhängig beim Durchmustern der Yeast Two-Hybrid-Bank isoliert wurden und andererseits spezifisch mit MMP-19, jedoch nicht mit einem der Kontrollköderproteine interagierten, wurden ausgehend von den 5'- und 3'-flankierenden Primern BCO1 und BCO2 ansequenziert. Tabelle 3 zeigt eine Übersicht über die erhaltenen cDNA Fragmente.

Zwei der erhaltenen Klone gehören den sogenannten Hitzeschockproteinen (HSP) an. Die physiologische Funktion der HSPs als Chaperone, das heißt, bei der Faltung neu synthetisierter Proteine, lässt sie zu den am häufigsten isolierten Proteinen bei der Durchmusterung von Yeast Two-Hybrid Banken werden. Da Chaperone mit einer Vielzahl von Proteinen interagieren können und dies auch in ihrem biologischen Kontext tun, sind sie nicht unbedingt als falsch-positiv zu bezeichnen. Sie sind jedoch nicht besonders interessant als neue Wechselwirkungspartnern von MMP-19.

Der Klon Rapa-14 (**RASI-Partner** Nummer 14) zeigte keinerlei Homologie zu Hitzeschockproteinen, noch zu anderen bekannten Sequenzen. Dieser Klon wurde als interessanter, potentieller Kandidat für einen neuen, bisher unbekanntem Interaktionspartner von MMP-19 weiter analysiert.

Klon	Länge	Anzahl	Ähnlichkeiten / Identitäten (BLAST-Vergleich mit GenBank)	
			5'-Sequenz	3'-Sequenz
Rapa-14	ca. 1,6 kB	3	Keine Homologie	keine Homologie
Rapa-24	ca. 2,2 kB	2	Hitzeschockprotein ähnlich	Hitzeschockprotein ähnlich
Rapa-25	ca. 2,1 kB	2	Hsc70	Hsc70

Tabelle 3 Übersicht über alle mehrfach isolierten und in Hefen spezifisch mit MMP-19 interagierenden Proteine

Die Nummerierung entspricht der Reihenfolge der Isolierung im Yeast Two-Hybrid Screen. Rapa steht für **RASI-Partner**. Die Länge der Klone wurde mithilfe einer PCR-Reaktion abgeschätzt. Die Anzahl gibt die der unabhängig isolierten Klone wieder. Die Identitäten, bzw. Ähnlichkeiten zu bekannten cDNA Sequenzen wurde mit einem BLAST 2 Alignment bestimmt. Die Vergleiche wurden sowohl mit der "non redundant" GenBank+EMBL Datenbank, als auch mit der dbEST-Datenbank ("expressed sequence tags"), beide am "National Center for Biological Information" (Washington, U.S.A.) durchgeführt.

3.5 Rapa-14 interagiert mit MMP-19

Der dreimal unabhängig im Yeast Two-Hybrid Screen isolierte Klon Rapa-14 interagiert im Hefezellkern spezifisch mit MMP-19. Um diese Wechselwirkung in einem unabhängigen Experiment zu untersuchen, wurde das offene Leseraster von Rapa-14 in einer PCR-Reaktion mit einer eukaryontischen Translationsstartsequenz versehen (Kozak, 1986), in einen pCR-Script Vektor subkloniert, *in vitro* transkribiert und in der Gegenwart von ^{35}S -Methionin *in vitro* translatiert. Das radioaktiv markierte Polypeptid wurde gemeinsam mit entsprechend hergestelltem MMP-19 inkubiert. Eine eventuelle Bindung des *in vitro* translatierten Rapa-14s an MMP-19 wurde analysiert, indem dieses mit den schon in Kapitel 3.3 beschriebenen monoklonalen anti-MMP-19 Antikörpern immunpräzipitiert wurde. Wie aus Abbildung 22 zu entnehmen ist, wird Rapa-14 gemeinsam mit MMP-19 immunpräzipitiert. Die verwendeten Antikörper erkennen jedoch nicht Rapa-14 alleine. Des Weiteren wird das ebenso *in vitro* translatierte Kontrollprotein L7 unter denselben Bedingungen nicht mit MMP-19 immunpräzipitiert.

Die in der Hefe aufgezeigte Bindung von Rapa-14 an MMP-19 scheint also genügend stark und spezifisch zu sein, um auch unter *in vitro* Bedingungen zu eindeutigen Ergebnissen zu führen. Über die wirkliche Bindungsstärke, das heißt über Bindungskonstanten, lässt sich in dieser Art der Analyse allerdings keine Aussage machen, da weder die Konzentration der beteiligten Proteine bekannt ist, noch eine Titration der Bindungspartner durchgeführt wurde.

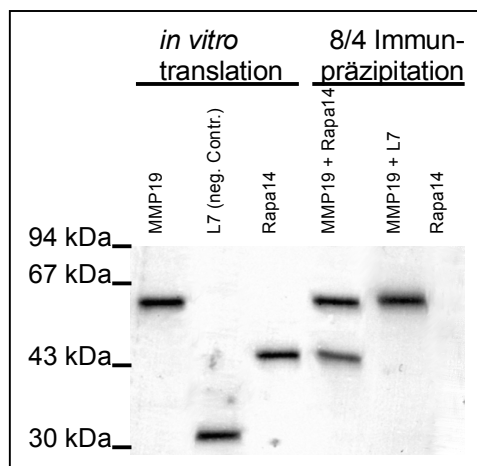


Abbildung 22 Koimmunpräzipitation von Rapa-14 mit MMP-19

Die offenen Leseraster von Rapa-14, MMP-19 und L7 wurden in pCR-Script Vektoren subkloniert und *in vitro* transkribiert und translatiert. Die entstandenen ^{35}S markierten Proteine wurden entsprechend der Abbildungsbeschriftung gemeinsam inkubiert und mit MMP-19-spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert. Die Detektion der Proteine erfolgte nach Auftrennung im SDS-PAGE über Auflegen eines Röntgenfilms.

3.6 Ist die Bindung von Rapa-14 an MMP-19 biologisch relevant?

In den vorangegangenen Kapiteln wurde aufgezeigt, dass das unbekannte Protein Rapa-14 im Yeast Two-Hybrid System und *in vitro* sehr spezifisch an die Matrixmetalloproteinase MMP-19 bindet. Wie ist jedoch die *in vivo* Relevanz dieser Beobachtung zu bewerten?

Um diese Frage zu beantworten, wurde Rapa-14 vollständig sequenziert und die DNA, bzw. die abgeleitete Aminosäuresequenz bezüglich folgender Fragen analysiert: Gibt es Ähnlichkeiten von

Rapa-14 zu bekannten Proteinen oder enthält Rapa-14 bekannte Sequenzmotive? Lassen eventuell vorhandene Homologien Schlussfolgerungen auf die biologische Rolle von Rapa-14 zu und kann aus diesen Daten eine Beurteilung der Relevanz der Interaktion mit MMP-19 abgeleitet werden?

BLAST- und fasta3-Vergleiche von Rapa-14 mit allen in der GenBank und der EMBL-Datenbank verzeichneten Sequenzen erbrachten keine signifikanten Ähnlichkeiten zu den dort verzeichneten cDNAs und Proteinen. Als auffällige Motive wurde zum einen ein sehr saures Aminosäure-Cluster zwischen den Aminosäurepositionen 180-210 gefunden, zum anderen ein Zinkfingermotiv des C₂H₂-Typs zwischen den Positionen 240-270. Diese beiden Sequenzabschnitte sind in der schematischen Darstellung der Abbildung 23 hervorgehoben. Eine genaue Darstellung der Sequenz findet sich im Anhang.

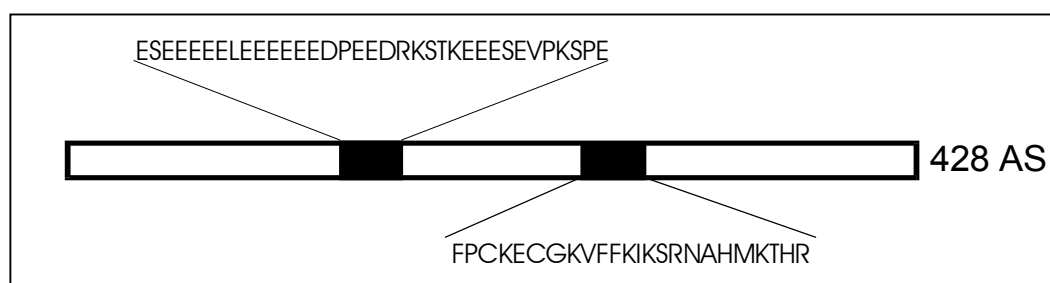


Abbildung 23 schematische Darstellung von Rapa-14

Der im Yeast Two-Hybrid Screen isolierte MMP-19-Wechselwirkungspartner Rapa-14 ist hier schematisch dargestellt. Das offene Leseraster umfaßt 1284 Nukleotide und kodiert damit für 428 Aminosäuren. Die abgeleitete molekulare Masse des Rapa-14-Polypeptids beträgt 47,4 kDa. Die beiden hervorgehobenen Sequenzabschnitte werden im Text erläutert.

Zinkfinger des C₂H₂-Typs finden sich in vielen Proteinen. Sie dienen entweder der Bindung an andere Proteine oder vermitteln die Wechselwirkung mit Nukleinsäuremolekülen (Miller *et al.*, 1985; Übersichten in Klug und Rhodes, 1987 und in Mackay und Crossley, 1998). Eine DNA-Bindung wird erreicht, indem der Finger sich in die große Rinne der DNA-Doppelhelix legt. Für eine solche Bindung sind allerdings mindestens zwei benachbarte und meist sogar noch mehr Zinkfingerstrukturen notwendig (Mackay und Crossley, 1998). Ein einzelner Zinkfinger wie er in Rapa-14 vorkommt sollte demnach eine Protein-DNA-Interaktion nicht ohne weiteres vermitteln können. Es ist möglich, dass dieser Finger nicht eine DNA Bindung, sondern eine Interaktion mit Proteinen vermittelt.

Die 19 Glutamate beinhaltende und damit sehr saure Aminosäureabfolge um Position 200 ist das zweite auffällige Motiv innerhalb der Rapa-14-Sequenz (ESEEEEEEEEEEDPEEDRKSTKEEVEVPKSPE). Sie wird weiter unten im Rahmen der Darstellungen der vollständigen Rapa-14 cDNA noch einmal ausführlich diskutiert.

3.7 Isolierung der vollständigen cDNA für Rapa-14

Betrachtet man das offene Leseraster des cDNA-Klons Rapa-14, so fällt auf, dass dieses am 5'-Ende ab der ersten Base offen ist. Das erste Startkodon ATG tritt in diesem Leseraster jedoch erst an Position 262 auf und ist des Weiteren in eine Umgebung eingegliedert, die keinen optimalen Translationsstart am eukaryontischen Ribosom erwarten lässt: Die Basenabfolge GTG ATG G entspricht nicht der optimalen eukaryontischen Translationsstartsequenz, die nach Kozak (1986) als ACC ATG G bestimmt wurde (Kozak-Box).

Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass das ATG₂₆₂ nicht den korrekten Translationsstart darstellt, das heißt, die vorliegende Rapa-14 Sequenz zumindest am 5'-Ende nicht vollständig ist. Dies war zu erwarten, da die verwendete Jurkat Expressions-cDNA-Bank nicht auf Vollständigkeit, sondern auf Translatierbarkeit der Klone hin optimiert wurde.

In mehreren Ansätzen wurde versucht, vollständige Klone von Rapa-14 zu isolieren. Im ersten Versuch wurde die 5'-RACE-Technik (rapid amplification of cDNA ends) angewandt (Frohman *et al.*, 1988; Belyavsky *et al.*, 1988). Die hierbei isolierten 5'-Enden umfaßten jedoch kaum neue Sequenzen und schienen ebenfalls nicht das vollständige offene Leseraster zu tragen.

Aus diesem Grund wurde der Weg gewählt, die vollständige cDNA für Rapa-14 über Kolonie Hybridisierung (Benton und Davis, 1977) aus einer cDNA-Bank zu isolieren. Da die ursprünglichen Klone aus einer Jurkat-cDNA-Bank isoliert wurden, lag es nahe, wiederum eine Jurkat-Bank zu durchsuchen. Die verwendete Bank repräsentierte die mRNA PMA-stimulierter Jurkat Zellen und lag subkloniert in den ZAP Express™ Vektor vor. Der Titer der Bank wurde mit $2,5 \times 10^5$ pfu/ μ l (plaque forming units) neu bestimmt. Die Bank wurde mit einer Digoxigenin-markierten cDNA-Sonde durchsucht, die den ersten 900 Nukleotiden der ursprünglichen Rapa-14 Sequenz entsprach. Es wurden etwa $0,9 \times 10^6$ cDNA enthaltende Lambda Plaques ausplattiert und nach Rapa-14 enthaltenden Sequenzen durchsucht. In der ersten Runde wurden 69 für Rapa-14 positive Plaques isoliert. Von diesen wurden 17 in zwei weiteren Runden als positiv bestätigt und vereinzelt. Aus den positiven, vereinzelt Lambdaphagen wurde durch eine Helferphagen Infektion das cDNA enthaltende Plasmid pBK-CMV ausgeschnitten und in *E. coli* XL2-blue überführt.

Die präparierte Plasmid-DNA wurde mehreren PCR- und Restriktionsanalysen unterworfen, um die Identität zu Rapa-14 genau zu untersuchen und um eine eventuell vorhandene Identität verschiedener Klone untereinander festzustellen. Abbildung 24 zeigt eine schematische Darstellung aller isolierten und eindeutig Rapa-14 beinhaltender Klone.

Die isolierten Klone weisen eine sehr starke Heterogenität bezüglich der Länge ihrer 5'- und 3'-Enden auf. Bei einer Länge von bis zu 4500 Basenpaaren ist dies einfach erklärbar: cDNA Synthesen in diesem Längenbereich sind oftmals unvollständig. Die starke 3'-Heterogenität rührt sicherlich auch daher, dass die cDNA Bank nicht nur mit oligo(dT)-Primern, also ausgehend vom polyA-Schwanz der mRNAs, sondern auch mit zufälligen Hexanukleotidprimern erstellt wurde.



Abbildung 24 schematische Darstellung aller isolierten Rapa-14 Klone

Dargestellt sind alle isolierten Rapa-14 cDNA Klone. Die Unternummerierung entspricht der Reihenfolge der Isolierung. Identische Bereiche (soweit untersucht) liegen untereinander. Rapa-14 "alt" entspricht der bei der Durchmusterung der Yeast Two-Hybrid Bank erhaltenen Sequenz. Der dunkelgrau hervorgehobene Bereich in Klon Rapa-14-33 zeigt die Position des offenen Leserasters. Die Länge der Klone ist jeweils rechts angegeben.

Welcher der isolierten cDNA Klone ist für weitere Arbeiten relevant?

Um die Relevanz der isolierten Rapa-14 cDNA Klone bezüglich einer Wechselwirkung mit MMP-19 abzuschätzen, ist in erster Linie das offene Leseraster, bzw. die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz wichtig. Es erschien nicht sinnvoll, alle Rapa Klone vollständig zu sequenzieren, da dieses den zeitlichen Rahmen des Projektes überstiegen hätte. Aus diesem Grunde wurde in einer gekoppelten *in vitro* Transkription/Translation überprüft, welcher der Klone ein vollständiges offenes Leseraster aufwies. Von den in Abbildung 24 dargestellten Klonen lies sicher der Klon Rapa-14-33 effizient *in vitro* transkribieren und translatieren. Das resultierende Protein wies ein apparentes Molekulargewicht von etwa 110 kDa auf (Daten nicht gezeigt). Die *in vitro* Transkription/Translation aller anderen Klone resultierte nicht in detektierbaren Proteinbanden. Aus diesem Grunde wurde der Klon Rapa-14-33 für weitere Analysen ausgewählt und vollständig sequenziert. Die Gesamtsequenz von 4164 Basenpaaren findet sich im Anhang dieser Arbeit. Sie beinhaltet, wie in Abbildung 24 schematisch dargestellt, ein offenes Leseraster von 2904 Basenpaaren und kodiert damit für ein Protein von 968 Aminosäuren. Die Eigenschaften dieses Proteins werden in Kapitel 3.8 ausführlich erläutert. Alle anderen Klone tragen nicht das erste ATG dieses Klones: sie sind jeweils am 5'-Ende stark verkürzt. Die zum Teil längeren 3'-Enden dieser Klone haben höchstwahrscheinlich keinen Einfluss auf die Länge der jeweiligen offenen Leseraster: Alle Klone sind im Sequenzabschnitt, in welchem der Klon Rapa-14-33 das Stopkodon aufweist, identisch. Es kann also davon ausgegangen werden kann, dass der Klon Rapa-14-33 das vollständige offene Leseraster beinhaltet.

3.8 Rapa-14-33

3.8.1 cDNA Sequenz

Wie im vorangegangenen Kapitel dargestellt, beinhaltet der 4164 Basenpaar lange cDNA Klon Rapa-14-33 ein offenes Leseraster von 2904 Basenpaaren. Dieses beginnt mit dem Adenin an Position 837 innerhalb einer nahezu optimalen Translationsstartsequenz nach Kozak (1986): AATATGG. 5'-wärts dieser Startsequenz finden sich in allen Leserastern mehrere Stopkodons, so dass davon ausgegangen werden kann, dass dies dem wirklichen Translationsstart entspricht.

Auch die nach Gribskov *et al.* (1984) bestimmte Kodierungswahrscheinlichkeit, die eine statistische Wahrscheinlichkeit für proteinkodierende Regionen innerhalb einer Sequenz angibt, ist innerhalb des gefundenen offenen Leserasters signifikant erhöht (Daten nicht gezeigt).

BLAST- und fasta3-Vergleiche der Rapa-14-33-cDNA Sequenz mit den in den Datenbanken GenBank und EMBL verzeichneten Sequenzen ergaben keine signifikanten Ähnlichkeiten zu bekannten Sequenzen. Die größte Ähnlichkeit auf DNA Ebene erstreckte sich auf etwa 50 Nukleotide außerhalb des offenen Leserasters mit einer nicht näher charakterisierten, nichtkodierenden Sequenz. Der Vergleich mit den "expressed sequence tag (dbEST)" Datenbanken des National Centers for Biological Information ergab insgesamt nur 10 Treffer. Dies ist bezüglich der Größe, die diese Datenbank mittlerweile hat, sehr wenig. Die jeweiligen EST-Fragmente wurden viermal aus Gehirn, dreimal aus B-Zellen, zweimal aus Dickdarm und einmal aus Eierstöcken gewonnen.

3.8.2 Das Protein Rapa-14-33

Die aus der cDNA Sequenz abgeleitete Proteinsequenz von Rapa-14-33 findet sich im Anhang dieser Arbeit. Abbildung 25 zeigt schematisch den Aufbau dieses Polypeptids. Das aus den 968 Aminosäuren abgeleitete Molekulargewicht beträgt 107,7 kDa, der errechnete isoelektische Punkt liegt bei 6,84.

Die Suche nach auffälligen Sequenzabschnitten, bzw. Proteindomänen und Motiven wurde zum einen nach statistischen Gesichtspunkten mithilfe einer sogenannten SAPS Analyse (Statistical Analysis of Protein Sequences) (Brendel *et al.*, 1992) und zum anderen über den Vergleich mit bekannten und in den Datenbanken PROSITE (Bairoch *et al.*, 1997), ProDom (Sonnhammer und Kahn, 1994; Corpet *et al.*, 1998) und Pfam (Sonnhammer *et al.*, 1997 und 1998) verzeichneten Sequenzen durchgeführt. Des Weiteren wurden "Gapped-BLAST" (BLASTP 2.0.8), PSI-BLAST (Position Specific Iterated BLAST) (Altschul *et al.*, 1990 und 1997), PHI-BLAST (Pattern Hit Initiated BLAST) (Zhang *et al.*, 1998) und fasta3 (Perason und Lipman, 1988) Suchanalysen durchgeführt, um eventuelle Ähnlichkeiten mit bekannten Proteinen aufzuzeigen.

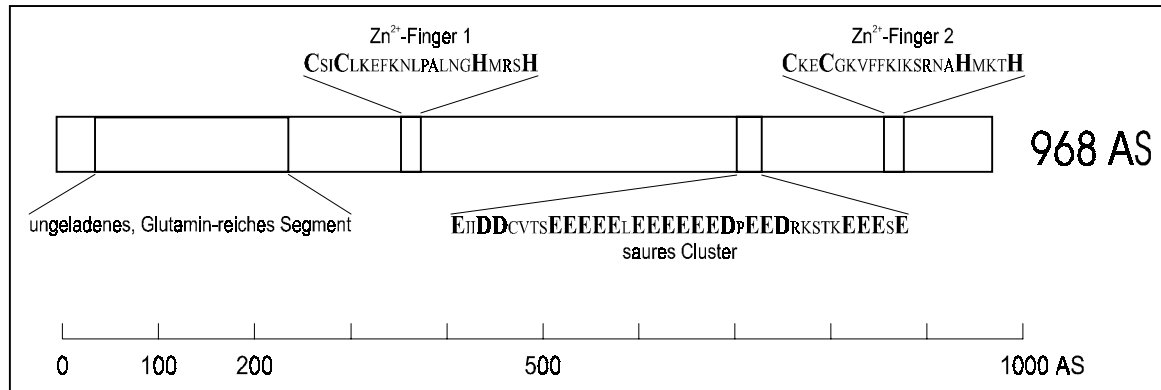


Abbildung 25 schematische Darstellung des vollständigen Proteins Rapa-14-33

Gezeigt ist ein Schema der aus dem offenen Leseraster des cDNA Klons Rapa-14-33 abgeleiteten vollständigen Rapa-14-33 Proteinsequenz. Die ausführliche Sequenz findet sich im Anhang. Die hervorgehobenen Elemente werden im Text erläutert.

Strukturelle Motive in Rapa-14

Vergleicht man Rapa-14 mit den in der GenBank verzeichneten Sequenzen, so findet sich kein einziges Protein, das über die volle Länge signifikante Ähnlichkeit zur dieser neuen Sequenz hat. Die Ähnlichkeiten liegen fast in jedem Fall unter 30% und beziehen sich nur auf kurze Sequenzabschnitte. Auffällig sind die mit 11,1% und 11,9% sehr hohen Anteile an Prolin und Glutamin, die über dem 95%, bzw. sogar über dem 99% Quantil der Normalverteilung liegen. Die Proline sind über die gesamte Sequenz nahezu gleichmäßig verteilt, eine leichte Häufung findet sich im vorderen Drittel, wo der Prolinanteil über 16% liegt. Die Glutamine hingegen finden sich zum größten Teil innerhalb der ersten 256 der insgesamt 968 Aminosäuren. Der Glutaminanteil liegt hier bei 29,3%. Schränkt man den Bereich auf die Positionen 40 bis 240 ein, so erhöht sich dieser Wert auf 34%. Zusammen mit dem Prolinanteil von 14,5% in diesem Abschnitt und dem sehr niedrigen Anteil der geladenen Aminosäuren Arginin, Lysin, Glutamat und Aspartat von insgesamt nur 5,5% kann dieser Abschnitt als signifikant ungeladenes Segment bezeichnet werden. Verschiedene Proteine beinhalten ähnliche Domänen, wie weiter unten gezeigt wird.

Der Gehalt an geladenen Aminosäuren liegt mit insgesamt 19% bezogen auf die Gesamtsequenz im normalen Bereich, wobei sich die Ladungen nahezu ausgleichen, das heißt weder negativ noch positiv geladene Reste überwiegen. Auffällig ist hier jedoch wiederum eine Ungleichverteilung dieser Aminosäuren. Sowohl positive als auch negativ geladene Aminosäuren finden sich überwiegend in den hinteren zwei Dritteln des Proteins. Vor allem die negativ geladenen Reste und hier vor allem Glutamat befinden sich gehäuft zwischen den Positionen 703 und 728. Dieser sehr auffällige, stark negativ geladene Sequenzabschnitt (**EIIIDDCVTS EEEEELEEEEEEDPEEDRK STKEE ESE**) besteht zu 50% aus Glutamat und weiterhin zu 11,1% aus Aspartat. Ähnliche Anhäufungen saurer Aminosäuren kommen auch in verschiedenen anderen Proteinen vor (siehe unten).

Zusätzlich zu dem schon im unvollständigen Rapa-14 Fragment enthaltenen ersten Zinkfinger

(entspricht Zinkfinger 2 in Abbildung 25), weist die vollständige Sequenz eine weitere Domäne dieses Typs auf (Positionen 353 bis 373, bzw. 856 bis 876). Beide Zinkfinger gehören dem C₂H₂-Typ an, wie sie in einer Vielzahl nukleärer, aber auch zytoplasmatischer Proteine vorkommen und sowohl der Bindung von Nukleinsäuren, als auch der Wechselwirkung mit anderen Proteinen dienen (Mackay und Crossley, 1998). Der Abstand zwischen beiden Fingern ist mit 487 Aminosäuren sehr groß, so dass eine gemeinsame Funktion beider Finger relativ unwahrscheinlich erscheint. Welche Funktion diese Zinkfinger in Rapa-14-33 erfüllen können, wird in Kapitel 4 (Diskussion) näher erläutert.

Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen

Wie bereits erwähnt, sind keine Proteine bekannt, die über die gesamte Länge Homologie zu Rapa-14-33 aufweisen. Jedoch finden sich zu den erwähnten Motiven innerhalb Rapa-14-33 andere Proteine, die ähnliche Strukturmerkmale aufweisen.

Der Prolin und Glutamin-reiche N-Terminus zeigt Ähnlichkeit zu einer Vielzahl von Proteinen. Am auffälligsten ist die Ähnlichkeit dieses Abschnittes von knapp 30% zu Involucrinen. Diese sind in Keratinozyten exprimierte, zytosolische Proteine, die durch Transglutaminasen an Membranproteine gekoppelt werden und somit eine unter der Plasmamembran liegende Hülle bilden (Yaffe *et al.*, 1992). Man nimmt an, dass die Glutamine hier während der Transglutaminasereaktion die Wechselwirkung mit Lysin anderer Paramembranproteine vermitteln. Auch Synapsine, also periphere Membranproteine der synaptischen Vesikel, die diese an das Actin Zytoskelett koppeln (Sudhof, 1990), beinhalten ähnliche Strukturen. Weitere Ähnlichkeiten von jeweils knapp über 30% Identität, die sich auf die ersten 300 Aminosäuren beschränken, bestehen zu vesikulären Getreidestrukturproteinen wie Hordein, Secalin und Gliadin und dem Nematodenhüllprotein "microfilarial sheath protein". Ein kurzer Abschnitt (Positionen 10 bis 90) zeigt eine Homologie zu Kollagentypen verschiedener Organismen, wie z.B. dem humanen Kollagen alpha 1(XV). Jedoch liegt die Identität hier unter 25%.

Eine relativ hohe Identität von 45% (50% Ähnlichkeit) zum Drosophila Protein Sevenless zeigt der Bereich zwischen Lysin₂₆₅ und Aspartat₃₂₃, das heißt, der Bereich zwischen dem ungeladenen Segment und Zinkfinger 1. Jedoch ist der entsprechende Abschnitt dieses 2554 Aminosäuren großen Mitglieds der Tyrosin-Protein Kinasen Insulinrezeptorfamilie keiner speziellen Funktion zugeordnet. Im selben Bereich findet sich auch eine knapp 30% Identität zum zytoplasmatischen Teil der Interleukin-4 Rezeptor alpha Kette.

Die beiden C₂H₂-Zinkfinger zeigen erwartungsgemäß Homologie zu einer Vielzahl von Zinkfingerproteinen der "Krüppel-ähnlichen" Klasse, wie z.B. FOG (Friend of GATA) oder Sryδ. Dabei entsprechen diese Sequenzabschnitte zu 100% der aus einer Vielzahl von Zinkfingern abgeleiteten Konsensussequenz (Mackay und Crossley, 1998). Jedoch bezieht sich die Ähnlichkeit ausschließlich auf die reine Zinkfingersequenz und nicht auf deren Umgebung.

Der als "saures Cluster" bezeichnete Bereich zwischen den Positionen 703 und 728 zeigt ebenfalls Ähnlichkeit zu einer Vielzahl von Proteinen. Die Liste von Proteinen, die Polyglutamatabschnitte ähnlicher Länge und Umgebung enthalten, beinhaltet unter anderem Calnexin und verwandte Proteine wie Calmegin und Calreticulin. Diese sind alle drei im endoplasmatischen Reticulum (ER) lokalisiert und besitzen eine Vielzahl von Kalziumbindestellen. Calreticulin liegt löslich im ER vor; Calnexin und Calmegin hingegen sind Transmembranproteine. Der zur Rapa-14-33 korrespondierende saure Abschnitt in diesen Proteinen liegt jeweils auf der zytoplasmatischen Seite im direkten Anschluss an die Transmembransequenz. Die biologische Funktion des Calnexinmoleküls wird in der Kontrolle des Exports von Glykoproteinen gesehen (Bergeron *et al.*, 1994; Williams, 1995).

Weiterhin besteht eine 50%ige Identität des sauren Abschnitts in Rapa-14-33 zur 50 Aminosäuren großen Troponin T Untereinheit des Troponin Komplexes. Dieser reguliert kalziumabhängig die Interaktion zwischen Myosin und Actin bei der Muskelkontraktion (Fahrah und Reinach, 1995).

Auch die Ran GTPase, die in Transportvorgängen zwischen Zytoplasma und Nukleus involviert ist, besitzt ähnliche "saure Cluster" (Melchior und Gerace, 1998). Die saure Domäne scheint hier die Wechselwirkung mit einem weiteren Protein, RanBP1, zu vermitteln (Ren *et al.*, 1995).

Weitere Proteine die solche Polyglutamatabschnitte aufweisen sind das mit Nervenwachstum assoziierte und Ca^{2+} -bindende, an der Innenseite von Zellmembranen lokalisierte Protein Neuromodulin des Goldfisches (GAP-43), ein noch nicht weiter analysiertes Ionenaustauschprotein des Bisons und Chromogranin im Menschen. Die Funktion der sauren Abschnitte bei GAP-43, die hier eine gewisse Ähnlichkeit mit Neurofilamenten aufweisen, werden in der Wechselwirkung mit dem Zytoskelett vermutet (LaBate und Skene, 1989). Chromogranin ist ein saures, lösliches und kalziumbindendes Protein, das in sekretorischen Vesikeln des neuroendokrinen Systems gefunden wird, und zusammen mit Hormonen und Neurotransmittern freigesetzt wird (Hendy *et al.*, 1995).

Eine letzte interessante Homologie findet sich im Sequenzabschnitt vor dem "sauren Cluster". Die Aminosäuren zwischen den Positionen 537 und 700 zeigen eine 27%ige Identität zum "Metastasis-associated protein" MTA1 der Ratte. Die Identität zum menschlichen MTA1 Protein beträgt 36%, umfaßt aber einen weitaus kürzeren Bereich (644-703). Die biologische Rolle von MTA1 ist noch nicht geklärt. Man nimmt an, dass dieses Protein in Signaltransduktionsprozesse involviert ist, die Zellwachstum und Motilität steuern (Toh *et al.*, 1997; Nicolson, 1998).

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der phylogenetischen und funktionellen Einordnung der Matrixmetalloproteinase MMP-19 in die Familie der Matrixine (Matrixmetalloproteinasen).

Im ersten Teil wurde eine phylogenetische Zuordnung basierend auf Sequenzanalysen vorgenommen. Hierbei wurde der Verwandtschaftsgrad von MMP-19 zu anderen Matrixmetalloproteinasen untersucht. Aufgrund der gefundenen Ähnlichkeiten und Unterschiede wurden erste Hypothesen bezüglich der biologischen Funktion von MMP-19 generiert, bzw. aufgezeigt, welche der bekannten Aufgabebereiche der Matrixmetalloproteinasen für MMP-19 ausgeschlossen werden können. Dies wird in Kapitel 4.1 diskutiert.

Weiterhin wurde analysiert, welche Zelltypen MMP-19 exprimieren und wie diese Expression reguliert wird, um dadurch wiederum Hinweise auf die biologischen Funktionen von MMP-19 zu erhalten. Zusätzlich sollten diese Untersuchungen aber auch dazu dienen, ein zelluläres Modellsystem für weiterer Experimente zu etablieren. Die Diskussion dieser Daten findet sich in Kapitel 4.2.

Im letzten Teil der Arbeit wurde dargestellt, wie die anhand solcher zellulären Modelle aufgezeigte Oberflächenassoziation von MMP-19 untersucht wurde. Des weiteren wurde die Isolierung und Analyse neuer Interaktionspartner von MMP-19 beschrieben. Diese Ergebnisse werden in den Kapiteln 4.3 und 4.4 bewertet und diskutiert.

4.1 Einordnung von MMP-19 in die Matrixinfamilie

MMP-19 weist wie alle anderen Mitglieder dieser zinkabhängigen Metalloproteinasefamilie eine klar definierte Domänenstruktur auf. Die Einteilung in Signalpeptid, Propeptid, Katalytische Domäne, Hingeregion und Hämopexin-ähnliche Domäne kann eindeutig auch für MMP-19 vorgenommen werden und entspricht der der anderen Matrixmetalloproteinasen.

Auffällig ist allerdings die nur relativ geringe Ähnlichkeit zu den anderen Matrixmetalloproteinasen des Menschen. Bezogen auf das Gesamtzym beträgt sie nach der verwendeten PAM-Matrix nur um die 40%. Auch die Identität ist mit etwa 27% ungewöhnlich gering. Üblicherweise weist die Ähnlichkeit innerhalb der Matrixinfamilie Werte zwischen 50 bis 90% auf. Die Identitätswerte liegen üblicherweise zwischen 35 bis 80%. Stromelysin-1 ist der Kollagenase-1 zum Beispiel zu 70% ähnlich und zu 52% identisch. Vergleicht man in Struktur und Funktion nah verwandte Matrixmetalloproteinasen einer gemeinsamen Untergruppe, wie zum Beispiel Stromelysin-1 mit Stromelysin-2, so erhöhen sich diese Werte sogar auf 88% für die Ähnlichkeit und 78% für die Identität.

MMP-19 zeigt also wie die Membranständigen Matrixmetalloproteinasen und Stromelysin-3 eine geringe Übereinstimmung mit anderen Matrixinen. Jedoch ist die Ähnlichkeit zu diesen Enzymen ebenso gering und liegt jeweils um die 40% (ca. 30% Identität).

Aufgrund der gezeigten Stellung innerhalb des Matrixinstammbaums, könnte man MMP-19, wie auch Stromelysin-3, als Randgruppenmitglieder dieser Proteinasefamilie bezeichnen.

Vergleiche einzelner Domänen

Die Substratspezifität der einzelnen Matrixmetalloproteinasen wird in erster Linie durch die Katalytische und die Hämapexin-ähnliche Domäne bestimmt (Murphy und Knäuper, 1997). Abbildung 26 zeigt schematisch die aus Röntgen- und anderen Strukturanalysen abgeleitete Domänen-topologie der Matrixmetalloproteinasen. Die Katalytische Domäne ist bei allen Matrixmetalloproteinasen hochkonserviert: Das zinkbindende aktive Zentrum ist nahezu invariant. Die Ähnlichkeit der

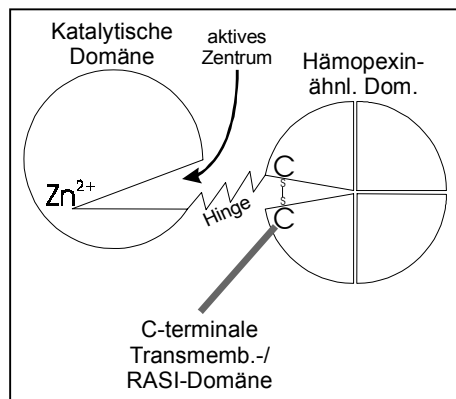


Abbildung 26 die Struktur der Matrixmetalloproteinasen

Schema adaptiert nach Murphy und Knäuper (1997)

gesamten Katalytischen Domäne von MMP-19 zu der anderen humanen Familienmitglieder liegt zwischen 47 und 60%, was wiederum ein vergleichsweise geringer Wert ist. Zwischen anderen Matrixmetalloproteinasen findet man hier Werte um die 70%.

Die größte Ähnlichkeit von ca. 60% innerhalb des aktiven Zentrums zeigt MMP-19 zu den beiden Stromelysinen, die sich durch eine, zumindest *in vitro*, sehr breite Substratspezifität aufweisen. Allerdings ist auch dieser Ähnlichkeitswert nicht signifikant höher als zu anderen Matrixmetalloproteinasen. So ist sogar die Katalytische Domäne des phylogenetisch weit entfernten "hatching enzymes" des Seesterns schon zu 58% ähnlich zu MMP-19.

Die geringste Ähnlichkeit besteht mit 47% zu MT1-MMP. Dies lässt sich mit der funktionellen Sonderrolle der MT1-MMP erklären: Sie erkennt und aktiviert die Gelatinase A (Sato *et al.*, 1994; Knäuper und Murphy, 1998).

Zusammengefasst heißt das, dass sich die für die Substratspezifität wichtige Katalytische Domäne von MMP-19 sehr stark von allen anderen Matrixinen unterscheidet. Die Ähnlichkeit, bzw. Identität beschränkt sich vor allem auf hochkonservierte und für den katalytischen Grundmechanismus essentielle Aminosäuren. Die umliegenden, Substratspezifität-definierenden Aminosäuren unterscheiden sich bei MMP-19 sehr stark von denen der anderen Matrixine und lassen sich auch keiner bestimmten Untergruppe zuordnen.

Entsprechendes gilt für die Hämapexin-ähnliche Domäne: Sie spielt neben der Katalytischen Domäne zumindest für einen Teil der Matrixine eine wichtige Rolle in der Definition der Substratspezifität. Dies wurde vor allem für die Kollagenasen-1, -2, -3 und für Stromelysin-1 gezeigt, deren Hämapexin-ähnlichen Domänen die Bindung zu nativem Kollagen vermitteln (Allan *et al.*, 1991; Murphy *et al.*, 1992c; Knäuper *et al.*, 1993 und 1997). Entfernt man den C-Terminus dieser Enzyme und damit die Hämapexin-ähnliche Domäne, so verlieren alle drei Kollagenasen die Fähigkeit, natives tripelhelikales Kollagen zu spalten (Clark und Cawston, 1989; Murphy *et al.*, 1992c; ; Knäuper *et al.*, 1993 und 1997). Dasselbe gilt auch, wenn man die Hämapexin-ähnliche Domäne der Kollagenase-1 durch die von Stromelysin-1 oder -2 ersetzt (und umgekehrt): Die für die Spaltung des nativen Kollagens

notwendige "triple"-Helikase Aktivität verschwindet (Murphy *et al.*, 1992; Sanchez-Lopez *et al.*, 1993).

Neben dem Einfluß auf die Substratspezifität hat die Hämapexin-ähnliche Domäne andere wichtige Funktionen inne: Bei fast allen Matrixmetalloproteinasen vermittelt diese Domäne die Bindung der spezifischen TIMP-Inhibitoren ("tissue inhibitors of metalloproteinases"). Die Hemmung der proteolytische Aktivität resultiert zwar aus einer direkten Bindung der TIMPs im katalytischen Zentrum, die initiale Bindung an die Hämapexin-ähnliche Domäne beschleunigt diesen Vorgang jedoch erheblich und erniedrigt die Dissoziationskonstante um den Faktor 10 (Howard und Banda, 1991; Fridman *et al.*, 1992; Kleine *et al.*, 1993; Willenbrock *et al.*, 1993; Nguyen *et al.*, 1994; O'Connell *et al.*, 1994; Taylor *et al.*, 1996).

Des weiteren scheint die Hämapexin-ähnliche Domäne für die Zelloberflächenassoziation sowohl der Gelatinase A, als auch der Prokollagenase-3 notwendig zu sein. Die Funktion hier liegt sehr wahrscheinlich in der Wechselwirkung mit anderen Oberflächenproteinen (Ward *et al.*, 1994; Strongin *et al.*, 1994; Knäuper *et al.*, 1996).

Interessanterweise zeigt die Hämapexin-ähnliche Domäne von MMP-19 mit 52% die größte Ähnlichkeit zu der von MT1-MMP (31% Identität) und damit zu dem Enzym, das, bezogen auf die Katalytische Domäne, die meisten Unterschiede zu MMP-19 aufweist. Die beiden Sequenzabschnitte scheinen also einem unterschiedlichen Selektionsdruck ausgesetzt zu sein. Dies spiegelt wieder, dass zwar beide Domänen für die biologischen Funktionen absolut notwendig sind, die jeweils vermittelten Aufgaben sich aber unterscheiden.

Die Funktion der C-terminalen Hämapexin-ähnlichen Domäne bei MT1-MMP unterscheidet sich von den der oben genannten: Im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Matrixmetalloproteinasen ist sie weder in der Festlegung der Substratspezifität, noch in die Bindung von TIMPs involviert (Will *et al.*, 1996; Butler *et al.*, 1998; Zucker *et al.*, 1998; Murphy und Knäuper, 1997). Eine Aussage bezüglich der Funktion dieser Domäne bei MMP-19, wie zum Beispiel der Vorhersage der präferenziellen Bindung eines bestimmten TIMPs, ist aus dieser Ähnlichkeit also nicht ableitbar.

Mit 40% ist die Ähnlichkeit der Hämapexin-ähnliche Domäne von MMP-19 zu der der beiden Stromelysine am geringsten (23 bzw. 26% Identität). Damit kann eine diesen Enzymen ähnliche Substratspezifität von MMP-19 sehr wahrscheinlich ausgeschlossen werden. Auch die Kollagenasen unterscheiden sich bezüglich dieser Domäne stark von MMP-19 (ca. 42% ähnlich).

MMP-19 kann also aufgrund bloßer Sequenzvergleiche keiner der bekannten Matrixmetalloproteinasenuntergruppen zugeordnet werden. Die beobachteten Ähnlichkeiten sind hierzu zu gering. Hinzu kommt, dass die Sequenzverwandtschaften der beiden die biologische Funktion einer Matrixmetalloproteinase bestimmenden Domänen in völlig unterschiedliche Richtungen deuten. Zusammen genommen spricht dies für eine gegenüber den anderen Matrixinen anders geartete Funktion.

Betrachtet man die phylogenetische Einordnung in die Matrixinfamilie (Kapitel 3.1, Abbildung 5), so bestätigt sich diese Sonderrolle: MMP-19 hat sich schon sehr früh in der Entwicklung von den anderen Familienmitgliedern abgekoppelt. Innerhalb des Stammbaums der betrachteten humanen Matrixmetalloproteinasen stellt dies die erste Verzweigung dar. Dies zeigt sich auch in der chromosomalen Lokalisierung des MMP-19 Gens. Es befindet sich nicht, wie die meisten anderen Matrixmetalloproteinasegene auf Chromosom 11, sondern auf Chromosom 12 (Pendas *et al.*, 1997).

Bei den bisher analysierten Matrixinen zeigt sich, dass jede nach phylogenetischen Kriterien definierte Unterfamilie dieser Enzymfamilie *in vitro* auch verwandte Substrate erkennt (Murphy *et al.*, 1991). Als Beispiel können hier sowohl die Kollagenasen, die Gelatinasen, die Stromelysine-1 und -2, als auch die Membranständigen Matrixmetalloproteinasen aufgeführt werden. Anders herum formuliert bedeutet dies, dass die phylogenetische Sonderstellung von MMP-19 wiederum für einen relativ großen Unterschied bezüglich der erkannten Substrate spricht.

Stromelysin-3 hat sich während der Matrixentwicklung gemeinsam mit MMP-19 von den restlichen Matrixmetalloproteinasen abgespalten. Es kann also als das nächstverwandte Enzym bezeichnet werden. Auch die chromosomale Lokalisierung des Stromelysin-3-Gens auf Chromosom 22 ist ebenfalls innerhalb der Matrixinfamilie einmalig. Um an diesem Punkt Verwirrung zu vermeiden, sei noch ein mal darauf hingewiesen, dass Stromelysin-3, weder phylogenetisch noch nach anderen Kriterien der Unterfamilie der Stromelysine zuzuordnen ist. Die falsche Namensgebung beruhte auf einem Missverständnis der Erstbeschreiber von Stromelysin-3, welches sich in der Nomenklatur gehalten hat (Basset *et al.*, 1990; Paul Basset, persönliche Mitteilung). Leider sind weder die Substratspezifität, noch die Funktion von Stromelysin-3 bis heute hinreichend geklärt. Stromelysin-3 erkennt unter *in vitro* Bedingungen, bei denen andere Matrixmetalloproteinasen Aktivität zeigen, keines der klassischen Substrate der extrazellulären Matrix (Parks und Mecham, 1998). Es wurde in einer Vielzahl von Publikationen gezeigt, dass die Expression von Stromelysin-3 mit Tumorpheression und Wundheilung korreliert (Basset *et al.*, 1993; Noel *et al.*, 1996; Okada *et al.*, 1997). Das heißt, Stromelysin-3 stellt ein Enzym dar, das eine wichtige Rolle in pathologischen Prozessen zu spielen scheint, aber wahrscheinlich ein für Matrixmetalloproteinasen untypisches Substrat erkennt. Die gemeinsame Abspaltung von Stromelysin-3 und MMP-19 von der Entwicklung der anderen Matrixmetalloproteinasen kann hier als Hinweis gewertet werden, dass auch MMP-19 unter Umständen kein klassisches Matrixmetalloproteinase-Substrat erkennt.

Die phylogenetische Verwandtschaft zwischen MMP-19 und Stromelysin-3 kann jedoch nicht als Argument für die gemeinsame Klassifizierung dieser beiden Enzyme in eine Matrixmetalloproteinasen Untergruppe herangezogen werden: MMP-19 zeigt keine der typischen Charakteristika der Stromelysin-3 Sequenz und umgekehrt: Stromelysin-3 besitzt eine Aktivierungssequenz, die von Golgi-lokalisierten Serinproteinasen des Furintyps erkannt wird (Pei und Weiss, 1995). Dieses RXXR Motiv, welches auch bei den Membranständigen Matrixmetalloproteinasen (MT-MMPs) zu finden ist, bewirkt eine Aktivierung des Matrixmetalloproteinasen-Proenzym schon während des Exports in den

Extrazellularraum. MMP-19 wiederum besitzt einen sehr auffälligen sauren Abschnitt in der Hingeregion und eine zusätzliche hydrophobe C-terminale Domäne. Beide scheinen charakteristisch für MMP-19 zu sein, da sie auch im murinen MMP-19 zu finden sind (Justine Kusch und Markus Müller, persönliche Mitteilung).

Zusätzlich zu den erwähnten Unterschieden zwischen MMP-19 und Stromelysin-3 spricht auch der sehr große phylogenetische Abstand zwischen diesen beiden Matrixmetalloproteinase für eine Einordnung in getrennte Untergruppen. Die nach der Verzweigung getrennte Entwicklung von MMP-19 und Stromelysin-3 ist länger, als bei allen anderen Familienmitgliedern.

Das heißt, dass sich damit wahrscheinlich auch die biologischen Rollen dieser beiden Enzyme weit voneinander entfernt haben.

Die hydrophobe C-terminale (RASI-)Domäne von MMP-19, die in dieser Art bei keiner der anderen Matrixine zu finden ist, verbindet MMP-19 mit den Membranständigen Matrixmetalloproteinase: Die Transmembranregionen dieser oberflächengebundenen Enzyme sind ebenso als zusätzliche C-terminale Domäne ausgeprägt (siehe Abbildung 26). Diesem Sequenzabschnitt ist bei MMP-19 und bei den Membranständigen Matrixmetalloproteinase ein Schwefelbrücken-vermittelndes Cystein vorgestellt, welches auch eine Entsprechung bei allen anderen Familienmitgliedern findet. Hier markiert dieses hochkonservierte Cystein jedoch das C-terminale Ende der Gesamtsequenz.

Ein gemeinsamer entwicklungsgeschichtlicher Ursprung der beiden C-terminalen Anhänge ist jedoch unwahrscheinlich: Die Transmembrandomäne der Membranständigen Matrixmetalloproteinase MT1-MMP wird in einem eigenen, zehnten Exon kodiert, und ist damit als unabhängiger Zusatz zur Matrixmetalloproteinase Grundstruktur anzusehen (Apte *et al.*, 1997). Die C-terminale Domäne von MMP-19 wird hingegen gemeinsam mit dem hinteren Teil der Hämapexin-ähnlichen Domäne durch das neunte Exon kodiert (Markus Müller, persönliche Mitteilung). Das heißt, hier scheint es sich eher um eine mutationsbedingte Verschiebung des Translationsstops zu handeln.

Betrachtet man alle gezeigten und diskutierten Ergebnisse zusammenfassend, so kann davon ausgegangen werden, dass MMP-19 das erste Mitglied einer neuen Unterfamilie der Matrixmetalloproteinase darstellt. Dies ist einerseits ein sehr spannendes Ergebnis, da somit mit MMP-19 eine Matrixmetalloproteinase gefunden wurde, die eine neue, bisher nicht der Familie der Matrixmetalloproteinase zugeordnete Substratspezifität abdecken könnte. Bezüglich der schnellen Aufklärung der biologischen Funktion von MMP-19 mittels Zuordnung zu einer der bekannten Matrixmetalloproteinaseuntergruppen, können diese Ergebnisse allerdings nur sehr wenig beitragen. Sie zeigen klar, dass MMP-19 weder eine Gelatinase, noch eine Kollagenase ist und auch den Stromelysinen oder anderen Matrixmetalloproteinase nicht zugeordnet werden kann. Die Betrachtung der Proteinase MMP-19 muss also zumindest partiell losgelöst von den Funktionen der anderen Matrixmetalloproteinase vorgenommen werden.

4.2 RNA Expression

Verschiedene Zelllinien wurden bezüglich der Expression der MMP-19 mRNA untersucht. Dabei konnten verschiedene Fibroblastenlinien und myeloide Zellen als MMP-19 mRNA Produzenten identifiziert werden.

Synoviale und Lungenfibroblasten

Eine der untersuchten Fibroblastenlinien wurde aus der Synovialmembran einer gesunden Person isoliert (Kontrolllinie). Zwei weitere stammten aus den Synovien von an Rheumatoider Arthritis erkrankten Personen (RA-Linien). Die beiden RA-Linien wiesen jeweils eine erhöhte Expression an MMP-19 mRNA gegenüber der Kontrolllinie auf. Dies könnte einen, auch in Kultur erhaltenen, krankheitsbedingten überaktivierten Status der beiden Zelllinien widerspiegeln. In einer Vielzahl von *in vivo* Untersuchungen wurden solche durch RA ausgelöste Zellaktivierungen mit einhergehenden Veränderungen der Genregulation gezeigt (Cunnane et al., 1998). Diese Modulationen der Genexpression wurden auch für verschiedene Matrixmetalloproteinasen, wie Stromelysin-1, Kollagenase-1 oder die beiden Gelatinasen gezeigt (Ishiguro et al., 1996; Keyszer et al., 1998). Es wird angenommen, dass diese Proteinasen wichtige Mediatoren der progressiven arthritischen Gelenkzerstörung darstellen, indem sie die Extrazellulärmatrix der Gelenke umsetzen (Cunnane et al., 1998). Hemmung der Metalloproteinaseaktivität führt dementsprechend zu einer signifikanten Reduktion dieses krankhaften Knorpel- und Knochenabbaus (Conway et al., 1995).

Da MMP-19 als RA-assoziiertes Autoantigen isoliert wurde (siehe Kapitel 1.4.1), ist eine potentielle positive Korrelation der MMP-19-mRNA Expression mit einer RA-Erkrankung von besonderem Interesse: Eine Theorie der Entstehung von Autoimmunerkrankungen geht davon aus, dass eine erhöhte Expression körpereigener Proteine zur Zunahme der MHC-vermittelten Präsentation dieser Proteine führt. Dies kann eine Überschreitung der Ignoranzschwelle des Immunsystems gegen sogenannte kryptische Determinanten dieses Proteins zur Folge haben. Als Resultat ist eine Autoimmunantwort gegen diese vormals immunprivilegierten kryptischen Epitope. Der nachfolgende Prozess des "epitope spreading" führt zu einer Ausweitung dieser Autoimmunantwort auf weitere Determinanten dieser Moleküle - eine Autoimmunerkrankung ist entstanden (Gammon et al., 1991; Cibotti et al., 1992; Mamula, 1993; Lehmann et al., 1992, 1993 und 1998; Moudgil und Sercarz, 1993 und 1994, Neu et al., 1997).

Ob ein solcher Zusammenhang auch für MMP-19 gilt, kann beim jetzigen Wissensstand noch nicht beantwortet werden. Gegen eine einfache Korrelation einer erhöhten MMP-19 Expression mit einer anti-MMP-19 Autoimmunantwort spricht, dass Gewebeschnitte von Gelenken RA-erkrankter Patienten keine erhöhte MMP-19 Proteinexpression in synovialen Fibroblasten zeigen (Kolb et al., 1997). Ob die in diesen Untersuchungen beobachtete erhöhte MMP-19 Expression in den Blutgefäßen der entzündeten Synovien als Auslöser für eine Autoimmunantwort ausreicht ist unklar: Die Analyse

der anti-MMP-19 Immunreaktion ist in unserer Arbeitsgruppe noch nicht weit genug fortgeschritten, um eine abschließende Beurteilung dieser Frage zu erlauben.

Die *in vivo* Relevanz der gezeigten MMP-19 Expression in der Lungenfibroblastenlinie SV80 kann ebenso nicht endgültig beantwortet werden, da bisher keine Lungengewebeschnitte durchgeführt wurden (Dr. Cornelia Kolb, persönliche Mitteilung). Sie korreliert allerdings mit der beobachteten Expression der MMP-19 mRNA in der menschlichen Lunge (Cossins *et al.*, 1996; Pendas *et al.*, 1997).

T-Lymphozyten

Die vor Beginn dieser Arbeit gezeigte MMP-19 Expression in Jurkat T-Lymphoblasten und in primären T-Lymphozyten konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Jurkat, CEM und Molt4 T-Zelllinien wurden also ebenso negativ für MMP-19 mRNA befunden wie primäre T-Zellen. Auch eine Oberflächenexpression des MMP-19-Proteins konnte für diese Zellen in mehrfach wiederholten Analysen nicht nachvollzogen werden. Ein Grund für diese Unstimmigkeiten könnten die in den früheren Analysen verwendeten Antikörper darstellen. Neuere Untersuchungen haben mittlerweile gezeigt, dass diese früheren Antikörper eine im Vergleich weitaus schlechtere Spezifität aufweisen, wie die in dieser Arbeit verwendeten.

Der frühere Nachweis von MMP-19 mRNA in ruhenden T-Zellen muss also aus heutiger Sicht als experimenteller Artefakt betrachtet werden.

Trotz der geschilderten Einschränkung bezüglich der früheren Ergebnisse muss erwähnt werden, dass Jurkat, nicht aber Molt4 T-Zellen nach einer Stimulation mit Phorbol ester MMP-19 mRNA aufweisen. Die Expression ist hier zwar um ein Vielfaches geringer als z.B. in aktivierten THP-1 Monozyten, aber dennoch klar nachweisbar. Es ist also nicht unwahrscheinlich, dass auch für T-Zellen spezifische Stimuli existieren, die eine MMP-19 Expression induzieren können. Eine Zelloberflächenassoziation des MMP-19 Proteins konnte jedoch auch auf aktivierten Jurkat Zellen nicht gezeigt werden: vielleicht fehlt auf Jurkat Zellen der dafür notwendige Zelloberflächen-Assoziationspartner.

Monozyten/Makrophagen

Sehr interessant in ihrer MMP-19 mRNA-Expression haben sich myeloide Zellen erwiesen. Einerseits scheint hier die Expression an Differenzierungsvorgänge gekoppelt, andererseits aber auch adhäsionsabhängig zu sein.

Die Makrophagendifferenzierung verläuft in mehreren Stufen: Sie geht von pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks aus und setzt sich über sogenannte myeloide Stammzellen, und weiter über Granulozyten-Monozyten Vorläuferzellen, bis zu Monozyten und zuletzt zu Makrophagen fort (Dougherty und William, 1989). Die aus dem Blut eines an akuter myeloider Leukämie erkrankten Patienten isolierten HL-60-Zellen werden als Promyelozyten, also als Granulozyten-Monozyten Vorläufer, eingestuft (Collins *et al.*, 1977; Lyons und Ashman, 1989). Damit besitzen sie sowohl die

Möglichkeit zu Neutrophilen Granulozyten, als auch zu Monozyten und dann weiter zu Makrophagen zu differenzieren. Die Differenzierung von myeloiden Vorläuferzellen zu Makrophagen geht, wie in dieser Arbeit gezeigt, einher mit der Hochregulierung der Expression der MMP-19 mRNA: Ruhende HL-60-Zellen exprimieren nur sehr wenig MMP-19 mRNA; die Differenzierung zu Makrophagen bewirkt jedoch eine stabile Erhöhung des Gehalts an mRNA für diese Matrixmetalloproteinase. Entsprechendes gilt für THP-1 Monozyten. Auch diese, einer akuten monozytischen Leukämie entstammenden, Zellen (Tsuchiya *et al.*, 1980; Lyons und Ashman, 1989) zeigen im Verlauf der Differenzierung zu Makrophagen eine deutliche Hochregulierung der MMP-19 mRNA.

Hierbei gibt es Parallelen zu anderen Matrixmetalloproteinasen: Die Makrophagenelastase (MMP-12) wird ihrem Namen entsprechend nahezu ausschließlich in differenzierten Makrophagen exprimiert (Shapiro und Senior, 1998). Ihre physiologische Aufgabe scheint gemäß den bisherigen Erkenntnissen im Abbau der Elastinfasern der Extrazellulärmatrix sowie verschiedener Komponenten der Basalmembran zu liegen (Shapiro *et al.*, 1992 und 1993; Gronski *et al.*, 1997; Shapiro und Senior, 1998). Eine mögliche, direkte Korrelation zwischen der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen wurde für dieses Enzym noch nicht untersucht. Es wurde aber gezeigt, dass dieser Differenzierungsschritt einen generellen Wechsel des Repertoires an matrixdegradierenden Proteinasen mit sich bringt: Monozyten exprimieren verstärkt intrazelluläre Serinproteinasen, wie die Leukozytenelastase und Cathepsin G, die Matrixmetalloproteinaseexpression ist demgegenüber sehr gering. Die Zellreifung zu Makrophagen bewirkt jedoch *in vitro* und *in vivo* eine mit dem Verlust an Serinproteinasen einhergehende Induktion von Matrixmetalloproteinasen. (Welgus *et al.*, 1990 und 1992; Campbell *et al.*, 1991; Shapiro *et al.*, 1991 und 1991a; Saren *et al.*, 1996). Dieser Wechsel reflektiert sehr wahrscheinlich die Veränderung der physiologischen Funktion dieser Zellen. Sie entwickeln sich von im Blut zirkulierenden Phagozyten und Transportzellen zu sehr spezialisierten Zellen, die innerhalb der biologischen Gewebe residieren. Dabei müssen sie im Verlaufe von Extravasations- und Migrationsprozessen, während des Gewebeumbaus bei Entzündungen und Wundheilung permanent Komponenten der Extrazellulärmatrix umsetzen (Zembala und Asherson, 1989).

Zu den in Makrophagen exprimierten Matrixmetalloproteinasen gehören neben der Metalloelastase die interstitielle Kollagenase (MMP-1), die beiden Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9), Stromelysin-1 (MMP-3) und Stromelysin-2 (MMP-10) (Mauviel, 1993 und darin aufgeführte Referenzen). Diese Liste kann nun um MMP-19 erweitert werden. In diesem Zusammenhang wird es sehr spannend sein, über antisense Techniken oder geeignete Antikörper die Expression, bzw. die Aktivität von MMP-19 spezifisch zu hemmen. In solchen Modellen könnte eine möglicherweise eingeschränkte Fähigkeit der Makrophagen zur Gewebewanderung beobachtet werden. Auch die derzeit entstehende MMP-19 "knockout" Maus sollte auf einen entsprechenden Phänotypen hin untersucht werden.

Der Gehalt an MMP-19-mRNA wird also im Verlaufe der PMA-induzierten HL-60 und THP-1 Differenzierung erhöht. Dieser Effekt konnte etwa sechs Stunden nach PMA-Gabe erstmals beobachtet werden. Eine solche Zeitverzögerung spricht gegen einen direkten, einfachen

"downstream"-Mechanismus dieses Phorbolesters über die Proteinkinase C (Pkc) auf die MMP-19 Expression. Sehr viel wahrscheinlicher ist eine Aktivierung der MMP-19 Expression über sekundäre zelluläre Ereignisse. Als möglicher Mechanismus hierfür erscheint eine durch Adhäsionsmoleküle vermittelte Induktion der MMP-19 Expression. Dies wird im folgenden Abschnitt erläutert.

Ein wichtiges Kennzeichen der Makrophagendifferenzierung ist die Zunahme der zellulären Adhäsion und dadurch die Ausbreitung auf der Unterlage (Collins *et al.*, 1987; Dougherty und McBride 1989). Diesen Anheftungsprozessen geht eine Erhöhung des zellulären Gehalts verschiedener Adhäsionsmoleküle voraus. Hierzu gehören verschiedene auf Makrophagen exprimierte Mitglieder der Integrinfamilie, wie zum Beispiel der Fibronectinrezeptor $\alpha_5\beta_1$ (CD49e/CD29; VLA-5; FNR) und der Fibrinogenrezeptor CD11b/CD18 ($\alpha_m\beta_2$; Mac-1) (Welgus *et al.*, 1985; Hynes, 1992; Imhof und Dunon, 1995).

Es wurde gezeigt, dass Hemmung der Interaktion von $\alpha_5\beta_1$ mit Fibronectin die Induktion der Gelatinase B (MMP-9) Expression im Verlauf der PMA-induzierten Differenzierung von HL-60-Zellen zu Makrophagen hemmt (Xie *et al.*, 1998). Andersherum erhöht die ligationsvermittelte Aktivierung des Fibrinogenrezeptors Mac-1 die Produktion dieser Matrixmetalloproteinase (Wize *et al.*, 1998).

Auch die in dieser Arbeit gezeigte Zunahme der MMP-19 Expression im Verlaufe der myeloiden Differenzierung scheint abhängig von zellulären Adhäsionsprozessen zu sein. Sie kann durch mechanische Verhinderung der Anheftung der PMA-stimulierten HL-60 Zellen nahezu vollständig unterdrückt werden. Welche Adhäsionsmoleküle diese Effekte vermitteln ist noch unklar, wird aber in weiteren Analysen mit spezifischen aktivierenden oder hemmenden Antikörpern untersucht werden. Alternativ zu einer direkten Aktivierung der MMP-19 Genexpression durch Adhäsionsmoleküle, bzw. der nachgeschalteten Signaltransduktionswege, ist auch ein Zytoskelett abhängiger Mechanismus denkbar. Eine Zunahme der Adhäsion führt zu einer Ausbreitung der Zellen auf der Unterlage und damit zu einer Umorganisation des zellulären Gerüsts. Auch hierfür wurde für verschiedene andere Matrixmetalloproteinasen eine Beeinflussung der Genexpression gezeigt (Werb *et al.*, 1986; Allenberg *et al.*, 1994; Tomasek *et al.*, 1997; Chintala *et al.*, 1998). Sollte die Induktion der MMP-19 Expression einem solchen zytoskelettabhängigen Mechanismus folgen, so sollte diese durch den Einsatz von Cytochalasin D gehemmt werden können. Auch dies werden nachfolgende Analysen aufklären. Sehr wahrscheinlich erscheint ein Mechanismus, in dem sowohl die Expression von Adhäsionsmolekülen, als auch die Umorganisation von Zytoskelettbestandteilen eine Rolle spielen, da beide Prozesse sehr eng miteinander verknüpft sind.

Diese Effekte sind nicht nur in HL-60 und THP-1 Zellen, sondern auch in untransformierten, primären humanen Monozyten und Makrophagen zu beobachten: Die Kultivierung von mononukleären Blutzellen mit autologem Serum führt ohne weitere Stimulation zu einer Induktion der MMP-19 Expression. In Sortierungsexperimenten konnte eindeutig gezeigt werden, dass es sich bei den hierfür verantwortlichen Zellen um die CD-14 positive Monozyten/Makrophagen Fraktion des Blutes handelt.

Des weiteren wurde sowohl eine durch Lymphozyten, als auch eine durch Serumverunreinigungen vermittelte Induktion ausgeschlossen. Die durchgeführten Experimente sprechen hier eindeutig für eine Serum und adhäsionsabhängige MMP-19-Induktion.

Da Monozyten in Kultur spontan zu Makrophagen differenzieren und sich damit auf der Unterlage ausbreiten ist hier im Gegensatz zu den in den Zelllinien gezeigten Effekten keine zusätzliche Stimulation durch Phorbolster notwendig. Die Anwesenheit von Serum ist hingegen zwingend. Dafür gibt es zwei mögliche Erklärungen: Zum einen sind Serumbestandteile, wie Wachstumsfaktoren, notwendig für die zugrunde liegenden Differenzierungsprozesse, zum anderen ist aber auch die zelluläre Adhäsion direkt von Serumbestandteilen abhängig (Dougherty und McBride, 1989). Sehr wahrscheinlich haben beide Faktoren Einfluß auf die serumabhängige MMP-19 Induktion.

Diese Induktion der MMP-19 Expression in kultivierten Monozyten/Makrophagen ist zwar nicht abhängig von der Gabe von Phorbolestern, kann durch diese aber deutlich verstärkt werden.

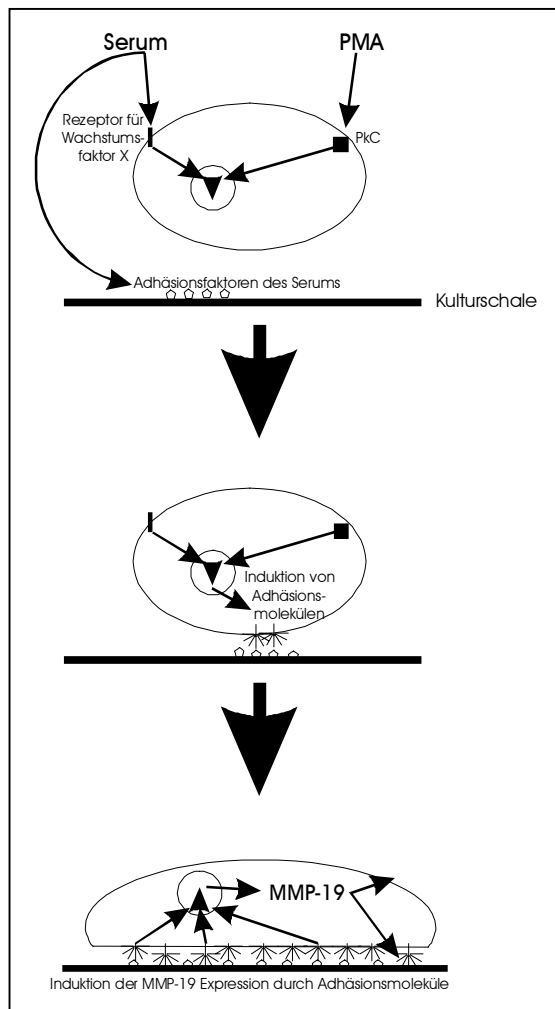


Abbildung 27 schematische Darstellung der MMP-19 mRNA Induktion in Blutzellen

Die in dieser Arbeit gezeigten Experimente sprechen dafür, dass der Mechanismus der dieser Verstärkung in primären Monozyten/Makrophagen zugrunde liegt, wiederum kein direkter Effekt auf die MMP-19 Expression ist. Denn auch hier führt die mechanische Verringerung der Adhäsion zu einer fast vollständigen Unterdrückung der MMP-19 Induktion. Als zentraler Induktor für die Hochregulation der MMP-19 mRNA tritt wieder die Anheftung, bzw. die Ausbreitung der Zellen auf der Unterlage auf. Abbildung 27 fasst das Gesagte noch einmal schematisch zusammen.

Wie lässt sich in dieses Schema die Wirkung von α -Tocopherol, also von Vitamin E einfügen? α -Tocopherol unterdrückt sowohl die PMA-, als auch die serumabhängige Induktion von MMP-19 in HL-60 und in primären Blutzellen. Ein Mechanismus der auf die antioxidativen Eigenschaften dieser Substanz beruht, konnte durch den direkten Vergleich mit dem bezüglich MMP-19 unwirksamen β -Tocopherol ausgeschlossen werden. Dieses unterscheidet sich in seinen antioxidativen Eigenschaften nicht von α -Tocopherol und sollte auch in gleicher Weise für die Zellen biologisch verfügbar sein.

Es ist bekannt, dass α -Tocopherol und auch einige nah verwandte Derivate dieser Substanz die zelluläre Adhäsion bestimmter Zelltypen hemmen. Diese Adhäsionshemmung konnte sowohl für Monozyten, als auch für glatte Muskelzellen nachgewiesen werden (Angelo Azzi, Universität Bern, persönliche Mitteilung; Erl *et al.*, 1997). Der zugrunde liegende Mechanismus ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Für glatte Muskelzellen konnte aber gezeigt werden, dass α -Tocopherol ein negativer Regulator der Proteinkinase C darstellt, wodurch die Aktivierung derselben verhindert wird (Tasinato *et al.*, 1995). Vermittelt wird dieser Effekt sehr wahrscheinlich durch ein bisher unbekanntes α -Tocopherol-Bindeprotein (Angelo Azzi, persönliche Mitteilung). Ein solcher Mechanismus könnte sehr einfach erklären, wieso α -Tocopherol die PMA-induzierte MMP-19 Expression hemmt: Es blockiert die an der MMP-19 Induktion beteiligten Vorgänge schon auf der obersten Stufe.

Wieso wird aber auch die PMA-unabhängige seruminduzierte MMP-19 Expression in Blutmonozyten/Makrophagen durch α -Tocopherol gehemmt? Um dies zu erklären muss das dargestellte Modell erweitert werden. Einerseits ist denkbar, dass neben der Proteinkinase C weitere zelluläre Ziel-moleküle für α -Tocopherol existieren, deren Inhibition sich analog einer Proteinkinase C Hemmung auswirkt. Hierfür gibt es jedoch bisher keine Hinweise. Wahrscheinlicher erscheint, dass auch die nachfolgenden PMA-unabhängigen Prozesse zumindest zum Teil von der Aktivität der Proteinkinase C abhängig sind. Dafür spricht, dass auch andere Hemmstoffe für diese Kinase die zelluläre Adhäsion in verschiedenen Zelltypen unterdrücken (Devaraj *et al.*, 1996). Der zugrunde liegende Mechanismus ist bislang nicht bis ins Detail entschlüsselt. Es konnte jedoch klar gezeigt werden, dass die Expression von Adhäsionsmolekülen kein einstufiger linearer Prozess ist, sondern dass hier eine komplexe Rückkopplung und eine Integration vieler Signale existiert. Das heißt, dass zu Beginn der zellulären Anheftung erst einige wenige initiale Adhäsionsmoleküle exprimiert werden, welche nach Ligandenkontakt Signale zum Zellkern senden, was die Expression weiterer Adhäsionsmoleküle zur Folge hat (Magee, 1995; Heino, 1996). Zu den hier beteiligten Signalmolekülen gehören unter anderen wiederum die verschiedenen Proteinkinase C Subtypen. Hemmung der Proteinkinase C ist in diesem Zusammenhang also gleich zu setzen mit Hemmung der Signalaktivität von Adhäsionsmolekülen.

Fasst man die hier diskutierten Daten bezüglich der MMP-19 Expression in mononukleären Blutzellen zusammen, so kann folgendes festgehalten werden: Im Blut zirkulierende Monozyten, T- und B-Lymphozyten sind negativ für MMP-19 mRNA. Eine Induktion der MMP-19 Genexpression findet im Verlauf der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen statt. Jedoch scheint nicht die Differenzierung selbst der Hauptauslöser für die MMP-19 Expression zu sein, sondern vielmehr die mit der zellulären Differenzierung einher gehende Zunahme der Adhäsion.

Der Sinn dieser Induktion der MMP-19 Genexpression durch Adhäsion liegt wahrscheinlich nicht in einer Notwendigkeit des MMP-19 Enzyms für die Durchwanderung der die Blutgefäße umgebenden Basalmembran. Die etwa sechsstündige Verzögerung nach dem ersten Kontakt der Zelle zur Unterlage bis zum Auftreten der MMP-19 mRNA ist dafür zu lange: Zellen die aus dem Blutgefäß extravasieren nehmen in einem "rolling" genannten Prozess Kontakt mit der Blutgefäßwand auf (Imhof und Dunon,

1995). Dabei kommt es zu einer Abfolge verschiedener Interaktionstufen: "rolling", "triggering", "strong adhesion" und "migration". In jeder dieser Stufen sind andere Oberflächenmoleküle beteiligt, deren Aktivität zum Teil durch die vorhergehende Stufe bestimmt wird. Diese Prozess laufen relativ schnell ab. Sie sind abgeschlossen, bevor neu exprimiertes MMP-19 aktiv vorliegen könnte. Es ist also viel wahrscheinlicher, dass die MMP-19 Expressionsinduktion bei der nachfolgende Migration durch die Extrazellulärmatrix wichtig ist. Welche Funktion MMP-19 dabei einnimmt, also welches Substrat von MMP-19 umgesetzt wird, ist jedoch, wie mehrfach erwähnt, noch ungeklärt.

Endothelzellen / glatte Muskelzellen

Die MMP-19 Expression in Zellen der Blutgefäßwand wurde erstmals beobachtet, als synoviale Gewebeschnitte von Rheumatoide Arthritis Patienten mit dem Anti-MMP-19-Antikörper 511 untersucht wurden (Kolb *et al.*, 1997). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Tunica Media von Blutgefäßen in entzündeten Synovien eine starke MMP-19 Expression aufweisen. Endothelzellen wurden als MMP-19 negativ detektiert. Spätere Untersuchungen haben dieses Bild inzwischen verfeinert und erweitert (Kolb *et al.*, 1999): Als Hauptproduzenten für MMP-19 in der Tunica Media wurden wie ursprünglich vermutet die glatten Muskelzellen identifiziert. Des weiteren wurde die Abwesenheit von MMP-19 in den meisten makrovaskulären Endothelzellen bestätigt. Neu hinzu kam jedoch die Beobachtung, dass MMP-19 in den mikrovaskulären Endothelzellen kleiner, wachsender Blutgefäße exprimiert wird. Diese Beobachtungen in Gewebeschnitten wurden durch die in dieser Arbeit gezeigten Zellkulturanalysen gestützt und erweitert: Die humane, makrovaskuläre venöse Endothelzelllinie ECV304 ist selbst nach Stimulation mit Phorbolestern, EGF und bFGF negativ für MMP-19. Dasselbe gilt für primäre HUVEC-Zellen (humane vaskuläre Endothelzellen). Humane arterielle Endothelzellen (HUAEC) zeigen sowohl auf mRNA, als auch auf Proteinebene eine geringfügige MMP-19 Expression. Im starken Kontrast dazu stehen die untersuchten mikrovaskulären Endothelzellen aus Haut und Fettgewebe. Diese Zellen, die kleinen und damit potentiell wachsenden Blutgefäßen entstammen, zeigen ein klares MMP-19 Signal. Welche Rolle MMP-19 in diesen Zellen spielen könnte, wird im folgenden geschildert.

Neovaskularisierung und Angiogenese, also die Neubildung und das Wachstum von Blutgefäßen sind komplexe vielstufige Prozesse. Sie spielen naturgemäß ein sehr wichtige Rolle bei allen Entwicklungs- und Wachstumsprozessen, da alle tierischen Gewebe von der Versorgung mit Sauerstoff und auch Nährstoffen abhängig sind. Selbst pathologische Gewebe wie Tumore sind von der Versorgung mit Blutgefäßen absolut abhängig: Ein Tumor, der kein Blutgefäßsystem ausbilden kann, bleibt auf eine diffusionslimitierte Größe von 0,4 mm beschränkt (Hanahan und Folkman, 1996). Beide Prozesse, also sowohl die Neubildung, als auch das Auswachsen von Blutgefäßen, benötigen proteolytische Aktivität: Beim ersten, auch Vaskulogenese genannten Prozess migrieren Vorläuferzellen zum Ort der Gefäßbildung, wo sie zu Blutgefäß bildenden Endothelzellen differenzieren (Cockerill *et al.*, 1995). Ein Umbau der Extrazellulärmatrix ist hier sowohl für die

Migration, als auch für die Zusammenlagerung der einzelnen Endothelzellen notwendig (Risau und Flamme, 1995). Im adulten Organismus werden neue Blutgefäße ausschließlich durch den zweiten, Angiogenese genannten Prozess gebildet: Hier findet ausschließlich ein Aussprossen neuer Kapillaren von existierenden Blutgefäßen statt. Dieser Prozess ist abgesehen von pathologischen Situationen wie Wundheilung und Tumorwachstum und von Vorgängen, die mit dem weiblichen Reproduktionszyklus zusammenhängen extrem selten: Im normalen adulten Blutgefäß befindet sich zu einer gegebenen Zeit nur eine von 10 000 Endothelzellen im Zellzyklus (Hobson und Denekamp, 1984). Findet er aber statt, so kommt es immer zu einer definierten Abfolge einzelner Schritte: Die Basalmembran, die die Gefäß bildende Endothelzellröhre umgibt, wird lokal abgebaut, die ehemals ruhenden Endothelzellen verändern ihr Aussehen und wandern in die umliegende Matrix aus, wo sie ein neues Gefäß ausbilden. An der Spitze dieses Gefäßes befinden sich mikrovaskuläre Endothelzellen, die durch andauernde Proliferation die Verlängerung der Gefäßröhre vorantreiben, bis sie wiederum auf ein anderes Blutgefäß stoßen mit dem sie verschmelzen (Cockerill *et al.*, 1995). Ein für eine erfolgreiche Angiogenese zentraler Prozess ist die extrazelluläre Proteolyse, deren Geschwindigkeit in erster Linie von der Aktivität der Matrixmetalloproteinasen bestimmt wird (Moses, 1997). Die differentielle Expression von MMP-19 spricht in diesem Zusammenhang dafür, dass diese Matrixmetalloproteinase beim angiogenetischen Matrixumbau eine wichtige Rolle spielt. Dies ist umso mehr bedeutsam, da weder MMP-1, MMP-2, noch MMP-9 in den MMP-19 exprimierenden mikrovaskulären Endothelzellen detektiert werden konnten (Kolb *et al.*, 1999) und spricht damit für eine sehr spezielle Regulation und Funktion von MMP-19. Damit stellt diese Proteinase ein potentiell interessantes Ziel für eine pharmakologische Unterdrückung der Angiogenese dar, was wie in Kapitel 1 dargestellt zu den wichtigsten neuen Ansätzen in der Tumorthherapie zählt.

Neben mikrovaskulären Endothelzellen findet sich MMP-19 auch in den die Gefäße umgebenden glatten Muskelzellen. Diese Zellen finden sich sowohl zirkulär um das Gefäß angeordnet in der Tunica media der Arterien, als auch in der dünnen Tunica media und der kräftigeren Tunica externa der Venen, wo sie längs ausgerichtet sind (Leonhardt, 1990). Die Aufgaben dieser Zellen sind vielfältig: Eine der Hauptaufgaben besteht in der Aufrechterhaltung der Struktur der Blutgefäße. Einerseits geschieht dies durch die direkte kontraktile Aktivität der glatten Muskelzellen, zum zweiten durch die andauernde Synthese und den Umbau des die Gefäße umgebenden Bindegewebes (Schwartz *et al.*, 1995). Im gesunden Blutgefäß herrscht eine Balance zwischen diesen aufbauenden und den entgegen gerichteten proteolytischen Prozessen. Da MMP-19 in den glatten Muskelzellen andauernd vorhanden ist, liegt es nahe anzunehmen, dass diese Matrixmetalloproteinase eine Funktion in der Aufrechterhaltung dieser Homöostase besitzt: MMP-19 als potentiell Matrix-degradierendes Enzym könnte nach Aktivierung sehr schnell überschüssige Matrixstrukturen abbauen.

Befinden sich die glatten Muskelzellen in der Replikation oder werden sie durch PMA oder bFGF zur Proliferation angeregt, so erhöht sich der Gehalt an MMP-19 weiter. Dies korreliert mit der Beobachtung, dass Zellteilung bei glatten Muskelzellen *in vivo* mit der Migration durch die

Gefäßmatrix einher geht (Schwartz *et al.*, 1995). Diese Wanderungsprozesse wiederum sind abhängig vom Vermögen, die umgebende Matrixschicht zu degradieren (Kenagy *et al.*, 1996). Aus diesem Grunde findet man Proliferation bei glatten Muskelzellen *in vivo* immer gekoppelt an die Expression von Proteinasen. Zum Teil scheint die Expression verschiedener Proteinasen, wie die der Gelatinasen sogar eine Voraussetzung für die Teilung der glatten Muskelzellen zu sein (Newby *et al.*, 1994). Die mechanistische Erklärung hierfür steht noch aus, es erscheint jedoch nicht unwahrscheinlich, dass die Proteolyse der umgebenden Matrix inhibierende Matrixmoleküle entfernt oder dass in die Matrix eingelagerte Wachstumsfaktoren durch den Abbau freigesetzt werden.

Interessanterweise ist der MMP-19-Inhibitor α -Tocopherol und wiederum nicht β -Tocopherol, auch ein wirksamer Inhibitor der glatten Muskelzellproliferation (Azzi *et al.*, 1997). Auch hier scheint der Mechanismus Proteinkinase C vermittelt zu sein und geht einher mit einer Inhibition der Adhäsion. Es wird aufschlußreich sein, zu untersuchen, ob α -Tocopherol auch eine Wirkung auf die MMP-19 Expression in glatten Muskelzellen zeigt. Dies erscheint sehr wahrscheinlich und hätte wichtige Implikationen, wie im folgenden Abschnitt erläutert wird.

Die häufigste Todesursache in zivilisierten Ländern stellt die Arteriosklerose, bzw. ihre Folgen Herzinfarkt, Schlaganfall und Unterversorgung der Extremitäten, dar (Ye *et al.*, 1998). Die Arteriosklerose beginnt mit einer Hyperproliferation der glatten Muskelzellschicht der Arterien. Gleichzeitig findet eine Einwanderung und Proliferation von Monozyten und Makrophagen statt, die zu sogenannten Schaumzellen differenzieren (Ross, 1993). Diese Hyperproliferation kann zwei Konsequenzen haben: Im ersten Fall kommt es zu einer Wucherung des vaskulären Bindegewebes und einer daraus resultierenden, lokalen Gefäßverengung. Im zweiten Fall geht diese Zellproliferation mit einer unkontrollierten Proteinaseexpression einher. Dies führt zu instabilen fibrotischen Plaques, die bei Belastung abreißen und mit dem Blutstrom weiter wandern, bis sie auf kleinere Gefäße stoßen, die sie dann verstopfen. Vitamin E- also α -Tocopherol-reiche Diät zeigt eine klare positive Wirkung bezüglich der Verhinderung von Arteriosklerose (Hoffman und Garewal, 1995). Dies wird zum einen der antioxidativen Wirkung dieser Substanz zugeschrieben (Olsson und Yuan, 1996). In vielen Fällen kann dies aber die beobachteten Effekte nicht ausreichend erklären (Traber und Packer, 1995; Azzi *et al.*, 1997). Ein möglicher, bezüglich der Arteriosklerose positiver Zusatzeffekt des Vitamin E (α -Tocopherol) könnte die Inhibition der glatten Muskelzellproliferation darstellen. Diese ist wiederum, wie oben erwähnt, direkt mit der proteolytischen Kapazität dieser Zellen verbunden und stellt damit einen der zur Pathogenese führenden Vorgänge bei der Arteriosklerose dar. MMP-19 könnte in diesem Vorgang ein wichtiger Mediator sein, dessen Expression, bzw. Hemmung einen direkten Einfluss auf die pathologischen Vorgänge der Arteriosklerose hat. In weiteren Untersuchungen sollte also das Augenmerk auf die MMP-19 Expression in arteriosklerotischen Plaques gelegt werden. Des weiteren ist die Wirkung des Vitamin E auf die MMP-19 Expression in glatten Muskelzellen in diesem Zusammenhang sehr interessant. Es stellt sich die Frage, ob diese Substanz, die ja die MMP-19 Induktion in Monozyten und Makrophagen hemmen kann, auch die sehr starke Expression in glatten

Muskelzellen inhibiert. Dies erscheint aufgrund der ähnlichen Wirkung von Vitamin E auf Makrophagen und glatte Muskelzellen (Traber und Packer, 1995) und dem gemeinsamen Einfluß beider Zelltypen auf die Pathogenese der Arteriosklerose sehr wahrscheinlich. Hierbei könnte sich MMP-19 wiederum als interessantes pharmakologisches Ziel herausstellen.

4.3 Zelloberflächenverankerung von MMP-19

Erste Hinweise, dass MMP-19 auf der Oberfläche von menschlichen Blutzellen lokalisiert ist, wurden durch Dr. Radislav Sedlacek in FACScan Analysen aufgezeigt (Sedlacek *et al.*, 1998). In diesen frühen Arbeiten wurde jedoch weder der Typ der MMP-19 tragenden Blutzellen bestimmt, noch wurde der Mechanismus der Oberflächenassoziation analysiert. Diese Fragestellungen wurden in der hier vorliegenden Arbeit aufgegriffen. Dabei stellte sich entsprechend des auf mRNA-Ebene aufgezeigten Expressionsmusters heraus, dass Makrophagen und Monozyten die MMP-19 tragenden Blutzellen darstellen; Lymphozyten sind MMP-19 negativ. Die myeloiden Zelllinien HL-60 und THP-1 zeigen im FACScan und in Immunpräzipitationsanalysen nach Oberflächenfärbung entsprechende Signale, Molt-4 und Jurkat T-Lymphozyten zeigen dies hingegen nicht. Im Blut finden sich direkt nach der Isolierung keine MMP-19 tragenden Zellen. Nach Kultivierung kommt es in den CD14 positiven Blutzellen zur Induktion der MMP-19 Oberflächenexpression. Entsprechend tragen auch humane Peritonealmakrophagen MMP-19 auf ihrer Oberfläche.

Die Oberflächenbindung von MMP-19 basiert auf einer nicht kovalenten Wechselwirkung, da MMP-19 sowohl durch Säurebehandlung direkt von den Zellen eluierbar ist, als auch durch alkalische Hochsalzextraktion gereinigter Membranfraktionen. Hiermit und durch die gezeigten Experimente mit Phosphatidylinosit-Phospholipase C kann auch eine potentielle Verankerung über Glycosylphosphatidylinositol ausgeschlossen werden. MMP-19 stellt also weder ein echtes Transmembranprotein des Typs I oder II dar, noch ist es über eine kovalente Bindung an andere Membranproteine oder Fettsäurereste fest in der Membran verankert. Höchstwahrscheinlich handelt es sich bei dieser Oberflächenverankerung um eine in der Natur sehr häufig vorkommende Art der Interaktion, nämlich dem Zusammenspiel verschiedener nicht kovalenter Kräfte zwischen Proteinen bestehend aus ionischen und dipolaren Wechselwirkungen, Wasserstoff-Brückenbindungen und hydrophoben Kräften.

Welches sind die Makromoleküle, die derartig mit MMP-19 interagieren? Oder anders gesagt: An welche Oberflächenmoleküle bindet MMP-19?

In den durchgeführten Immunpräzipitationsstudien wurden mindestens zwei Proteine isoliert, die spezifisch mit MMP-19 wechselwirken und die beide auf der Oberfläche der untersuchten THP-1 Monozyten lokalisiert sind. Beide Proteine besitzen ein im Vergleich zu MMP-19 höheres apparentes Molekulargewicht zwischen 66 und 80 kDa. Eine direkte Identifikation dieser Proteine über *In-Gel*-Verdau und anschließender massenspektrometrischer Analyse der resultierenden Peptidfragmente ergab keine eindeutige Aussage. Dafür gibt es mehrere Erklärungen: Es kann sein, dass die mit MMP-

19 kopräzipitierenden Proteine nicht in den durchsuchten Peptidmassen-Datenbanken verzeichnet sind, da diese im Augenblick erst aufgebaut werden. Eine zweite, nicht unwahrscheinlichere Möglichkeit ist, dass die durch die apparative Ausstattung limitierte Meßgenauigkeit nicht für eine Zuordnung ausreichte. Hierfür spricht, dass selbst die MMP-19 Bande nach dem tryptischen Verdau zwar den erwarteten Peptidmassen zugeordnet werden konnte, die Streuung und Unsicherheit der zugrunde liegenden Messwerte aber auch hier sehr groß war. Das heißt, dass auch bei der MMP-19 Bande eine eindeutige Identifizierung über bloßen Datenbankvergleich unsicher gewesen wäre. Verstärkt wurde die apparative Limitierung durch das weitere Problem der Analyse von Proteasen im tryptischen Verdau. Es ist zu erwarten, dass Proteasen wie MMP-19 im Zuge des tryptischen Verdaus selbst eine, wenn auch nur schwache, proteolytische Aktivität zeigen und in Folge dessen weitere Proteinfragmente entstehen, deren Peptidmassen sich von denen eines reinen tryptischen Verdaus unterscheiden. Dies erschwert die Identifizierung der Proteine sehr stark.

Die Identifizierung der mit MMP-19 kopräzipitierenden Proteine wird in unserer Arbeitsgruppe weiter verfolgt werden. Dabei sind drei Möglichkeiten vorhanden. Zum einen könnten die bereits hier durchgeführten Analysen zu einem späteren Zeitpunkt wiederholt werden, wenn eine verbesserte apparative Ausstattung zur Verfügung steht und die zugrunde liegende experimentelle Technik weiter gereift ist. Des weiteren sollte eine Kooperation mit Arbeitsgruppen angestrebt werden, die Edman-Mikrosequenzierung durchführen und damit in der Lage sind, kleine Proteinmengen zu untersuchen. Als weitere, aber durchaus nicht am wenigsten erfolversprechende Methode, könnte "Wissen-basiertes Raten" helfen, die Kopräzipitationsbanden bekannten Proteinen zuzuordnen. Das heißt, dass es möglich sein könnte, mit Antikörpern gegen mutmaßliche MMP-19-Interaktionspartner diese Banden direkt den entsprechenden Proteinen zuzuordnen.

Welche Proteine wären hier denkbar? Eine Klasse von naheliegenden Kandidaten stellen Mitglieder der Integrinfamilie dar. Wie in der Einleitung erwähnt, wurde für Gelatinase A (MMP-2) gezeigt, dass sie über das Integrin $\alpha\beta 3$ auf der Oberfläche von invasiven Zellen verankert vorliegt (Brooks *et al.*, 1996). Das apparente Molekulargewicht aller bekannten Integrinmoleküle liegt jedoch zwischen 90 und 120 kDa (Imhof und Dunon, 1995), das heißt, dass diese Moleküle eigentlich zu groß sind, um den beobachteten Kopräzipitationspartnern zu entsprechen.

Da die Induktion der MMP-19 mRNA in Monozyten an die zelluläre Adhäsion gekoppelt ist, das heißt parallel zur Expressionsinduktion von Oberflächenmolekülen verläuft, ist es denkbar, dass andere, nicht der Integrinfamilie zugehörige Oberflächenmoleküle die MMP-19 Bindung vermitteln. Allerdings liegt das Molekulargewicht auch bei einem Großteil dieser Moleküle über dem in den Kopräzipitationsstudien detektierten.

Sehr interessante und aufgrund ihres Molekulargewichts auch mögliche potentielle Interaktionspartner von MMP-19 stellen die Membranständigen Matrixmetalloproteinasen dar. Diese Transmembranmoleküle spielen, wie im ersten Kapitel (Einleitung) dargestellt, eine wichtige Rolle in der Aktivierung anderer Mitglieder der Matrixmetalloproteinasenfamilie. Dies wurde im besonderen für die

Zelloberflächen abhängige Aktivierung von MMP-2 durch MT1-MMP gezeigt (Sato *et al.*, 1994). Die detaillierte Untersuchung des hier zugrunde liegenden Mechanismus ist noch im Gange. Es hat sich aber im Laufe dieser Analysen gezeigt, dass MT1-MMP nicht nur der Aktivator von MMP-2 ist, sondern auch direkt die Zelloberflächenbindung dieser Gelatinase vermitteln kann (Knäuper und Murphy, 1998). Diese Ergebnisse konkurrieren im Augenblick mit dem oben geschilderten Modell der Integrin vermittelten Oberflächenbindung von MMP-2. Da es für beide Modelle eine Vielzahl guter experimenteller Belege gibt, wird versucht diese zu vereinigen. Hierfür gibt es allerdings noch keine abschließenden experimentellen Befunde. Betrachtet man die bisherigen Ergebnisse bezüglich der MT1-MMP vermittelten Oberflächenbindung der Gelatinase A (MMP-2), so ergibt sich das in

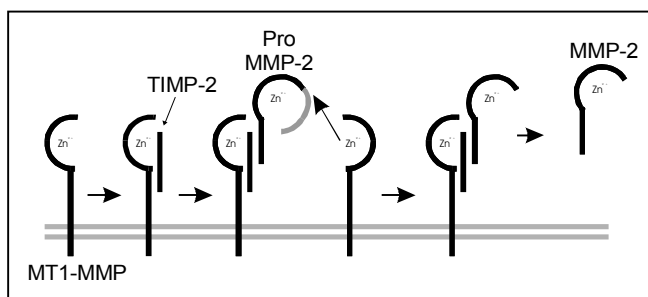


Abbildung 28 MT-1-MMP vermittelte Zelloberflächenbindung und Aktivierung der MMP-2

Nach Werb (1997). Erläuterung siehe Text.

Inhibitor TIMP-2 und wird dadurch gleichzeitig inaktiviert. MMP-2 bindet vermittelt durch die Hämopexin-ähnliche Domäne an dasselbe TIMP-2-Molekül und ist somit Zelloberflächen-assoziiert. Die Aktivierung der MMP-2 wird durch ein zweites, "freies" MT1-MMP Molekül vorgenommen. Anschließend kann die aktivierte MMP-2 freigesetzt werden und möglicherweise an andere Moleküle wie das Integrin $\alpha\beta 3$ binden.

Ob ein ähnlicher Mechanismus auch für MMP-19 bedeutsam ist, ist noch unklar. Es konnte aber gezeigt werden, dass MMP-19 TIMP-2 binden kann (Pendas *et al.*, 1997). Prinzipiell wäre ein solcher Mechanismus also möglich. Die in diesem Modell geforderte Beteiligung der Hämopexin-ähnlichen Domäne für die Oberflächenbindung steht ebenso im Einklang mit den experimentellen Befunden: Die durchgeführten Experimente mit rekombinant exprimierten MMP-19 Mutanten ergaben klar die absolute Notwendigkeit der Hämopexin-ähnlichen Domäne für die MMP-19 Zelloberflächenbindung. Hinzu kommt, dass die bereits diskutierten massenspektrometrischen Analysen eine Zuordnung der etwa 68 kDa-Bande zu MT1-MMP entsprechenden Peptidfragmenten zumindest nicht ausschließen. Die Hypothese einer Beteiligung der Membranständigen Matrixmetalloproteinasen an der MMP-19-Oberflächenverankerung (und Aktivierung) scheint also sinnvoll zu sein und sollte getestet werden, sobald Antikörper gegen die Mitglieder der Unterfamilie der Membranständigen Matrixmetalloproteinasen zur Verfügung stehen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass MMP-19 nach adhäsionsabhängiger Aktivierung der Genexpression auf der Oberfläche von Monozyten exprimiert wird. Diese Oberflächenassoziation wird vermittelt durch nicht kovalente Bindung an andere Zelloberflächenmoleküle, wobei die Hämopexin-ähnliche Domäne absolut notwendig für diese Bindung ist, so dass davon ausgegangen

werden kann, dass die Wechselwirkungen mit den anderen Oberflächenmolekülen über diese Domäne stattfinden.

Der biologische Sinn einer solchen Oberflächenassoziation liegt nahe: Im Falle eines MMP-2 ähnlichen Mechanismus wäre eine gut kontrollierbare, lokale Aktivierung von MMP-19 möglich. Die eindeutige Lokalisierung der proteolytischen Aktivität dieser Enzyme ist sehr wichtig, da sie eine sehr große destruktive Kapazität besitzen, die nur gezielt an dafür vorgesehenen Orten eingesetzt werden sollte. Da MMP-19 adhäsionsabhängig induziert wird, liegt es nahe anzunehmen, dass eine der Aufgaben dieser Matrixmetalloproteinase in proteolytischen Prozessen während der zellulären Migration zu finden ist. Das bedeutet, dass die enzymatische Aktivität auch nur in der direkten Umgebung der MMP-19-exprimierenden Zelle entfaltet werden sollte. In diesem Zusammenhang ist auch nochmals die oben geschilderte Hypothese der MMP-19 Oberflächenbindung durch Adhäsionsmoleküle von Interesse. Eine solche Wechselwirkung würde dazu führen, dass sich die proteolytische Aktivität von MMP-19 direkt an der Kontaktstelle der Zellen zur Extrazellulärmatrix entfalten würde. Das heißt an den Stellen, an denen für eine Durchwanderung auch ein Abbau von Matrixstrukturen notwendig ist. Ein spannendes Experiment hierzu wäre die Konkurrenz der MMP-19 Oberflächenbindung durch rekombinant exprimierte und aufgereinigte MMP-19 Fragmente, die der Hämopexin-ähnlichen Domäne entsprechen. Dies könnte aufgrund des Verlusts der vektoriellen Proteolyse zur Inhibition oder zumindest zur Verzögerung der gerichteten Migration von Monozyten und Makrophagen durch das Gewebe führen. Analog dazu könnten bei solchen Versuchen natürlich auch in angiogenetischen Modellen interessante Effekte auftreten. Die subzelluläre Lokalisierung von MMP-19 in Endothel- und glatten Muskelzellen ist allerdings noch nicht endgültig geklärt, das heißt, es ist nicht klar, ob MMP-19 auch auf der Oberfläche dieser Zellen zu finden ist.

Die hier gezeigte Charakterisierung der MMP-19 Expression und Oberflächenbindung bietet die Basis für weiterführende mechanistische Untersuchungen in geeigneten Modellsystemen. Hierbei bietet sich im besonderen die Studie der Monozyten und Makrophagen Migration durch künstliche und natürliche Matrixsubstanzen an. Des weiteren könnte die Rolle von MMP-19 in angiogenetischen Prozessen in Chorioallantois Modellen untersucht werden. Mit Hilfe dieser Analysen sollte es möglich sein zumindest einen Teil der biologischen Funktionen von MMP-19 zu bestimmen. Ein pathologischer Prozess, in dem MMP-19 eine wichtige Rolle spielen könnte und der in den im Augenblick in Arbeit befindlichen Mausmodellen untersucht werden sollte, ist die Arteriosklerose.

4.4 Die Wechselwirkung von MMP-19 mit Rapa-14

Wechselwirkungspartner von MMP-19 mit dem "Yeast Two-Hybrid" System zu isolieren, stellt einen von den bisher diskutierten Untersuchungen vollkommen getrennten genetischen Ansatz dar. Hier wurden cDNA Bank kodierte Proteine mit MMP-19 in Hefen koexprimiert und ihre Interaktion mit MMP-19 in der Hefe über die Aktivierung vom Reportergen bestimmt. (siehe Kapitel 3.4.1). Unter den $1,3 \times 10^7$ untersuchten Hefeklonen fanden sich sieben, die innerhalb des Hefesystems spezifisch mit MMP-19 interagierten. Vier dieser Klone stellten sich als Hitzeschockproteine heraus. Wie bereits im Ergebnisteil erwähnt, gehört diese Molekülklasse aufgrund ihrer Aufgabe als Chaperonine, das heißt als grundsätzlich proteinbindende Proteine, zu den häufigsten falsch-positiv isolierten Klonen in diesem System (Golemis *et al.*, 1993). Aus diesem Grunde wurden sie nicht weiter analysiert.

Die verbliebenen drei isolierten cDNA Klone kodierten alle für dasselbe Protein, welches aufgrund der Nummerierung während des Durchmusterens der Hefebank mit Rapa-14 bezeichnet wurde (RasiPartner Nr. 14). Rapa-14 bindet nicht nur im Hefesystem an MMP-19, sondern kopräzipitiert auch *in vitro* spezifisch mit dieser Matrixmetalloproteinase. Aus diesem Grunde wurde Rapa-14 weiter untersucht, indem die vollständige cDNA isoliert, sequenziert und mit bekannten Proteinstrukturen verglichen wurde. Dabei stellte sich Rapa-14, bzw. der als vollständiger Klon ausgewählte Vertreter Rapa-14(33), als bisher unbekanntes Protein dar, welches nur minimale Ähnlichkeiten mit bekannten Polypeptiden aufweist. Die zugrunde liegende cDNA zeigt keinerlei relevante Ähnlichkeiten mit in den in GenBank und der EMBL-Datenbank niedergelegten DNA-Sequenzen. Der Vergleich mit der EST-Datenbank des "National Centers for Biological Information", in der der transkribierte Teil des Genoms, das heißt cDNA-Sequenzfragmente verzeichnet sind, ergab nur zehn Treffer. Dies ist sehr wenig, da die Datenbank mittlerweile den Großteil des exprimierten Genoms abdeckt (Patterson und Handel, 1998). Höher exprimierte und damit häufiger isolierte cDNA Sequenzen finden sich zwischen 100 und 1000 Mal in dieser Datenbank. Die Rapa-14-EST-Fragmente wurden viermal aus Gehirn, dreimal aus B-Zellen, zweimal aus Dickdarm, und einmal aus Eierstöcken gewonnen. Aus dieser geringen Anzahl läßt sich sicherlich kein Expressionsmuster von Rapa-14 ableiten, es spricht jedoch für eine grundsätzlich relativ niedrige, bzw. auf wenige Gewebetypen beschränkte Expression von Rapa-14.

Das 968 Aminosäuren umfassende, aus der cDNA Sequenz abgeleitete Protein Rapa-14 besitzt ein errechnetes Molekulargewicht von 107,7 kDa. Wie ausführlich in Kapitel 3.8 dargestellt, sind alle zu bekannten Proteinen ähnliche Bereiche auf kurze Sequenzabschnitte beschränkt. Und auch diese Ähnlichkeiten sind nur sehr gering. Es ist also schwierig, daraus Vorhersagen über die biologische Funktion von Rapa-14 abzuleiten. Entsprechend ist es auch nahezu unmöglich, abschließend die biologische Relevanz der Wechselwirkung von Rapa-14 mit MMP-19 abschließend zu beurteilen. Trotz dieser Einschränkung soll hier versucht werden, alle Hinweise auf die potentielle biologische Rolle von Rapa-14 zu diskutieren.

Rapa-14 besitzt mehrere sehr auffällige Sequenzabschnitte: Zum einen sind das die beiden Zinkfinger des C₂H₂-Typs an den Aminosäurepositionen um 360, bzw. um 860. Dieses Strukturmotiv wurde erstmals in Transkriptionsfaktoren verschiedener Spezies gefunden. Ein gutes Beispiel hierfür ist das Protein Ikaros, welches eine zentrale Rolle in der Lymphozytenentwicklung inne hat (Georgopoulos *et al.*, 1997). Es besitzt je nach Spleißvariante bis zu sechs Zinkfinger dieses Typs. Vier davon binden DNA, indem sich die alpha Helices der Finger in die große Rinne der DNA-Doppelhelix einlagern. Die beiden C-terminalen Finger, die in jeder Spleißvariante konserviert sind, dienen der Protein-Protein-Interaktion. Dabei vermitteln sie zum einen Ikaros Homodimerisierung, als auch Wechselwirkung mit dem Protein Aiolos (Sun *et al.*, 1996; Morgan *et al.*, 1997). Dieses Beispiel zeigt die beiden bekannten Funktionen von Zinkfingern des C₂H₂-Typs auf: Sie vermitteln DNA-Bindung und Protein-Protein-Interaktionen. Die Protein-Protein-Interaktionen beziehen sich meist auf eine Wechselwirkung zwischen Zinkfingern, wobei hier auch die Wechselwirkung mit Zinkfingern anderer Klassen wie z.B. des C₂C₂-Typs möglich ist (Klug und Rhodes, 1987).

Es ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich auszusagen, welche Funktion die beiden Finger in Rapa-14 vermitteln. Es fällt jedoch auf, dass der Abstand von etwa 500 Aminosäuren zwischen den beiden Fingern in keinem der bisher untersuchten DNA-bindenden Protein gefunden wurde. Dazu muß erwähnt werden, dass die DNA- und auch RNA-Bindung durch Zinkfinger immer mehrere benachbarte Finger umfaßt. Protein-Protein-Wechselwirkung kann hingegen auch durch einzelne Zinkfinger vermittelt werden (Mackay und Crossley, 1998). Der große Abstand zwischen den beiden Fingerstrukturen macht eine gemeinsame Bindung von DNA eher unwahrscheinlich, was als Hinweis auf eine Funktion der Finger bei Protein-Protein-Interaktionen gewertet werden kann. Hinzu kommt, dass nahezu alle nukleären, der DNA-Bindung dienenden Zinkfingerproteine eine große Anzahl an Fingern besitzen, cytoplasmatische und extrazelluläre Proteine jedoch meist nur einen oder zwei. Derartige Zinkfinger dienen meist der Bindung anderer Proteine (Mackay und Crossley, 1998).

Ein weiteres auffälliges und Rapa-14 auszeichnendes Sequenzmotiv ist der saure Abschnitt im C-terminalen Teil des Proteins. Ähnliche Abschnitte werden, wie in Kapitel 3.8.2 dargestellt, hauptsächlich in kalziumbindenden Proteinen gefunden. Sie dienen hier der niedrigaffinen Kalziumbindung oder wiederum der oftmals Kalzium-vermittelten Wechselwirkung mit anderen Proteinen, wie zum Beispiel mit Komponenten des Zytoskeletts (siehe Zitate in Kapitel 3.8.2).

Der letzte Sequenzabschnitt der bezüglich einer Funktionszuweisung zum jetzigen Zeitpunkt interessant erscheint und hier diskutiert wird, ist der Prolin- und Glutamin-reiche ungeladene N-Terminus. Die aufgefundene Ähnlichkeit dieses Abschnitts zu Sequenzbereichen von Proteinen wie zum Beispiel Involucrin oder Hordein bringen Rapa-14 in Verbindung mit Struktur- und Hüllproteinen. Zusammenfassend kann damit gesagt werden, dass Rapa-14 Motive besitzt, die eine Funktion als Strukturprotein nahelegen: So gibt es Sequenzen, die der direkten und auch der Kalzium-vermittelten Protein-Protein-Interaktion dienen könnten und Sequenzen, die selbst sehr häufig in Strukturbildenden Proteinen vorkommen.

Die Rapa-14-Bindung an MMP-19 kann über die gefundenen Ähnlichkeiten nicht bewertet werden und alle Aussagen hierzu, wie zum Beispiel über eine Zink- oder Kalzium-vermittelte Protein-Protein-Interaktion sind zum jetzigen Zeitpunkt völlig spekulativ, so dass eine Beurteilung dieser Wechselwirkung hier nicht vorgenommen wird. Im Augenblick werden Antikörper gegen Rapa-14 erstellt, die weitere Experimente erlauben. Die dann möglichen Analysen sollten in relativ kurzer Zeit die Beurteilung der Relevanz der MMP-19-Rapa-14 Interaktion zulassen. Sie werden in jedem Fall erste Ergebnisse liefern, wie das aufgrund der ungewöhnlichen Sequenz interessante Protein Rapa-14 in das zelluläre Geschehen einzuordnen ist.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Analysen zur biologischen Funktion der humanen Matrixmetalloproteinase MMP-19 beschrieben. Diese Proteinase wurde im Vorfeld als das mit Rheumatoider Arthritis assoziierte Autoantigen RASI-1 aus der Synovialmembran einer RA-Patientin isoliert.

Das Ziel dieser Arbeit war es, MMP-19 in die Proteinfamilie der Matrixine (= Matrixmetalloproteinasen) einzuordnen. Hieraus sollte abgeleitet werden, in welchem Kontext MMP-19 Aktivität zeigt und welchen Platz dieses Enzym im komplexen Wechselspiel der extrazellulären Proteinase einnimmt. Des Weiteren sollten MMP-19 tragende Zellen identifiziert werden um mechanistische Studien mit diesen Zellen als Modellsysteme durchzuführen und um Ideen über den Wirkungsort von MMP-19 zu erhalten.

Im Einzelnen wurden dabei folgende Ergebnisse erzielt:

Trotz der geringen Ähnlichkeit zu anderen Familienmitgliedern kann MMP-19 eindeutig der Matrixinfamilie zugeordnet werden: die für diese Proteinfamilie charakteristische Domänenstruktur ist bei MMP-19 eindeutig erkennbar. Alle grundlegenden die Familie definierenden Motive wie z.B. das aktive Zentrum sind vorhanden. MMP-19 ist phylogenetisch als "Frühform" der Matrixmetalloproteinase zu betrachten. Sie hat sich als erstes Familienmitglied von der Entwicklung der anderen bekannten Matrixmetalloproteinase abgespalten. Sie kann keiner der bisher bekannten Unterfamilien, wie den Gelatinasen, Stromelysinen, Kollagenasen oder den Membranständigen Matrixmetalloproteinase, zugeordnet werden und muss somit als erster Vertreter einer neuen Unterfamilie betrachtet werden. Die Differenz zu den anderen Matrixmetalloproteinase ist bezüglich der Domänen, die als determinierend für Substrataffinität und Protein-Protein-Wechselwirkung betrachtet werden, so groß, dass die von MMP-19 erkannten Substrate sich sehr wahrscheinlich von denen der anderen Matrixmetalloproteinase unterscheiden. Innerhalb der Familie der Matrixmetalloproteinase nimmt MMP-19 damit eine Sonderrolle ein.

Bei der Analyse der MMP-19 exprimierenden Zelltypen haben sich zum einen myeloide Zellen, zum anderen Blutgefäßzellen als interessant erwiesen:

MMP-19 wird im Verlauf der myeloiden Differenzierung vom Promyelocyten zum Makrophagen hochreguliert. Induziert wird dieses durch die mit der Differenzierung einhergehende Zunahme der zellulären Adhäsion. Dieser Induktionsmechanismus hat wichtige Implikationen für die mögliche Rolle von MMP-19 bei der Migration von Makrophagen durch das Gewebe und bei arteriosklerotischen Gefäßveränderungen. In diesem Zusammenhang fällt auch die in dieser Arbeit gezeigte sehr starke Expression von MMP-19 in Zellen der glatten Gefäßmuskulatur auf. Grundsätzlich ist eine veränderte zelluläre Adhäsion mit einhergehender Veränderung der Genexpression als wichtiger pathologischer Faktor bei der Arteriosklerose zu betrachten.

Sehr interessant stellt sich die regulierte Expression von MMP-19 in mikrovaskulären Endothelzellen dar. Im Gegensatz zu den makrovaskulären Endothelzellen adulter Gefäße, die negativ für MMP-19 sind, zeigen diese Zellen der neu entstehenden Gefäße eine klare und durch proangiogenetische Stimuli sogar nochmals erhöhte MMP-19 Expression. Dies spricht für eine wichtige Rolle von MMP-19 in frühen angiogenetischen Prozessen.

Es wurde weiterhin gezeigt, dass das Protein MMP-19 nicht kovalent auf der Oberfläche von myeloiden Zellen verankert vorliegt. Es interagiert hier mit mindestens zwei weiteren Oberflächenproteinen, die mit MMP-19 kopräzipitieren. Diese Bindung, die durch Hochsalz gelöst werden kann, wird durch die C-terminale Hämapexin-ähnliche Domäne vermittelt: Deletion dieser Domäne bei MMP-19 führt zu einem Verlust der Oberflächenbindung.

Parallel zu den erwähnten Kopräzipitationsexperimenten wurde die Wechselwirkung von MMP-19 mit anderen Proteinen im Yeast Two-Hybrid System analysiert. Hier wurde eine Interaktion von MMP-19 mit dem bislang unbekanntem Protein Rapa-14 gezeigt. Dieses Protein mit dem abgeleiteten Molekulargewicht von ca. 110 kDa zeigt keine signifikante Ähnlichkeit zu bisher identifizierten Proteinen. Es besitzt Abwandlungen mehrerer bekannter Motive und Domänen, die es als mögliches Strukturprotein erscheinen lassen. Die Bindung von Rapa-14 an MMP-19 konnte durch Immunpräzipitationen *in vitro* auch ausserhalb des Yeast Two-Hybrid Systems gezeigt werden. Damit wurden die Grundlagen für die Analyse der *in vivo* Relevanz dieser Wechselwirkung gelegt.

6 Literaturverzeichnis

- Allan, J. A., Hembry, R. M., Angal, S., Reynolds, J. J., and Murphy, G. (1991). Binding of latent and high Mr active forms of stromelysin to collagen is mediated by the C-terminal domain. *J Cell Sci* *99*, 789-95.
- Allan, J. A., Docherty, A. J., Barker, P. J., Huskisson, N. S., Reynolds, J. J., and Murphy, G. (1995). Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. *Biochem J* *309*, 299-306.
- Allenberg, M., Weinstein, T., Li, I., and Silverman, M. (1994). Activation of procollagenase IV by cytochalasin D and concanavalin A in cultured rat mesangial cells: linkage to cytoskeletal reorganization. *J Am Soc Nephrol* *4*, 1760-70.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* *215*, 403-10.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* *25*, 3389-402.
- Amour, A., Slocombe, P. M., Webster, A., Butler, M., Knight, C. G., Smith, B. J., Stephens, P. E., Shelley, C., Hutton, M., Knauper, V., Docherty, A. J., and Murphy, G. (1998). TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS Lett* *435*, 39-44.
- Apte, S. S., Fukai, N., Beier, D. R., and 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 embryogenesis. *J Biol Chem* *272*, 25511-7.
- Auerbach, W., and Auerbach, R. (1994). Angiogenesis inhibition: a review. *Pharmacol. Ther.* *63*, 265-311.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1993). *Current Protocols in Molecular Biology*, K. Janssen, ed. (Boston, MA: John Wiley & Sons, Inc.).
- Auwerx, J. (1991). The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia* *47*, 22-31.
- Ayad, S., Boot-Handford, R. P., Humphries, M. J., Kadler, E. K., and Shuttleworth, C. A. (1994). *The Extracellular Matrix FactsBook*: Academic Press, London).
- Ayad, S. E., Boot-Handford R., and Humphries, M. J. (1998). *The extracellular matrix factsbook*, 2nd Edition: Academic Press).
- Azzi, A., Boscoboinik, D., Clement, S., Marilley, D., Ozer, N. K., Ricciarelli, R., and Tasinato, A. (1997). Alpha-tocopherol as a modulator of smooth muscle cell proliferation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* *57*, 507-14.
- Bairoch, A., Bucher, P., and Hofman, K. (1997). The PROSITE database, its status in 1997. *Nucl. Ac. Res.* *1997*, 217-221.
- Banyai, L., Tordai, H., and Patthy, L. (1996). Structure and domain-domain interactions of the gelatin binding site of human 72-kilodalton type IV collagenase (gelatinase A, matrix metalloproteinase 2). *J Biol Chem* *271*, 12003-8.
- Barret, A. J., Rawlings, N. D., and Woessner, J. F. (1998). *Handbook of Proteolytic Enzymes* (London: Academic Press).
- Bartel, P. L., Chien, C.-T., Sterngalnz, R., and Fields, S. (1993). Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions. In *Cellular Interactions in Development: A Practical Approach*, D. A. Harteley, ed. (Oxford: Oxford University Press), pp. 153-179.
- Bartlett, J. D., Simmer, J. P., Xue, J., Margolis, H. C., and Moreno, E. C. (1996). Molecular cloning and mRNA tissue distribution of a novel matrix metalloproteinase isolated from porcine enamel organ. *Gene* *183*, 123-8.
- Basset, P., Bellocq, J. P., Wolf, C., Stoll, I., Hutin, P., Limacher, J. M., Podhajcer, O. L., Chenard, M. P., Rio, M. C., and Chambon, P. (1990). A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature* *348*, 699-704.
- Beckett, R., and Whittaker, M. (1998). Matrix metalloproteinase inhibitors 1998. *Exp. Opin. Ther. Patents* *8*, 259-282.
- Belyavsky, A., Vinogradova, T., and Rajewsky, K. (1989). PCR-based cDNA library construction: general cDNA libraries at the level of a few cells [published erratum appears in *Nucleic Acids Res* 1989 Jul 25;17(14):5883]. *Nucleic Acids Res* *17*, 2919-32.

- Benton, W. D., and Davis, R. W. (1977). Screening lambda-gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. *Science* *196*, 180.
- Berg, J. M. (1988). Proposed structure for the zinc-binding domains from transcription factor IIIA and related proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* *85*, 99-102.
- Bergeron, J. J. M., Brenner, M. B., Thomas, D. Y., and Williams, D. B. (1994). Calnexin: a membrane-bound chaperone of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem. Sci.* *19*, 124-128.
- Bertaux, B., Hornebeck, W., Eisen, A. Z., and Dubertret, L. (1991). Growth stimulation of human keratinocytes by tissue inhibitor of metalloproteinases. *J Invest Dermatol* *97*, 679-85.
- Birkedal-Hansen, H., Moore, W. G., Bodden, M. K., Windsor, L. J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A., and Engler, J. A. (1993). Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* *4*, 197-250.
- Birkedal-Hansen, H. (1995). Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* *7*, 728-35.
- Birnboim, H. C. (1983). A rapid alkaline extraction method for isolating plasmid DNA. *Meth. Enzymol.* *100*, 243-255.
- Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K. A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J. N., Johnson, R. S., Paxton, R. J., March, C. J., and Cerretti, D. P. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature* *385*, 729-33.
- Blüggel, M., and Immler, D. (1998). Proteinanalytik in der Proteomforschung. *Bio Spektrum* *5*, 39-44.
- Bodden, M. K., Harber, G. J., Birkedal-Hansen, B., Windsor, L. J., Caterina, N. C., Engler, J. A., and Birkedal-Hansen, H. (1994). Functional domains of human TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases). *J Biol Chem* *269*, 18943-52.
- Bode, W., Gomis-Ruth, F. X., and Stockler, W. (1993). Astacins, serralytins, 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 'metzincins'. *FEBS Lett.* *331*, 134-140.
- Bode, W., Reinemer, P., Huber, R., Kleine, T., Schmierer, S., and Tschesche, H. (1994). The X-ray crystal structure of the catalytic domain of human neutrophil collagenase inhibited by a substrate analogue reveals the essentials for catalysis and specificity. *Embo J* *13*, 1263-9.
- Bode, W., Grams, F., Reinemer, P., Gomis-Ruth, F. X., Baumann, U., McKay, D. B., and Stocker, W. (1996). The metzincin-superfamily of zinc-peptidases. *Adv Exp Med Biol* *389*, 1-11.
- Borkakoti, N. (1998). Matrix metalloproteases: variations on a theme. *Prog Biophys Mol Biol* *70*, 73-94.
- Brendel, V., Bucher, P., Nourbakhsh, I., Blaisdell, B. E., and Karlin, S. (1992). Methods and algorithms for statistical analysis of protein sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *89*, 2002-2006.
- Brent, R., and Ptashne, M. (1984). A bacterial repressor protein or a yeast transcriptional terminator can block upstream activation of a yeast gene. *Nature* *312*, 612-615.
- Brooks, P. C., Stromblad, S., Sanders, L. C., von Schalscha, T. L., Aimes, R. T., Stetler-Stevenson, W. G., Quigley, J. P., and Cheresch, D. A. (1996). Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin α v β 3. *Cell* *85*, 683-93.
- Brooks, P. C., Silletti, S., von Schalscha, T. L., Friedlander, M., and Cheresch, D. A. (1998). Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. *Cell* *92*, 391-400.
- Browner, M. F., Smith, W. W., and Castelano, A. L. (1995). Matrilysin-inhibitor complexes: common themes among metalloproteases. *Biochemistry* *34*, 6602-10.
- Burns, E. H., Jr., Marciel, A. M., and Musser, J. M. (1996). Activation of a 66-kilodalton human endothelial cell matrix metalloprotease by *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease. *Infect Immun* *64*, 4744-50.
- Butler, G. S., Butler, M. J., Atkinson, S. J., Will, H., Tamura, T., van Westrum, S. S., Crabbe, T., Clements, J., d'Ortho, M. P., and Murphy, G. (1998). The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase "receptor" regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study. *J Biol Chem* *273*, 871-80.
- Campbell, E. J., Cury, J. D., Shapiro, S. D., Goldberg, G. I., and Welgus, H. G. (1991). Neutral proteinases of human mononuclear phagocytes. Cellular differentiation markedly alters cell phenotype for serine proteinases, metalloproteinases, and tissue inhibitor of metalloproteinases. *J Immunol* *146*, 1286-93.

- Cao, J., Sato, H., Takino, T., and Seiki, M. (1995). The C-terminal region of membrane type matrix metalloproteinase is a functional transmembrane domain required for pro-gelatinase A activation. *J. Biol. Chem.* *270*, 801-805.
- Chan, A. C. (1998). Vitamin E and atherosclerosis. *J Nutr* *128*, 1593-6.
- Chandler, S., Miller, K. M., Clements, J. M., Lury, J., Corkill, D., Anthony, D. C., Adams, S. E., and Gearing, A. J. (1997). Matrix metalloproteinases, tumor necrosis factor and multiple sclerosis: an overview. *J Neuroimmunol* *72*, 155-61.
- Chien, C. T., Bartel, P. L., Sternglanz, R., and Fields, S. (1991). The Two-Hybrid System: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* *88*, 9578-9582.
- Chintala, S. K., Sawaya, R., Aggarwal, B. B., Majumder, S., Giri, D. K., Kyritsis, A. P., Gokaslan, Z. L., and Rao, J. S. (1998). Induction of matrix metalloproteinase-9 requires a polymerized actin cytoskeleton in human malignant glioma cells. *J Biol Chem* *273*, 13545-51.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* *162*, 156-159.
- Cibotti, R., Kanellopoulos, J. M., Cabaniols, J. P., Halle-Panenko, O., Kosmatopoulos, K., Sercarz, E., and Kourilsky, P. (1992). Tolerance to a self-protein involves its immunodominant but does not involve its subdominant determinants. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 416-20.
- Clark, I. M., and Cawston, T. E. (1989). Fragments of human fibroblast collagenase. Purification and characterization. *Biochem J* *263*, 201-6.
- Clements, J. M., Cossins, J. A., Wells, G. M., Corkill, D. J., Helfrich, K., Wood, L. M., Pigott, R., Stabler, G., Ward, G. A., Gearing, A. J., and Miller, K. M. (1997). Matrix metalloproteinase expression during experimental autoimmune encephalomyelitis and effects of a combined matrix metalloproteinase and tumour necrosis factor-alpha inhibitor. *J Neuroimmunol* *74*, 85-94.
- Cockerill, G. W., Gamble, J. R., and Vadas, M. A. (1995). Angiogenesis: models and modulators. *Int. Rev. Cytol.* *159*, 113-160.
- Collier, I. E., Bruns, G. A., Goldberg, G. I., and Gerhard, D. S. (1991). On the structure and chromosome location of the 72- and 92-kDa human type IV collagenase genes. *Genomics* *9*, 429-34.
- Collier, I. E., Krasnov, P. A., Strongin, A. Y., Birkedal-Hansen, H., and Golgberg, G. I. (1992). Alanine scanning mutagenesis and functional analysis of the fibronectin-like collagen-binding domain from human 92-kDa type IV collagenase. *J. Biol. Chem.* *267*, 6776-6781.
- Collins, S. J., Gallo, R. C., and Gallagher, R. E. (1977). Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature* *270*, 347-9.
- Collins, S. J., Ruscetti, F. W., Gallagher, R. E., and Gallo, R. C. (1979). Normal functional characteristics of cultured human promyelocytic leukemia cells (HL-60) after induction of differentiation by dimethylsulfoxide. *J Exp Med* *149*, 969-74.
- Collins, S. J. (1987). The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood* *70*, 1233-44.
- Conway, J., Wakefield, J., Brown, R., Marron, B., Sekut, L., Stimpson, S., McElroy, A., Menius, J., Jeffreys, J., Clark, R., and et, a. (1995). Inhibition of cartilage and bone destruction in adjuvant arthritis in the rat by a matrix metalloproteinase inhibitor. *J Exp Med* *182*, 449-57.
- Cornelius, L. A., Nehring, L. C., Harding, E., Bolanowski, M., Welgus, H. G., Kobayashi, D. K., Pierce, R. A., and Shapiro, S. D. (1998). Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization. *J Immunol* *161*, 6845-52.
- Corpet, F., J., G., and Kahn, D. (1998). The ProDom database of protein domain families. *Nucl. Ac. Res.* *26*, 323-326.
- Cossins, J., Dudgeon, T. J., Catlin, G., Gearing, A. J., and Clements, J. M. (1996). Identification of MMP-18, a putative novel human matrix metalloproteinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *228*, 494-498.
- Crawford, H. C., and Matrisian, L. M. (1994). Tumor and stromal expression of matrix metalloproteinases and their role in tumor progression. *Invasion Metastasis* *14*, 234-45.
- Cunnane, G., Hummel, K. M., Muller-Ladner, U., Gay, R. E., and Gay, S. (1998). Mechanism of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* *46*, 1-7.

- D'Armiento, J., Dalal, S. S., Okada, Y., Berg, R. A., and Chada, K. (1992). Collagenase expression in the lungs of transgenic mice causes pulmonary emphysema. *Cell* *71*, 955-61.
- de Souza, S. J., and Brentani, R. (1992). Collagen binding site in collagenase can be determined using the concept of sense-antisense peptide interactions. *J Biol Chem* *267*, 13763-7.
- de Souza, S. J., and Brentani, R. (1993). Sequence homology between a bacterial metalloproteinase and eukaryotic matrix metalloproteinases [letter]. *J Mol Evol* *36*, 596-8.
- Dean, D. D., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J. P., Howell, D. S., and Woessner, J. F., Jr. (1989). Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* *84*, 678-85.
- DeClerck, Y. A., Imren, S., Montgomery, A. M. P., Mueller, B. M., Reisfeld, R. A., and Laug, W. E. (1997). Proteases and protease inhibitors in tumor progression. In *Chemistry and biology of serpins*, C. e. al., ed. (New York: Plenum Press), pp. 89-97.
- Desrochers, P. E., Jeffrey, J. J., and Weiss, S. J. (1991). Interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) expresses serpinase activity. *J Clin Invest* *87*, 2258-65.
- Devaraj, S., Li, D., and Jialal, I. (1996). The effects of alpha tocopherol supplementation on monocyte function. Decreased lipid oxidation, interleukin 1 beta secretion, and monocyte adhesion to endothelium. *J Clin Invest* *98*, 756-63.
- Devarajan, P., Mookhtiar, K., Van Wart, H., and Berliner, N. (1991). Structure and expression of the cDNA encoding human neutrophil collagenase. *Blood* *77*, 2731-8.
- Dhanaraj, V., Ye, Q. Z., Johnson, L. L., Hupe, D. J., Ortwine, D. F., Dunbar, J. B., Jr., Rubin, J. R., Pavlovsky, A., Humblet, C., and Blundell, T. L. (1996). X-ray structure of a hydroxamate inhibitor complex of stromelysin catalytic domain and its comparison with members of the zinc metalloproteinase superfamily. *Structure* *4*, 375-86.
- Dodge, G. R., Pidoux, I., and Poole, A. R. (1991). The degradation of type II collagen in rheumatoid arthritis: an immunoelectron microscopic study. *Matrix* *11*, 330-338.
- Dong, Z., Kumar, R., Yang, X., and Fidler, I. J. (1997). Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiotensin in Lewis lung carcinoma. *Cell* *88*, 801-810.
- Dougherty, G., and McBride, W. H. (1989). Monocyte differentiation in vitro. In *Human Monocytes*, M. Zembala and G. L. Asherson, eds. (London: Academic Press Limited), pp. 49-58.
- Durfee, T., Becherer, K., Chen, P. L., Yeh, S. H., Yang, Y., Kilburn, A. E., Lee, W. H., and Elledge, S. J. (1993). The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type I catalytic subunit. *Genes dev.* *7*, 555-569.
- Emmert-Buck, M. R., Emonard, H. P., Corcoran, M. L., Krutzsch, H. C., Foidart, J. M., and Stetler-Stevenson, W. G. (1995). Cell surface binding of TIMP-2 and pro-MMP-2/TIMP-2 complex. *FEBS Lett* *364*, 28-32.
- Englund, P. T. (1993). The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Annu.Rev.Biochem.* *62*, 121-138.
- Erl, W., Weber, C., Wardemann, C., and Weber, P. C. (1997). alpha-Tocopheryl succinate inhibits monocytic cell adhesion to endothelial cells by suppressing Nf-kappa B mobilization. *Am J Physiol* *273*, H634-40.
- Estojak, J., Brent, R., and Golemis, E. (1995). Correlation of two-hybrid affinity data with in vitro measurements. *Mol.Cel.Biol.* *15*, 5820-5829.
- Evans, R. M., and Hollenberg, S. M. (1988). Zinc fingers: gilt by association [published erratum appears in *Cell* 1988 Mar 11;52(5):783]. *Cell* *52*, 1-3.
- Ey, P. L., Prowse, S. J., and Jenkin, C. R. (1978). Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-sepharose. *Immunochemistry* *15*, 429-36.
- Farah, C. S., and Reinach, F. C. (1995). The troponin complex and regulation of muscle contraction. *FASEB J.* *9*, 755-767.
- Feinberg, A. P., and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* *132*.
- Feldmann, M., Brennan, F. M., and Maini, R. V. (1996). Role of cytokines in Rheumatoid Arthritis. *Annu. Rev. Immunol.* *14*, 397-440.
- Feldmann, M., Brennan, F., and Maini, R. (1996b). Rheumatoid Arthritis. *Cell* *85*, 307-310.

- Feng, D. F., and Doolittle, R. F. (1987). Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees. *J.Mol.Evol.* 25, 351-360.
- Fernandez-Catalan, C., Bode, W., Huber, R., Turk, D., Calvete, J. J., Lichte, A., Tschesche, H., and Maskos, K. (1998). Crystal structure of the complex formed by the membrane type 1-matrix metalloproteinase with the tissue inhibitor of metalloproteinases-2, the soluble progelatinase A receptor. *Embo J* 17, 5238-48.
- Finie, M. E., Cook, J. R., Mohan, R., and Brinckerhoff, C. (1998). Regulation of Matrix Metalloproteinase Gene Expression. In *Matrix Metalloproteinases*, W. C. Parks and R. P. Mecham, eds. (London: Academic Press), pp. 299-356.
- Flannery, C. R., Lark, M. W., and Sandy, J. D. (1992). Identification of a stromelysin cleavage site within the interglobular domain of human aggrecan. Evidence for proteolysis at this site in vivo in human articular cartilage. *J Biol Chem* 267, 1008-14.
- Folkman, J. (1995). Tumor angiogenesis. In *The molecular basis of cancer*, J. Mendelsohn, P. M. Howley, M. A. Israel and L. A. Liotta, eds. (Philadelphia: W.B. Saunders Co.), pp. 206-232.
- Folkman, J., and D'Amore, P. A. (1996). Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell* 87, 1153-1155.
- Forsang, A. J., Last, K., Knäuper, V., Murphy, G., and Neame, P. J. (1996). Degradation of cartilage aggrecan by collagenase-3 (MMP-13). *FEBS Lett.* 380, 17-20.
- Fridman, R., Fuerst, T. R., Bird, R. E., Hoyhtya, M., Oelkuct, M., Kraus, S., Komarek, D., Liotta, L. A., Berman, M. L., and Stetler-Stevenson, W. G. (1992). Domain structure of human 72-kDa gelatinase/type IV collagenase. Characterization of proteolytic activity and identification of the tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) binding regions. *J Biol Chem* 267, 15398-405.
- Frohman, M. A., Dush, M. K., and Martin, G. R. (1988). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 8998-9002.
- Fye, k. H., and Sack, K. E. (1994). Rheumatic diseases. In *Basic & Clinical Immunology*, D. P. Stites, A. I. Terr and T. G. Parslow, eds.: Appelson & Lange), pp. 387-411.
- Galis, Z. S., Sukhova, G. K., Kranzhofer, R., Clark, S., and Libby, P. (1995). Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 402-6.
- Gammon, G., Sercarz, E. E., and Benichou, G. (1991). The dominant self and the cryptic self: shaping the autoreactive T-cell repertoire. *Immunol Today* 12, 193-5.
- Georgopoulos, K., Winandy, S., and Avitahl, N. (1997). *Annu. Rev. Immunol.* 15, 155-176.
- Giambernardi, T. A., Grant, G. M., Taylor, G. P., Hay, R. J., Maher, V. M., McCormick, J. J., and Klebe, R. J. (1998). Overview of matrix metalloproteinase expression in cultured human cells [In Process Citation]. *Matrix Biol* 16, 483-96.
- Gijbels, K., Galardy, R. E., and Steinman, L. (1994). Reversal of experimental autoimmune encephalomyelitis with a hydroxamate inhibitor of matrix metalloproteases. *J Clin Invest* 94, 2177-82.
- Goetzl, E., Banda, M., and Leppert, D. (1996). Matrix metalloproteinases in immunity. *J Immunol* 156, 1-4.
- Gold, D. P. (1994). TCR V gene usage in autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* 6, 907-912.
- Golemis, E., Gyuris, J., and Brent, R. (1993). Interaction Trap/Two-Hybrid System to identify interacting proteins. In *Current Protocols in Molecular Biology*, F. Ausubel, R. Brent, R. Kingston, D. Moore, J. Seidman, J. Smith and K. Struhl, eds. (New York: Wiley Interscience), pp. 10.1.1-20.1.28.
- Gomez, D. E., Alonso, D. F., Yoshiji, H., and Thorgeirsson, U. P. (1997). Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 74, 111-22.
- Görg, A., Postel, W., and Günther, S. (1988). The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 9, 531-546.
- Görg, A., in collaboration with: Boguth, G., Obermaier, C., Scheibe, B., and Weiss, W. (1997). Two-dimensional electrophoresis of Proteins using Immobilized pH Gradients. *Handbook of one-week 2D electrophoresis courses (GDCh, 1990-1997, FEBS 1997).*
- Grams, F., Reinemer, P., Powers, J. C., Kleine, T., Pieper, M., Tschesche, H., Huber, R., and Bode, W. (1995). X-ray structures of human neutrophil collagenase complexed with peptide hydroxamate and peptide thiol inhibitors. Implications for substrate binding and rational drug design. *Eur J Biochem* 228, 830-41.

- Gravallese, E. M., Darling, J. M., Ladd, A. L., Katz, J. N., and Glimcher, L. H. (1991). In situ hybridization studies of stromelysin and collagenase messenger RNA expression in rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 34, 1076-84.
- Gribskov, M., Devereux, J., and Burgess, R. R. (1984). The codon preference plot: graphic analysis of protein coding sequences and prediction of gene expression. *Nucl. Ac. Res.* 14, 539-549.
- Gronski, T. J., Jr., Martin, R. L., Kobayashi, D. K., Walsh, B. C., Holman, M. C., Huber, M., Van Wart, H. E., and Shapiro, S. D. (1997). Hydrolysis of a broad spectrum of extracellular matrix proteins by human macrophage elastase. *J Biol Chem* 272, 12189-94.
- Gyuris, J., Golemis, E., Chertkov, H., and Brent, R. (1993). Cdi1, a human G1- and S-phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* 75, 791-803.
- Hanahan, D., and Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353-364.
- Hautamaki, R. D., Kobayashi, D. K., Senior, R. M., and Shapiro, S. D. (1997). Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science* 277, 2002-4.
- Hay, B., and Short, J. M. (1992). ExAssist(TM) helper phage and SOLR(TM) cells for lamda ZAP excisions. *Strategies* 5, 16-18.
- Hayakawa, T., Yamashita, K., Tanzawa, K., Uchijima, E., and Iwata, K. (1992). Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. *FEBS Lett* 298, 29-32.
- Heino, J. (1996). Biology of tumor cell invasion: interplay of cell adhesion and matrix degradation. *Int J Cancer* 65, 717-22.
- Hendy, G. N., Bevan, S., Mattei, M. G., and Moulard, A. J. (1995). Chromogranin A. *Clin Invest Med* 18, 47-65.
- Heukesshoven, J. R., and Dernick, R. (1985). Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 6, 103-112.
- Hewson, A. K., Smith, T., Leonard, J. P., and Cuzner, M. L. (1995). Suppression of experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat by the matrix metalloproteinase inhibitor Ro31-9790. *Inflamm Res* 44, 345-9.
- Hillert, J., and Olerup, O. (1992). Gem-line polymorphism of TCR genes and disease susceptibility - fact or hypothesis? *Immunol. Today* 13, 47-49.
- Hobson, B., and denekamp, J. (1984). Endothelial proliferation in tumors and normal tissues: continuous labeling studies. *Br. J. Cancer* 49, 405-413.
- Hoffman, R. M., and Garewal, H. S. (1995). Antioxidants and the prevention of coronary heart disease [see comments]. *Arch Intern Med* 155, 241-6.
- Howard, E. W., and Banda, M. J. (1991). Binding of tissue inhibitor of metalloproteinases 2 to two distinct sites on human 72-kDa gelatinase. Identification of a stabilization site. *J Biol Chem* 266, 17972-7.
- Huberman, E., Braslawsky, G. R., Callahan, M., and Fugiki, H. (1982). Induction of differentiation of human promyelocytic leukemia (HL-60) cells by teleocidin and phorbol-12-myristate-13-acetate. *Carcinogenesis* 3, 111-4.
- Hunt, S. W. r., Harris, E. S., Kellermann, S. A., and Shimizu, Y. (1996). T-lymphocyte interactions with endothelium and extracellular matrix. *Crit Rev Oral Biol Med* 7, 59-86.
- Hynes, R. O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69, 11-25.
- Imhof, B. A., and Dunon, D. (1995). Leukocyte migration and adhesion. *Adv. Immunol.* 58, 345-416.
- Imper, V., and Van Wart, H. E. (1998). Substrate Specificity and Mechanisms of Substrate Recognition of the Matrix Metalloproteinases. In *Matrix Metalloproteinases*, W. C. Parks and R. P. Mecham, eds. (London: Academic Press), pp. 219-242.
- Inoue, H., and al., e. (1990). High efficient transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene* 96, 23-28.
- Ishiguro, N., Ito, T., Obata, K., Fujimoto, N., and Iwata, H. (1996). Determination of stromelysin-1, 72 and 92 kDa type IV collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), and TIMP-2 in synovial fluid and serum from patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 23, 1599-604.

- Itoh, T., Ikeda, T., Gomi, H., Nakao, S., Suzuki, T., and Itohara, S. (1997). Unaltered secretion of beta-amyloid precursor protein in gelatinase A (matrix metalloproteinase 2)-deficient mice. *J Biol Chem* 272, 22389-92.
- Iwasaka, C., Tanaka, K., Abe, M., and Sato, Y. (1996). Ets-1 regulates angiogenesis by inducing the expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinase-1 and the migration of vascular endothelial cells. *J Cell Physiol* 169, 522-31.
- Jiang, W., and Bond, J. S. (1992). Families of metalloendopeptidases and their relationships. *FEBS Lett* 312, 110-4.
- Johnson, L. L., Dyer, R., and Hupe, D. J. (1998). Matrix metalloproteinases. *Curr Opin Chem Biol* 2, 466-71.
- Jukes, T. H., and Cantor, C. R. (1996). Evolution of Protein Molecules. In *Mammalian Protein Metabolism*, H. N. Munro, ed. (San Diego, California, USA: Academic Press), pp. 21-132.
- Kenagy, R. D., Vergel, S., Mattsson, E., Bendeck, M., Reidy, M. A., and Clowes, A. W. (1996). The role of plasminogen, plasminogen activators, and matrix metalloproteinases in primate arterial smooth muscle cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16, 1373-82.
- Keyszer, G., Redlich, A., Haupl, T., Zacher, J., Sparmann, M., Engethum, U., Gay, S., and Burmester, G. R. (1998). Differential expression of cathepsins B and L compared with matrix metalloproteinases and their respective inhibitors in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: a parallel investigation by semiquantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *Arthritis Rheum* 41, 1378-87.
- Kimura, M. (1983). *The Neutral Theory of Molecular Evolution* (Cambridge, UK: Cambridge University Press).
- Kleine, T., Bartsch, S., Blaser, J., Schnierer, S., Triebel, S., Valentin, M., Gote, T., and Tschesche, H. (1993). Preparation of active recombinant TIMP-1 from *Escherichia coli* inclusion bodies and complex formation with the recombinant catalytic domain of PMNL-collagenase. *Biochemistry* 32, 14125-31.
- Klekamp, M., and Weil, P. (1982). Specific transcription of homologous class III genes in yeast *Saccharomyces cerevisiae* soluble cell-free extracts. *J Biol Chem* 257, 8432-8441.
- Klug, A., and Rhodes, D. (1987). *Trends Biochem. Sci.* 12, 464-469.
- Knäuper, V., Osthues, A., DeClerck, Y. A., Langley, K. E., Blaser, J., and Tschesche, H. (1993). Fragmentation of human polymorphonuclear-leucocyte collagenase [see comments]. *Biochem J* 291, 847-54.
- Knäuper, V., Will, H., Lopez-Otin, C., Smith, B., Atkinson, S. J., Stanton, H., Hembry, R. M., and Murphy, G. (1996). Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme. *J Biol Chem* 271, 17124-31.
- Knäuper, V., Cowell, S., Smith, B., Lopez-Otin, C., M. O. S., Morris, H., Zardi, L., and Murphy, G. (1997). The role of the C-terminal domain of human collagenase-3 (MMP-13) in the activation of procollagenase-3, substrate specificity, and tissue inhibitor of metalloproteinase interaction. *J Biol Chem* 272, 7608-16.
- Knäuper, V., and Murphy, G. (1998). Membrane-Type Matrix Metalloproteinases and Cell Surface-Associated Activation Cascades for Matrix Metalloproteinases. In *Matrix Metalloproteinases*, W. C. Parks and R. P. Mecham, eds. (London: Academic Press), pp. 199-218.
- Kolb, C., Mauch, S., Peter, H. H., Krawinkel, U., and Sedlacek, R. (1997). The matrix metalloproteinase RASI-1 is expressed in synovial blood vessels of a rheumatoid arthritis patient. *Immunol Lett* 57, 83-8.
- Kolb, C., Mauch, S., Krawinkel, U., and Sedlacek, R. (1999). Matrix Metalloproteinase-19 in Capillary Endothelial Cells: Expression in Acutely, but Not in Chronically, Inflamed Synovium. *Exp Cell Res* 250, 122-130.
- Kolodziej, P. A., and Young, R. A. (1991). Epitope tagging and protein surveillance. *Methods Enzymol.* 194, 508-519.
- Kozak, M. (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44, 283-292.
- Krane, S. M. (1994). Clinical importance of metalloproteinases and their inhibitors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 732, 1-10.
- Krausel, I., and Elbertshagen, H. (1987). *Elektrophorese-Forum*, 382-384.
- Krawinkel, U., Mauch, S., and Sedlacek, R. (1996). Autoantigene und Verfahren zur Diagnose von Autoimmunkrankheiten. In *internationales Patent: PCT/DE96/02094*.

- Kyte, J., and Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* *157*, 105-132.
- Labat-Robert, J., Bihari-Varga, M., and Robert, L. (1990). Extracellular matrix. *FEBS Lett* *268*, 386-93.
- LaBate ME, S. J. (1989). Selective conservation of GAP-43 structure in vertebrate evolution. *Neuron* *3*, 229-310.
- Lake, J. A., and Moore, J. E. (1998). Phylogenetic analysis & comparative genomics. *Trends guide to bioinformatics*, 22-23.
- Lark, M. W., Bayne, E. K., Flanagan, J., Harper, C. F., Hoerrner, L. A., Hutchinson, N. I., Singer, II, Donatelli, S. A., Weidner, J. R., Williams, H. R., Mumford, R. A., and 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.
- Lämmler, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-5.
- Leblond, C. P., and Inoue, S. (1989). Structure, composition, and assembly of basement membrane. *Am J Anat* *185*, 367-90.
- Lehmann, P. V., Forsthuber, T., Miller, A., and Sercarz, E. E. (1992). Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature* *358*, 155-7.
- Lehmann, P. V., Sercarz, E. E., Forsthuber, T., Dayan, C. M., and Gammon, G. (1993). Determinant spreading and the dynamics of the autoimmune T-cell repertoire [see comments]. *Immunol Today* *14*, 203-8.
- Lehmann, P. V., Targoni, O. S., and Forsthuber, T. G. (1998). Shifting T-cell activation thresholds in autoimmunity and determinant spreading. *Immunol Rev* *164*, 53-61.
- Leonhardt, H. (1990). *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*, Volume 8 (Stuttgart: Thieme Verlag).
- Leppert, D., Waubant, E., Galaray, R., Bunnett, N. W., and Hauser, S. L. (1995). T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in vitro. *J Immunol* *154*, 4379-89.
- Limos, A., Worthington, J. W., and O'Fallon, W. M. (1980). The epidemiology of rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota: a study of its incidence, prevalence and mortality. *Amer. J. Epidemiem.* *111*, 87-98.
- Llano, E., Pendas, A. M., Knauper, V., Sorsa, T., Salo, T., Salido, E., Murphy, G., Simmer, J. P., Bartlett, J. D., and Lopez-Otin, C. (1997). Identification and structural and functional characterization of human enamelysin (MMP-20). *Biochemistry* *36*, 15101-8.
- Logan, S. K., Fisher, S. J., and Damsky, C. H. (1992). Human placental cells transformed with temperature-sensitive simian virus 40 are immortalized and mimic the phenotype of invasive cytotrophoblasts at both permissive and nonpermissive temperatures. *Cancer Res* *52*, 6001-9.
- Logan, S. K., Hansell, E. J., Damsky, C. H., and Werb, Z. (1996). T-antigen inhibits metalloproteinase expression and invasion in human placental cells transformed with temperature-sensitive simian virus 40. *Matrix Biol* *15*, 81-9.
- Lovejoy, B., Cleasby, A., Hassell, A. M., Longley, K., Luther, M. A., Weigl, D., McGeehan, G., McElroy, A. B., Drewry, D., Lambert, M. H., and et al. (1994). Structure of the catalytic domain of fibroblast collagenase complexed with an inhibitor. *Science* *263*, 375-7.
- Low, M. G., and Saltiel, A. R. (1988). Structural and functional roles of glycosyl-phosphatidylinositol in membranes. *Science* *239*, 268-275.
- Lyons, B. A., and Ashman, L. K. (1989). Monocyte cell lines. In *Human Monocytes*, M. Zembala and G. L. Asherson, eds. (London: Academic Press Limited), pp. 59-69.
- Ma, J., and Ptashne, M. (1988). Converting an eukaryotic transcriptional inhibitor into an activator. *Cell* *55*, 443-446.
- Mackay, J. P., and Crossley, M. (1998). Zinc finger are sticking together. *Trends Biochem. Sci.* *23*, 1-4.
- Madri, J. A., Graesser, D., and Haas, T. (1996). The roles of adhesion molecules and proteinases in lymphocyte transendothelial migration. *Biochem Cell Biol* *74*, 749-57.
- Maeda, H., Okamoto, T., and Akaike, T. (1998). Human matrix metalloprotease activation by insults of bacterial infection involving proteases and free radicals. *Biol Chem* *379*, 193-200.
- Magee, A. (1995). Cell adhesion molecules and intracellular signalling: from fly to man. *Cell Signal* *7*, 165-70.

- Mamula, M. J. (1993). The inability to process a self-peptide allows autoreactive T cells to escape tolerance. *J Exp Med* *177*, 567-71.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning: A laboratory manual* (New York, NY, USA: Cold Spring Harbor).
- Massova, I., Kotra, L. P., and Mobashery, S. (1998a). Structural insight into the binding motifs for the calcium ion and the non-catalytic zinc in matrix metalloproteases. *Bioorg Med Chem Lett* *8*, 853-8.
- Massova, I., Kotra, L. P., Fridman, R., and Mobashery, S. (1998b). Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *Faseb J* *12*, 1075-95.
- Matrisian, L. M. (1992). The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays* *14*, 455-463.
- Matsumoto, K., Shams, N. B., Hanninen, L. A., and Kenyon, K. R. (1992). Proteolytic activation of corneal matrix metalloproteinase by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Curr Eye Res* *11*, 1105-9.
- Mauch, S. (1996). Charakterisierung des Autoantigens RASED. In Diplomarbeit: Universität Konstanz.
- Mauviel, A. (1993). Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. *J Cell Biochem* *53*, 288-95.
- Melcher, A. H., and Chan, J. (1981). Phagocytosis and Digestion of Collagen by Gingival Fibroblasts *In Vivo*. A Study of serial Sections. *J. Ultrastruct. Res.* *77*, 1-36.
- Melchior, F., and Gerace, L. (1998). Two-way trafficking with Ran. *Trends Cell Biol* *8*, 175-9.
- Mendelsohn, A. R., and Brent, R. (1994). Application of interaction traps/two-hybrid systems to biotechnology research. *Curr.Op.Biotechnol.* *5*, 482-486.
- Merker, H. J. (1994). Morphology of the basement membrane. *Microsc Res Tech* *28*, 95-124.
- Merril, C. R., Dunau, M. L., and Goldman, D. (1981). A rapid sensitive silver stain for polypeptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* *110*, 201-7.
- Mignatti, P., and Rifkin, D. B. (1993). Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev* *73*, 161-95.
- Miller, J., McLachlan, A. D., and Klug, A. (1985). Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *Embo J* *4*, 1609-14.
- Mitchell, T. I., Jeffrey, J. J., Palmiter, R. D., and Brinckerhoff, C. E. (1993). The acute phase reactant serum amyloid A (SAA3) is a novel substrate for degradation by the metalloproteinases collagenase and stromelysin. *Biochim Biophys Acta* *1156*, 245-54.
- Moore, K. J., Fabunmi, R. P., Andersson, L. P., and Freeman, M. W. (1998). In vitro-differentiated embryonic stem cell macrophages: a model system for studying atherosclerosis-associated macrophage functions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *18*, 1647-54.
- Morgan, B. e. a. (1997). *EMBO J.* *16*, 2004-2013.
- Moses, M. A. (1997). The regulation of neovascularization of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Stem Cells* *15*, 180-9.
- Mosher, D. F., Sottile, J., Wu, C., and McDonald, J. A. (1992). Assembly of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* *4*, 810-8.
- Moss, M. L., Jin, S. L., Milla, M. E., Burkhart, W., Carter, H. L., Chen, W. J., Clay, W. C., Didsbury, J. R., Hassler, D., Hoffman, C. R., Kost, T. A., Lambert, M. H., Leesnitzer, M. A., McCauley, P., McGeehan, G., Mitchell, J., Moyer, M., Pahel, G., Rocque, W., Overton, L. K., Schoenen, F., Seaton, T., Su, J. L., Warner, J., Becherer, J. D., and et al. (1997). Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature* *385*, 733-6.
- Moss, M. L., Jin, S. L., Becherer, J. D., Bickett, D. M., Burkhart, W., Chen, W. J., Hassler, D., Leesnitzer, M. T., McGeehan, G., Milla, M., Moyer, M., Rocque, W., Seaton, T., Schoenen, F., Warner, J., and Willard, D. (1997). Structural features and biochemical properties of TNF-alpha converting enzyme (TACE). *J Neuroimmunol* *72*, 127-9.
- Moudgil, K. D., and Sercarz, E. E. (1993). Dominant determinants in hen eggwhite lysozyme correspond to the cryptic determinants within its self-homologue, mouse lysozyme: implications in shaping of the T cell repertoire and autoimmunity. *J Exp Med* *178*, 2131-8.

- Moudgil, K. D., and Sercarz, E. E. (1994). Can antitumor immune responses discriminate between self and nonself? *Immunol Today* *15*, 353-5.
- Moy, F. J., Chanda, P. K., Cosmi, S., Pisano, M. R., Urbano, C., Wilhelm, J., and Powers, R. (1998). High-resolution solution structure of the inhibitor-free catalytic fragment of human fibroblast collagenase determined by multidimensional NMR. *Biochemistry* *37*, 1495-504.
- Mudgett, J. S., Hutchinson, N. I., Chartrain, N. A., Forsyth, A. J., McDonnell, J., Singer, II, Bayne, E. K., Flanagan, J., Kawka, D., Shen, C. F., Stevens, K., Chen, H., Trumbauer, M., and Visco, D. M. (1998). Susceptibility of stromelysin 1-deficient mice to collagen-induced arthritis and cartilage destruction. *Arthritis Rheum* *41*, 110-21.
- Murphy, G., Murphy, G., and Reynolds, J. (1991). The origin of matrix metalloproteinases and their familial relationships. *FEBS Lett* *289*, 4-7.
- Murphy, G., Ward, R., Gavrilovic, J., and Atkinson, S. (1992). Physiological mechanisms for metalloproteinase activation. *Matrix Suppl* *1*, 224-30.
- Murphy, G., Willenbrock, F., Ward, R. V., Cockett, M. I., Eaton, D., and Docherty, A. J. (1992b). The C-terminal domain of 72 kDa gelatinase A is not required for catalysis, but is essential for membrane activation and modulates interactions with tissue inhibitors of metalloproteinases. *Biochem J* *283*, 637-41.
- Murphy, G., Allan, J. A., Willenbrock, F., Cockett, M. I., JP, O. C., and Docherty, A. J. (1992c). The role of the C-terminal domain in collagenase and stromelysin specificity. *J Biol Chem* *267*, 9612-8.
- Murphy, G., and Knäuper, V. (1997). Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain? *Matrix Biol.* *15*, 511-518.
- Nagase, H. (1997). Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* *378*, 151-60.
- Nagase, H. (1998). The Matrix Metalloproteinase Family. In *Matrix Metalloproteinases*, W. C. Parks and R. P. Mecham, eds. (London: Academic Press), pp. 43-84.
- Nepom, G. T. (1991). MHC class-II molecules and autoimmunity. *Ann. Rev. Immunol.* *9*, 493-453.
- Neu, E., Hemmerich, P. H., Peter, H. H., Krawinkel, U., and von Mikecz, A. H. (1997). Characteristic epitope recognition pattern of autoantibodies against eukaryotic ribosomal protein L7 in systemic autoimmune diseases. *Arthritis Rheum* *40*, 661-71.
- Newby, A., Southgate, K., and Davies, M. (1994). Extracellular matrix degrading metalloproteinases in the pathogenesis of arteriosclerosis. *Basic Res Cardiol* *89 Suppl 1*, 59-70.
- Newby, A. C., and George, S. J. (1996). Proliferation, migration, matrix turnover, and death of smooth muscle cells in native coronary and vein graft atherosclerosis. *Curr Opin Cardiol* *11*, 574-82.
- Nguyen, Q., Willenbrock, F., Cockett, M. I., M, O. S., Docherty, A. J., and Murphy, G. (1994). Different domain interactions are involved in the binding of tissue inhibitors of metalloproteinases to stromelysin-1 and gelatinase A. *Biochemistry* *33*, 2089-95.
- Nguyen, M., Arkell, J., and Jackson, C. J. (1998). Active and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-free gelatinase B accumulates within human microvascular endothelial vesicles. *J Biol Chem* *273*, 5400-4.
- Nicholas, K. B., and Nicholas, H. B. J. (1996). GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. (Distributed by the author).
- Nicolson, G. L. (1998). Breast cancer metastasis-associated genes: role in tumour progression to the metastatic state. *Biochem Soc Symp* *63*, 231-243.
- O'Connell, J. P., Willenbrock, F., Docherty, A. J., Eaton, D., and Murphy, G. (1994). Analysis of the role of the COOH-terminal domain in the activation, proteolytic activity, and tissue inhibitor of metalloproteinase interactions of gelatinase B. *J Biol Chem* *269*, 14967-73.
- Ochieng, J., Fridman, R., Nangia-Makker, P., Kleiner, D. E., Liotta, L. A., Stetler-Stevenson, W. G., and Raz, A. (1994). Galectin-3 is a novel substrate for human matrix metalloproteinases-2 and -9. *Biochemistry* *33*, 14109-14.
- Ohuchi, E., Imai, K., Fujii, Y., Sato, H., Seiki, M., and Okada, Y. (1997). Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem* *272*, 2446-51.

- Okada, S., Kita, H., George, T. J., Gleich, G. J., and Leiferman, K. M. (1997). Migration of eosinophils through basement membrane components in vitro: role of matrix metalloproteinase-9. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17, 519-28.
- Oldberg, A., Antonsson, P., Hedbom, E., and Heinegard, D. (1990). Structure and function of extracellular matrix proteoglycans. *Biochem Soc Trans* 18, 789-92.
- Olson, M. W., Toth, M., Gervasi, D. C., Sado, Y., Ninomiya, Y., and Fridman, R. (1998). High affinity binding of latent matrix metalloproteinase-9 to the alpha2(IV) chain of collagen IV. *J Biol Chem* 273, 10672-81.
- Olsson, A. G., and Yuan, X. M. (1996). Antioxidants in the prevention of atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 7, 374-80.
- Overall, C. M. (1994). Regulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase expression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 732, 51-64.
- Ozenberger, B. A., and Young, K. H. (1995). Functional interaction of ligands and receptors of the hematopoietic superfamily in yeast [published erratum appears in *Mol Endocrinol* 1996 Aug;10(8):936]. *Mol Endocrinol* 9, 1321-9.
- Pakianathan, D. R. (1995). Extracellular matrix proteins and leukocyte function. *J Leukoc Biol* 57, 699-702.
- Park, A. J., Matrisian, L. M., Kells, A. F., Pearson, R., Yuan, Z. Y., and Navre, M. (1991). Mutational analysis of the transin (rat stromelysin) autoinhibitor region demonstrates a role for residues surrounding the "cysteine switch". *J. Biol. Chem.* 266, 1584-1590.
- Parks, W. C., and Mecham, R. P. (1998). Preface. In *Matrix Metalloproteinases*, W. C. Parks and R. P. Mecham, eds. (London: Academic Press), pp. xi-xii.
- Parks, W. C., Sudbeck, B. D., Doyle, G. R., and Sariahlo-Kere, U. K. (1998). Matrix Metalloproteinases in Tissue Repair. In *Matrix Metalloproteinases*, W. C. Parks and R. P. Mecham, eds. (London: Academic Press), pp. 263-297.
- Patterson, M., and Handel, M. (1988). *Trends Guide to Bioinformatics*: Elsevier Science).
- Patterson, B. C., and Sang, Q. A. (1997). Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9). *J Biol Chem* 272, 28823-5.
- Payre, F., and Vincent, A. (1988). Finger proteins and DNA-specific recognition: distinct patterns of conserved amino acids suggest different evolutionary modes. *FEBS Lett* 234, 245-50.
- Pearson, W. R., and Lipman, D.-J. (1988). Improved tools for sequence analysis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 85, 2444-2448.
- Pei, D., Majmudar, G., and Weiss, S. J. (1994). Hydrolytic inactivation of a breast carcinoma cell-derived serpin by human stromelysin-3. *J Biol Chem* 269, 25849-55.
- Pei, D., and Weiss, S. (1995). Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature* 375, 244-7.
- 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, 9135-40.
- Pendas, A. M., Knauper, V., Puente, X. S., Llano, E., Mattei, M. G., Apte, S., Murphy, G., and Lopez-Otin, C. (1997). Identification and characterization of a novel human matrix metalloproteinase with unique structural characteristics, chromosomal location, and tissue distribution. *J. Biol. Chem.* 272, 4281-4286.
- Piechocki, M. P., Kantak, S., and Onoda, J. M. (1992). TPA-induced differentiation of rat aortic endothelial cells is substrate-specific and receptor mediated. *Exs* 61, 152-157.
- Pieper, M., Betz, M., Budisa, N., Gomis-Ruth, F. X., Bode, W., and Tschesche, H. (1997). Expression, purification, characterization, and X-ray analysis of selenomethionine 215 variant of leukocyte collagenase. *J Protein Chem* 16, 637-50.
- Piez, K. A. (1997). History of extracellular matrix: a personal view. *Matrix Biol* 16, 85-92.
- Plow, E. F., Freany, D. E., Plecsia, J., and Miles, L. A. (1986). The Plasminogen System and Cell Surfaces: Evidence for Plasminogen and Urokinase Receptors on the same Cell. *J.Cell.Biol.* 103, 2411-2420.
- Polette, M., and Birembaut, P. (1998). Membrane-type metalloproteinases in tumor invasion. *Int J Biochem Cell Biol* 30, 1195-202.
- Pourmottabed, T. (1994). Relation between substrate specificity and domain structure of 92-kDa type IV collagenase. *Ann. NY Acad. Sci.* 723, 372-374.

- Ratner, S. (1992). Lymphocyte migration through extracellular matrix. *Invasion Metastasis* 12, 82-100.
- Rawlings, N. D., and Barrett, A. J. (1995). Evolutionary families of metalloproteinases. *Methods Enzymol* 248, 183-228.
- Ren, M., Villamarin, A., Shih, A., Coutavas, E., Moore, M. S., LoCurcio, M., Clarke, V., Oppenheim, J. D., P, D. E., and Rush, M. G. (1995). Separate domains of the Ran GTPase interact with different factors to regulate nuclear protein import and RNA processing. *Mol Cell Biol* 15, 2117-24.
- Risau, W., and Flamme, I. (1995). Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, 73-91.
- Rosenbloom, J., Abrams, W. R., and Mecham, R. (1993). Extracellular matrix 4: the elastic fiber. *Faseb J* 7, 1208-18.
- Ross, R. (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362, 807-809.
- Ruoslahti, E. (1996). Brain extracellular matrix. *Glycobiology* 6, 489-92.
- Salowe, S. P., Marcy, A. I., Cuca, G. C., Smith, C. K., Kopka, I. E., Hagmann, W. K., and Hermes, J. D. (1992). Characterization of zinc-binding sites in human stromelysin-1: stoichiometry of the catalytic domain and identification of a cysteine ligand in the proenzyme. *Biochemistry* 31, 4535-40.
- Sanchez-Lopez, R., Nicholson, R., Gesnel, M. C., Matrisian, L. M., and Breathnach, R. (1988). Structure-function relationships in the collagenase family member transin. *J Biol Chem* 263, 11892-9.
- Sanchez-Lopez, R., Alexander, C. M., Behrendtsen, O., Breathnach, R., and Werb, Z. (1993). Role of zinc-binding- and hemopexin domain-encoded sequences in the substrate specificity of collagenase and stromelysin-2 as revealed by chimeric proteins. *J Biol Chem* 268, 7238-47.
- Sandy, J. D., Flannery, C. R., Neame, P. J., and Lohmander, L. S. (1992). The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. Evidence for the involvement in osteoarthritis of a novel proteinase which cleaves the Glu 373-Ala374 bond of the interglobular domain. *J. Clin. Invest.* 89, 1512-1516.
- Sanger, F., and Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 94, 441-8.
- Saren, P., Welgus, H. G., and Kovanen, P. T. (1996). TNF-alpha and IL-1beta selectively induce expression of 92-kDa gelatinase by human macrophages. *J Immunol* 157, 4159-65.
- Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E., and Seiki, M. (1994). A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 370, 61-65.
- Sato, H., Kinoshita, T., Takino, T., Nakayama, K., and Seiki, M. (1996). Activation of a recombinant membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2. *FEBS Lett* 393, 101-4.
- Schägger, H., and von Jagow, G. (1987). *Anal Biochem.* 166, 368-379.
- Schwartz, S. M., O'Brien, O. R., deBlois, D., and Giachelli, C. M. (1995). Relevance of Smooth Muscle Cell Replication and Development to Vascular Disease. In *The Vascular Smooth Muscle Cell*, S. M. Schwartz and R. P. Mecham, eds. (London: Academic Press, Inc.), pp. 81-139.
- Scott, J. E. (1995). Extracellular matrix, supramolecular organisation and shape. *J Anat* 187, 259-69.
- Sechler, J. L., Corbett, S. A., Wenk, M. B., and Schwarzbauer, J. E. (1998). Modulation of cell-extracellular matrix interactions. *Ann N Y Acad Sci* 857, 143-54.
- Sedlacek, R. (1996). RASI-1 a new autoantigen in rheumatoid arthritis and a novel member of the matrix metalloproteinase family. In *Dissertation: Universität Konstanz*.
- Sedlacek, R., Mauch, S., Kolb, B., Schatzlein, C., Eibel, H., Peter, H. H., Schmitt, J., and Krawinkel, U. (1998). Matrix metalloproteinase MMP-19 (RASI-1) is expressed on the surface of activated peripheral blood mononuclear cells and is detected as an autoantigen in rheumatoid arthritis. *Immunobiology* 198, 408-23.
- Senior, R. M., Griffin, G. L., Fliszar, C. J., Shapiro, S. D., Goldberg, G. I., and Welgus, H. G. (1991). Human 92- and 72-kilodalton type IV collagenases are elastases. *J Biol Chem* 266, 7870-5.
- Shah, P. K., Falk, E., Badimon, J. J., Fernandez-Ortiz, A., Mailhac, A., Villareal-Levy, G., Fallon, J. T., Regnstrom, J., and Fuster, V. (1995). Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation* 92, 1565-9.

- Shapiro, S. D., Campbell, E. J., Senior, R. M., and Welgus, H. G. (1991). Proteinases secreted by human mononuclear phagocytes. *J Rheumatol Suppl* 27, 95-8.
- Shapiro, S. D., Campbell, E. J., Welgus, H. G., and Senior, R. M. (1991a). Elastin degradation by mononuclear phagocytes. *Ann N Y Acad Sci* 624, 69-80.
- Shapiro, S. D., Griffin, G. L., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Welgus, H. G., Senior, R. M., and Ley, T. J. (1992). Molecular cloning, chromosomal localization, and bacterial expression of a murine macrophage metalloelastase. *J Biol Chem* 267, 4664-71.
- Shapiro, S. D., Kobayashi, D. K., and Ley, T. J. (1993). Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. *J Biol Chem* 268, 23824-9.
- Shapiro, S. D. (1997). Mighty mice: transgenic technology "knocks out" questions of matrix metalloproteinase function [In Process Citation]. *Matrix Biol* 15, 527-33.
- Shapiro, S. D., and Senior, R. M. (1998). Macrophage Elastase (MMP-12). In *Matrix Metalloproteinases*, W. C. Parks and R. P. Mecham, eds. (London: Academic Press), pp. 185-197.
- Shiple, J. M., Wesselschmidt, R. L., Kobayashi, D. K., Ley, T. J., and Shapiro, S. D. (1996). Metalloelastase is required for macrophage-mediated proteolysis and matrix invasion in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3942-6.
- Smeekens, S. P. (1993). Processing of protein precursors by a novel family of subtilisin-related mammalian endoproteases. *Bio/Technology* 11, 182-186.
- Sneath, P. H. A., and Sokal, R. R. (1973). *Numerical Taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Classification*, (San Francisco, California, USA: W.H. Freeman and Company).
- Sonnhammer, E., and Kahn, D. (1994). *Prot. Sci.* 3, 482-492.
- Sonnhammer, E. L., Eddy, S. R., and Durbin, R. (1997). Pfam: A Comprehensive Database of Protein Families Based on Seed Alignments. *Proteins* 28, 405-420.
- Sonnhammer, E. L., Eddy, S. R., Birney, E., Bateman, A., and Durbin, R. (1998). Pfam: multiple sequence alignments and HMM-profiles of protein domains. *Nucl. Ac. Res.* 26, 320-322.
- Springman, E. B., Angleton, E. L., Birkedal-Hansen, H., and Van Wart, H. E. (1990). Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of Cys73 active-site zinc complex in latency and a cysteine switch mechanism for activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 364-368.
- Stetler-Stevenson, W. G. (1994). Progelatinase A activation during tumor cell invasion. *Invasion Metastasis* 14, 259-68.
- Stopeck, A. T., Vahedian, M., and Williams, S. K. (1997). Transfer and expression of the interferon gamma gene in human endothelial cells inhibits vascular smooth muscle cell growth in vitro. *Cell. Transplant.* 6, 1-8.
- Stöcker, W., Grams, F., Baumann, U., Reinemer, P., Gomis-Ruth, F., McKay, D., and Bode, W. (1995). The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci* 4, 823-40.
- Strongin, A. Y., Marmer, B. L., Grant, G. A., and Goldberg, G. I. (1993). Plasma membrane-dependent activation of the 72-kDa type IV collagenase is prevented by complex formation with TIMP-2. *J Biol Chem* 268, 14033-9.
- Strongin, A. Y., Collier, I. E., Krasnov, P. A., Genrich, L. T., Marmer, B. L., and Goldberg, G. I. (1993). Human 92 kDa type IV collagenase: functional analysis of fibronectin and carboxyl-end domains. *Kidney Int* 43, 158-62.
- Strongin, A. Y., Collier, I., Bannikov, G., Marmer, B. L., Grant, G. A., and Goldberg, G. I. (1995). Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J. Biol. Chem.* 270, 5331-5338.
- Sudhof, T. C. (1990). The structure of the human synapsin I gene and protein. *J. Biol. Chem.* 265, 7849-7852.
- Sun, L., Liu, A., and Georgopoulos, K. (1996). *EMBO J.* 15, 5358-5369.
- Suzukawa, M., Ayaori, M., Shige, H., Hisada, T., Ishikawa, T., and Nakamura, H. (1998). Effect of supplementation with vitamin E on LDL oxidizability and prevention of atherosclerosis. *Biofactors* 7, 51-4.
- Takahashi, K., Swawasaki, Y., Hata, J., Mukai, K., and Goto, T. (1990). Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 26, 265-274.

- Takigawa, M., Nishida, Y., Suzuki, F., Kishi, J., Yamashita, K., and Hayakawa, T. (1990). Induction of angiogenesis in chick yolk-sac membrane by polyamines and its inhibition by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP and TIMP-2). *Biochem Biophys Res Commun* *171*, 1264-71.
- Takino, T., Sato, H., Yamamoto, E., and Seiki, M. (1995a). Cloning of a human gene potentially encoding a novel matrix metalloproteinase having a C-terminal transmembrane domain. *Gene* *155*, 293-8.
- Takino, T., Sato, H., Shinagawa, A., and Seiki, M. (1995b). Identification of the second membrane-type matrix metalloproteinase (MT- MMP-2) gene from a human placenta cDNA library. MT-MMPs form a unique membrane-type subclass in the MMP family. *J Biol Chem* *270*, 23013-20.
- Tasinato, A., Boscoboinik, D., Bartoli, G. M., Maroni, P., and Azzi, A. (1995). d-alpha-tocopherol inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation occurs at physiological concentrations, correlates with protein kinase C inhibition, and is independent of its antioxidant properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 12190-4.
- Taylor, K. B., Windsor, L. J., Caterina, N. C. M., Bodden, M. K., and Engler, J. A. (1996). The mechanism of inhibition of collagenase by TIMP-1. *J Biol Chem* *271*, 23938-45.
- Taylor, N., K.I.J., S., Cutler, D. F., and Docherty, K. (1997). Mutations within the propeptide, the primary cleavage site or the catalytic site, or deletion of C-terminal sequences, prevents secretion of proPC2 from transfected COS-7 cells. *Biochem J.* *321*, 367-373.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* *25*, 4876-82.
- Toh, Y., Oki, E., Oda, S., Tokunaga, E., Ohno, S., Maehara, Y., Nicolson, G. L., and Sugimachi, K. (1997). Overexpression of the MTA1 gene in gastrointestinal carcinomas: correlation with invasion and metastasis. *Int J Cancer* *74*, 459-463.
- Tomasek, J. J., Halliday, N. L., Updike, D. L., Ahern-Moore, J. S., Vu, T. K., Liu, R. W., and Howard, E. W. (1997). Gelatinase A activation is regulated by the organization of the polymerized actin cytoskeleton. *J Biol Chem* *272*, 7482-7.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* *76*, 4350-4.
- Traber, M. G., and Packer, L. (1995). Vitamin E: beyond antioxidant function. *Am J Clin Nutr* *62*, 1501S-1509S.
- Tschesche, H., and Farr, M. (1998). Matrix Metalloproeinasen und ihre Inhibitoren. *BIOforum* *12*, 767-772.
- Tschesche, H. (1998b). Bimolecular interaction of matrix metalloproteinases and their inhibitors TIMPs. *J Protein Chem* *17*, 549-51.
- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., and Tada, K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* *26*, 171-6.
- Unemori, E. N., Bouhana, K. S., and Werb, Z. (1990). Vectorial secretion of extracellular matrix proteins, matrix-degrading proteinases, and tissue inhibitor of metalloproteinases by endothelial cells. *J Biol Chem* *265*, 445-51.
- Vaes, G. (1988). Cellular Biology and Biochemical Mechanism of Bone Resorption. *Clin. Orthop. Rel. Res.* *231*, 239-271.
- Vaes, G., Delaisse, J. M., and Eeckhout, Y. (1992). Relative roles of collagenase and lysosomal cysteine-proteinases in bone resorption. *Matrix Suppl* *1*, 383-8.
- 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 U S A* *87*, 5578-82.
- Vassalli, J. D., Baccino, D., and Belin, D. (1985). A Cellular Binding Site for the Mr 55000 Form of the Human Plasminogen Activator, Urokinase. *J. Cell. Biol.* *100*, 86-92.
- Vassalli, J. D., and Pepper, M. S. (1994). Tumour biology. Membrane proteases in focus [news; comment]. *Nature* *370*, 14-15.
- Voijtek, A. B., Hollenberg, S. M., and Sooper, J. A. (1993). Mammalian ras interacts directly with the serine/threonine kinase raf. *Cell* *74*, 205-214.
- Vu, T. H., and Werb, Z. (1998). Gelatinase B: Structure, Regulation, and Function. In *Matrix Metalloproteinases*, W. C. Parks and R. P. Mecham, eds. (London: Academic Press), pp. 115-148.

- Vu, T. H., Shipley, J. M., Bergers, G., Berger, J. E., Helms, J. A., Hanahan, D., Shapiro, S. D., Senior, R. M., and Werb, Z. (1998). MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 93, 411-22.
- Walakovits, L. A., Moore, V. L., Bhardwaj, N., Gallick, G. S., and Lark, M. W. (1992). Detection of stromelysin and collagenase in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and posttraumatic knee injury. *Arthritis Rheum* 35, 35-42.
- Ward, R. V., Atkinson, S. J., Reynolds, J. J., and Murphy, G. (1994). Cell surface-mediated activation of progelatinase A: demonstration of the involvement of the C-terminal domain of progelatinase A in cell surface binding and activation of progelatinase A by primary fibroblasts. *Biochem J* 304, 263-9.
- Welgus, H. G., Campbell, E. J., Bar-Shavit, Z., Senior, R. M., and Teitelbaum, S. L. (1985). Human alveolar macrophages produce a fibroblast-like collagenase and collagenase inhibitor. *J Clin Invest* 76, 219-24.
- Welgus, H. G., Campbell, E. J., Cury, J. D., Eisen, A. Z., Senior, R. M., Wilhelm, S. M., and Goldberg, G. I. (1990). Neutral metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. Enzyme profile, regulation, and expression during cellular development. *J Clin Invest* 86, 1496-502.
- Welgus, H. G., Senior, R. M., Parks, W. C., Kahn, A. J., Ley, T. J., Shapiro, S. D., and Campbell, E. J. (1992). Neutral proteinase expression by human mononuclear phagocytes: a prominent role of cellular differentiation. *Matrix Suppl* 1, 363-7.
- Werb, Z., Hembry, R. M., Murphy, G., and Aggeler, J. (1986). Commitment to expression of the metalloendopeptidases, collagenase and stromelysin: relationship of inducing events to changes in cytoskeletal architecture. *J Cell Biol* 102, 697-702.
- Werb, Z. (1997). ECM and Cell Surface Proteolysis: Regulating Cellular Ecology. *Cell* 91, 439-442.
- Westermeier, R. (1990). *Elektrophorese-Praktikum* (D-6940 Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft).
- Wetmore, D. R., and Hardman, K. D. (1996). Roles of the propeptide and metal ions in the folding and stability of the catalytic domain of stromelysin (matrix metalloproteinase 3). *Biochemistry* 35, 6549-58.
- Will, H., and Hinzmann, B. (1995). cDna sequence and mRNA tissue distribution of a novel human matrix metalloproteinase with a potential transmembrane segment. *Eur J Biochem* 231, 602-8.
- Will, H., Atkinson, S. J., Butler, G. S., Smith, B., and Murphy, G. (1996). The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autoproteolytic activation. Regulation by TIMP-2 and TIMP-3. *J Biol Chem* 271, 17119-23.
- Willenbrock, F., Crabbe, T., Slocombe, P. M., Sutton, C. W., Docherty, A. J., Cockett, M. I., M, O. S., Brocklehurst, K., Phillips, I. R., and Murphy, G. (1993). The activity of the tissue inhibitors of metalloproteinases is regulated by C-terminal domain interactions: a kinetic analysis of the inhibition of gelatinase A. *Biochemistry* 32, 4330-7.
- Williams, d. B. (1995). Calnexin: a molecular chaperone with a taste for carbohydrate. *Biochem. Cell. Biol.* 73, 123-132.
- Wilson, C. L., Heppner, K. J., Labosky, P. A., Hogan, B. L., and Matrisian, L. M. (1997). Intestinal tumorigenesis is suppressed in mice lacking the metalloproteinase matrilysin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 1402-1407.
- Wilson, C. L., and Matrisian, L. M. (1998). Matrilysin. In *Matrix Metalloproteinases*, W. C. Parks and R. P. Mecham, eds. (London: Academic Press), pp. 149-184.
- Winchester, R. (1994). The molecular basis of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Adv. Immunol.* 56, 389-466.
- Windsor, L. J., Birkedal-Hansen, H., Birkedal-Hansen, B., and Engler, J. A. (1991). An internal cysteine plays a role in the maintenance of the latency of human fibroblast collagenase. *Biochemistry* 30, 641-7.
- Witte, S., and Krawinkel, U. (1997). Specific interactions of the autoantigen L7 with multi-zinc finger protein ZNF7 and ribosomal protein S7. *J Biol Chem* 272, 22243-7.
- Wize, J., Sopata, I., Smerdel, A., and Maslinski, S. (1998). Ligation of selectin L and integrin CD11b/CD18 (Mac-1) induces release of gelatinase B (MMP-9) from human neutrophils [In Process Citation]. *Inflamm Res* 47, 325-7.
- Woessner, J. F. J. (1994). The family of matrix metalloproteinases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 732, 11-21.
- Woessner, J. F. (1998). The Matrix Metalloproteinase Family. In *Matrix Metalloproteinases*, W. C. Parks and R. P. Mecham, eds. (London: Academic Press), pp. 1-14.
- Wong, K., and McClelland, M. (1991). PCR with 5-methyl-dCTP replacing dCTP. *Nucleic Acids Res* 19, 1081-5.

- Wong, H., Anderson, W., Cheng, T., and Riabowol, K. (1994). Monitoring mRNA Expression by Polymerase Chain Reaction: The "Primer-Dropping" Method. *Analytical Biochemistry* 223, 251-258.
- Xie, B., Laouar, A., and Huberman, E. (1998). Fibronectin-mediated cell adhesion is required for induction of 92-kDa type IV collagenase/gelatinase (MMP-9) gene expression during macrophage differentiation. The signaling role of protein kinase C-beta. *J Biol Chem* 273, 11576-82.
- Xie, B., Laouar, A., and Huberman, E. (1998a). Autocrine regulation of macrophage differentiation and 92-kDa gelatinase production by tumor necrosis factor-alpha via alpha5 beta1 integrin in HL-60 cells. *J Biol Chem* 273, 11583-8.
- Yaffee, M. B., Beegen, H., and Eckert, R. L. (1992). Biophysical characterization of involucrin reveals a molecule ideally suited to function as an intermolecular cross-bridge of the keratinocyte cornified envelope. *J. BIOL. CHEM.* 267, 12233-12238.
- Ye, S., Humphries, S., and Henney, A. (1998). Matrix metalloproteinases: implications in vascular matrix remodelling during atherogenesis. *Clinical Science* 94, 103-110.
- Yu, A. E., Hewitt, R. E., Connor, E. W., and Stetler-Stevenson, W. G. (1997). Matrix metalloproteinases. Novel targets for directed cancer therapy. *Drugs Aging* 11, 229-44.
- Yu, A. E., Murphy, A. N., and Stetler-Stevenson, W. G. (1998). 72-kDa Gelatinase (Gelatinase A): Structure, Activation, Regulation, and Substrate Specificity. In *Matrix Metalloproteinases*, W. C. Parks and R. P. Mecham, eds. (London: Academic Press), pp. 85-113.
- Zarnowski, H., Mireau, R., Werdier, D. D., and al., e. (1986). Increased frequency of GM (1,2,21) phenotype in HLA-DR4 positive seropositive rheumatoid arthritis. *J. Rheum.* 13, 858-863.
- Zembala, M., and Asherson, G. L. (1989). *Human Monocytes, Volume 1* (London: Academic Press Limited).
- Zhang, Z., Schaffer, A. A., Miller, W., Madden, T. L., Lipman, D. J., Koonin, E. V., and Altschul, S. F. (1998). Protein sequence similarity searches using patterns as seeds. *Nucleic Acids Res* 26, 3986-90.
- Zhou, C. (1994). Mini-preps in ten minutes. *BioTechniques* 8, 172-173.
- Zucker, S., Drews, M., Conner, C., Foda, H. D., DeClerck, Y. A., Langley, K. E., Bahou, W. F., Docherty, A. J., and Cao, J. (1998). Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) binds to the catalytic domain of the cell surface receptor, membrane type 1-matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP). *J Biol Chem* 273, 1216-22.

7 Anhang

7.1 Die vollständige Rapa-14-33 Sequenz

Im folgenden dargestellt ist die cDNA Sequenz des Klonen Rapa-14-33. Weiterhin die Übersetzung des offenen Leserasters in die entsprechende Aminosäuresequenz. In Kapitel 3.8.2 diskutierte und in der schematischen Abbildung 25 (Seite 74) hervorgehobene Struktur motive, sind hier ebenfalls markiert.

GG CAC GAG GGG ACT CTG CTC GCC CCC CAT CTC ACC CCC CAA GCG GAT ACT GGT CTT CTC	59
GTC GGA TTG CCC ATG CAC TTG TTG CAG AAA CAG CCA AGG CCC TGG CTG TGG AGA ATG CTG	119
AAG GAA GAA GAC GCA GAA GCA GGA CGA CCC TGA AAG ATT CAG CCT CTT CAT CCT CAA ACA	179
GGT CGC TTC TCG GGA GTT CTT GGT GTT GGA ATA TTT TAC AGC AAA GCA GTC GAC CAG GCC	239
TCC TCT TCC CAC CTG TCC AGC AGC ATG AAA GCA GCA TGA TTG GCC GAC CGC AGG AGA AGC	299
CCC CAG AAC CAG GCC CCC AAC TCA GCC ATC TGC GGA GGT CAA GGT GTG AGC GAC GTC TCC	359
TCA CCA CAG TGC TGT GTG GTC TAT ACC TCA GCC AGG GAG AGG ATG TGA AAC CCC CCG CCC	419
TGC ACA TGA GTG GTA CAG GCC AAC AGG AAC ACC TGG CTC CAG CCA CGT TCA CAG ACA TGT	479
CAG CCG TGG AGT AGT GCT GAC ACT TTT CTC TCA GCT TCT CAG GGT TTC AGT CCT TTT GGG	539
TTT GGT TTA TTT ACC TTT TTT ATG GTT TTG TGG CTG GAC GTT CAC AAC CAA GGC AGA CAG	599
CAT GGG TGA CCA GCA ACT GTA CAA GAC CAA CCA TGT GGC CCA TGG TAG TGA GAA CCT TTT	659
CTA CCA ACA GCC ACC ACT TGG CGT CCA CAG CGG GCT GAG CCC ACT GAT GGC TAC CAA TAC	719
ACC TAC TCC CAG GCC AGC GAG ATC CGG ACC CAG AAG CTT ACC AGC GGT GTC TTA CAC AAG	779
CTG GAC TCT TTC ACC CAG GTG TTT GCC AAC CAA AAC CTG CGA ATT CAG GTC AAC AAT ATG	839
M	1
GCC CAG GTG CTG CAC ACT CAG TCA GCA GTG ATG GAT GGA GCC CCT GAC AGT GCT CTC CGC	899
A Q V L H T Q S A V M D G A P D S A L R	21
CAG CTG CTG TCT CAG AAG CCC ATG GAG CCC CCA GCA CCG GCT ATC CCT TCC CGC TAC CAG	959
Q L L S Q K P M E P P A P A I P S R Y Q	41
CAG GTG CCC CAG CAG CCT CAC CCT GGT TTC ACT GGT GGG CTG TCC AAA CCA GCT CTT CAG	1019
Q V P Q Q P H P G F T G G L S K P A L Q	61
GTC GGG CAG CAC CCT ACC CAA GGG CAC CTG TAT TAT GAC TAC CAG CAG CCT CTG GCT CAG	1079
V G Q H P T Q G H L Y Y D Y Q Q P L A Q	81
GTG CCA GTG CAG GGA GGA CAG CCA CTG CAG GCC CCA CAG ATG CTG TCA CAG CAC ATG CAA	1139
V P V Q G G Q P L Q A P Q M L S Q H M Q	101
CAG ATG CAG CAG CAC CAG TAT TAC CCA CCG CAG CAA CAG CAG CAA GCC GGG CAA CAG CGT	1199
Q M Q Q H Q Y Y P P Q Q Q Q Q A G Q Q R	121
ATC TCC ATG CAA GAA ATA CAG ACG CAG CCG CAA CAA ATT CGC CCA TCA CAG CCA CAG CCG	1259
I S M Q E I Q T Q P Q Q I R P S Q P Q P	141
CCG CCA CAG CAG CAG CAG CCG CAG CAG CTA CAG CTG CAG CAG CGG CAG GGT TCA ATG CAG	1319
P P Q Q Q Q P Q Q L Q L Q Q R Q G S M Q	161
ATA CCT CAG TAT TAT CAG CCC CAA CCC ATG ATG CAG CAC TTG CAA GAG CAG CAG CAG CAA	1379
I P Q Y Y Q P Q P M M Q H L Q E Q Q Q Q	181
CAG ATG CAC CTG CAG CCT CCT TCT TAT CAC AGG GAC CCT CAC CAG TAT ACC CCA GAG CAG	1439
Q M H L Q P P S Y H R D P H Q Y T P E Q	201

GCA	CAC	ACT	GTC	CAG	CTG	ATT	CCC	CTG	GGC	TCC	ATG	TCC	CAG	TAC	TAC	TAC	CAG	GAG	CCC	1499
A	H	T	V	Q	L	I	P	L	G	S	M	S	Q	Y	Y	Y	Q	E	P	221
CAG	CAG	CCC	TAC	AGC	CAC	CCC	CTT	TAC	CAG	CAG	AGC	CAC	CTG	TCC	CAG	CAC	CAG	CAG	CGT	1559
Q	Q	P	Y	S	H	P	L	Y	Q	Q	S	H	L	S	Q	H	Q	Q	R	241
GAG	GAC	AGT	CAG	CTG	AAG	ACC	TAC	TCT	AGT	GAC	AGA	CAG	GCC	CAG	GCC	ATG	CTG	AGC	TCC	1619
E	D	S	Q	L	K	T	Y	S	S	D	R	Q	A	Q	A	M	L	S	S	261
CAT	GGG	GAC	CTG	GGG	CCT	CCT	GAC	ACA	GGA	ATG	GGA	GAC	CCA	GCG	AGC	TCA	GAT	CTG	ACC	1679
H	G	D	L	G	P	P	D	T	G	M	G	D	P	A	S	S	D	L	T	281
CGG	GTC	AGC	AGC	ACC	CTC	CCC	CAT	CGC	CCC	CTC	CTA	TCC	CCC	AGT	GGG	ATC	CAC	CTC	AAC	1739
R	V	S	S	T	L	P	H	R	P	L	L	S	P	S	G	I	H	L	N	301
AAC	ATG	GGG	CCT	CAG	CAT	CAG	CAG	CTG	TCT	CCC	AGT	GCC	ATG	TGG	CCC	CAG	ATG	CAC	CTA	1799
N	M	G	P	Q	H	Q	Q	L	S	P	S	A	M	W	P	Q	M	H	L	321
CCT	GAT	GGG	AGA	GCC	CAG	CCA	GGG	TCC	CCT	GAG	TCA	AGT	GGC	CAA	CCC	AAA	GGA	GCG	TTT	1859
P	D	G	R	A	Q	P	G	S	P	E	S	S	G	Q	P	K	G	A	F	341
GGG	GAG	CAG	TTT	GAT	GCC	AAG	AAC	AAG	CTG	ACA	TGC	TCC	ATC	TGC	CTG	AAG	GAG	TTC	AAG	1919
G	E	Q	F	D	A	K	N	K	L	T	C	S	I	C	L	K	E	F	K	361
AAC	CTG	CCT	GCC	CTG	AAT	GGC	CAC	ATG	CGG	TCC	CAC	GGG	GGA	ATG	AGG	GCC	TCC	CCC	AAC	1979
N	L	P	A	L	N	G	H	M	R	S	H	G	G	M	R	A	S	P	N	381
CTC	AAA	CAG	GAA	ATC	CCC	AGG	AAG	CAT	CAG	CCG	AGT	GTG	CCC	AAA	GCC	GAG	GAG	CCC	CTC	2039
L	K	Q	E	I	P	R	K	H	Q	P	S	V	P	K	A	E	E	P	L	401
AAG	ACC	GTG	CAG	GAG	AAG	AAA	AAG	TTC	CGG	CAC	CGG	TCG	GAA	CCT	CTC	TTC	ATC	CCG	CCG	2099
K	T	V	Q	E	K	K	K	F	R	H	R	S	E	P	L	F	I	P	P	421
CCG	CCC	TCC	TAC	AAC	CCG	AAC	CCC	GCT	GCC	TCC	TAC	TCG	GGC	GCC	ACC	CTG	TAC	CAG	AGC	2159
P	P	S	Y	N	P	N	P	A	A	S	Y	S	G	A	T	L	Y	Q	S	441
CAG	CTG	CGC	TCC	CCG	CGC	GTC	CTC	GGG	GAC	CAC	CTG	CTC	CTG	GAC	CCC	ACC	CAC	GAG	CTG	2219
Q	L	R	S	P	R	V	L	G	D	H	L	L	L	D	P	T	H	E	L	461
CCC	CCT	TAC	ACG	CCC	CCA	CCC	ATG	CTG	AGC	CCG	GTG	CGC	CAG	GGC	TCG	GGG	CTC	TTC	AGC	2279
P	P	Y	T	P	P	P	M	L	S	P	V	R	Q	G	S	G	L	F	S	481
AAT	GTC	CTC	ATC	TCC	GGC	CAC	GGC	CCT	GGC	GCC	CAC	CCG	CAG	CTG	CCC	CTG	ACG	CCC	CTG	2339
N	V	L	I	S	G	H	G	P	G	A	H	P	Q	L	P	L	T	P	L	501
ACG	CCC	ACA	CCA	CGG	GTG	CTG	CTG	TGT	CGC	TCC	AAC	AGC	ATC	GAT	GGC	AGC	AAC	GTG	ACG	2399
T	P	T	P	R	V	L	L	C	R	S	N	S	I	D	G	S	N	V	T	521
GTC	ACC	CCA	GGG	CCT	GGA	GAG	CAG	ACT	GTA	GAT	GTT	GAA	CCA	CGC	ATC	AAC	ATT	GGC	TTG	2459
V	T	P	G	P	G	E	Q	T	V	D	V	E	P	R	I	N	I	G	L	541
AGA	TTC	CAA	GCA	GAA	ATC	CCT	GAA	CTC	CAA	GAT	ATC	TCT	GCC	CTG	GCC	CAG	GAC	ACA	CAC	2519
R	F	Q	A	E	I	P	E	L	Q	D	I	S	A	L	A	Q	D	T	H	561
AAG	GCC	ACA	CTG	GTA	TGG	AAG	CCC	TGG	CCA	GAA	CTA	GAA	AAC	CAT	GAC	CTC	CAG	CAA	AGA	2579
K	A	T	L	V	W	K	P	W	P	E	L	E	N	H	D	L	Q	Q	R	581
GTG	GAG	AAT	CTT	CTG	AAT	TTG	TGC	TGT	TCC	AGT	GCA	TTG	CCA	GGT	GGA	GGG	ACC	AAT	TCT	2639
V	E	N	L	L	N	L	C	C	S	S	A	L	P	G	G	G	T	N	S	601
GAA	TTT	GCT	TTG	CAC	TCT	CTG	TTT	GAG	GCC	AAA	GGT	GAT	GTG	ATG	GTT	GCT	CTG	GAA	ATG	2699
E	F	A	L	H	S	L	F	E	A	K	G	D	V	M	V	A	L	E	M	621
CTG	CTA	CTG	CGG	AAG	CCT	GTC	AGG	TTA	AAA	TGT	CAT	CCT	TTA	GCA	AAT	TAC	CAC	TAT	GCC	2759
L	L	L	R	K	P	V	R	L	K	C	H	P	L	A	N	Y	H	Y	A	641
GGT	TCG	GAC	AAG	TGG	ACC	TCC	CTA	GAA	AGA	AAA	CTG	TTT	AAC	AAA	GCA	CTA	GCC	ACT	TAC	2819
G	S	D	K	W	T	S	L	E	R	K	L	F	N	K	A	L	A	T	Y	661
AGC	AAA	GAC	TTT	ATT	TTT	GTA	CAG	AAG	ATG	GTG	AAG	TCC	AAG	ACG	GTG	GCT	CAG	TGC	GTG	2879
S	K	D	F	I	F	V	Q	K	M	V	K	S	K	T	V	A	Q	C	V	681
GAG	TAC	TAC	TAC	ACG	TGG	AAA	AAG	ATC	ATG	CGG	CTG	GGG	CGG	AAA	CAC	CGG	ACA	CGC	CTG	2939
E	Y	Y	Y	T	W	K	K	I	M	R	L	G	R	K	H	R	T	R	L	701
GCA	GAA	ATC	ATC	GAC	GAT	TGT	GTG	ACA	AGT	GAA	GAA	GAA	GAA	GAG	TTA	GAG	GAG	GAG	GAG	2999
A	E	I	I	D	D	C	V	T	S	E	E	E	E	E	L	E	E	E	E	721

GAG	GAG	GAC	CCG	GAA	GAA	GAT	AGG	AAA	TCC	ACA	AAA	GAA	GAA	GAG	AGT	GAG	GTG	CCG	AAG	3059
E	E	D	P	E	E	D	R	K	S	T	K	E	E	E	S	E	V	P	K	741
TCC	CCG	GAG	CCA	CCA	CCC	GTC	CCC	GTC	CTG	GCT	CCC	ACG	GAG	GGG	CCG	CCC	CTG	CAG	GCC	3119
S	P	E	P	P	P	V	P	V	L	A	P	T	E	G	P	P	L	Q	A	761
CTG	GGC	CAG	CCC	TCA	GGC	TCC	TTC	ATC	TGT	GAA	ATG	CCC	AAC	TGT	GGG	GCT	GAC	TGT	AGA	3179
L	G	Q	P	S	G	S	F	I	C	E	M	P	N	C	G	A	D	C	R	781
TGT	CAT	GTC	ACT	CCC	TTT	CTT	CCC	CAG	GTG	TTC	AGC	TCC	CGA	CAG	GCA	CTG	AAT	GGC	CAT	3239
C	H	V	T	P	F	L	P	Q	V	F	S	S	R	Q	A	L	N	G	H	801
GCC	CGC	ATC	CAC	GGG	GGC	ACC	AAC	CAG	GTG	ACC	AAG	GCC	CGA	GGT	GCC	ATC	CCC	TCT	GGG	3299
A	R	I	H	G	G	T	N	Q	V	T	K	A	R	G	A	I	P	S	G	821
AAG	CAG	AAG	CCT	GGT	GGC	ACC	CAG	AGT	GGG	TAC	TGT	TCG	GTA	AAG	AGC	TCA	CCC	TCT	CAC	3359
K	Q	K	P	G	G	T	Q	S	G	Y	C	S	V	K	S	S	P	S	H	841
AGC	ACC	ACC	AGC	GGC	GAG	ACA	GAC	CCC	ACC	ACC	ATC	TTC	CCC	TGC	AAG	GAG	TGT	GGC	AAA	3419
S	T	T	S	G	E	T	D	P	T	T	I	F	P	C	K	E	C	G	K	861
GTC	TTC	TTC	AAG	ATC	AAA	AGC	CGA	AAT	GCA	CAC	ATG	AAA	ACT	CAC	AGG	CAG	CAG	GAG	GAA	3479
V	F	F	K	I	K	S	R	N	A	H	M	K	T	H	R	Q	Q	E	E	881
CAA	CAG	AGG	CAA	AAG	GCT	CAG	AAG	GCG	GCT	TTT	GCA	GCT	GAG	ATG	GCA	GCC	ACG	ATT	GAG	3539
Q	Q	R	Q	K	A	Q	K	A	A	F	A	A	E	M	A	A	T	I	E	901
AGG	ACT	ACG	GGG	CCC	GTG	GGG	GCG	CCG	GGG	CTG	CTG	CCC	CTG	GAC	CAG	CTG	AGT	CTG	ATC	3599
R	T	T	G	P	V	G	A	P	G	L	L	P	L	D	Q	L	S	L	I	921
AAA	CCC	ATC	AAG	GAT	GTG	GAC	ATC	CTC	GAC	GAC	GAC	GTC	GTC	CAG	CAG	TTG	GGA	GGT	GTC	3659
K	P	I	K	D	V	D	I	L	D	D	D	V	V	Q	Q	L	G	G	V	941
ATG	GAA	GAG	GCT	GAA	GTT	GTG	GAC	ACC	GAT	CTT	CTC	TTG	GAT	GAT	CAA	GAT	TCA	GTC	TTG	3719
M	E	E	A	E	V	V	D	T	D	L	L	L	D	D	Q	D	S	V	L	961
CTT	CAG	GGT	GAC	GCA	GAA	CTA	TAA	AGC	CCT	GTG	TGT	CAC	TTA	GAG	ACA	GTG	AAA	ACC	CAC	3779
L	Q	G	D	A	E	L	*													968
GGC	CTC	CAT	CTT	CAT	TAA	TCA	GGA	AAC	CTG	GAC	TGC	CTG	CTT	GTT	TTG	TAA	CCC	TTT	TAA	3839
ACT	ACC	TGT	TTT	AAA	AGT	GGT	CAT	TTT	ATT	CAG	GTT	TAG	AAA	AAA	AAA	TCC	TAT	TTC	TTT	3899
TCC	TTT	TAT	TTA	AAA	AAA	TTT	GTT	TTT	GTG	GGG	GGT	TGG	GCT	CGT	GCC	GAA	TTC	TTT	GGA	3959
TCC	ACT	AGT	GTC	GAC	CTG	CAG	GCG	CGC	GAG	CTC	CAG	CTT	TTG	TTC	CCT	TTA	GTG	AGG	GTT	4019
AAT	TTC	GAG	CTT	GGC	GTA	ATC	AAG	GTC	ATA	GCT	GTT	TCC	TGT	GTG	AAA	TTG	GTA	TCC	CGC	4079
TCA	CAA	TTC	CAC	ACA	ATA	TAC	GAG	CCC	GGA	AAG	TAT	AAA	GTG	TAA	AGC	CTG	GGG	TGC	CTT	4139
AAT	GAG	TGG	AGC	TAA	CCT	CAC	C													4161