

**Modulation des proteolytischen Mikromilieus
von Tumoren mittels
GPI-verankerter TIMP-1-Varianten**

-vom Breitspektrum zum spezifischen Proteaseinhibitor-

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

an der biologischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von Nicole Rieth

München, den 26.05.2011



ERSTGUTACHTERIN:

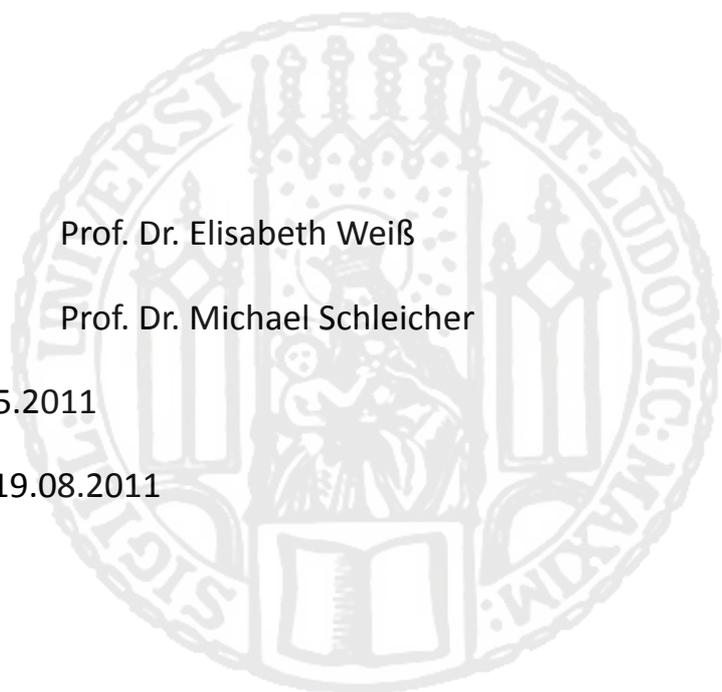
Prof. Dr. Elisabeth Weiß

ZWEITGUTACHTER:

Prof. Dr. Michael Schleicher

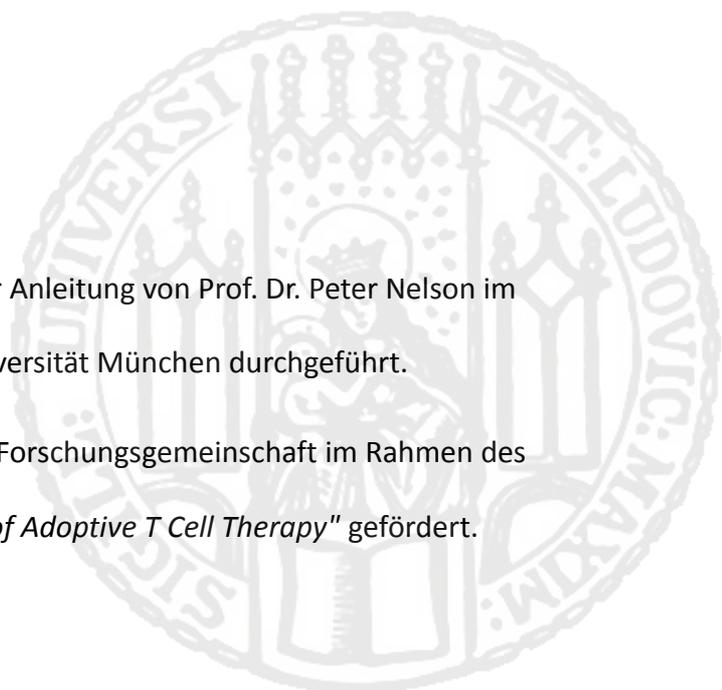
Dissertation eingereicht am: 26.05.2011

Termin der mündlichen Prüfung: 19.08.2011



Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Prof. Dr. Peter Nelson im
Forschungslabor des Klinikums der Universität München durchgeführt.

Das Projekt wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft im Rahmen des
SFB-TR36 "*Principles and Applications of Adoptive T Cell Therapy*" gefördert.



INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG.....	1
2	EINLEITUNG.....	2
2.1	<i>Aufbau und Funktion der extrazellulären Matrix.....</i>	<i>2</i>
2.2	<i>Matrix-Metalloproteasen (MMP).....</i>	<i>3</i>
2.2.1	Vorkommen und Aufgaben der MMP.....	3
2.2.2	Struktur der MMP.....	4
2.2.3	Aktivierungsmechanismus der MMP.....	6
2.3	<i>Tissue inhibitors of metalloproteases (TIMP), die gewebespezifischen Inhibitoren der MMP.....</i>	<i>8</i>
2.3.1	Vorkommen und biologische Funktion.....	8
2.3.2	Struktur der Proteine der TIMP-Familie.....	9
2.3.3	Spezifische Struktur von TIMP-1 und Interaktion mit den MMP.....	10
2.3.4	Mutationsstudien an TIMP-1 - eine Charakterisierung der N-terminalen Domäne (NTD).....	12
2.4	<i>Das Renalzellkarzinom (RCC).....</i>	<i>14</i>
2.5	<i>MMP in der Tumorgenese und ihre Rolle im Renalzellkarzinom.....</i>	<i>14</i>
2.6	<i>GPI-Anker und das Konzept der Reinkorporierung GPI-verankerter Proteine.....</i>	<i>17</i>
2.7	<i>Das GPI-verankerte TIMP-1.....</i>	<i>19</i>
3	ZIELSETZUNG.....	20
4	MATERIAL UND METHODEN.....	21
4.1	<i>Material.....</i>	<i>21</i>
4.1.1	Zellkultur.....	21
4.1.1.1	Medien und Zusätze.....	21
4.1.1.2	Zelllinien.....	22
4.1.2	Plasmide und Vektoren.....	22
4.1.3	Bakterienstämme.....	22
4.1.4	Reagenzienpakete.....	22
4.1.5	Puffer und Lösungen.....	23
4.1.6	Kommerzielle Lösungen.....	27
4.1.7	Enzyme.....	27
4.1.8	Größenstandards.....	27
4.1.9	Rekombinante Proteine und Peptide.....	28
4.1.10	Farbstoffe.....	28
4.1.11	Oligonukleotide.....	28
4.1.12	Software.....	28
4.1.13	Verbrauchsmaterial.....	29
4.1.14	Antikörper	29

4.1.15	Chemikalien.....	29
4.1.16	Geräte.....	30
4.1.17	Sonstige Materialien.....	31
4.1.18	Säulenchromatographie.....	31
4.2	Methoden.....	32
4.2.1	Zellbiologische Methoden.....	32
4.2.1.1	Allgemeine Zellkultur.....	32
4.2.1.2	Einfrieren von Zellen.....	33
4.2.1.3	Bestimmung der Zellzahl.....	33
4.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	33
4.2.2.1	Glyzerinkultur von Bakterien.....	33
4.2.2.2	Restriktionsverdau von DNS.....	33
4.2.2.3	Auftrennung von DNS im Agarosegel.....	34
4.2.2.4	Extraktion von DNS aus Agarosegelen.....	34
4.2.2.5	Konzentrationsbestimmung von DNS und RNS.....	34
4.2.2.6	Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNS.....	34
4.2.2.7	Ligation von DNS Fragmenten.....	35
4.2.2.8	Herstellung chemokompetenter <i>E. coli</i> DH5 α - Bakterien.....	35
4.2.2.9	Transformation von DNS in chemokompetente <i>E. coli</i> DH5 α Bakterien.....	35
4.2.2.10	Präparation von DNS aus Bakterien.....	36
4.2.2.11	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	36
4.2.2.12	Mutagenese-PCR.....	37
4.2.2.13	DNS-Sequenzierung.....	37
4.2.2.14	Stabile Transfektion in CHO-Zellen.....	37
4.2.2.15	mRNS-Isolierung und Reverse Transkription von RNS in cDNS.....	38
4.2.2.16	Herstellung mikrobiologischer Nährböden.....	39
4.2.3	Klonierungsstrategie.....	39
4.2.3.1	Klonierung von TIMP-1-GPI.....	39
4.2.3.2	Klonierung des Doppel-mycTags.....	40
4.2.4	Allgemeine Vorgehensweise bei der Klonierung der TIMP-1-Varianten.....	40
4.2.4.1	Klonierung von N-TIMP-1.....	40
4.2.4.2	Klonierung von VV-TIMP-1.....	40
4.2.5	Protein-biochemische Methoden.....	41
4.2.5.1	Produktion des anti-mycTag Antikörpers 9E10.....	41
4.2.5.2	Aufreinigung der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten durch Säulenchromatographie.....	41
4.2.5.3	Gelelektrophorese und Western-Analyse.....	43
4.2.5.4	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	46
4.2.5.5	Denaturierung der gereinigten Proteine.....	47
4.2.5.6	Silberfärbung.....	47
4.2.5.7	Coomassie-Färbung.....	48
4.2.5.8	Lyophilisieren der Proteine.....	48
4.2.5.9	Reverse Zymographie.....	48

4.2.5.10	Aktivitätsversuch für MMP-3.....	49
4.2.5.11	Immunpräzipitation der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten.....	49
4.2.5.12	Coomassie-Färbung von PVDF-Membranen für den Edman-Abbau.....	50
4.2.5.13	Sequenzierung der Proteine mittels Edman-Abbau.....	51
4.2.6	In vitro-Versuche.....	51
4.2.6.1	Tunicamycinbehandlung.....	51
4.2.6.2	FACS-Analysen.....	51
4.2.6.3	Immunfluoreszenz-Mikroskopie zum Nachweis der Expression und der Reinkorporierung der Konstrukte in Tumorzellen.....	53
4.2.6.4	Zymographie.....	54
4.2.6.5	Bestimmung der Proliferationsaktivität von Nierenkarzinomzellen.....	55
4.2.6.6	Bestimmung der Migrationsaktivität von Fibrosarkomzellen.....	56
5	ERGEBNISSE.....	58
5.1	Planung und Klonierung der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten.....	58
5.2	Expression der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten in CHO-Zellen.....	62
5.3	Ergebnisse der Proteinsequenzierung.....	66
5.4	Reinigung der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten.....	67
5.5	Analyse der Glykosylierung der TIMP-1-Varianten.....	70
5.6	Die GPI-verankerten TIMP-1-Varianten können in die Membran von Tumorzellen reinkorporiert werden.....	72
5.7	Eine intakte NTD in TIMP-1 ist notwendig und ausreichend für die effektive Inhibition der Aktivität von MMP-3.....	75
5.8	Die N-terminale Domäne des GPI-verankerten TIMP-1 vermittelt die Inhibition von MMP-2 und MMP-9.....	77
5.9	Durch die Reinkorporierung von TIMP-1-GPI und N-TIMP-1-GPI, nicht aber von der VV-Mutante, in die Membran von Tumorzellen, wird die MMP-Aktivität im Überstand der Zellen verringert.....	79
5.10	Reinkorporierung der TIMP-1-GPI-Varianten in die Membran von Tumorzellen vermittelt eine Bindung verschiedener MMP an die Zelloberfläche.....	84
5.11	Die Hemmung der Proliferation von Nierenkarzinomzellen wird durch eine intakte N-terminale Domäne des GPI-verankerten TIMP-1 vermittelt.....	86
5.12	Die CTD der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten vermittelt eine Hemmung der gerichteten Chemotaxis von Fibrosarkomzellen.....	89
6	DISKUSSION.....	99
7	ANHANG.....	115
7.1	Zusätzliche Daten des Migrationsversuchs.....	115

7.2	Erklärung der Parameter des Migrationsversuchs.....	116
7.2.1	Akkumulierte und euklidische Distanz sowie Vorwärts-Migrationsindex.....	116
7.2.2	Rayleigh-Test.....	117
7.3	Sequenzen der TIMP-1-GPI-Varianten.....	118
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	123
9	LITERATURVERZEICHNIS.....	125
10	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	132
11	DANKSAGUNG.....	134
12	CURRICULUM VITAE.....	135

1 ZUSAMMENFASSUNG

Die Expression der Matrix-Metalloproteasen (MMP) ist in Tumoren erhöht und steht in direktem Zusammenhang mit deren Invasivität, weshalb die Erforschung ihrer Aktivität und Regulation ein wichtiges therapeutisches Ziel darstellt. Um die Aktivität eines physiologischen Inhibitors der MMP, TIMP-1, lokal auf die Zelloberfläche zu fokussieren, wurde eine GPI-verankerte Variante hergestellt, die sich in die Zellmembran einbaut. Die daraus resultierende Veränderung der TIMP-MMP Stöchiometrie im extrazellulären Raum führte zur Änderung des proteolytischen Mikromilieus der Zellen und hemmte die Tumorgenese *in vivo*. Die beiden Domänen von TIMP-1, die N-terminale Domäne (NTD) und die C-terminale Domäne (CTD), besitzen verschiedene, voneinander unabhängige Funktionen. Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, den Zusammenhang von Struktur und Funktion des GPI-verankerten TIMP-1 zu analysieren. Hierfür wurden zusätzlich zwei Varianten des Proteins hergestellt: eine Variante ohne die CTD (N-TIMP-1-GPI) sowie ein vollständiges TIMP-1 mit zwei zusätzlichen Valinresten in der MMP-Binderegion (VV-TIMP-1-GPI). Die Proteine wurden in CHO-Zellen synthetisiert und mittels FPLC gereinigt. Aktivitätsversuche zeigten, dass die Mutation am N-Terminus des Proteins die Inhibition von MMP-2, -3 und -9 verringert. Der Einfluss der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten auf die proteolytische Tumorumgebung sowie auf die Tumorzellbiologie des Nierenzellkarzinoms wurde untersucht. Nach der Inkorporierung von TIMP-1- und N-TIMP-1-GPI, nicht aber der VV-Mutante, konnte eine Abnahme von MMP-2, -7 und -9 im Kulturüberstand der Zellen gezeigt werden. FACS-Analysen wiesen anschließend verschiedene MMP auf der Zelloberfläche nach, eine Bindung erfolgte durch alle drei Proteinvarianten. Zusätzlich hatten TIMP-1- und N-TIMP-1-GPI eine hemmende Wirkung auf die Proliferation der Tumorzellen, welche von der VV-Mutante nicht vermittelt wurde. Die gerichtete Migration von Fibrosarkomzellen wurde durch TIMP-1- und VV-TIMP-1-GPI, nicht aber N-TIMP-1-GPI, gehemmt. Die NTD des GPI-verankerten TIMP-1 vermittelt demnach die inhibitorische Aktivität gegen verschiedene MMP und die Hemmung der Proliferation von Tumorzellen. Zusätzlich wurden Prozesse wie z.B. die Migration von Fibrosarkomzellen identifiziert, die durch die CTD von TIMP-1 beeinflusst werden. Der Einsatz des GPI-verankerten TIMP-1 bei der Tumorthherapie ist also abhängig davon, welche Prozesse der Tumorgenese beeinflusst werden sollen. Durch weitere Modifikationen in der MMP-Bindungsregion kann dieses Protein zu einem Inhibitor gestaltet werden, der noch gezielter bestimmte Mitglieder der MMP-Familie beeinflusst und als Adjuvans in der Therapie verwendet werden kann.

2 EINLEITUNG

2.1 Aufbau und Funktion der extrazellulären Matrix

Die extrazelluläre Matrix (EZM) ist ein komplexes Netzwerk verschiedener Makromoleküle, das den Zellen im Gewebe mechanische Festigkeit und Zusammenhalt vermittelt und einen organisierten Raum darstellt, in dem Zellen wandern und interagieren können (Weinl 2007/ 2009). Zusätzlich dient die extrazelluläre Matrix als Depot für Wachstumsfaktoren, welche durch Proteasen freigesetzt werden können (Hoffmann 2003). Dies erlaubt eine schnelle und lokale wachstumsfaktorvermittelte Aktivierung zellulärer Funktionen, ohne dass eine Neusynthese der Proteine nötig ist. Die Bildung der extrazellulären Matrix ist essentiell für physiologische Prozesse wie Wachstum und Wundheilung. Das Verständnis von Struktur und Zusammensetzung der EZM ist darüber hinaus notwendig für die Erforschung der komplexen Dynamik von Tumorinvasion und Metastasierung in der Krebsbiologie, da diese Prozesse den Abbau der EZM durch Serin- und Threoninproteasen sowie Matrix-Metalloproteasen (MMP) erfordern (Egeblad und Werb 2002).

Die Makromoleküle der EZM werden von den in ihr eingebetteten Zellen synthetisiert, wobei im Bindegewebe vornehmlich Fibroblasten diese Aufgabe übernehmen (Weinl 2007/ 2009). Die EZM besteht aus einer komplexen Mischung aus Proteinen und Glukosaminoglykanen (GAG). Nahezu alle Proteine sind dabei durch zahlreiche kurze Kohlenhydratketten stark glykosyliert. Sie steuern die Anordnung weiterer Komponenten der EZM sowie die Anheftung der Zellen an die Matrix und beeinflussen dadurch Bewegung und Gestalt der Zellen (Weinl 2007/ 2009). Kollagen, das häufigste Protein, macht bis zu 90% der Knochenmatrixproteine aus. Proteine der Kollagenfamilie lassen sich in 17 Subtypen gliedern und stellen den faserförmigen Bestandteil der Matrix dar. Es handelt sich dabei um homo- oder heterotrimere Moleküle, welche aus verschiedenen α -Ketten bestehen (Kern et al. 2001). Ein weiterer bekannter Vertreter der EZM-Proteine ist Fibronectin, welches Kollagenfibrillen und andere Moleküle der EZM binden kann und als Adhäsionsmolekül für verschiedene Zellen während der Migration dient (Deutzmann 2007). Die GAG sind Kohlenhydrat-Polymere, die üblicherweise an ein Kernprotein gebunden sind und so ein Proteoglykan bilden. Durch ihre negative Gesamtladung ziehen sie positiv geladene Ionen, z.B. Natriumionen, an, was entsprechend eines osmotischen Ausgleichs eine Wassereinlagerung zur Folge hat. So bleiben EZM und die darin eingebetteten Zellen hydriert (Alberts B

2002). Der häufigste Kohlenhydratrest in Proteoglykanen ist N-Azetylglykosamin. Weitere Beispiele für Proteoglykane sind Heparansulfat und Keratansulfat. Abbildung 1 zeigt den Aufbau der EZM mit den oben beschriebenen Bestandteilen:

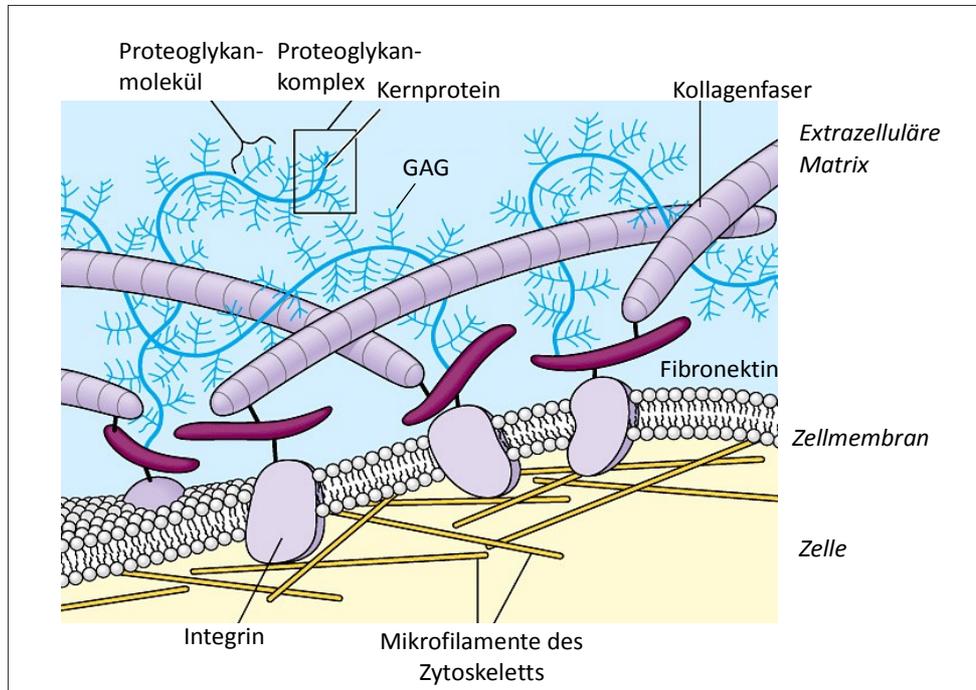


Abbildung 1: Aufbau der extrazellulären Matrix (EZM).

Die EZM besteht überwiegend aus faserigen Bestandteilen wie z.B. Kollagenen und Polysacchariden, hauptsächlich Glukosaminoglykane (GAG), die meist an ein Kernprotein gebunden sind und so die Proteoglykane bilden. Die Kollagenfasern interagieren über Komponenten wie Fibronektin mit Integrinen in der Plasmamembran und sind so mit dem Zytoskelett der Zelle verbunden. Abbildung modifiziert mit freundlicher Genehmigung von Pearson Education.

Die Funktion der extrazellulären Matrix besteht nicht nur darin, Zellen einen strukturellen Rahmen zu geben, sondern die Matrix spielt auch eine dynamische Rolle bei der Wechselwirkung mit umgebenden Zellen. Durch die Interaktion der Zellen mit der EZM werden wichtige Prozesse wie z.B. Proliferation, Differenzierung und Signalwege für Überlebenssignale reguliert. Sowohl normale Entwicklungsprozesse als auch die Aufrechterhaltung der Funktionalität des Organismus benötigen den ständigen Auf- und Abbau der EZM (Stetler-Stevenson 2008).

2.2 Matrix-Metalloproteasen (MMP)

2.2.1 Vorkommen und Aufgaben der MMP

Der Umbau der extrazellulären Matrix ist ein essentieller Vorgang während Entwicklungsprozessen, Morphogenese und Gewebeumbau. Obwohl verschiedene Proteasefamilien daran beteiligt

sind, stellen die Mitglieder der MMP-Familie, auch Matrixine genannt, die hauptverantwortlichen Enzyme dar. Matrix-Metalloproteasen sind zinkabhängige Endopeptidasen und gehören neben anderen Familien, wie Serralysine oder Astazine, zur Superfamilie der Metzinkine. Die MMP wurden zuerst 1962 in Vertebraten, später auch in Invertebraten wie Seeigeln oder dem Wurm *C. elegans* sowie Pflanzen beschrieben. Man unterscheidet die MMP von anderen Endopeptidasen durch ihre Abhängigkeit von Metallionen als Kofaktoren (Das et al. 2003). Nahezu alle Bestandteile der EZM sind Substrate der Mitglieder dieser Familie. Sie sind beteiligt an physiologischen Prozessen wie z.B. der Embryonalentwicklung, Morphogenese von Organen, Wundheilung und dem Menstruationszyklus (Brew et al. 2000). Neben ihrer Hauptaktivität, dem Abbau der Komponenten der EZM, werden diese Proteasen auch für die Prozessierung bioaktiver Moleküle wie z.B. Oberflächenrezeptoren oder für die Apoptose relevante Liganden (FAS-Ligand), Chemokine und Zytokine benötigt (li et al. 2006; Van Lint und Libert 2007).

Die Expression dieser Proteasen ist im physiologischen Zustand relativ niedrig und streng reguliert. Auf der Transkriptionsebene geschieht dies über Wachstumsfaktoren, Zytokine, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte (Nagase und Woessner 1999). MMP sind hauptsächlich an der Zelloberfläche und im extrazellulären Raum aktiv. Ihre Aktivität wird dort durch zwei Faktoren reguliert: Einerseits werden die MMP als Proenzyme sezerniert, die erst einer proteolytischen Prozessierung bedürfen, um aktiv zu werden, andererseits werden sie durch endogene Inhibitoren gebunden und inaktiviert. Für letzteren Prozess ist das α 2-Makroglobulin in Blut und Sekreten verantwortlich und Proteine der TIMP-Familie im Gewebe (Nagase und Woessner 1999). Eine Störung des Gleichgewichts aus Produktion der aktiven Proteasen und deren Inhibition resultiert in Krankheiten, die mit unkontrolliertem Auf- oder Abbau der EZM assoziiert sind: Entzündungsreaktionen und unkontrolliertes Zellwachstum oder Migration der Zellen ist die Folge (Malemud 2006).

2.2.2 Struktur der MMP

In Menschen gibt es 24 MMP-Gene, wovon das MMP-23 Gen dupliziert ist; somit gibt es 23 verschiedene Mitglieder der humanen MMP-Familie. Historisch werden die Mitglieder der MMP-Familie entweder nach ihrem evolutionärem Hintergrund oder ihrer Substratspezifität in fünf Klassen eingeteilt: Kollagenasen (z.B. MMP-1 und -8), Gelatinasen (MMP-2 und -9), Stromelysine (z.B. MMP-3 und -10), Matrilysine (z.B. MMP-7) und membrangebundene MMP (MT-MMP). Eine neuere Klassifizierung erfolgt über den Aufbau bzw. die Struktur der Proteasen, wobei acht

Untergruppen bekannt sind:

GPI-verankert, mit nur einer Hämopexin-Domäne, Gelatine-bindend, Minimale Domänenstruktur, Furin-aktiviert, TypII-Transmembran-Proteine, Vitronektin-ähnliche Domäne, Transmembranproteine (Egeblad und Werb 2002).

Die untenstehende Abbildung (Abb. 2) zeigt den schematischen Aufbau der Mitglieder der MMP-Familie:

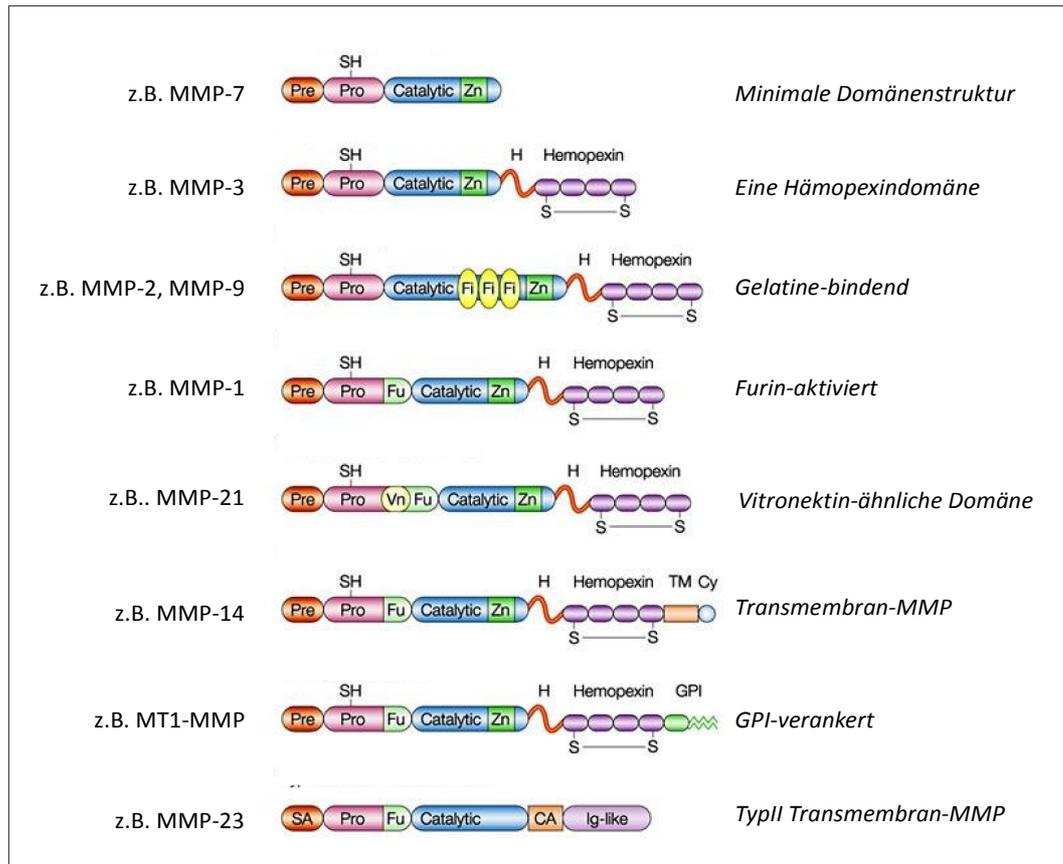


Abbildung 2: Proteinstruktur der MMP-Familie.

Die Mitglieder der MMP-Familie werden nach ihrer Struktur in acht Unterfamilien eingeteilt: MMP mit minimaler Domänenstruktur, GPI-verankert, mit nur einer Hämopexin-Domäne, Gelatine-bindend, Furin-aktiviert, mit Vitronektin-ähnlicher Domäne, Transmembran-MMP und TypII-Transmembran-MMP. Abkürzungen: *Pre*: Präpeptid, *Pro*: Propeptid, *Fi*: Fibronektin-TypII-Motiv, *Zn*: Zinkbindedomäne, *Fu*: Furin, *Vn*: Vitronektin, *TM*: Transmembran, *Cy*: Zytoplasmatisch. Abbildung modifiziert nach Egeblad 2002.

Neben der sekretorischen Signalsequenz (*Pre*), dem regulatorischen Propeptid mit ungefähr 80 Aminosäuren (*Pro*) und der katalytischen Domäne mit ca. 170 Aminosäuren (*catalytic*) haben die MMP eine C-terminale Hämopexin-Domäne (PEX). Ausnahmen hierfür bilden MMP-7, -23 und -26, die Mitglieder der Minimale-Domäne Unterfamilie. Zwei Gelatinasen, Gelatinase-A (MMP-2) und Gelatinase-B (MMP-9) haben drei Wiederholungen des Fibronektin-TypII-Motivs (*Fi*), welches an der Proteolyse von denaturiertem Kollagen, Typ IV-Kollagen und Elastin beteiligt

ist (Murphy und Nagase 2011). Das Zinkbindungsmotiv HEXXHXXGXXH in der katalytischen Domäne und das „Cystein-Switch“ Motiv PRCGXPD im Propeptid sind gemeinsame Strukturen aller MMP (Bode 2003). Drei Histidinreste im Zinkbindungsmotiv interagieren mit dem katalytischen Zink. Die Wechselwirkung zwischen Cystein und Zn^{2+} hält das Zymogen inaktiv. In einigen der Proteasen, z.B. bei der Kollagenase-Unterfamilie, ist die PEX-Domäne an der Substraterkennung und -spezifität beteiligt (Overall 2002). Diese C-terminale Domäne hat strukturelle Ähnlichkeit mit dem Serumprotein Hämpexin, woher sie auch ihren Namen hat. Sie enthält vier β -Propeller-Strukturen, die eine große flache Oberfläche bilden, welche in Protein-Protein-Wechselwirkungen involviert ist (Knauper et al. 1997).

Obwohl der Großteil der MMP sezernierte Proteasen sind, gibt es Ausnahmen: Proteine mit einem GPI-Anker (MT1-MMP), Transmembranproteine oder TypII-Transmembran-Proteine (MMP-23). Diese werden allgemein in der Gruppe der MT-MMP zusammengefasst.

2.2.3 Aktivierungsmechanismus der MMP

Die Aktivierung der Zymogene ist ein mehrstufiger Prozess. MMP werden als latente Zymogene sezerniert und erlangen ihre katalytische Aktivität erst im extrazellulären Raum. Einige der Proteasen werden intrazellulär, einige wenige an der Zellmembran, in vollständig aktive Enzyme prozessiert. Im Proenzym ist der Zugang zum katalytischen Zentrum durch die Bindung eines Cysteinrests an das Zinkatom im aktiven Zentrum blockiert. Der Aktivierungsmechanismus der MMP, auch „Cystein-Switch-Modell“ genannt, beinhaltet eine proteolytische Spaltung der Propeptidregion, die zu einer Destabilisierung der Interaktion von Cystein und Zinkion führt (Murphy et al. 1999). Nicht-proteolytische Substanzen wie z.B. 4-Aminophenyl-Quecksilberazetat (APMA), SDS, aber auch andere Proteasen können ebenso den sogenannten „Cystein-Switch“ auslösen. Die schrittweise Aktivierung der Proteasen ist in Abb. 3 gezeigt.

Das „Cystein-Switch-Modell“ beschreibt den ersten Schritt der Aktivierung: Die Bindung des intramolekularen Komplexes aus dem Cys73 in der Propeptiddomäne und dem Zinkion (Zn^{2+}) in der katalytischen Domäne wird getrennt. Dieser Komplex blockiert zuvor den Zugang zur aktiven Stelle des Enzyms. Die Aminosäuresequenz, die den kritischen Cysteinrest und die das Zinkatom bindenden Histidinreste umgibt, ist in allen MMP hoch konserviert (Chow et al. 2007). Auch Veränderungen des pH-Wertes haben Einfluss auf die Aktivierung der proMMP. Es konnte gezeigt werden, dass eine Ansäuerung und eine anschließende Neutralisierung des Milieus proMMP-9 aktivieren kann (Tjaderhane et al. 1998). Die Prodomäne der MMP wird autokataly-

tisch von Proteasen abgespalten und das Zinkion durch ein Wassermolekül ersetzt um die Enzymkatalyse fortschreiten zu lassen (Van Wart und Birkedal-Hansen 1990). Eine Aktivierung des 43 kDa großen proMMP-1 durch APMA führt erst zu einer nur schwach aktiven MMP-1, woraus anschließend durch die Prozessierung durch MMP-1 oder MMP-3 die vollständig aktive Form mit 41 kDa entsteht (Nagase et al. 1992).

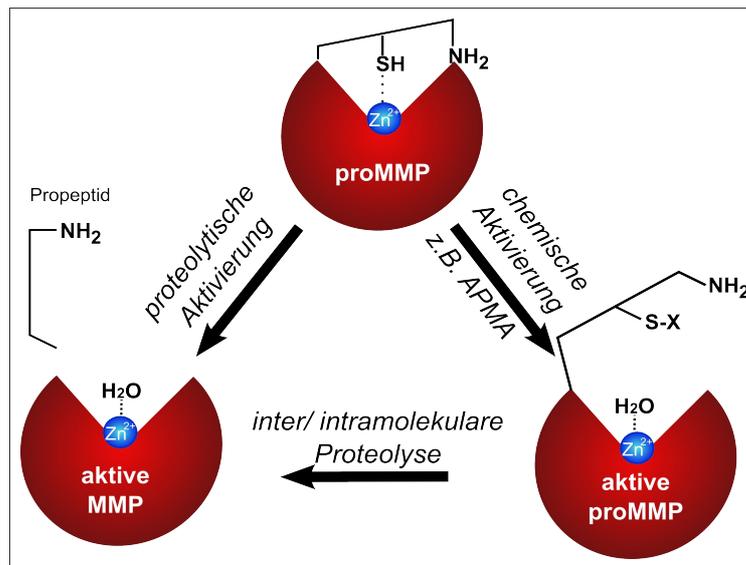


Abbildung 3: Aktivierungsmechanismen der MMP.

Es sind zwei Aktivierungswege möglich. Die proteolytische Aktivierung durch andere Proteasen (z.B. für proMMP-2 der MT1-MMP/TIMP Komplex) geschieht durch das Abspalten des autoinhibitorischen Propeptids (schwarze Linien) und resultiert in einer verkürzten, aktiven MMP-2 (linker Weg). Oxidativer Stress oder chemische Verbindungen wie SDS und APMA (Aminophenyl-Quecksilberazetat) stören die Bindung des katalytischen Zinks (blaue Kugel) mit dem Cysteinrest im Propetid und führen zu einer aktiven proMMP mit voller Länge (rechter Weg). Eine aktive proMMP kann auch durch unvollständige Proteolyse durch eine andere Protease entstehen. Eine weitere proteolytische Prozessierung ist oft zur vollständigen Aktivierung nötig (inter/intramolekulare Proteolyse, unterer Pfeil).

Autoaktivierung ist ein zusätzlicher Mechanismus zur Aktivierung einiger MMP (Stetler-Stevenson et al. 1989). MMP-11, MMP-28 und MT-MMP enthalten ein konserviertes RXXRKR-Motiv, ein furinähnliches Enzym-Erkennungsmotiv zwischen ihrer Pro- und der katalytischen Domäne und können intrazellulär im Golgi-Netzwerk aktiviert werden (Marchenko und Strongin 2001). Andere, bereits aktive MMP oder verschiedene Serinproteasen können darüber hinaus latente proMMP an der Zelloberfläche oder perizellulär aktivieren.

Für proMMP-2 und proMMP-9 ist ein zusätzlicher, einzigartiger Aktivierungsmechanismus bekannt: Das membrangebundene MT1-MMP bindet proMMP-2 über die Interaktion beider C-terminaler Domänen. Bindet MT1-MMP zusätzlich die negativ geladene C-terminale Domäne von TIMP-2 über elektrostatische Wechselwirkungen, wird proMMP-2 aktiviert (Zucker et al. 1998).

ProMMP-9 kann dagegen von MMP-1, MMP-2 und MMP-26 aktiviert werden (Fridman et al. 1995). MMP-7 aktiviert proMMP-9, welches an TIMP-1 gebunden ist und erhöht kurzzeitig die gelatinolytische Aktivität von proMMP-2 im Komplex mit TIMP-2 (von Bredow et al. 1998). Die Aktivierungsmechanismen der MMP sind demnach komplex und immer noch nicht vollständig erforscht. Im folgenden Absatz werden die physiologischen Inhibitionsmechanismen der MMP erläutert.

2.3 *Tissue inhibitors of metalloproteases (TIMP)*, die gewebespezifischen Inhibitoren der MMP

2.3.1 Vorkommen und biologische Funktion

Die Proteine der TIMP-Familie sind die physiologischen gewebespezifischen Inhibitoren der MMP. Sie werden im Menschen von vier paralogen Genen kodiert, Homologe wurden sowohl bei Vertebraten als auch bei Invertebraten nachgewiesen (Bode 2003). Die korrespondierenden Proteine bestehen aus 184 bis 194 Aminosäuren. Neben der inhibitorischen Rolle für Mitglieder der MMP-Familie, die im Folgenden genauer beschrieben wird, konnte für TIMP-Proteine auch eine wachstumsfaktorähnliche Aktivität und eine inhibitorische Aktivität auf Angiogenese nachgewiesen werden (Willenbrock et al. 1995; Gomez et al. 1997).

Im menschlichen Organismus besteht die TIMP-Familie aus vier Mitgliedern, TIMP-1 bis -4. Während TIMP-1, -2 und -4 sezernierte Proteine sind und ihre Aktivität hauptsächlich im extrazellulären Raum oder an der Zelloberfläche entfalten, ist TIMP-3 ein matrixassoziiertes Protein, das über seinen C-Terminus mit Heparansulfaten der EZM interagiert (Lee et al. 2007). Die vier Proteine besitzen zu 40% homologe Aminosäuresequenzen. Die Divergenz in den Sequenzen der vier TIMP Proteine legt nahe, dass die einzelnen Vertreter unterschiedliche Funktionen erfüllen (Brew et al. 2000). Obwohl TIMP-1 bis -4 nahezu alle Mitglieder der MMP-Familie binden können und somit Breitspektrum-Inhibitoren der MMP-Familie darstellen, gibt es deutliche Unterschiede sowohl in der Fähigkeit die MMP in ihrer Aktivität zu hemmen, als auch Unterschiede in der Spezifität für einzelne MMP. So sind beispielsweise TIMP-2 und -3 effektive Inhibitoren von membrangebundenen MMP, während TIMP-1 die Aktivität dieser Unterfamilie nicht beeinflusst (Brew et al. 2000). TIMP-1 verfügt im Vergleich zu den anderen Inhibitoren über ein eingeschränktes Substratspektrum. TIMP-1 ist der potenteste Inhibitor für MMP-3 und MMP-7, welche von TIMP-2 und -3 nur sehr schwach gehemmt werden. TIMP-3 kann zusätzlich andere Pro-

teasen, die Mitglieder der ADAM und ADAM-TS Familie, hemmen, deren bekanntester Vertreter wohl TACE, das *TNF- α converting enzyme* ist (Brew und Nagase 2010).

TIMP-Proteine binden die MMP in einer 1:1 Stöchiometrie und inhibieren deren Proteaseaktivität. Mehrere Studien haben gezeigt, dass TIMP zelluläre Invasion, Tumorgenese, Metastasierung und Angiogenese reduzieren (Gomez et al. 1997), wobei diese Aktivitäten nur teilweise auf die Inhibition verschiedener MMP zurückgeführt wurden. Tatsächlich wurde TIMP-1 bei seiner Entdeckung als Faktor identifiziert, der das Wachstum der erythroiden Knochenmarks-Vorläuferzellen fördert (EPA-Aktivität, *erythroid-potentiating activity*); später wurde ein wachstumsfördernder Einfluss auf Keratinozyten und mehrere andere Zelltypen nachgewiesen (Hayakawa et al. 1992; Chesler et al. 1995). Die Expression der Proteine der TIMP-Familie ist, wie die der MMP, während des Umbaus von Gewebe streng reguliert, um ein Gleichgewicht im Metabolismus der extrazellulären Matrix aufrecht zu erhalten. Ist dieses Gleichgewicht gestört, kommt es zu Erkrankungen, die mit unkontrolliertem Auf- und Abbau der Matrix assoziiert sind, z.B. Arthritis, Krebs, kardiovaskuläre Erkrankungen, Nephritis und Fibrose (Nagase und Woessner 1999). Die Gruppe um Chesler zeigte 1995, dass die Inhibition verschiedener MMP und die wachstumsfaktorähnliche Aktivität von TIMP-1 unabhängige Aktivitäten sind und gaben damit einen ersten Hinweis darauf, dass die beiden Domänen von TIMP-1, N-terminale und C-terminale Domäne, unterschiedliche Funktionen haben (Chesler et al. 1995). Der genaue Aufbau des in dieser Arbeit untersuchten TIMP-1 wird im folgenden Kapitel genauer dargestellt.

2.3.2 Struktur der Proteine der TIMP-Familie

TIMP-Proteine besitzen zwei Domänen, eine N-terminale Domäne (NTD), die ungefähr zwei Drittel des Gesamtproteins ausmacht, und eine C-terminale Domäne (CTD). Die NTD besteht aus ungefähr 125 Aminosäuren, die CTD ist mit ca. 65 Aminosäuren deutlich kleiner (Murphy et al. 1991). Jede Domäne wird durch drei Disulfidbrücken stabilisiert. Die dreidimensionale Struktur der TIMP-Proteine konnte über kristallographische Analysen und magnetische Kernresonanzstudien aufgeklärt werden und ist in der unten stehenden Abbildung (Abb. 4) für TIMP-1 gezeigt. Die TIMP-Moleküle besitzen insgesamt eine keilförmige Struktur. Das N-terminale Segment besteht dabei aus einem β -Fass mit fünf β -Faltblättern. Eine zentrale helikale Region dient als Verbindungsregion der beiden Domänen. Die C-terminale β -Struktur setzt sich aus zwei parallelen und zwei antiparallelen Strängen sowie einer kleinen α -Helix zusammen (Brew et al. 2000). Eine genauere Untersuchung der Struktur zeigte, dass das β -Fass in der NTD relativ unbeweglich ist.

Das N-terminale Ende, welches über die Disulfidbrücken der Reste Cys1-Cys72 und Cys3-Cys101 an das β -Fass gebunden ist, sowie die Schleife zwischen den β -Strängen A und B sind im Gegensatz dazu relativ flexibel (Gomis-Ruth et al. 1997; Brew et al. 2000; Brew und Nagase 2010).

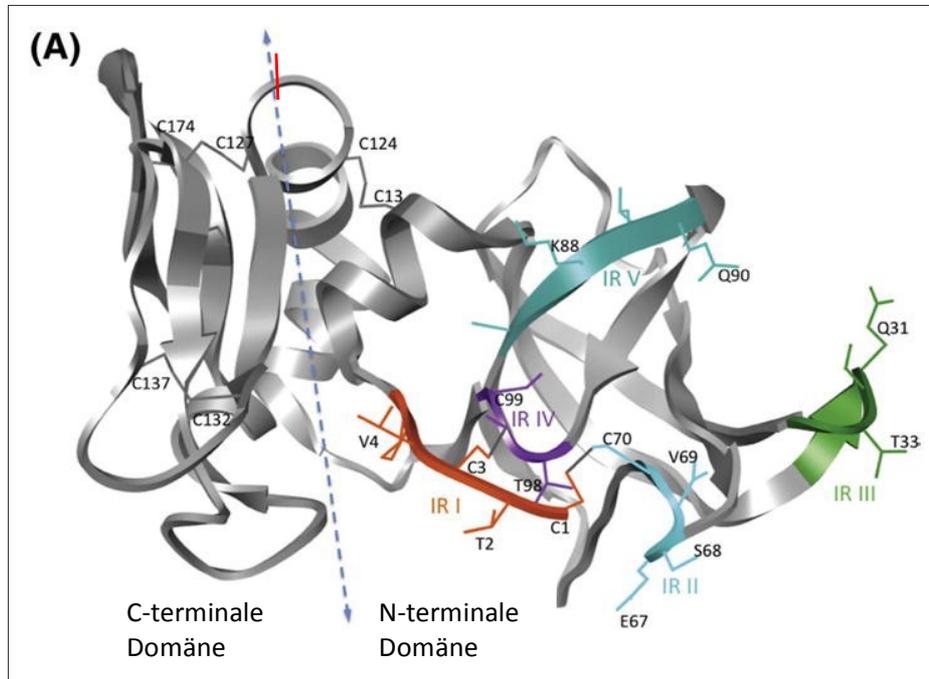


Abbildung 4: Struktur von TIMP-1.

Die Bandstruktur von TIMP-1 zeigt die Lokalisation der Disulfidbrücken, der beiden Domänen und der Regionen IR I-V, die mit den MMP in Wechselwirkung treten (IR= Interaktionsregionen). Dabei werden bis zu zwei Drittel der Wechselwirkungen zwischen MMP und TIMP-1 durch die IR I und die IR II hergestellt, welche durch die Disulfidbrücke zwischen Cys1- Cys70 zu einer benachbarten Region zusammengeführt werden. Die eingezeichnete Linie entstammt dem Originalbild und soll den Übergang zwischen NTD und CTD ausweisen. Zur Verdeutlichung der Grenze zwischen den Domänen ist mit dem kurzen, roten Strich die Aminosäure 125 hervorgehoben, die als die letzte, zur NTD gehörige Aminosäure gilt. Abbildung modifiziert nach Brew und Nagase 2010.

2.3.3 Spezifische Struktur von TIMP-1 und Interaktion mit den MMP

Die Bindungskante von TIMP-1 wird von mindestens fünf verschiedenen Kettenteilen gebildet, bestehend aus den ersten fünf Aminosäuren Cys1- Pro5 und zwei flankierenden Schleifen aus N- sowie C-terminaler Domäne auf beiden Seiten. Im Komplex mit der MMP blockiert das keilförmige TIMP-1 mit dieser Kante die Spalte des aktiven Zentrums der MMP. Die Bindung erfolgt über die gesamte Länge der Spalte hinweg (Gomis-Ruth et al. 1997). Abb. 5 stellt diese wichtige Interaktionsregion des Proteins TIMP-1 mit den MMP dar. Die ersten fünf Aminosäuren von TIMP-1, Cys1 bis Pro5, binden dabei das aktive Zentrum der MMP. Diese Wechselwirkung ist vergleichbar mit einer Substrat-Enzym-Bindung. Es werden dabei fünf intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet. Daher werden die beteiligten Aminosäuren der Protease

nach Schechter und Berger 1967 mit den für eine Enzym-Substrat-Reaktion üblichen Bezeichnungen benannt. „C“ steht dabei für das katalytische Zentrum des Enzyms, im Fall von TIMP-1 das Cys1. Die an der Bindung beteiligten Reste von TIMP-1 werden in C-terminaler Richtung von „C“ mit P1, P2 etc. und in N-terminaler Richtung mit P1', P2' etc. benannt. Die korrespondierenden Reste der MMP werden mit S1, S2 sowie S1', S2' benannt (Bode 2003; Brew und Nagase 2010).

Außerdem sind die Reste Ser68-Val69 an der Interaktion mit der Protease beteiligt, welche ebenfalls direkten Kontakt mit dem aktiven Zentrum der Protease haben.

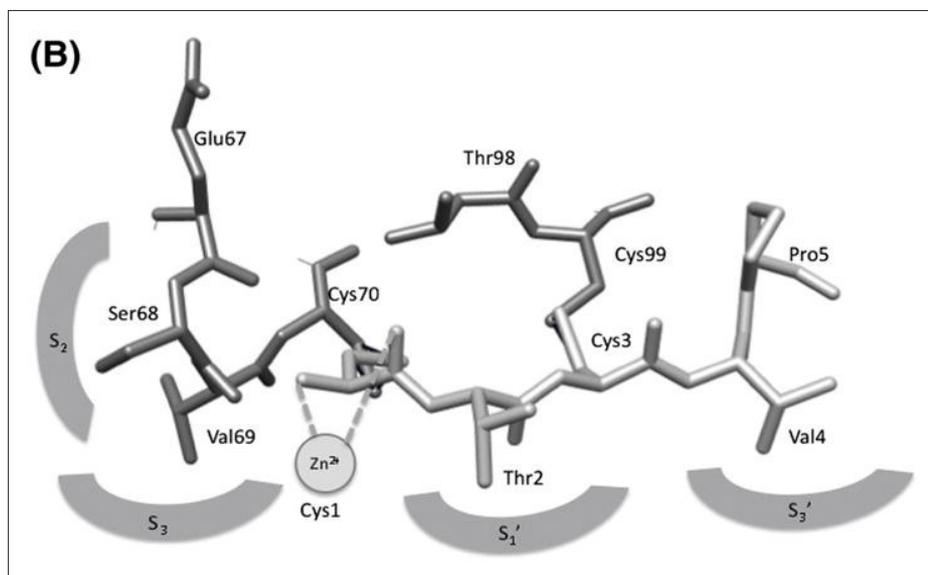


Abbildung 5: Zentraler Teil der TIMP-1-MMP-Binderegion.

Der Großteil der Bindungen zwischen MMP und TIMP wird durch die sogenannte MMP-Bindungskante in TIMP hergestellt. Diese wird in TIMP-1 hauptsächlich durch die ersten fünf Aminosäuren (Cys1-Pro5) sowie durch die Reste Ser68 und Val69 gebildet. Thr2 bindet die S1'-MMP-Spezifitätstasche, Ser68 die S2-Stelle, Val69 die S3-Stelle, Val4 die S3'-Stelle der MMP. Cys1 tritt mit dem katalytischen Zn²⁺-Atom der MMP in Wechselwirkung. Abbildung aus Brew und Nagase, 2010.

Cys1 befindet sich bei dieser Wechselwirkung direkt über dem katalytischen Zink der Protease. Sowohl die N-Aminogruppe als auch das Sauerstoffatom der Carbonylgruppe des Cysteins interagieren mit dem Zinkion und verdrängen dabei das Wassermolekül der Protease, welches das Enzym für die Hydrolyse von Peptidbindungen benötigt (Murphy et al. 1999).

Die unten stehende Abbildung (Abb. 6) stellt die Wechselwirkung zwischen TIMP-1 und MMP-3 in der Übersicht dar. Das Modell von Brew verdeutlicht bildlich, dass zwei Drittel aller Kontakte zwischen TIMP-1 und MMP über die NTD von TIMP-1 hergestellt werden und dabei sechs verschiedene Regionen des TIMP-1 beteiligt sind. Dabei entstammen vier Bindungsregionen der NTD und die anderen beiden der CTD von TIMP-1. Die so gebildete MMP-Bindungsregion, auch

Bindungskante genannt, war Gegenstand verschiedener Studien, die im folgenden Kapitel zusammengefasst werden.

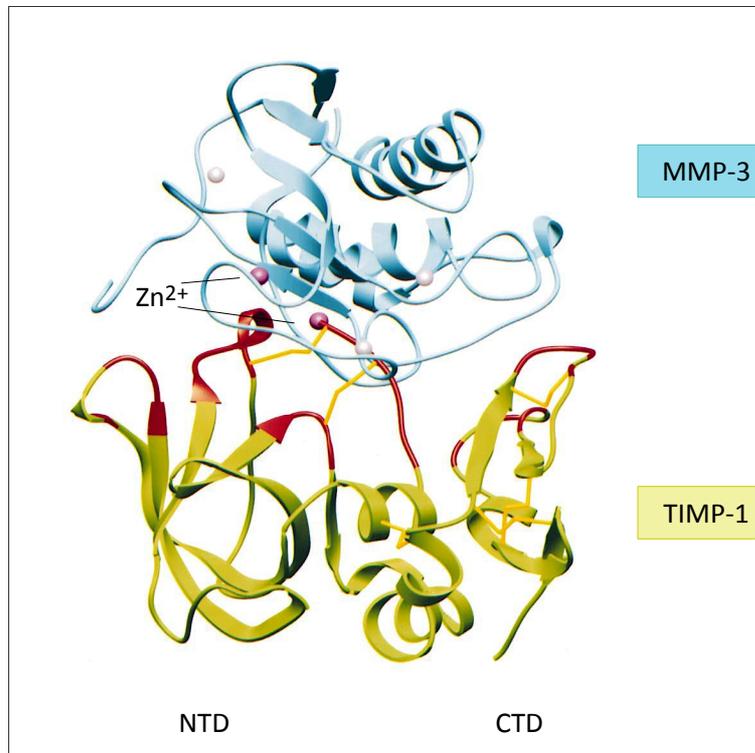


Abbildung 6: Kristallographisches Bandstrukturmodell des TIMP-1-MMP-3-Komplexes.

TIMP-1 ist gelb, MMP-3 blau dargestellt. Durch eine rote Markierung sind die Regionen des TIMP-1-Proteins gekennzeichnet, die 5 Å oder weniger von der Protease entfernt liegen. Die Positionen von Zinkionen sind durch purpurfarbene Kugeln verdeutlicht. Abbildung modifiziert nach Brew, 2000.

2.3.4 Mutationsstudien an TIMP-1 - eine Charakterisierung der N-terminalen Domäne (NTD)

Wie bereits im letzten Kapitel beschrieben, werden 60-70% aller Kontakte zwischen der Protease und dem Inhibitor TIMP-1 von der NTD des TIMP hergestellt. Die NTD von TIMP-1 behält nach einer Expression ohne den C-terminalen Teil des Proteins die inhibitorische Aktivität gegen MMP (Murphy et al. 1991). Die Gruppe um Murphy exprimierte nur die drei N-terminalen Schleifen mit den Aminosäuren 1-126 in Maus-Myelomzellen und konnten zeigen, dass die verkürzte TIMP-1 Mutante, N-TIMP-1, sowohl aktive MMP-3 als auch MMP-9 inhibieren kann. Außerdem wurde die Aktivität von MMP-7 und einer (damals noch unklassifizierten) Kollagenase stark gehemmt. Lediglich die Affinität zu MMP-2 war reduziert.

Die zweite Aminosäure, an der Stelle P1', ist in jedem Protein der TIMP-Familie entweder ein Threonin oder ein Serin. Die Seitenkette dieser Aminosäure erstreckt sich in die S1'-Tasche der MMP, ohne diese Tasche dabei vollständig auszufüllen (Brew et al. 2000). Im Komplex aus

TIMP-1 und MMP-3 bindet Thr2 an Glu202 der MMP und verdrängt dabei ein Wassermolekül, welches eine entscheidende katalytische Rolle für die Protease spielt. Die Biologie dieses zweiten Aminosäurerests ist deshalb entscheidend für die Bindungsaffinität und -spezifität des Inhibitors zur jeweiligen Protease. Thr2 in TIMP-1 war Gegenstand vieler Studien (Huang et al. 1997; Meng et al. 1999) und seine Wichtigkeit für die Spezifität der Bindung wurde dabei kontrovers diskutiert. Huang zeigte, dass das Ersetzen von Thr2 durch andere Aminosäuren zu TIMP-1 Mutanten führt, die spezifisch zwischen verschiedenen MMP unterscheiden. 1999 analysierte die Gruppe von Meng, dass Thr2 einen maßgeblichen Einfluss auf drei MMP hat: MMP-1, MMP-2 und MMP-3. Die Mutation von Threonin zu Alanin (T2A) hatte eine 100-fache Verringerung der Aktivität gegen die katalytische Domäne von MMP-3 zur Folge. Die Affinität des Inhibitors wurde in der Publikation mit der Inhibitionskonstante k_i angegeben, die die Dissoziationskonstante des Komplexes aus Enzym und Inhibitor darstellt. Je höher der k_i -Wert, desto schwächer die Bindung zwischen Protease und Inhibitor. Im Vergleich zu Wildtyp-TIMP-1 stieg der k_i -Wert für MMP-3 von 1,1 auf 2090 nM, während der für MMP-1 oder -2 nur von 1,1 bzw. 1,9 auf 308 bzw. 126 nM stieg. Die T2A-Mutante konnte also nach dem Austausch der zweiten Aminosäure spezifisch MMP-1 und -2, nicht aber MMP-3 inhibieren (Huang et al. 1997). Die Struktur dieses Rests bestimmt somit maßgeblich die Bindungsaffinität zur und -spezifität für die jeweilige Protease. Negativ geladene Seitenketten an dieser Stelle, wie z.B. in Asparagin oder Glutamin, verringern die Bindungsaffinität deutlich (Murphy und Nagase 2008).

Entscheidend für die vorliegende Arbeit sind darüber hinaus zwei weitere Mutationsstudien an TIMP-Proteinen. Wingfield und Stetler-Stevenson analysierten eine TIMP-2 Mutante mit einem zusätzlichen Alanin vor dem ersten Cystein (Ala-TIMP-2) und konnten zeigen, dass die inhibitorische Aktivität dieser TIMP-2 Mutante gegen MMP-2 um das Vierfache verringert ist. Insgesamt zeigte diese Mutante nur noch sehr geringe MMP-Inhibition (Wingfield et al. 1999). Die Gruppe zog daraus die Schlussfolgerung, dass der Aminoterminus des Cys1 für die Entfaltung der inhibitorischen Aktivität gegen MMP ungebunden sein muss. Nur so kann die Aminogruppe mit dem Zinkion der MMP interagieren und dessen proteolytische Aktivität hemmen. Zusätzlich zu der Wechselwirkung über die beiden N-terminalen Domänen der Proteine kann TIMP-2 MMP-2 aber auch über die Interaktion mit einer C-terminalen Stelle der Protease binden. Diese Bindung war in der oben genannten Studie nicht vollständig verhindert, so dass diese Ala-TIMP-2 Mutante noch einen Komplex mit proMMP-2 bilden konnte. Die Interaktion fand dabei über die Propellerstruktur in der PEX-Domäne des MMP statt und war sehr stabil. Dies bewies eine hochaffi-

ne Wechselwirkung der beiden Moleküle. Die Bindung hatte jedoch keinen Einfluss auf die Interaktion der Protease mit seinem Substrat, wie z.B. Peptidsubstrate oder Gelatine. Die Arbeitsgruppe um Wingfield lieferte mit ihren Ergebnissen einen eindeutigen Hinweis auf MMP-unabhängige Funktionen von TIMP-2; die Ala-TIMP-2 Mutante behielt ihre wachstumsfördernde Aktivität auf Fibroblasten und lieferte damit den definitiven Beweis für TIMP-Aktivitäten, die unabhängig von der Inhibition der Proteolyse durch MMP-Proteine sind.

2.4 Das Renalzellkarzinom (RCC)

Das Renalzellkarzinom (*renal cell carcinoma*, RCC), auch als Hypernephrom bekannt, ist ein von den proximalen Tubuluszellen der Niere ausgehender maligner Tumor. Etwa 90% der Nierentumore sind Nierenzellkarzinome. Diese stellen ca. 3% aller bösartigen Tumoren im Erwachsenenalter, wobei die Inzidenz etwa 9 auf 100.000 Einwohner beträgt und Männer doppelt so häufig betroffen sind wie Frauen. Die operative Entfernung des Tumors ist für eine Heilung immer unumgänglich (Ljungberg et al. 2007). Bei Tumorherden mit einem Durchmesser von unter 4 cm ist eine Nierenteilresektion möglich, bei größeren Tumoren muss eine radikale Tumornephrektomie erfolgen, wobei die betroffene Niere mit einem Teil des umliegenden Fettgewebes entfernt werden muss. Wenn der Tumor auf das Nierenparenchym beschränkt ist, beträgt die Fünf-Jahre-Überlebensrate 60-70%; im Falle einer Metastasierung fällt die Überlebensrate deutlich niedriger aus. Das Nierenzellkarzinom ist in der Regel nicht durch eine Strahlen- oder Chemotherapie beeinflussbar, obwohl in manchen Fällen eine Immuntherapie mit IFN- α eine Besserung gezeigt hat (Ljungberg et al. 2007). Wächst der Tumor nach der Operation erneut, ist die Prognose für den Patienten im Allgemeinen sehr schlecht.

Eine Klassifizierung des Renalzellkarzinoms findet durch seinen Ursprung statt: Am häufigsten findet sich das konventionelle Nierenzellkarzinom, das oft auch als klarzelliges Nierenkarzinom bezeichnet wird. Weniger häufig treten das chromophile (papilläre), das chromophobe und am seltensten das Ductus-Bellini-Karzinom (Sammelrohrkarzinom) auf.

2.5 MMP in der Tumorgenese und ihre Rolle im Renalzellkarzinom

Auf- und Abbau der EZM spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Tumoren sowie bei deren Wachstum und Metastasierung (Egeblad und Werb 2002). Eine fehlregulierte Expression von Proteinen der MMP- und TIMP-Familie ist eine wichtige Voraussetzung für den metastatischen Prozess vieler verschiedener Tumorerkrankungen, wie auch im Renalzellkarzinom (Hem-

merlein et al. 2004).

Direkte Beweise für die Beteiligung der MMP in der Tumorprogression konnten durch Xenograft-Experimente gewonnen werden, in denen Krebszellen mit veränderter MMP- oder TIMP-Expression verwendet wurden. Weitere Erkenntnisse wurden aus Versuchen mit knock-out Mäusen und der Analyse zahlreicher humaner Patientenproben auf ihre MMP und TIMP-Expression hin gewonnen. Dabei konnte bei fast jedem humanen Tumortyp eine hohe MMP-Expression mit einer schlechten Prognose für den Patienten assoziiert werden (Blavier et al. 1999; Cousens et al. 2002; Egeblad und Werb 2002). Während einige MMP, z.B. MMP-7, von den Tumorzellen selbst produziert werden, entstammen andere (z.B. MMP-2 und -9) oft den umgebenden Stromazellen, wie z.B. Fibroblasten, Myofibroblasten, Immunzellen und Endothelzellen. Die Proteasen begünstigen das Tumorwachstum durch eine Erleichterung von Migration und Invasion und fördern somit letztendlich Metastasierung und Angiogenese. Diesen Effekt erreichen sie durch das Spalten verschiedener Substrate, die nicht ausschließlich Bestandteile der EZM umfassen, sondern auch Wachstumsfaktoren, Rezeptortyrosin-Kinasen, Zelladhäsionsmoleküle und andere Proteasen (Curran und Murray 2000). Die Rolle der Proteasen bei verschiedenen Prozessen der Tumorentstehung und -progression ist in Abb. 7 dargestellt.

In der Entwicklung eines Tumors benötigt der Primärtumor zunehmend Platz und der Nährstoffbedarf steigt. Der Umbau der EZM stellt eine wichtige Voraussetzung für die Ausbreitung des Tumors dar und auch der Prozess der Angiogenese ist abhängig vom Umbau der EZM. Das spätere Stadium der Metastasierung, welches auch eine phänotypische Veränderung der Zellen beinhaltet, ist oft mit einer Überexpression der MMP assoziiert.

In vielen Tumorerkrankungen mit einem aggressiven metastatischen Phänotyp wurde eine hohe Expression der MMP nachgewiesen (Blavier et al. 1999). Man konnte einen Zusammenhang zwischen der Expression von MMP-7 und Invasion, Wachstum und Apoptose der Tumorzellen (li et al. 2006). Die Expression von MMP-2 spielt eine entscheidende Rolle bei Brustkrebs (Jeziarska und Motyl 2009).

Gerade im Fall des Nierenzellkarzinoms ist die Fähigkeit der Zellen, die EZM durch lokal produzierte Gelatinasen abzubauen, eine wichtige Voraussetzung für die Invasion der Tumorzellen in andere Gewebe (Roomi et al. 2006). Die mRNA-Expression von TIMP-2 in Proben von klarzelligem Nierenzellkarzinom ist signifikant niedriger als in normalem Nierengewebe, während die Expression von MMP-2 und -9 deutlich erhöht ist.

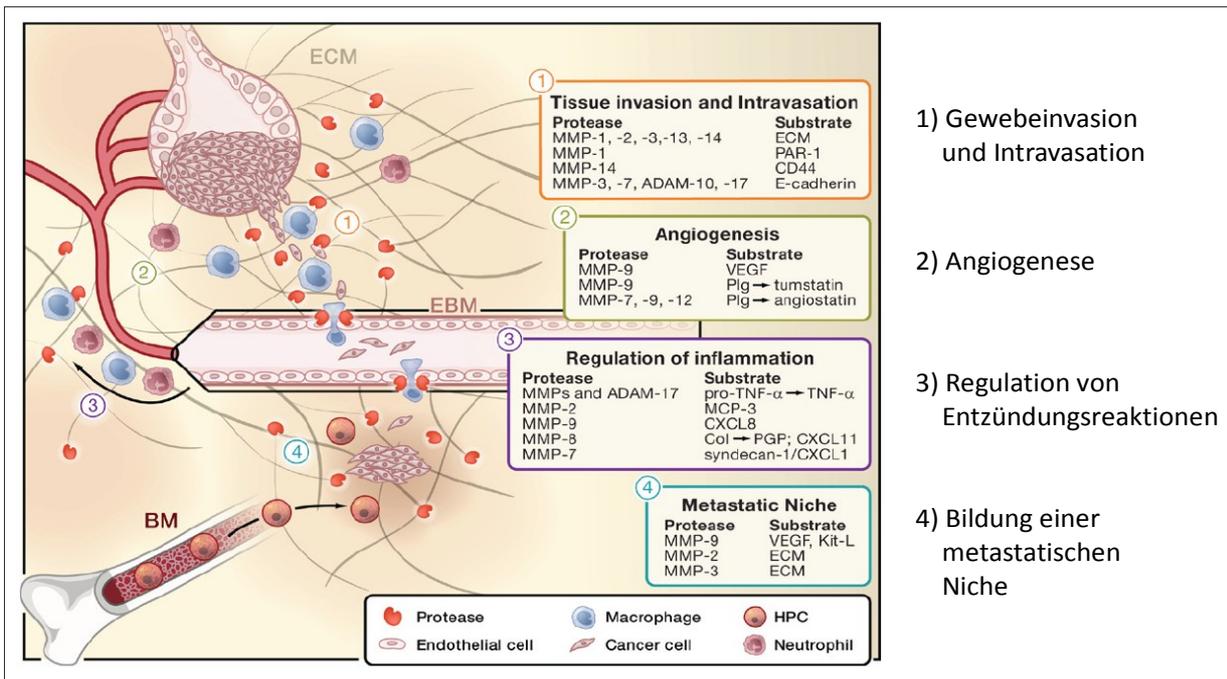


Abbildung 7: Rolle der MMP in der Tumorbiologie.

Verschiedene Mitglieder der MMP-Familie sind an den Vorgängen von Tumorwachstum und -ausbreitung beteiligt. 1) Sowohl bei der Invasion ins Gewebe und der Intravasation einzelner Zellen in ein Blutgefäß als auch 2) bei der Induktion von Angiogenese-Prozessen zur Versorgung des Tumors spielt der Abbau von EZM eine entscheidende Rolle. 3) Auch bei der Regulation von Entzündungsreaktionen sind verschiedene Mitglieder der MMP Familie beteiligt. 4) Durch die Ausbildung einer metastatischen Nische wird Tumoren die Metastasierung erleichtert. *Abkürzungen: BM: Knochenmark (bone marrow), HPC: hämatopoetische Vorläuferzellen (hematopoietic progenitor cells), ECM: extrazelluläre Matrix, EBM: endotheliale Basalmembran.* Abbildung modifiziert nach Kessebrock et al, 2010

Zusätzlich korreliert die Überexpression von MMP-2 und -9 mit einer erhöhten Expression von CXCR-4, welches mit einem hohen metastatischen Potential des Tumors in Verbindung steht (Eichelberg et al. 2009). MMP-7 wird von den Tumorzellen selbst produziert und dient als Serummarker für die Diagnose des Renalzellkarzinoms (Sarkissian et al. 2008). In aggressiven, stark metastasierenden Tumoren im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung ist die Expression von MMP-2 stark erhöht, ebenso die Expression von MMP-7 in aggressiven Nierenzellkarzinomen, was für eine Rolle bei der Invasion und Metastasierung spricht (Sumi et al. 2003). Diverse MMP spielen demnach eine wichtige Rolle im Nierenzellkarzinom, vor allem aber MMP-2, -7 und -9. Einige synthetische MMP-Inhibitoren wurden bereits entwickelt. Die meisten zeigten in der klinischen Phase allerdings keine positive Auswirkung auf die Genesung der Patienten. Die Teil- oder vollständige Entfernung der Niere scheint bisher die einzige Therapie zu sein.

2.6 GPI-Anker und das Konzept der Reinkorporierung GPI-verankerter Proteine

Glykosylphosphatidylinositol- (GPI-) Anker sind Membrananker, die im gesamten Tierreich vorkommen. Glykosylphosphatidylinositol ist ein Glykolipid, das posttranslational an den C-Terminus eines Proteins angefügt wird. Diese amphipatische Struktur verankert ein Protein in die äußere Schicht der Zellmembran. Der Aufbau eines GPI-Ankers wird in Abb. 8 veranschaulicht:

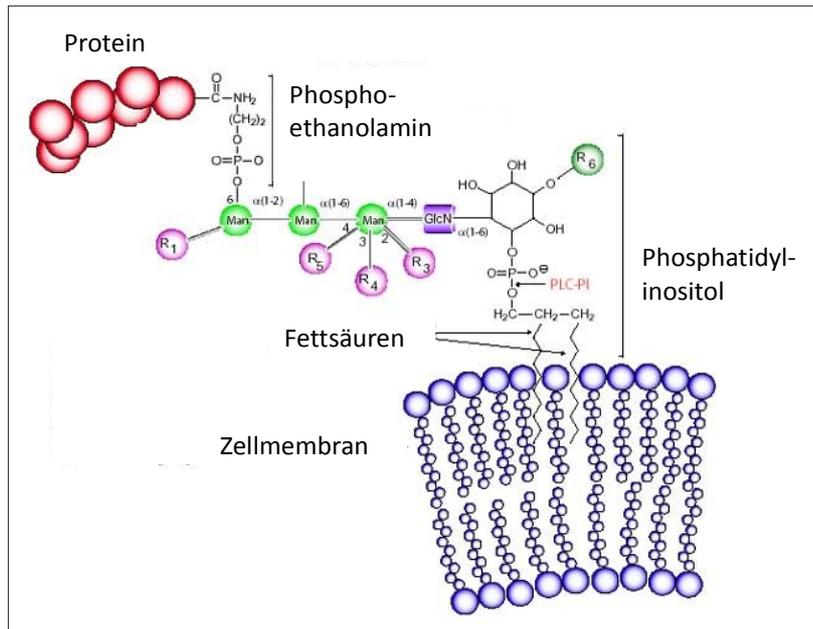


Abbildung 8: Struktur eines GPI-Ankers.

Der posttranslational an den C-Terminus eines Proteins angefügte Glykolipidanker besteht aus Fettsäuren, die ihn in der äußeren Schicht der Zellmembran verankern. Diese sind über das Phosphatidylinositol und ein Kohlenhydratgerüst mit variablen Resten an ein Phosphoethanolamin gebunden, welches über eine Phosphodiesterbindung die Verbindung zum Protein herstellt. *Abkürzungen: GlcN: N-Azetylglukosamin, Man: Mannose, R: Rest.* Abbildung mit freundlicher Genehmigung modifiziert nach Sigma-Aldrich, Taufkirchen.

Der Anker besteht aus einer Phosphatidylinositol-Gruppe, die über ein Kohlenhydratgerüst an den C-Terminus eines Proteins gebunden ist. Die Kohlenhydratkette besteht aus Glukosamin und Mannose, die glykosidisch an das Inositol gebunden sind. Zwei hydrophobe Fettsäuren in der Phosphatidylinositol-Gruppe verankern das Protein in der Zellmembran. Das Protein selbst ist über Phosphoethanolamin durch eine Phosphodiesterbindung an den Kohlenhydratkern aus drei Mannoseresten (Man) und N-Azetylglukosamin (GlcNAc) gebunden. Der Kern ist sehr variabel mit anderen Resten verbunden (siehe Abb 8, violette Kreise mit R1-R5). Diese Reste sind meist auch Mannosereste oder GlcNAc.

GPI-verankerte Proteine enthalten ein N-terminales Signalpeptid, das sie in das Endoplasmatische Retikulum (ER) leitet. Es wird beim Durchtritt durch die Membran des ER abgespalten. Der C-Terminus besteht aus hydrophoben Aminosäuren, die in die ER-Membran eingebaut werden.

Das hydrophobe Ende wird anschließend abgespalten und durch einen vorgefertigten GPI-Anker ersetzt. Das Protein wird über den sekretorischen Weg prozessiert und über das Golgi-Netzwerk in Vesikeln zur Zelloberfläche transportiert. Dort fusionieren die Vesikel mit der Zellmembran, so dass das Protein in der äußeren Membran verankert bleibt. GPI-verankerte Proteine sind bevorzugt in Lipidflößen der Zellmembran lokalisiert, was innerhalb der Plasmamembran zu einer Organisation in Mikrodomänen führt (Legler et al. 2005).

Der T-Zellmarker Thy-1 und die Azetylcholinesterase sowie diverse Adhäsionsproteine, regulatorische Proteine des Komplementsystems und Antigene sind Beispiele für GPI-verankerte Proteine. Obwohl die vorrangige Funktion des GPI-Ankers die Verankerung und Bewegung von Proteinen in der äußeren Membranschicht ist, gibt es einige weitere Funktionen: intrazelluläre Sortierung von Proteinen in Lipidflöße, die Sortierung zur apikalen Seite des Epithels sowie Signaltransduktion (Brown et al. 1989; Lisanti et al. 1989; Mayor und Riezman 2004).

GPI-verankerte Proteine können aus der Zellmembran extrahiert und aufgereinigt werden. 1996 publizierte die Gruppe von Medof, dass sich diese Proteine, wenn sie nach der Aufreinigung zu anderen Zellen gegeben werden, in die Zellmembran inkorporieren und dort ihre native Aktivität entfalten (Medof et al. 1996). Dieser Vorgang wird heute auch „Surface Painting“, also Oberflächenbemalung, genannt. Nahezu jedes Protein kann durch die Fusion mit einem GPI-Anker modifiziert werden und somit die spezifische Proteinaktivität auf die Oberfläche jeder beliebigen Zelle transferiert werden.

Das „Cell Painting“ stellt eine Alternative zu konventionellen Methoden wie zum Beispiel dem Gentransfer dar, um die Komposition von Zelloberflächen zu verändern (Premkumar et al. 2001). Die Vorteile dieser Technik liegen darin, dass schwer zu transfizierende Zellen verändert werden können, diese Veränderung der Oberfläche sofort erfolgt und keine weitere Kultivierung der Zellen erforderlich ist. Außerdem ist die Menge an Protein, das auf die Zelloberfläche gebracht wird, genauer zu kontrollieren und es können sogar verschiedene Proteine gleichzeitig oder nacheinander in die Membran eingebracht werden. Mit dieser Technik können somit komplexe Zelloberflächen-Interaktionen einfacher untersucht werden. In der Entwicklung von Krebsvakzinen oder bei der Modulation von antigenpräsentierenden Zellen stellt diese Technik ein interessantes Werkzeug dar (Medof et al. 1996).

2.7 Das GPI-verankerte TIMP-1

In diesem Labor wurde eine GPI-verankerte Variante des humanen TIMP-1 hergestellt und in CHO-Zellen synthetisiert. Das Protein kann nach der Extraktion aus der Zellmembran und der Reinigung mittels FPLC in die Membran jedes beliebigen Zelltyps reinkorporiert werden. Eine Analyse des Proteins zeigte neuartige und verbesserte Aktivitäten im Vergleich zu rekombinanten, löslichen TIMP-1. Dies war zumindest teilweise auf eine Veränderung der Stöchiometrie von TIMP-1 und MMP an der Zelloberfläche zurückzuführen. Die Freisetzung diverser MMP aus verschiedenen Tumorzelllinien sowie primären Endothelzellen oder Keratinozyten wurde blockiert. Zusätzlich konnten die Proteasen auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Die Migration mikrovaskulärer Endothelzellen wurde durch die Reinkorporierung von TIMP-1-GPI effektiv gehemmt, die Proliferation dieser Zellen stimuliert (Djafarzadeh et al. 2004). Die Proliferation von Nierenkarzinomzellen hingegen wurde gehemmt und die Zellen waren sensitiver für FAS-vermittelte Apoptose (Djafarzadeh et al. 2006). Zusätzlich wurde eine Verschiebung des Gleichgewichts von pro- und antiapoptotischen Proteinen der bcl-Familie in Richtung der proapoptotischen Faktoren gezeigt, was den Einfluss des Proteins auf die Apoptose erklärt. Der Einbau von TIMP-1-GPI in die Membran von Melanomzellen, kombiniert mit einem zweistündigen Hitzeschock bei 41,8°C, führte zu einer deutlichen Verringerung der Anzahl überlebender Zellen. Auch die Resistenz der Zellen gegenüber FAS-vermittelter Apoptose war deutlich geringer und die Expression von Proteinen der bcl-Familie verschob sich zugunsten der proapoptotischen Proteine. In vivo führte die peritumorale Injektion von TIMP-1-GPI in Rag2-defizienten Mäusen mit einem Kolonkarzinom zu einer deutlichen Reduktion von Tumorwachstum und -größe verglichen zu der Behandlung mit rhTIMP-1 (Raggi et al. 2009). Die Untersuchung von biologischen Prozessen von Keratinozyten lieferte interessante Ergebnisse, die eine Abhängigkeit der Aktivität von TIMP-1-GPI vom untersuchten Zelltyp zeigten: Proliferation und Migration der Zellen wurden durch die Reinkorporierung von TIMP-1-GPI stimuliert. Zusätzlich zeigten Wundheilungsversuche *in vitro* und *in vivo*, dass TIMP-1-GPI diesen Vorgang beschleunigt (Daten noch nicht publiziert). Die Reinkorporierung von TIMP-1-GPI in Zellmembranen zeigte insgesamt neuartige und verbesserte Funktionen in Bezug auf Tumorzellwachstum und Wundheilung. Um dieses Werkzeug spezifischer einsetzen zu können, ist eine genaue Analyse der verschiedenen Aktivitäten des Proteins notwendig. TIMP-1-GPI kann dann als Adjuvans in der Tumorthherapie eine wichtige Rolle spielen.

3 ZIELSETZUNG

Matrix-Metalloproteasen sind in Tumoren häufig hoch exprimiert. Diese Proteasen sind für den Aufbau und die Aufrechterhaltung eines Mikromilieus verantwortlich, welches das Wachstum und die Nährstoffversorgung von Tumoren ermöglicht. Die Mitglieder der TIMP-Familie sind physiologische Inhibitoren der MMP und wurden als wichtige Regulatoren der Tumorgenese identifiziert. In unserem Labor wurde das humane, physiologisch sezernierte Protein TIMP-1 mit einem GPI-Anker versehen, um ein flexibles Reagenz zur selektiven Modifikation der proteolytischen Umgebung von Tumorzellen herzustellen. GPI-verankerte Proteine können nach der Extraktion aus der Zellmembran und einer Reinigung in die Membran von Zellen eingebaut werden und entfalten dort ihre volle Aktivität (Medof et al. 1996). Die Aktivität von TIMP-1 kann so durch den exogenen Einbau des Lipidankers in die Membran lokal an die Zellmembran fokussiert werden. Damit kann das natürliche Gleichgewicht zwischen TIMP-1 und MMP im extrazellulären Raum zugunsten des Inhibitors TIMP-1 verschoben werden, was die proteolytische Umgebung von Tumorzellen maßgeblich verändert. TIMP-1-GPI zeigte in Vorarbeiten neuartige Aktivitäten in Bezug auf die Regulation der Tumorbiologie. Es hemmt das Tumorzellwachstum, was auch in *in vivo* Studien gezeigt werden konnte (Djafarzadeh 2004, 2006, 2009-A, 2009-B). TIMP-1 besitzt eine Zwei-Domänen-Struktur, wobei die hauptsächliche Bindung und Hemmung der proteolytischen Aktivität der MMP von der N-terminalen Domäne des Proteins vermittelt wird. Die C-terminale Domäne besitzt hingegen Funktionen, die unabhängig von der Inhibition der MMP-Aktivität sind: eine wachstumsfaktorähnliche Aktivität und die Vermittlung von Wechselwirkungen mit Signalmolekülen und die Stabilisierung von TIMP-MMP-Komplexen. Um den Zusammenhang aus Struktur und Funktion des modifizierten Proteaseinhibitors TIMP-1-GPI zu analysieren, wurden zusätzlich zwei Varianten des GPI-verankerten TIMP-1 hergestellt: die GPI-verankerte N-terminale Domäne von TIMP-1 (N-TIMP-1-GPI) sowie eine Mutante mit zwei zusätzlichen Valinresten in der N-terminalen, MMP-inhibierenden Domäne (VV-TIMP-1-GPI). Die Proteine wurden in CHO-Zellen synthetisiert, gereinigt und in die Membran von Nierenkarzinomzellen reinkorporiert. Die Aktivität der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten sowie deren Einfluss auf die Biologie von Tumorzellen sollte in dieser Arbeit untersucht werden.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Material

4.1.1 Zellkultur

4.1.1.1 Medien und Zusätze

Medien:

MEM Alpha Medium	Invitrogen, Carlsbad
RPMI 1640	Invitrogen, Carlsbad
RPMI farblos	Invitrogen, Carlsbad
RPMI (für Hybridomzellen)	Invitrogen, Carlsbad

Zusätze:

dialysiertes fötales Kälberserum (dFBS)	Biochrom AG, Berlin
fötales Kälberserum (FBS)	Biochrom AG, Berlin
Glukose	Invitrogen, Carlsbad
HEPES	Invitrogen, Carlsbad
HT-Supplement	Invitrogen, Carlsbad
L-Glutamin	Invitrogen, Carlsbad
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)	Invitrogen, Carlsbad
Natriumpyruvat	Invitrogen, Carlsbad
Penizillin/Streptomycin (P/S)	PAA Laboratories, Pasching
Serum, Lowlg	PAN, Aidenbach

Sonstige Reagenzien:

Biotase	Biochrom AG, Berlin
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
ETDA	Biochrom AG, Berlin
PBS (1x, 10x, ohne Kalzium und Magnesium)	PAA Laboratories, Pasching
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories, Pasching

4.1.1.2 Zelllinien

Zelllinie/Wachstum	Beschreibung	Herkunft	Medium	Zusätze
CHO adhärent	Ovarzellen aus chinesischem Hamster	ATCC, USA Transfektion im Rahmen dieser Arbeit	MEM Alpha Medium	+ 10% FBS + 1% P/S <u>untransfiziert:</u> + 10% dFBS + 1% P/S + 1% HT-Supplement
HT1080 adhärent	Invasive humane Fibrosarkom-Zelllinie	Unbekannt	RPMI 1640	+ 10% FBS + 1% P/S
RCC-53 adhärent	Humane Nierenkarzinom-Zelllinie, aggressiv wachsend von metastasiertem Tumor	Isoliert von D. Schendel	RPMI 1640	+ 12% FBS + 1% P/S + 1% NEAA + 1% Natriumpyruvat
A-498 adhärent	Humane Nierenkarzinom-Zelllinie	ATCC, USA	RPMI 1640	+ 12% FBS + 1% P/S + 1% NEAA + 1% Natriumpyruvat
9E10 Hybridomzellen	Hybridomzellen, die den mycTag Antikörper produzieren	Leihgabe W. Uckert, MDC Berlin	RPMI	+ 3,5 g/l Glukose + L-Glutamin + 2,383 g/l HEPES + 110 mg/l Natriumpyruvat

4.1.2 Plasmide und Vektoren

Plasmid	Beschreibung	Herkunft	Resistenz	Verwendung
pEF _{DHFR}	enthält DHFR Gen	von M. Mack, Regensburg	Ampizillin	Expressionsvektor zur Expression in CHO-Zellen
pUC19		Invitrogen	Ampizillin	Klonierung vor der Expression
MP71 gp100	Retroviraler Vektor mit Doppel-mycTag	W. Uckert, MDC Berlin	Ampizillin	Zur Amplifikation des mycTags

4.1.3 Bakterienstämme

DH5alpha *E. coli* Genotyp: supE44, ΔlacU169 (Φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1

E. coli XL1-Blue Supercompetent Cells (Reagenzienpaket für Mutagenese)

4.1.4 Reagenzienpakete

Endofree Plasmid Maxi Kit
Innuprep Plasmid Mini Kit
Innuprep Doublepure Kit
PureLink RNA Mini Kit

Qiagen, Hilden
Qiagen, Hilden
Qiagen, Hilden
Invitrogen, Carlsbad

Quant-it™ DNA Assay Kit, high sensitivity	Invitrogen, Carlsbad
Quant-it™ dsDNA Assay Kit, broad range	Invitrogen, Carlsbad
Quant-it™ RNA Assay Kit	Invitrogen, Carlsbad
Quikchange Site-directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Santa Clara
RNase-freies DNase Set	Qiagen, Hilden
Silberfärbungskit	Fermentas, St. Leon-Rot

4.1.5 Puffer und Lösungen

Säulenchromatographie:

Alle bei der Säulenchromatographie verwendeten Puffer wurden mit Injektionswasser hergestellt.

Hypotonischer Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 7,5 1 Proteinaseinhibitor Tablette/50 ml
Extraktionspuffer M (EBM)	4 mM n-Dodecyl-β-D-Maltosid 50 mM Tris, pH 7,5 100 mM NaCl 1 Proteaseinhibitortablette/50 ml
Extraktionspuffer T (EBT)	100 mM NaCl 1% Triton X-100H 50 mM Tris/HCl, pH 7,5 5 mM EDTA 1 Proteaseinhibitortablette/50ml pH 7,4 (RT)
myc-Äquilibriumspuffer	PBS + 0,025% TritonX-H
myc-Waschpuffer	0,025% Triton X-100H 145 mM NaCl in PBS
myc-Elutionspuffer	0,01 mg/ml myc-Peptid in Äquilibriumspuffer
myc-Regenerierpuffer	0,17 M Glyzin in H ₂ O, pH 2,3 (4°C)
myc-Lagerungspuffer	0,1% Natriumazid in PBS (w/v)
Phosphatpuffer (Antikörperreinigung)	20 mM Na ₂ HPO ₄ / NaH ₂ PO ₄ , pH 7,4 (4°C)
Zitratpuffer (Antikörperreinigung)	20 mM Zitratpuffer pH 3,6 (4°C), titriert aus Zitronensäure und Natriumzitrat

Zymographie:

Renaturierungslösung	2,5% Triton X-100 in H ₂ O
----------------------	---------------------------------------

Entwicklungspuffer
50 mM Tris/HCl pH 7,5
200 mM NaCl
5 mM CaCl₂
0,15% Brij35

SDS-PAGE:

Blockierlösung (Western-Analyse) 5% Magermilchpulver in TBST (w/v)

Elektrophoresepuffer (10x)
1,9 M Glyzin
0,25 M Tris
1% (w/v) SDS

Lämmli Ladepuffer (3x)
150 mM Tris/HCl, pH 6,8
30% Glyzerin
6% SDS
0,3% Bromphenolblau
7,5% β -Mercaptoethanol

TBE (1x)
90 mM Tris
2 mM Borsäure
10 mM EDTA, pH 8,0 (RT)

TBS (10x)
1,5 M NaCl
100 mM Tris
10 mM NaN₃

TBST 0,05% Tween²⁰ in TBS

Tris, 1,5 M, pH 8,8 1,5 M Tris in H₂O (w/v), pH 8,8 (RT)

Tris, 1 M, pH 6,8 1 M Tris in H₂O (w/v), pH 6,8 (RT)

10% SDS 10% SDS in H₂O (w/v)

10% APS 10% APS in H₂O (w/v)

Coomassie-Färbung:

Fixierlösung
50% Methanol
10% Essigsäure
40% H₂O

Färbelösung
0,25% Coomassie G250 in
25% Isopropanol
10% Essigsäure
65% H₂O

Entfärbelösung	10% Methanol 10% Essigsäure 80% H ₂ O
<u>Puffer für die Molekularbiologie:</u>	
EGTA-Lösung	100 mM EGTA in H ₂ O, pH 8,0 (RT)
Ladepuffer für Agarosegele (6x)	0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylen-Cyanol FF 30% Glycerin
TBE-Puffer (1x)	90 mM Tris 2 mM Borsäure 0,01 M EDTA in H ₂ O, pH 8,0 (RT)
<u>Lösungen für die Mikrobiologie:</u>	
Agar (3%)	3% Agar-Agar in H ₂ O, autoklavieren
Ampizillinlösung	50 mg/ml Ampizillin in 70% Ethanol (w/v)
CaCl ₂ -Lösung	60 mM CaCl ₂ 15% Glycerin 10 mM PIPES, pH 7 (RT) sterilfiltrieren (0,2 µm)
Einfrierlösung für Bakterien (10x)	132,3 mM KH ₂ PO ₄ 21 mM Natriumzitat 3,7 mM MgSO ₄ *7H ₂ O 68,1 mM (NH) ₂ SO ₄ 459,3 mM K ₂ HPO ₄ *3 H ₂ O 35,2% (w/v) Glycerin in H ₂ O, autoklavieren
LB-Medium (2x)	2% Baktotrypton 342 mM NaCl 1 % Hefeextrakt pH 7,2 bis 7,3 (RT), autoklavieren
SOC-Medium	0,5 % Hefeextrakt 2% Baktotrypton 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glukose Ohne Glukose autoklavieren

Puffer für ELISA:

PBS (20x) 2,74 M NaCl
 129,2 mM Na₂HPO₄*2 H₂O
 54 mM KCl
 29,4 mM KH₂PO₄

Assaypuffer ELISA 0,5% BSA
 0,05% Tween²⁰
 in PBS

Waschpuffer ELISA 0,05% Tween²⁰ in PBS

Puffer für die Immunpräzipitation:

Waschpuffer A 50 mM Tris/HCl, pH 7,5
 150 mM NaCl
 1% NP-40
 0,5% Natriumdeoxycholat
 1 Proteaseinhibitortablette/ 50 ml

Waschpuffer B 50 mM Tris/HCl, pH 7,5
 500 mM NaCl
 0,1% NP-40
 0,05% Natriumdeoxycholat

Waschpuffer C 50 mM Tris/HCl, pH 7,5
 0,1% NP-40
 0,05% Natriumdeoxycholat

Färbelösung für die Membran 0,02% ServaBlue R
 25% Methanol
 10% Essigsäure

Sonstige Lösungen:

Anti-Proteasengemisch (SDS-PAGE) 1 Tablette Complete Proteaseinhibitoren/20 ml H₂O

APMA 20 mM (w/v) in 80 mM NaOH

FACS-Puffer 2 mM EDTA
 2% FBS
 in PBS

Fixierungslösung Immunfluoreszenz 1% PFA in PBS (w/v)

Gelatinelösung für die Zymographie 5 mg/ml Gelatine in H₂O (w/v)

Hypotonischer Lysepuffer (Tunicamyzin)	5 mM Tris/HCl, pH 7,5 (RT) 0,1 mM EDTA 2 mM MgCl 1 Proteaseinhibitortablette/20 ml
MTT-Stocklösung	5 mg/ml MTT in PBS
MTT-Färbelösung	MTT-Stocklösung, 1:7 verdünnt in farblosem RPMI
TNCZB-Puffer	50 mM Tris, pH 7,5 150 mM NaCl 5 mM CaCl ₂ 1 µM ZnCl ₂ 0,01% Brij35

4.1.6 Kommerzielle Lösungen

Acrylamid/ Bisacrylamid-Lösung	Roth, Karlsruhe
ECL-Substrat (Western-Analyse)	Pierce, Rockford, USA
Entwicklungslösungen für ELISA <i>OptEIA</i>	BD Bioscience, Bedford
First Strand Buffer (5x)	Invitrogen, Carlsbad
Hanks Buffered Salt Solution (HBSS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NuPAGE LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen, Carlsbad
NuPAGE Transferpuffer (50x)	Invitrogen, Carlsbad
Puffer M für den Restriktionsverdau	NEB, Frankfurt
Tris/HCl (1M) pH 7,5 (4°C)	Invitrogen, Carlsbad

4.1.7 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim
Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C	Invitrogen, Carlsbad
Restriktionsenzyme: <i>EcoRI</i> , <i>Sall</i> , <i>NheI</i> , <i>NdeI</i> , <i>XbaI</i>	NEB, Frankfurt
RNAsin Ribonuklease Inhibitor	Promega, Madison, USA
SuperScript II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Carlsbad
T4 DNS Ligase	NEB, Frankfurt
Taq DNS Polymerase	NEB, Frankfurt
Tunicamyzin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

4.1.8 Größenstandards

MagicMark™ XP Western Protein Standard	Invitrogen, Carlsbad
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
DNA 1 kb-Leiter	Invitrogen, Carlsbad

4.1.9 Rekombinante Proteine und Peptide

Protein	Spezies	Verwendung	Firma
Myc-Peptid		Proteinreinigung	MBL, Japan
rhTIMP-1	Human	ELISA, <i>in vitro</i> Versuche	Peptotec, Hamburg
rhMMP-2	Human, aus CHO-Zellen	Reverse Zymographie	Calbiochem, Darmstadt
rhMMP-9	Human, aus CHO-Zellen	Reverse Zymographie	Calbiochem, Darmstadt
rhMMP-3 _{kat}	Human	MMP-3 Aktivitätsversuch	H. Nagase, London
Streptavidin-HRP	Nicht angegeben	ELISA	BD Biosciences, San Jose
Streptavidin-RPE	<i>S. avidinii</i>	FACS	Dako, Roskilde, Dänemark
Streptavidin-APC	Nicht angegeben	FACS	BD Biosciences, San Jose
Fluorogenes Peptidsubstrat II (Mca-R-P-K-P-V-E—Nval-W-R-K(Dnp)-NH ₂)		MMP-3 Aktivitätsversuch	R&D Systems, Minneapolis, USA

4.1.10 Farbstoffe

Propidiumiodid	BD Biosciences, San Jose
ServaBlue R	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

4.1.11 Oligonukleotide

p2xMycTag_RV	5′-CTTCATTGCTAGCCAGGTCCTCCTC-3′
p2xMycTag_FW	5′-GTTAAGCTGTGTATCTAGAGAACAGAA-3′
VV-NT1Pi_FW	5′-CCCCCAGCAGGGCCGTGGTATGCACCTG-3′
VV-NT1Pi_RV	5′-GACACAGGTGCATACCACGGCCCTGCTG-3′
NT1_RV	5′-GAAATCTAGACACTGTGGATTCCTCAC-3′
T1_in_FW	5′-GAATTCATGGCCCCCTTTG-3′
GPI_in_RV	5′-CTATAATACATTCATATACAGC-3′
pEF_Insert_FW	5′-GATCTTGCTTCATTCTCAAGCC-3′
pEF_Insert_RV	5′-ATACCGGAGTACTAGCCGCC-3′

4.1.12 Software

CellQuest (FACS Aufnahme)	BD Biosciences, Bedford, USA
Chemotaxis and Migration Tool	Ibidi, Martinsried
FlowJo	TreeStar Inc., USA
ImageJ	National Institutes of Health, USA
Prism 4.0	GraphPad Software, La Jolla, USA
Pymol	DeLano Scientific LLC, Schrödinger
RCSB Protein Data Bank	http://www.pdb.org/
Unicorn	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
XFluor (Plattenlesegerät)	Tecan, Crailsheim

4.1.13 Verbrauchsmaterial

96-Loch Mikrotiterplatte, Flachboden	Greiner, Frickenhausen
96-Loch Mikrotiterplatte, Rundboden	Greiner, Frickenhausen
96-Loch Mikrotiterplatte, ELISA	Nunc, Roskilde, Dänemark
48-Loch Kulturplatte	TPP, Trasadingen, Schweiz
Chemotaxis Objektträger	Ibidi, Martinsried
Schälchen für die Immunfluoreszenz	Ibidi, Martinsried

4.1.14 Antikörper

<i>Primäre Antikörper</i>	<i>Spezies</i>	<i>Verwendung</i>	<i>Firma</i>
Anti-hTIMP-1	Maus	FACS	Calbiochem, Darmstadt
Anti-hTIMP-1	Maus	Western-Analyse	LabVision, Fremont, USA
Anti-hMMP-1	Maus	FACS	Calbiochem, Darmstadt
Anti-hMMP-3	Maus	FACS	Calbiochem, Darmstadt
Anti-hMMP-7	Maus	FACS, Western-Analyse	LabVision, Fremont, USA
Anti-mycTag	Maus	ELISA, Western-Analyse, FACS, IP	Selbst gereinigt (Hybridom)
mIgG1κ	Maus	FACS Isotypkontrolle	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
mIgG2a	Maus	FACS Isotypkontrolle	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
mIgG2b	Maus	FACS Isotypkontrolle	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>Sekundäre Antikörper</i>	<i>Spezies</i>	<i>Verwendung</i>	<i>Firma</i>
Anti-mIgG/RPE	Kaninchen	FACS, Immunfluoreszenz	Dako, Roskilde, Dänemark
Anti-m/Biotin	Ratte	FACS, Immunfluoreszenz	BD Pharmingen, Bedford
Anti-m/HRP	Kaninchen	Western-Analyse	Dako, Roskilde, Dänemark

4.1.15 Chemikalien

Agar-Agar	BD, Franklin Lakes, USA
Agarose	Invitrogen, Carlsbad
Ampizillin	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
APMA (4-Aminophenyl-Quecksilberazetat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Baktotrypton	BD, Franklin Lakes
Bio-Rad Reagenz	BioRad, Hercules
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA) FraktionV	Roche, Mannheim
Brij35-Lösung	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid (CaCl)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
EDTA	Merck, Darmstadt
EDTA, für die Zellkultur	Biochrom AG, Berlin
EGTA	Roth, Karlsruhe

Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid (0,5% Lösung)	Roth, Karlsruhe
Gelatine, porcine skin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glyzin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	BD, Franklin Lakes, USA
Isobutanol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Methanol, absolut	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl)	Merck, Darmstadt
Mineralöl	Sigma, St. Louis, USA
MTT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumazid (NaN ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (5M)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumdeoxycholat	Roth, Karlsruhe
Natronlauge (NaOH)	Merck, Darmstadt
n-Dodecyl-β-D-Maltosid	Calbiochem, Merck, Darmstadt
NP-40	Calbiochem, Merck, Darmstadt
PBS, für die Zellkultur	PAN, Aidenbach
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Phorbolmyristatazetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PIPES (Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure))	Merck, Darmstadt
Proteaseinhibitor-Tabletten <i>Complete</i>	Roche, Mannheim
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Merck, Darmstadt
SDS (Sodiumdodecylsulfate)	Roth, Karlsruhe
TEMED	Roth, Karlsruhe
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt
Tris, pH 7,5 (RT)	Invitrogen, Carlsbad
Triton X-100	Fluka Biochemica, Buchs
Triton X-100H	Calbiochem, San Diego, USA
Tween20	Fluka Chemika, Buchs
Wasser (Injektionswasser, Aqua ad iniectabilia)	Braun, Melsungen
Xylen-Cyanol-FF	Serva, Heidelberg
Zinkchlorid (ZnCl)	Merck, Darmstadt

4.1.16 Geräte

Brutschrank <i>Modell 400</i>	Janeschitz, Hammelburg
Drehmischer	Bachofer, Reutlingen
<i>E. coli</i> Pulser	BioRad, Hercules, USA
ELISA Plattenlesegerät	Tecan, Crailsheim
Entwicklermaschine für Röntgenfilme	Agfa, Mortsel, Belgien
Fluorescence Activated Cell Scanner <i>FACS Calibur</i>	BD Biosciences, San Jose, USA
Fluoreszenzmikroskop <i>Leica DM IL</i>	Leica, Wetzlar

FPLC Äkta
 Gellaufkammer Agarosegele
 Gellaufkammer SDS-PAGE
 Gelgießkammer Agarosegele
 Gelgießkammer SDS-Gele
 Lyophile
 PCR-Gerät *SpeedCycler*
 PCR-Gerät *Perkin Elmer*
 Qubit Fluorometer
 Robocycler Gradient 96
 Rollsystem für die Zellkultur
 Röntgenfilm Entwicklungssystem
 Semi-Dry Blotting System
 Schüttelfähiger Heizblock *Thermomixer comfort*
 Schüttelmischer
 Tischzentrifuge
 Transfektionsgerät Zellkultur
 UV-Dokumentationsgerät für Agarosegele
 Zellkultur-Zentrifuge
 4°C Zentrifuge *Megafuge 1.0R*

4.1.17 Sonstige Materialien

Abstandshalter (SDS-PAGE)
 Aluminiumoxid-Platten (SDS-PAGE)
 Filtriereinheiten 0,1 µm und 0,22 µm Porengröße
 Folie für TaqMan PCR
 Glasplatten (SDS-PAGE)
 Glassäule (FPLC)
 Kämmen für Agarosegele
 Küvetten für das Photometer
 Küvetten, 1mm
 Küvetten, 4 mm
 Neubauer Zählkammer
 ProteinG-Agarose
 PVDF-Membran
 Rollerflaschen für die Zellkultur
 Röntgenfilme
 Schwämme für den Elektrotransfer
 Zymographie Gele (10% Gelatine)

4.1.18 Säulenchromatographie

Anti-MycTag Gel
 Äkta FPLC-System
 ProteinA-HP Säule

Amersham, Uppsala, Schweden
 LMS GmbH, Dossenheim
 Novex, San Diego, USA
 LMS GmbH, Dossenheim
 Hoefer Scientific, San Francisco, USA
 Christ, Osterode
 Analytic Jena
 Perkin Elmer, Massachusetts, USA
 Invitrogen, Carlsbad
 Agilent, Santa Clara, USA
 Integra Bioscience, Fernwald
 Agfa, Mortsel, Belgien
 Novex, San Diego, USA
 Eppendorf, Hamburg
 IKA Labortechnik, Staufen
 Roth, Karlsruhe
 BioRad, Hercules, USA
 Bachofer, Reutlingen
 Hettich, Adelsried
 Heraeus, Hanau

GE Healthcare, Uppsala, Schweden
 GE Healthcare, Uppsala, Schweden
 Millipore, Billerica, USA,
 Applied Biosystems, Foster City
 GE Healthcare, Uppsala, Schweden
 GE Healthcare, Uppsala, Schweden
 LMS GmbH, Dossenheim
 Beckmann, Brea, USA
 peqLab, Erlangen
 peqLab, Erlangen
 Merck, Darmstadt
 Boehringer Mannheim GmbH
 Millipore, Billerica, USA
 Greiner, Frickenhausen
 GE Healthcare, Uppsala, Schweden
 GE Healthcare, Uppsala, Schweden
 Invitrogen, Carlsbad

MBL, Japan
 Amersham Biosciences, Uppsala
 GE Healthcare, Uppsala, Schweden

4.2 Methoden

4.2.1 Zellbiologische Methoden

4.2.1.1 Allgemeine Zellkultur

Alle Arbeitsschritte mit lebenden Zellen wurden unter sterilen Bedingungen und ausschließlich mit sterilen Reagenzien durchgeführt, um Kontaminationen mit Pilzen oder Bakterien zu vermeiden. Verwendete Materialien und Lösungen wurden vor der Zugabe zu Zellen im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Alle Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert.

Es wurden zwei verschiedene Nierenkarzinom-Zelllinien, Hybridomzellen sowie Fibrosarkom-Zellen kultiviert.

Zur Produktion der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten wurden die transfizierten CHO-Zellen im großen Maßstab gezüchtet. Diese Zellen wurden ausschließlich mit 4 mM EDTA in PBS abgelöst. Zur Gewinnung des Zellsediments für eine Proteinreinigung wurden Zellen in je acht 300 cm²-Flaschen gezüchtet, abgelöst und nach dem Waschen mit PBS bei -80°C gelagert.

Die Hybridomzellen wurden in speziellen Flaschen auf einem Rollersystem kultiviert, da es sich hierbei um Suspensionszellen handelt. In diese Flaschen konnte bis zu ein Liter Medium zugegeben werden, um eine große Menge Ausgangsmaterial für die Antikörperreinigung zu gewinnen. Eine Woche vor dem Ernten des Überstands wurden die Zellen in farbloses RPMI Medium mit Immunglobulin-reduziertem Serum überführt. Die Hybridomzellen wurden bis zu einer optimalen Dichte in einem Liter Medium vermehrt und anschließend für eine weitere Woche auf dem Rollersystem belassen, um eine möglichst hohe Ausbeute des produzierten Antikörpers zu erreichen.

Die Nierenzellkarzinom-Linie RCC-53 wurde zweimal pro Woche im Verhältnis 1:7 gesplittet. Wurden die Zellen nicht für einen Versuch benötigt, wurde zum Ablösen Trypsin-EDTA verwendet. Zum Aussähen für einen Versuch wurden die Zellen mit 4 mM EDTA abgelöst.

Die zweite Nierenzellkarzinom-Linie, A-498, wurde zweimal pro Woche im Verhältnis 1:5 gesplittet und ebenfalls mit Trypsin-EDTA oder 4 mM EDTA abgelöst, wie für die Linie RCC-53 beschrieben.

Die Fibrosarkomzellen der Linie HT1080 wurden mit Trypsin abgelöst und zweimal pro Woche 1:20 gesplittet.

Untransfizierte CHO-Zellen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase transfiziert. Die Zellen wurden zweimal pro Woche 1:10 gesplittet. Am Tag vor der Elektroporation wurden die Zellen erneut abgelöst und 1:2 gesplittet, damit sie sich für die Transfektion in der logarithmischen Wachstumsphase befanden.

4.2.1.2 Einfrieren von Zellen

Zellen wurden im jeweiligen Kulturmedium mit 10% DMSO in einem Isopropanolbehälter über einen Zeitraum von 24 h auf -80°C gekühlt. Zur dauerhaften Lagerung wurden sie anschließend in flüssigem Stickstoff bei -160°C eingefroren.

4.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierfür wurden 50 µl der Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau verdünnt und in die Zählkammer pipettiert. Es wurden nur Trypanblau-negative, lebende Zellen von vier Großquadraten gezählt und anschließend die Zellzahl pro ml mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{gezählte Zellen}}{4} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

4.2.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.2.1 Glyzerinkultur von Bakterien

Zur langfristigen Lagerung eines Bakterienstammes wurde von diesem eine Glyzerinkultur angefertigt. Hierfür wurden 900 µl Über-Nacht-Flüssigkultur der Bakterien mit 100 µl Einfrierlösung (10x) gemischt und in einem Kryoröhrchen bei -80°C eingefroren.

4.2.2.2 Restriktionsverdau von DNS

Für das gezielte Schneiden von DNS mit Restriktionsenzymen wurde pro µg DNS eine Einheit Enzym sowie der für das Enzym geeignete Puffer zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde mit Wasser aufgefüllt. Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass das zugegebene Volumen an Enzymlösung nicht mehr als 1/10 des Gesamtvolumens ausmachte. Alle Verdauansätze wurden bei 37°C für eine Stunde auf dem Heizschüttler inkubiert.

4.2.2.3 Auftrennung von DNS im Agarosegel

Zur Analyse und Präparation von DNS wurden Agarosegele verwendet, deren Agarose-Konzentration abhängig von der Länge des gewünschten Fragments oder Plasmids gewählt wurde und zwischen 0,6% und 2% Agarose lag. Alle Gellösungen wurden in 0,5x TBE angesetzt und vor dem Gießen in der Mikrowelle erwärmt. Anschließend wurden je 100 ng/ml Ethidiumbromidlösung zugegeben. Die Gellösung wurde nach kurzem Abkühlen in entsprechende Kammern gegossen und der Kamm für die Taschen eingesetzt. Nach dem Erstarren des Gels wurde dieses in 0,5x TBE-Puffer gelegt, der Kamm für die Probenaschen aus dem Gel gezogen und die Proben in die Taschen geladen. Die DNS-Proben wurden zuvor mit dem entsprechenden Volumen 6x Ladepuffer versetzt; zusätzlich wurden 200-400 ng eines Größenstandards aufgetragen. Als Laufpuffer für die Elektrophorese wurde 0,5x TBE verwendet, die Elektrophorese erfolgte bei 120 V bis zur optimalen Trennung. Zur Dokumentation wurden die Gele unter UV-Licht fotografiert, bei der präparativen Elektrophorese wurde die gewünschte Bande zuvor unter schwachem UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten.

4.2.2.4 Extraktion von DNS aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNS aus Agarosegelen wurde mithilfe des Reagenzienpakets von der Firma Analytik Jena nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Die DNS wurde am Ende mit Injektionswasser anstelle des vom Hersteller mitgelieferten Puffers eluiert.

4.2.2.5 Konzentrationsbestimmung von DNS und RNS

Die Konzentration von DNS und RNS wurde fluorometrisch mit dem Qubit Fluorometer und den zugehörigen Reagenzienpaketen der Firma Invitrogen bestimmt. Dabei werden DNS und RNS mit einem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff versetzt und anschließend die Emission gemessen. Hierfür wurde für Konzentrationen zwischen 0,2 ng/ml und 100 ng/ml eine Bestimmung von DNS mit dem Reagenzienpaket für hohe Sensitivität (HS), für höhere Konzentrationen von 2 ng/ml bis 1000 ng/ml mit dem Paket mit einem breiten Messspektrum (broad range, BR) gearbeitet. Für die Messung von RNS-Konzentrationen wurde das entsprechende RNS-Paket verwendet.

4.2.2.6 Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNS

Um eine Religation der geschnittenen DNS eines Plasmids nach dem Verdau mit nur einem Re-

striktionsenzym, wie zum Beispiel bei der Linearisierung eines Plasmids, zu verhindern, wurden die 5'-Enden nach den Restriktionsverdau dephosphoryliert. Hierfür wurde für 50 pmol DNS eine Einheit alkalische Phosphatase zum Restriktionsansatz gegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von EGTA in einer Endkonzentration von 20 mM und Erhitzen für zehn Minuten auf 65°C beendet. Vor einer Ligation wurde die dephosphorylierte DNS mit einem Reagenzienpaket der Firma Invitrogen nach dem entsprechenden Protokoll des Herstellers gereinigt.

4.2.2.7 Ligation von DNS Fragmenten

Für die Ligation von DNS-Fragmenten in ein Plasmid wurden das einzufügende Fragment und Plasmid-DNS in einem äquimolaren Mengenverhältnis von 3:1 eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt, wobei die DNS mit 1 µl T4 DNS-Ligase, entsprechend einer Endkonzentration von 50 U/ml, und 2 µl Ligasepuffer (10x) in Injektionswasser für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurde.

4.2.2.8 Herstellung chemokompetenter *E. coli* DH5α- Bakterien

Eine Kolonie des Bakterienstammes *E. coli* DH5α wurde von einer Agarplatte abgenommen und in 50 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C und 250 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Von der Flüssigkultur wurden am nächsten Morgen 4 ml in 400 ml LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD_{600 nm} von 0,375 weiter kultiviert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension in 50 ml Gefäße aliquotiert und für 5 min auf Eis gestellt. Nach einem Zentrifugationsschritt von 7 min bei 1600 x g und 4°C wurde der Überstand verworfen und die Bakterien in jeweils 10 ml eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt und die Bakterien erneut in der CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis wurden die Bakterien erneut abzentrifugiert, in jeweils 2 ml der CaCl₂-Lösung aufgenommen und in 250 µl Aliquots bei -80°C eingefroren.

4.2.2.9 Transformation von DNS in chemokompetente *E. coli* DH5α Bakterien

Für die Transformation von Ligationsansätzen in Bakterien wurde jeweils 1/10 des Volumens des Ligationsansatzes, entsprechend 10-100 ng DNS, verwendet. Die DNS wurde zu 50 µl Bakteriensuspension gegeben und für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 2 min einer Temperatur von 42 °C ausgesetzt und sofort wieder auf Eis abgekühlt. Die trans-

formierten Bakterien wurden in je 1 ml SOC-Medium aufgenommen und bei 37°C für 45 min geschüttelt. Nach dieser Inkubationszeit wurde die Bakteriensuspension auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampizillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien für Minikulturen abgenommen.

4.2.2.10 Präparation von DNS aus Bakterien

Die Präparation von Plasmid-DNS aus transformierten *E. coli* DH5α Bakterien erfolgte mithilfe kommerziell erhältlicher Reagenzienpakete der Firmen Analytik Jena und Qiagen nach dem jeweiligen Protokoll des Herstellers. Um einen analytischen Restriktionsverdau durchzuführen, wurde die DNS aus je 1,5 ml einer Über-Nacht-Flüssigkultur mit dem *innuPREP Plasmid Mini Kit* präpariert, zur Gewinnung von DNS aus 100 ml Bakterienkultur für präparative Verdaus wurde das *EndoFree Plasmid Maxi Kit* (Qiagen) verwendet. Die gereinigte DNS wurde mit Injektionswasser von den Säulen eluiert und eine Konzentrationsbestimmung mit dem Qubit-System durchgeführt (siehe Kapitel 4.2.2.5).

4.2.2.11 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNS wurde eine Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt. Die N-terminale Domäne von TIMP-1 wurde aus dem TIMP-1-GPI Konstrukt in pUC19 amplifiziert. Das DoppelmycTag wurde mittels PCR aus dem Plasmid MP71 amplifiziert. Beide Reaktionen wurden, wenn nicht anders angegeben, mittels synthetischer Oligonukleotide der Firma Entelechon im PCR-Gerät der Firma Perkin Elmer durchgeführt. Die Anlagerungstemperatur der Oligonukleotide wurde 4-5 °C unter der Schmelztemperatur (T_M) der Oligonukleotide gewählt. Die einzelnen Bestandteile der Ansätze sind im Folgenden zusammengefasst:

Bestandteile der PCR-Ansätze:

dNTP-Gemisch	0,2 mM
Vorwärts-Oligonukleotid	0,4 pM
Rückwärts-Oligonukleotid	0,4 pM
DNS Polymerase	0,04 U/µl
DNS	4 ng/µl
ThermoPol Puffer in H ₂ O	(1x)

Die Bedingungen der verschiedenen, im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten PCR-Ansätze sind in der unten stehenden Tabelle angegeben:

Ziel der PCR	N-TIMP-1			mycTag Amplifikation			Re-PCR CHO		
Denaturierung	95°C	120 sek		94°C	5 min		94°C	3 min	
Denaturierung	95°C	4 sek	35x	94°C	30 sek	35x	94°C	30 sek	35x
Anlagerung	52°C	4 sek		64°C	30 sek		58°C	1 min	
Elongation	72°C	20 sek		72°C	30 sek		72°C	1 min	
Elongation	72°C	50 sek		72°C	5 min		72°C	7 min	
Gerät	Speed Cycler			Perkin Elmer			Robocycler		

Alle Proben wurden mit Mineralöl überschichtet. Nach Beenden der Reaktion wurden die Proben auf Laborfilm vom Öl getrennt und entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert.

4.2.2.12 Mutagenese-PCR

Die Mutagenese einzelner Aminosäuren von TIMP-1 wurde mittels des kommerziell erhältlichen Reagenzienpakets *QuikChange® site directed Mutagenesis Kit* der Firma Stratagene nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Oligonukleotide wurden mithilfe der Software der Firma geplant und die Anlagerungstemperatur wie im Protokoll beschrieben angepasst.

4.2.2.13 DNS-Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmide wurde als Auftragsarbeit von der Firma Entelechon durchgeführt. Dabei wurden zur Sequenzierung von Konstrukten im pEF-Plasmid die Oligonukleotide pEF_Insert_FW und pEF_Insert-RV sowie für die Sequenzierung von DNS im pUC19-Plasmid die Oligonukleotide M13_FW und M13_RV verwendet.

4.2.2.14 Stabile Transfektion in CHO-Zellen

Um in Eukaryontenzellen eine stabile Expression des mittels pEF-Plasmid transfizierten Konstrukts zu erreichen, muss sich die Vektor-DNS stabil in die chromosomale DNS der Zielzellen integrieren. Dies wird durch homologe oder nicht-homologe Rekombination erreicht. Die linearisierte DNS wird dabei über Elektroporation in die Zielzellen eingebracht („Transfektion“); danach werden mittels geeigneter Selektionsmethoden nur solche Zellen weiter vermehrt, die die DNS stabil in ihre chromosomale DNS integriert haben. Um die GPI-verankerten TIMP-1-Konstrukte stabil in CHO-Zellen zu transfizieren, wurden die Plasmide durch einen Restriktionsverdau mit *NdeI* linearisiert, da die Wahrscheinlichkeit, dass das gewünschte Gen in der linearisierten DNS intakt über Rekombination in chromosomale DNS integriert werden kann, höher ist. Die Zellen

wurden am Vortag geteilt, so dass am Tag der Transfektion ein etwa 90% konfluenten Zellrasen zur Verfügung stand. Die Zellen wurden mit 4 mM EDTA in PBS abgelöst, für 3 Minuten bei 220 x g zentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen. 1×10^7 Zellen pro Transfektionsansatz wurden in 400 μ l PBS aufgenommen und 30 μ g der linearisierten DNS in 90 μ l Injektionswasser zugegeben. Nach einer zehnmütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen bei 960 μ F und 260 V elektroporiert und danach erneut für 10 Minuten auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die transfizierten Zellen in Vollmedium in eine Zellkulturflasche gegeben und für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das Vollmedium durch ein Selektionsmedium ersetzt. Die verwendeten CHO-Zellen haben eine Dihydrofolatreduktase (DHFR)-Defizienz. Dieses Enzym ist essentiell für die Nukleotid-Biosynthese, so dass die Zellen ein Supplement für das Wachstum benötigen, welches eine Mischung aus Natriumhypoxanthin und Thymidin enthält, also Purine und Pyrimidine, die die DHFR-defizienten Zellen selbst nicht produzieren können. Mit der Transfektion des pEF_{DHFR} Plasmids wird auch das Gen für DHFR wieder in die Zellen eingebracht, so dass eine Selektion der Zellen mittels Hypoxanthin-freiem Medium möglich ist. Zusätzlich wird dialysiertes Serum verwendet, welches ebenfalls frei von Thymidin und Hypoxanthin ist. in regelmäßigen Abständen. Um die Expression der transfizierten Konstrukte in den Zellen zu kontrollieren, wurde in regelmäßigen Abständen RNS aus transfizierten Zellen isoliert, mittels Reverser Transkription in cDNS umgeschrieben, und eine PCR nach TIMP-1 durchgeführt (siehe Kapitel 4.2.2.11, PCR, und Kapitel 4.2.2.15, RNS-Isolierung).

4.2.2.15 mRNA-Isolierung und Reverse Transkription von RNS in cDNS

Gesamt-RNS von CHO-Zellen wurde nach dem Protokoll des Herstellers mit einem Reagenzienpaket der Firma Invitrogen isoliert. Der optionale DNase-Verdau wurde durchgeführt und die RNS am Ende mit 30 μ l RNase-freiem Wasser von den Säulen eluiert. Die Konzentration der isolierten RNS wurde fluorometrisch mit dem Qubit-Fluorometer bestimmt. Nach der Konzentrationsbestimmung wurden 2 μ g RNS für die Reverse Transkription sowie 0,2 μ g RNS für die Kontrolle ohne Reverse Transkriptase (RT_{minus}) in neue Gefäße überführt. Die folgende Reaktionslösung wurde für alle Ansätze hergestellt:

First Strand Buffer (5x)	1x
DTT	0,5 mM
dNTP	2 mM
RNAsin	0,025 U/ μ l
Acrylamid	62,5 ng/ml
Hexamernukleotide (10x)	1x

Die Reverse Transkription wurde ohne Änderungen nach dem Protokoll der Firma Applied Biosystems durchgeführt. 2 µg RNS wurden mit der Reaktionslösung und dem Enzym Reverse Transkriptase in einem Endvolumen von 40 µl in cDNS umgeschrieben. Für den RT_{minus}-Ansatz wurden jeweils 0,2 µg RNS eingesetzt, allerdings ohne das Enzym. In der Reaktionslösung der RT_{plus}-Ansätze waren je 4,3 U *Superskript II* Reverse Transkriptase enthalten; dies wurde in der Reaktionslösung für die RT_{minus}-Ansätze durch Wasser ersetzt. Anschließend wurden die Proben für 90 Minuten bei 42°C und leichtem Rütteln im Heizblock inkubiert. Alle Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

4.2.2.16 Herstellung mikrobiologischer Nährböden

Zur Herstellung von Agar-Platten für die Bakterienkultur wurde 3%iger Agar durch Erwärmen verflüssigt und mit 2x LB-Medium in gleichem Volumenverhältnis gemischt. Nach Zugabe von Ampizillinlösung (Endkonzentration 100 µg/ml) wurde die Flüssigkeit in Petrischalen gegossen und bis zum Erstarren stehen gelassen. Die Platten wurden verpackt und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

4.2.3 Klonierungsstrategie

4.2.3.1 Klonierung von TIMP-1-GPI

Die GPI-verankerte Variante des humanen TIMP-1 wurde bereits in Vorarbeiten dieses Labors hergestellt (Djafarzadeh et al. 2004). Hierfür wurde die Signalsequenz für den GPI-Anker mittels PCR aus LFA-3 amplifiziert und gleichzeitig eine *Xba*I-Schnittstelle am 5'- und eine *Sa*II-Schnittstelle am 3'-Ende eingeführt. Über diese Schnittstellen wurde die Signalsequenz in den pUC19-Vektor kloniert. TIMP-1 wurde mittels PCR aus humaner cDNS amplifiziert und gleichzeitig mittels mutagener Oligonukleotide eine *Eco*RI-Schnittstelle am 5'- und eine *Xba*I-Schnittstelle am 3'-Ende eingefügt. Anschließend wurde TIMP-1 über die eingeführten Schnittstellen vor die Signalsequenz zur GPI-Verankerung in den pUC19-Vektor ligiert. Nachdem das Plasmid zur Vermehrung in *E. coli* DH5α-Bakterien transformiert wurde, wurde die Gesamtsequenz von TIMP-1-GPI über die Restriktionsschnittstellen *Eco*RI und *Sa*II in das pEFD_{HFR} Plasmid zur Expression in CHO-Zellen subkloniert.

4.2.3.2 Klonierung des Doppel-mycTags

Das doppelte mycTag wurde aus dem retroviralen Vektor MP71 mittels der Oligonukleotide p2xMycTag_FW und p2xMycTag_RV amplifiziert und hierbei gleichzeitig eine *Xba*I-Schnittstelle am 5'- und eine *Nhe*I-Schnittstelle am 3'-Ende eingefügt. Das mycTag wurde anschließend mittels dieser Schnittstellen in ein pUC19-Plasmid vor die GPI-Anker-Signalsequenz ligiert, wobei die *Nhe*I-Schnittstelle durch eine Ligation mit *Xba*I verloren ging.

4.2.4 Allgemeine Vorgehensweise bei der Klonierung der TIMP-1-Varianten

Für die Klonierung der TIMP-1-Varianten wurde zunächst die Sequenz des Doppel-mycTags mit der Signalsequenz zur GPI-Verankerung über die *Xba*I und *Sa*II Schnittstellen (vgl. 4.2.3.2) in ein pEF_{DHFR} Plasmid ligiert. Anschließend wurden die Gensequenzen für alle TIMP-1-Varianten mittels PCR oder Mutagenese-PCR hergestellt und über die Schnittstellen *Eco*RI und *Xba*I in das pEF_{DHFR} Plasmid mit den Sequenzen für das Doppel-mycTag und die GPI-Signalsequenz kloniert. Danach wurden die verschiedenen Plasmide mit *Nde*I linearisiert und in CHO-Zellen transfiziert.

4.2.4.1 Klonierung von N-TIMP-1

Die Aminosäuren 1-126, entsprechend der N-terminalen Domäne von TIMP-1 (N-TIMP-1) und die zusätzlichen Aminosäuren 127-129 als kurze Brückensequenz zum mycTag, wurden mittels PCR mit den Oligonukleotiden T1_in_FW und NT1_RV sowie pEF_{DHFR}TIMP-1-GPI als Matrizen-DNS amplifiziert. Gleichzeitig wurde bei dieser PCR mittels des mutagenen Primers NT1_RV eine *Xba*I-Schnittstelle am neu entstandenen 3'-Ende eingeführt und zusätzlich die Aminosäure Cys127 zu einem Serin mutiert, damit später in dem Protein kein freies Cystein vorhanden ist. Das für N-TIMP-1 codierende DNS-Fragment wurde anschließend, wie in Kapitel 4.2.4 beschrieben, über die Schnittstellen *Eco*RI und *Xba*I in das pEF_{DHFR} myc-GPI Plasmid ligiert.

4.2.4.2 Klonierung von VV-TIMP-1

Die VV-Mutante von TIMP-1 enthält zwei zusätzliche Valinreste am N-Terminus, die zwischen die Signalsequenz zur Sekretion und die für TIMP-1 codierende Sequenz eingeführt wurden. VV-TIMP-1 wurde mittels Mutagenese-PCR von einer anderen Mutante, MA-TIMP-1, amplifiziert. MA-TIMP-1 wird im Rahmen dieser Arbeit nicht behandelt. Diese Variante enthält zusätzlich ein Methionin und ein Alanin am N-Terminus. Für die Herstellung der VV-Mutante von TIMP-1 wurden die Codons für Methionin und Alanin mittels Basenpaaraustausch durch muta-

gene Oligonukleotide in zwei Valinreste umgewandelt. Hierfür wurde eine PCR mit dem Mutagenese-System der Firma Stratagene und den Oligonukleotiden VV_NT1Pi_FW und VV_NT1Pi_RV sowie pUC19 MA-TIMP-1-GPI als Matrizen-DNS durchgeführt und anschließend VV-TIMP-1 wie oben beschrieben über die Schnittstellen *EcoRI* und *XbaI* in das pEF_{DHFR} myc-GPI Plasmid ligiert.

4.2.5 Protein-biochemische Methoden

4.2.5.1 Produktion des anti-mycTag Antikörpers 9E10

Die Hybridomzellen der Linie 9E10 wurden wie in Kapitel 4.2.1.1 beschrieben kultiviert. Nach dem Medienwechsel der Zellen in farbloses RPMI mit speziellem, immunglobulinarmem Serum wurden die Zellen darin für eine weitere Woche kultiviert. Zur Gewinnung des Überstandes wurden die Zellen bei 2000 x g für 10 min abzentrifugiert und durch Filter mit 0,22 µm Poren feste Bestandteile abgetrennt. Aus dem Überstand wurden die Antikörper mittels des FPLC-Systems über eine ProteinA-Sepharose Säule mit 2 ml Volumen gereinigt. Die Säule wurde für 5 CV mit Phosphatpuffer äquilibriert und der Überstand bei einer Flussrate von 1 ml/min aufgetragen. Nach einem Waschschrift für 5 CV mit Phosphatpuffer wurden die Immunglobuline mit Zitratpuffer von der Säule eluiert. Die Fraktionen wurden anschließend sofort mit Tris (1 M, pH 8) auf pH 7,5 neutralisiert. Eine Analyse der Fraktionen erfolgte mittels Coomassiefärbung und Konzentrationsbestimmung nach der Bradford-Methode. Proben der Fraktionen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel wie in Kapitel 4.2.5.7 beschrieben mit Coomassie gefärbt. Die Fraktionen, die das stärkste Antikörpersignal zeigten, wurden vereinigt und über eine Desaltingsäule in PBS umgepuffert. Die Konzentration des Antikörpers wurde mit der Bradford-Methode bestimmt. Anschließend wurden kleine Portionen des mycTag-spezifischen Antikörpers bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

4.2.5.2 Aufreinigung der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten durch Säulenchromatographie

4.2.5.2.1 Allgemeines

Die Reinigung der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten erfolgte mittels Säulenchromatographie an einem FPLC-System (*fast protein liquid chromatography*-System). Hierfür wurde das zwischen Proteindomäne und GPI-Anker eingefügte mycTag zur Bindung an eine Antikörpersäule verwen-

det. Der speziell von der Firma MBL entwickelte mycTag-spezifische Antikörper wurde kovalent an das Säulenmaterial Sepharose gebunden und erlaubte eine milde Elution mittels kompetitiver Peptidbindung. Dies machte einen Elutionspuffer mit einem pH-Wert im sauren Bereich unnötig und schonte das gereinigte Protein. Ein erster Vorreinigungsschritt erfolgte mittels eines Extraktionsschritts in hypotonischem Puffer. Hierbei wurden zytosolische Proteine durch mechanische Zerstörung der Zellen und einem Zentrifugationsschritt zuerst abgetrennt und anschließend die Membranproteine extrahiert, wie in Kapitel 4.2.5.1.3 beschrieben.

Alle verwendeten Puffer der Extraktion und der Säule enthielten Triton X-100H als Detergens. Da mit der Einführung des GPI-Ankers an das Protein der C-Terminus der Proteine lipophilen Charakter erhält, mussten die Puffer Detergens enthalten, um die Proteine in Lösung zu halten. Die Detektion von Proteinen bei der Säulenchromatographie erfolgte mittels UV-Absorption, weshalb hydrogenisiertes Triton X-100 (Triton X-100H) verwendet wurde, das keine Eigenabsorption aufweist.

Das FPLC-System wurde mit einem Computer gesteuert. UV-Absorption, Salzkonzentration, Flussrate, Puffer und andere wichtige Parameter wurden mithilfe der Software Unicorn 4.0 oder Unicorn 5 (abhängig davon, welches FPLC-System benutzt wurde) erfasst und graphisch dargestellt.

4.2.5.2.2 Vorgehensweise

Das Sepharosematerial mit dem kovalent gekoppelten mycTag-spezifischen Antikörper wurde luftblasenfrei in eine Glassäule gegossen. Die Säulen hatten ein standardmäßiges Volumen von 1 ml. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden die Säulen in 0,1% Natriumazid-Lösung gelagert und vor dem Gebrauch mit PBS gespült. Das FPLC-System und die Schläuche wurden in 20% Ethanol gelagert und vor Gebrauch mit Wasser gespült. Das Material einer Säule konnte bis zu zehnmal wiederverwendet werden.

Alle Lösungen und Puffer enthielten ausschließlich pyrogenfreie Bestandteile, auch Plastikmaterial, Pipettenspitzen und Filter waren pyrogenfrei. Dies war wichtig, um die gereinigten Proteine für *in vivo* Versuche verwenden zu können.

4.2.5.2.3 Extraktion der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten aus den CHO-Zellen

$1,5 \times 10^8$ CHO-Transfektanten wurden in 5 ml hypotonischem Lysepuffer resuspendiert und in eine Spritze aufgenommen. Durch achtmaliges Resuspendieren mit einer 25G-Nadel wurden die

Zellen mechanisch aufgebrochen, die Membranfragmente bei 16000 x g und 4°C abzentrifugiert und in 7 ml Extraktionspuffer aufgenommen. Nach einstündiger Inkubation bei 4°C auf einem Rollersystem wurden die festen Zellbestandteile bei 16000 x g für 20 Minuten abzentrifugiert und der Überstand mit den extrahierten Proteinen mittels Filter mit 0,22 µm Porengröße von Zellresten getrennt.

4.2.5.2.4 *Myc-Affinitätschromatographie*

Das zur Lagerung verwendete Natriumazid wurde mit PBS aus der myc-Affinitätssäule gewaschen und die Säule anschließend mit 5 Säulenvolumina (CV) Äquilibriumspuffer vorbereitet. Der Schlauch zum Auftragen des Proteingemisches wurde ebenfalls mit Äquilibriumspuffer gespült. Die zweite Pumpe wurde mit Waschpuffer gespült. Das Proteingemisch wurde über Nacht mit der niedrigsten Flussrate, die bei diesem System möglich ist (0,01 ml/min), auf die Säule aufgetragen und ungebundene Proteine mit 2 CV Puffer ausgewaschen. Anschließend wurde die Säule mit 3 CV Waschpuffer und solange mit Äquilibriumspuffer gespült, bis das Salz des Waschpuffers ausgewaschen war. Die Elution erfolgte mit 5 ml myc-Peptid (0,01 mg/ml) in Äquilibriumspuffer und wurde beendet, wenn die UV-Absorption wieder das Ausgangsniveau erreicht hatte.

4.2.5.2.5 *Analyse der Proteinreinigung*

Die Elutionsfraktionen der myc-Affinitätschromatographie wurden mittels Western-Analyse untersucht. Die Fraktionen mit der höchsten TIMP-1 Konzentration wurden gesammelt und durch Filter der Porengröße 0,1 µm steril filtriert. Die Proteinkonzentration wurde mittels ELISA bestimmt und die Reinheit in einer Silberfärbung untersucht (siehe Kapitel 4.2.5.4.2 und 4.2.5.6).

4.2.5.3 **Gelelektrophorese und Western-Analyse**

4.2.5.3.1 *Gießen eines SDS Gels*

Der Prozentanteil des Acrylamid/Bisacrylamid-Gemisches in den SDS-Gelen wurde nach der Größe des nachzuweisenden Proteins gewählt und ist in dieser Arbeit in der jeweiligen Beschreibung zur Western-Analyse angegeben.

Die Gelform wurde aus Glasplatte, Aluminiumoxidplatte und den beiden Abstandshaltern zusammengebaut und die Gießapparatur eingespannt. Anschließend wurde die Gellösung für das

Trenngel vorbereitet. In der unten stehenden Tabelle sind Wasservolumen und das Volumen der Gelmischung angegeben, die für ein Gesamtvolumen von 20 ml Gellösung verwendet wurden.

	8%	10%	12%	15%
Gelmischung (ml)	9,3	7,9	6,6	4,6
H ₂ O (ml)	5,3	6,7	8	10

Zu allen Gellösungen wurden 5 ml Tris (pH 8,0), 0,1 % SDS, 0,1 % APS und 0,01% TEMED in genau dieser Reihenfolge zugegeben, so dass sich ein Gesamtvolumen von 20 ml ergab. Nachdem die Lösung für das Trenngel in die Gelform pipettiert wurde, wurde sie mit Isobutanol (in Wasser ausgeschüttelt) überschichtet, um eine gerade Trenngelkante zu erreichen. Das Trenngel wurde 5,5 cm hoch gegossen. Nachdem das Gel vollständig polymerisiert war, wurde die Lösung für das Sammelgel (immer 5%) gemischt, nach Abkippen des Isobutanols die Oberfläche des Trenngels damit gespült und die Gelform vollständig damit aufgefüllt, so dass ein 5% Sammelgel mit 2,5 cm Länge entstand. Sofort wurde ein Kamm mit der gewünschten Taschenanzahl und -breite eingesetzt. Nach vollständiger Polymerisation wurde der Kamm aus dem Gel gezogen, die Taschen mehrmals mit Wasser ausgespült und das Gel bis zur Verwendung bei 4°C in feuchten Tüchern gelagert.

4.2.5.3.2 Allgemeine Vorgehensweise bei der Elektrophorese

Die Proben wurden für eine Analyse unter nicht-reduzierenden Bedingungen im Verhältnis 3 VE (Volumeneinheiten) Probe + 1 VE LDS-Ladepuffer (4x) mit Ladepuffer und zusätzlich mit 5% Proteaseinhibitoren versetzt. Anschließend wurden die Proben für 15 min bei 50°C erhitzt und nach kurzem Abzentrifugieren das gewünschte Volumen auf das Gel aufgetragen.

Um Proteinproben unter reduzierenden Bedingungen zu analysieren, wurden sie im Verhältnis 2 VE Probe + 1 VE Laemmli-Puffer (3x) und zusätzlich 5% Proteaseinhibitoren versetzt. Diese Proben wurden für 5 min bei 95°C erhitzt, kurz abzentrifugiert und das gewünschte Volumen in die Taschen eines Gels pipettiert.

Zusätzlich wurden für alle Gele 1 µl des MagicMark Größenstandards auf das Gel aufgetragen, sowie bei Bedarf 5 µl vorgefärbten Proteinstandards PageRuler, um die Trennung der Proteine im Gel und den anschließenden Transfer auf die Membran zu kontrollieren.

Die Proben wurden bei 80 V in das Sammelgel laufen gelassen, dann bei 120 V aufgetrennt und

anschließend bei 30 V für 1 h in einem Nass-Blot-Gerät auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde für zwei bis vier Stunden mit 5% TBST-Milch blockiert und nach zweimaligem Waschen mit Wasser über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper auf einem Schüttelmischer inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran vier Mal für 10 min mit TBST gewaschen und für 1 h mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem viermaligen Waschen mit TBST und zweimaligem Waschen mit TBS wurde die Membran im Dunkelraum weiter gefärbt. Zur Entwicklung wurde die Membran mit 4 ml des ECL-Substrats für eine Minute inkubiert, kurz mit Filterpapier abgetupft und zwischen zwei Folien gelegt. Diese wurde anschließend für die gewünschten Entwicklungszeiten in einer Filmkassette fixiert und mit einem Röntgenfilm bedeckt. Der Film wurde anschließend in der Entwicklungsmaschine entwickelt und getrocknet.

Western-Analyse der FPLC-Fraktionen:

Zur Analyse der FPLC-Fraktionen der gereinigten TIMP-1-GPI-Varianten wurden die Proteine unter nicht-reduzierenden Bedingungen in einer SDS-PAGE in einem 12% SDS-Gel getrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und diese mit 0,5 µg/ml hTIMP-1-spezifischem Antikörper gefärbt. Der Nachweis erfolgte mit anti-mIg/HRP Antikörper (1:5000 in 5% TBST-Milch). Um die Proteinbanden optimal darstellen zu können, wurden Filme mit unterschiedlichen Entwicklungszeiten, zwischen einer Sekunde und fünf Minuten, angefertigt.

Western-Analyse der Proteinexpression in CHO-Zellen:

Zur Analyse der TIMP-1-GPI-Varianten in den transfizierten CHO-Zellen wurden Proteinextrakte aus $1,5 \times 10^8$ CHO-Zellen hergestellt, 0,4 µg Proteinextrakt pro Spur in einem 12% SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit 0,5 µg/ml anti-hTIMP-1 Antikörper oder 1 µg/ml anti-mycTag Antikörper gefärbt. Der Nachweis erfolgte mit anti-mIg/HRP Antikörper (1:5000 in 5% TBST-Milch). Um die Proteinbanden optimal darstellen zu können wurden Filme mit unterschiedlichen Entwicklungszeiten, zwischen einer Sekunde und fünf Minuten, angefertigt.

Western-Analyse der Untersuchung der Glykosylierung mit Tunicamyzin:

Von den wie in Kapitel 4.2.6.1 beschrieben hergestellten Proteinextrakten wurden 0,5 µg pro Probe in einer 12% SDS-PAGE aufgetrennt. Hierfür wurden die Proteinextrakte mit LDS-Ladepuf-

fer versetzt. Die anschließende Western-Analyse erfolgte, wie oben für die Analyse von FPLC-Fraktionen beschrieben.

Nachweis von MMP-7 in Kulturüberständen von Nierenkarzinomzellen

Kulturüberstände von Nierenkarzinomzellen der Linie A-498 wurden wie in Kapitel 4.2.6.4.2 beschrieben hergestellt. Je 30 µl der Überstände wurden mit LDS-Ladepuffer versetzt und in einer 15% SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran wurde diese nach dem oben angegebenen Protokoll mit 2 µg/ml anti-hMMP-7 Antikörper gefärbt und die Färbung mit dem ECL-System entwickelt.

4.2.5.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

4.2.5.4.1 Methode nach Bradford

Proteinkonzentrationen in Zellkulturüberständen oder Zellextrakten wurden nach der Bradford-Methode bestimmt. Eine Standardkurve wurde mit verschiedenen Verdünnungen von BSA sowie unterschiedlichen Verdünnungsstufen der Proben hergestellt. Nach Zugabe von 50 µl BioRad-Reagenz zu je 200 µl der Proteinverdünnungen wurde die Absorption bei 590 nm am Plattenlesegerät gemessen. Nach Erstellen einer Standardkurve mit den verschiedenen Verdünnungen von BSA konnten die Konzentrationen errechnet werden.

4.2.5.4.2 ELISA zur Bestimmung der Konzentration der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten

Zur Bestimmung der Konzentration der gereinigten GPI-verankerten TIMP-1 Mutanten wurde ein Sandwich-ELISA entwickelt, bei dem die Platte mit einem mycTag-spezifischen Antikörper beschichtet wurde und nach Bindung der Proteine ein Nachweis mit einem polyklonalen TIMP-1 Antikörper erfolgte. Für die Eichkurve wurde das Protein VV-TIMP-1-mycStop verwendet. Dieses Protein entspricht in seiner Struktur exakt dem GPI-verankerten VV-TIMP-1, enthält jedoch keinen GPI-Anker, sondern endet nach dem mycTag. Es wurde in diesem Labor kloniert und ebenfalls in CHO-Zellen synthetisiert, aber von der kooperierenden Arbeitsgruppe von Christian Ries gereinigt. Da es sich hierbei nicht um ein Membranprotein sondern um eine sezernierte Variante handelt, kann es aus dem Überstand der Zellen gewonnen werden und die Reinigung über die myc-Affinitätssäule ergibt große Mengen sehr reinen Proteins. Die Konzentration dieses gereinigten Proteins wurde mittels der Coomassie-Bradford-Methode bestimmt und als Standard-

konzentration für den ELISA verwendet.

Je 100 μ l anti-mycTag Antikörper (4 μ g/ml in PBS) wurden in die Vertiefungen der speziell proteinbindenden Mikrotiterplatte *Maxisorp* pipettiert und die durch eine Folie verschlossene Platte über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Nach 12-18 Stunden wurde der Antikörper abgekippt, die Platte einmal mit Waschpuffer gewaschen und auf Zellstoff ausgeklopft, bis keine Tropfen mehr in den Vertiefungen zu sehen waren. Nach Inkubation mit je 300 μ l Blockierlösung pro Vertiefung für zwei Stunden bei Raumtemperatur wurde die Platte fünfmal gewaschen. Nach jedem Befüllen mit Waschpuffer und Abkippen wurde die Platte auf Zellstoff trocken geklopft. Dieser Waschschrift wurde auch nach jedem der folgenden Schritte durchgeführt. Die Proben wurden in Assaypuffer verdünnt, je 100 μ l in Doppelansätzen in die Vertiefungen pipettiert und je 50 μ l biotinylierter Sekundärantikörper (1:1000 verdünnt in Assaypuffer, Angabe des Herstellers) zu den Proben gegeben. Die Proben und der Sekundärantikörper wurden für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttelmischer inkubiert und die Platte anschließend gewaschen. Das Streptavidin-HRP wurde 1:5000 in Assaypuffer verdünnt und je 100 μ l davon in den Vertiefungen für 1 h auf dem Schüttelmischer inkubiert. Nach einem anschließenden Waschschrift wurden je 100 μ l Entwicklungslösung in die Vertiefungen pipettiert, die Platte bis zur gewünschten Blaufärbung der Proben oder maximal 20 min im Dunklen inkubiert und die Reaktion mit 50 μ l 1M H₂SO₄ gestoppt, wobei ein Farbumschlag ins Gelbe stattfand. Die Absorption der Proben wurde im Plattenlesegerät bei 450 nm gemessen und die Konzentration der Proben anhand der Standardkurve berechnet.

4.2.5.5 Denaturierung der gereinigten Proteine

Um die Proteinaktivität der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten zu zerstören, wurden diese im Heizblock erhitzt. Diese denaturierten Proteine (denatTIMP-1-GPI, denatN-TIMP-1-GPI, denatVV-TIMP-1-GPI) wurden als Negativkontrollen für die Versuche verwendet. Die Denaturierung erfolgte bei 99°C für eine Stunde. Die Proteine wurden anschließend bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

4.2.5.6 Silberfärbung

Zur Prüfung der Reinheit der gereinigten TIMP-1-GPI-Varianten wurde nach jeder Präparation eine Silberfärbung durchgeführt. Hierfür wurden 10 μ l der Proben der gereinigten Proteine unter nicht-reduzierenden Bedingungen in einer 12% SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend

eine Färbung des Gels mit dem Reagenzienpaket für Silberfärbung durchgeführt. Hierbei wurde das Protokoll des Herstellers für hohe Sensitivität befolgt.

4.2.5.7 Coomassie-Färbung

Für die Färbung eines Gels wurde dieses zuerst 30 min in Fixierungslösung inkubiert und anschließend bis zur gewünschten Färbung in Coomassie-Färbelösung geschüttelt (3-6 h). Es folgte eine Entfärbung des Hintergrundes in der Fixierungslösung für 10-30 min und eine Inkubation in Entfärbelösung für 30 min. Anschließend wurde das Gel mit Wasser gewaschen und mithilfe eines Flachbettscanners dokumentiert.

4.2.5.8 Lyophilisieren der Proteine

Um die GPI-verankerten TIMP-1-Varianten zu lyophilisieren, wurden sie in pyrogenfreie Gefäße überführt, die mit Parafilm abgeschlossen wurden. In den Parafilm wurden mit einer Kanüle Löcher gestochen. Nachdem die Proteine in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden, wurden sie in die vorgekühlte Lyophile gestellt. Wenn keine Flüssigkeit mehr in den Proben zu sehen war, wurden die Gefäße mit Deckeln verschlossen und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

4.2.5.9 Reverse Zymographie

4.2.5.9.1 Gießen des Gelatine-Protease-Gels

Die Reverse Zymographie wurde mit minimalen Abweichungen nach dem Protokoll in *Current Protocols in Protein Science* (2003) durchgeführt (Troeberg 2003).

Zum Gießen des Gels für die Reverse Zymographie wurden Abstandshalter mit 0,75 mm verwendet. 10% SDS-Gele wurden nach Angabe in Kapitel 4.2.5.3.1 hergestellt. Ein Teil des Wassers wurde durch Gelatine ersetzt. Außerdem wurden zusätzlich 100 ng rhMMP-2 oder -9 (aktive Formen) zu dem Gelgemisch gegeben. Das Sammelgel wurde ohne Änderungen mit 5% Acrylamid hergestellt. Für das Trenngel ergaben sich folgende Endkonzentrationen:

0,5 mg/ml	Gelatine
375 mM	Tris (pH 8,8)
10%	Acrylamidgemisch (Acrylamid: Bisacrylamid = 37,5:1)
0,1%	SDS (w/v)
0,1%	APS (w/v)
0,01%	TEMED (v/v) in H ₂ O
100 ng	rhMMP-2 oder -9 pro Minigel (5 ml Gellösung)

Nach der Polymerisation wurde das Gel sofort für die Reverse Zymographie verwendet und nicht aufbewahrt, um eine Beeinträchtigung der Proteaseaktivität durch das im Gel enthaltene SDS auszuschließen.

4.2.5.9.2 Elektrophorese und Entwicklung

Für die Reverse Zymographie wurden lyophilisierte Proteine verwendet und die Proteine beim Lösen durch Verwendung von weniger Volumen um das 10-fache ankonzentriert. Die Proteine wurden mit 4x LDS-Ladepuffer versetzt und 6 pmol auf die Spuren des Gelatinegels aufgetragen. Zusätzlich wurde ein farbiger Größenstandard zur Kontrolle der Elektrophorese verwendet. Das Gel lief 90 min bei 120 V und wurde anschließend nach dem Protokoll einer Zymographie entwickelt und gefärbt (siehe Kapitel 4.2.6.4.3). Die Entwicklungszeit wurde hierbei auf 36 h verkürzt. Nach der Coomassiefärbung wurden die Gele durch Scannen dokumentiert.

4.2.5.10 Aktivitätsversuch für MMP-3

Um die GPI-verankerten TIMP-1-Varianten auf ihre Inhibitionsaktivität gegen MMP-3 zu testen, wurde ein peptidbasierter Versuchsaufbau gewählt. Der Versuch wurde von einem Kooperationspartner, der AG Christian Ries, durchgeführt. Als Substrat diente ein fluoreszenzmarkiertes Peptid (Mca-R-P-K-P-V-E-Nval-W-R-K(Dnp)-NH₂), wobei die Fluoreszenz unterdrückt ist und erst durch die proteolytische Spaltung des Peptids freigesetzt wird. Dies geschieht durch die katalytische Domäne von MMP-3 (rhMMP-3_{kat}), die der AG Ries von H. Nagase, Imperial College London, zur Verfügung gestellt wurde. 10 nM rhMMP-3_{kat} wurden mit 0,5 nM, 2 nM oder 4 nM der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten in TNCZB-Puffer versetzt. Die Ansätze wurden für eine Stunde bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Das fluorogene Peptidsubstrat wurde in Tris/NaCl-Puffer auf 100 µM verdünnt. Nach der Inkubationszeit wurden 10 µM zum Enzym-Inhibitor-Ansatz gegeben. Messungen erfolgten im Abstand von 10 min bei einer Anregungswellenlänge von 320 nm und einer Emissionswellenlänge von 405 nm am Plattenlesegerät, sowie eine Endpunktmessung nach 60 min.

4.2.5.11 Immunpräzipitation der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten

Um zu überprüfen, ob nach der Sekretion die N-terminal eingefügten Valinreste im Protein erhalten sind, wurden die N-terminalen Enden von TIMP-1-GPI und VV-TIMP-1-GPI mittels Edman-Abbau sequenziert. Hierfür wurde eine Immunpräzipitation aus den extrahierten Protein-

gemischen der transfizierten CHO-Zellen durchgeführt. Als Kontrolle wurde eine Immunpräzipitation mit untransfizierten CHO-Zellen durchgeführt (Kontrollextrakt). Alle folgenden Schritte wurden im Kühlraum bei 4°C durchgeführt.

2×10^8 transfizierte CHO-Zellen der Linien TIMP-1-GPI und VV-TIMP-1-GPI wurden in 1 ml Extraktionspuffer EBT resuspendiert und für eine Stunde auf dem Drehmischer inkubiert. Nach Abzentrifugieren der festen Zellreste bei $16000 \times g$ für 20 min wurde ein Vorreinigungsschritt (preclearing) durchgeführt. Hierzu wurde der Überstand der Proteinextraktion für 3 Stunden mit 50 μ l ProteinG-Agarose inkubiert, um unspezifisch an ProteinG bindende Proteine im Gemisch vorab abzutrennen. Anschließend wurden die Proben bei $12000 \times g$ für 30 Sekunden abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt.

Mittels Zugabe von 30 μ g mycTag-spezifischem Antikörper (9E10) und Inkubation für zwei Stunden wurden die rekombinanten Proteine im Gemisch an den Antikörper gebunden. Während der darauf folgenden Inkubationszeit über Nacht auf dem Drehmischer wurde der Antikörper-Protein-Komplex an 50 μ l ProteinG-Agarosekügelchen gebunden.

Anschließend erfolgte eine Reinigung der Agarosekügelchen. Hierfür wurde je zweimal mit je 500 μ l Waschpuffer A, Waschpuffer B und einmal mit Waschpuffer C gewaschen. Bei jedem Waschschrift wurden die Proben bei $12000 \times g$ für 1 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Zugabe des jeweiligen Waschpuffers wurden die Proben durch sanftes Anschneiden der Röhrchen gelöst und für 10 min auf dem Drehmischer inkubiert. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Kügelchen in 30 μ l 1x Lämmli-Puffer resuspendiert und für 5 min bei 95°C erhitzt. Durch Zentrifugation für 10 min bei $16000 \times g$ wurden die Agarosekügelchen von den Proteinen getrennt. Je 1 μ l der Proben wurde auf eine zusätzliche Spur des Gels zur Kontrolle der Banden mittels Western-Analyse aufgetragen und die restliche Probe anschließend auf ein 15% SDS-Gel aufgetragen. Die Elektrophorese der Proben sowie der Transfer und die Färbung der Membran mit dem anti-mycTag Antikörper 9E10 wurden wie in Kap. 4.2.5.3 beschrieben durchgeführt. Die Membran mit den für die Sequenzierung bestimmten Proben wurde nach dem Transfer mit einem Skalpell abgeschnitten und statt der Antikörperfärbung wurde eine Coomassie-Färbung der Membran durchgeführt (siehe Kap. 4.2.5.12).

4.2.5.12 Coomassie-Färbung von PVDF-Membranen für den Edman-Abbau

Nach dem Transferschritt wurde die Membran kurz mit Wasser gespült, wobei hier und bei den folgenden Schritten nur Reagenzien und Plastikmaterialien mit höchstem Reinheitsgrad verwen-

det wurden. Anschließend wurde die Membran für 30 min in Färbelösung ServaBlue R gefärbt und in Wasser entfärbt, bis der Kontrast zwischen blauen Banden und hellem Hintergrund deutlich wurde. Die Membran wurde getrocknet und die gefärbten Banden mit denen der Antikörperfärbung verglichen. Banden mit der richtigen Größe, korrespondierend zu TIMP-1-GPI bzw. VV-TIMP-1-GPI wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und zum Sequenzieren geschickt.

4.2.5.13 Sequenzierung der Proteine mittels Edman-Abbau

Die auf eine PVDF-Membran transferierten Proteine wurden zur Sequenzierung mittels Edman-Abbau zu Herrn R. Mentele am Max-Planck-Institut für Neurobiologie in Martinsried gesendet. Der Edman-Abbau wurde von Herrn Mentele durchgeführt.

4.2.6 *In vitro*-Versuche

4.2.6.1 Tunicamycinbehandlung

Zur Analyse des Glykosylierungsschemas der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten wurde die N-Glykosylierung in den CHO-Zellen durch eine Behandlung mit Tunicamycin gehemmt. Transfizierte CHO-Zellen der Linien TIMP-1-GPI, N-TIMP-1-GPI und VV-TIMP-1-GPI sowie untransfizierte Zellen als Kontrolle wurden in Schalen mit 6 cm Durchmesser bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert. Nach Zugabe von 1 µg/ml Tunicamycin oder DMSO in äquivalentem Volumen als Kontrolle wurden die Zellen für weitere 24 h inkubiert. Zur Herstellung der Proteinextrakte wurden die Zellen nach einmaligem Waschen mit PBS in hypotonischem Puffer abgeschabt und für eine Stunde bei 4°C auf dem Drehmischer inkubiert. Die Zellen wurden bei 16000 x g für 10 min zentrifugiert und in 200 µl Extraktionspuffer T aufgenommen. Nach erneuter Inkubation für eine Stunde auf dem Drehmischer wurden Zellfragmente wie oben beschrieben abzentrifugiert und die Überstände in ein neues Gefäß überführt. Die Analyse der Proteine erfolgte mittels Western-Analyse, wie in Kapitel 3.2.5.2 beschrieben.

4.2.6.2 FACS-Analysen

4.2.6.2.1 Nachweis der Expression der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten in CHO-Zellen sowie der Reinkorporierung der Proteine in Tumorzellmembranen

Zur Analyse der Expression der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten auf der Oberfläche der transfizierten CHO-Zellen mittels FACS wurden pro Ansatz 3×10^6 Zellen mit 4 mM EDTA in PBS abge-

löst, zentrifugiert und in serumfreies Kulturmedium aufgenommen. Die Zellen wurden jeweils mit anti-hTIMP-1, anti-mycTag und zur Kontrolle der spezifischen Antikörperbindung mit mIgG1 (je 10 µg/ml) in einem Gesamtvolumen von je 100 µl in einer Rundboden-Mikrotiterplatte für 45 Minuten auf Eis gefärbt. Nach zweimaligem Waschen mit kaltem PBS wurden die Zellen für 30 min mit 10 µg/ml RPE-konjugiertem anti-mIg inkubiert und vor der Analyse am FACS dreimal mit PBS gewaschen.

Die Analyse der Reinkorporierung der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten erfolgte nach demselben Protokoll. Zuvor wurden die Tumorzellen mit 4 mM EDTA von der Flasche abgelöst und nach einem Waschschrift mit PBS für eine Stunde mit den Proteinen in der in der Abbildung im Ergebnisteil angegebenen Konzentration, verdünnt in serumfreien RPMI, inkubiert. Vor der Färbung für die FACS-Analyse erfolgte ein weiterer Waschschrift mit kaltem PBS, anschließend wurde das oben angegebene Protokoll verfolgt.

4.2.6.2.2 Spaltung des GPI-Ankers mit PI-PLC

Um nachzuweisen, dass das gemessene Oberflächensignal auf den transfizierten CHO-Zellen und den behandelten Tumorzellen durch den Einbau der TIMP-1-Varianten mittels GPI-Anker erfolgte, wurden die Zellen mit PI-PLC behandelt. Die Zellen wurden nach dem Ablösen mit 4 mM EDTA in PBS und Zentrifugation bei 200 x g für 3 min in einer Rundboden-Mikrotiterplatte einmal mit 200 µl HBSS gewaschen und anschließend jeder Ansatz auf zwei Vertiefungen der Platte aufgeteilt, so dass jeweils $1,5 \times 10^6$ Zellen verwendet wurden. Je ein Teil wurde für eine Stunde mit 0,1 U PI-PLC in HBSS in einem Gesamtvolumen von 100 µl im Brutschrank inkubiert. Der zweite Teil wurde gleichzeitig in HBSS ohne Enzym belassen. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und nach erneutem Aufteilen in zwei Vertiefungen Färbungen mit anti-hTIMP-1 oder der Isotypkontrolle mIgG1 nach dem Protokoll in Kapitel 4.2.6.2.1 durchgeführt.

4.2.6.2.3 Nachweis von MMP auf der Zelloberfläche

Zellkultur und Reinkorporierung der Zellen mit den GPI-verankerten TIMP-1-Varianten:

Zum Bindungsnachweis der MMP durch die GPI-verankerten TIMP-1-Proteine wurden Zellen der Linie RCC-53 am Tag vor der Reinkorporierung in T75-Flaschen umgesetzt, so dass sie zum Zeitpunkt der Reinkorporierung eine Konfluenz von 70% - 80% hatten. Die Zellen wurden mit den GPI-verankerten TIMP-1-Varianten sowie rhTIMP-1 oder Puffer als Kontrolle für eine Stunde inkubiert. Hierfür wurden die Proteine in Puffer auf die angegebene Konzentration verdünnt, so

dass alle Ansätze das gleiche Volumen Puffer enthielten. Anschließend wurden die Lösungen auf 3 ml mit RPMI aufgefüllt und zu den Zellen gegeben. Während einer zweistündigen Inkubationszeit wurden die Flaschen mehrmals geschwenkt, um die Lösung gut auf den Zellen zu verteilen. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in serumfreiem RCC-Medium für weitere 22 h kultiviert.

Färbung und FACS-Analyse:

2×10^6 Zellen wurden mit 5 ml Biotase von den Flaschen abgelöst, bei 200 x g für 3 min zentrifugiert und in serumfreien RPMI resuspendiert. Je 50 μ l Zellsuspension wurde auf die FACS-Röhrchen verteilt und 50 μ l Antikörperlösung zugegeben. Verwendet wurden mIgG1, mIgG2a, mIgG2b, anti-hTIMP-1, anti-hMMP-1, anti-hMMP-3 und anti-hMMP-7 in einer Endkonzentration von 10 μ g/ml. Nach einer einstündigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen, bei 200 x g für 2 min zentrifugiert und je 100 μ l anti-mIg/Biotin mit einer Endkonzentration von 5 μ g/ml zugegeben. Die Proben wurden erneut für 45 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend gewaschen. Im letzten Färbeschritt wurde 4 μ g/ml Streptavidin-APC zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min im Dunkeln auf Eis wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden 5 μ g/ml Propidiumiodid (PI) zugegeben und die Fluoreszenz der Zellen nach kurzer Inkubationszeit am FACS-Calibur im FL-4 und FL-2 Kanal gemessen. Tote Zellen, die im FL-2 Kanal PI-positiv waren, wurden für die Analyse ausgeschlossen, die Fluoreszenz im FL-4 Kanal (entsprechend der Antikörperfärbung mit Streptavidin-APC) als Histogramm dargestellt.

4.2.6.3 Immunfluoreszenz-Mikroskopie zum Nachweis der Expression und der Reinkorporierung der Konstrukte in Tumorzellen

Um die GPI-verankerten TIMP-1-Varianten auf der Oberfläche von transfizierten CHO-Zellen oder nach der Reinkorporierung in Tumorzellen nachzuweisen, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit anschließender Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt.

Transfizierte CHO-Zellen (und untransfizierte CHO-Zellen als Kontrolle) wurden in speziellen Mikroskopschälchen gezüchtet, bis sie eine Konfluenz von 90% erreicht hatten. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und für 20 min mit 200 μ l 1% PFA in PBS bei Raumtemperatur fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden 200 μ l mycTag-spezifischer Antikörper, verdünnt auf 10 μ g/ml in HBSS, zugegeben und für 50 min inkubiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit

PBS wurden die Zellen für 50 min mit 5 µg/ml anti-mIg/Biotin in HBSS inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde der Antikörperkomplex mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin nachgewiesen. Hierfür wurden die Zellen für 40 min mit Streptavidin-RPE, 1:50 verdünnt in HBSS, in völliger Dunkelheit inkubiert. Ab diesem Schritt wurde darauf geachtet, dass die Proben nur mit sehr wenig Licht in Kontakt kamen, der Raum wurde verdunkelt und die Schälchen stets in einer licht-abhaltenden Kammer inkubiert. Die Zellen wurden erneut gewaschen, 350 µl PBS zugegeben und die Schälchen mit runden Deckgläschen bedeckt. Anschließend wurden Bilder am Fluoreszenzmikroskop mit dem entsprechenden Fluoreszenzfilter aufgenommen, die jeweilige Belichtungszeit ist unter den Abbildungen vermerkt.

Ein Nachweis der Reinkorporierung der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten mittels Immunfluoreszenz erfolgte nach dem gleichen Protokoll. Zellen der Linie RCC-53 wurden in den Schälchen gezüchtet. Vor der Färbung wurden sie einmal mit PBS gewaschen und für eine Stunde mit Lösungen mit je 0,7 nM der gereinigten Proteinen TIMP-1-GPI, N-TIMP-1-GPI oder VV-TIMP-1-GPI sowie Puffer als Kontrolle inkubiert. Nach diesem Reinkorporierungsschritt wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und anschließend nach dem oben angegebenen Protokoll gefärbt.

4.2.6.4 Zymographie

4.2.6.4.1 Herstellung von konditioniertem Überstand von HT1080-Zellen

Zur Herstellung einer Positivkontrolle für die Zymographie wurden Zellen der Fibrosarkomzelllinie HT1080, die bekannt für eine hohe Expression von Proteinen der MMP-Familie ist, bis zu einer Konfluenz von 90% kultiviert. Anschließend wurden sie mit 50 ng/ml PMA in RPMI ohne weitere Zusätze für 24 h stimuliert, dies regte die Zellen zu verstärkter MMP-Produktion an. Der Überstand wurde abgenommen und durch Zentrifugation bei 400 x g für fünf Minuten Zellreste im Überstand entfernt. Um die im Medium enthaltenen Zymogene proMMP-2 und proMMP-9 zu aktiven Proteasen zu aktivieren, wurde der Überstand für 12 h mit 2 mM APMA bei 37°C inkubiert und anschließend bis zur Verwendung in Aliquots bei -20°C gelagert. APMA löst dabei die autokatalytische Aktivierung der Proteasen aus (Stetler-Stevenson et al. 1989, siehe Kapitel 2.2.3).

4.2.6.4.2 Behandlung der Zellen

7x10³ RCC-53 Zellen wurden in einer Platte mit 48 Vertiefungen für 8 h bis zu einer Konfluenz

von 70-80% in Vollmedium kultiviert. Die GPI-verankerten TIMP-1-Varianten wurden in einer Konzentration von 0,17, 0,35, 0,5 oder 0,7 nM in einem Endvolumen von 20 µl RPMI für eine Stunde zu den Zellen gegeben und anschließend die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 200 µl RPMI ohne Zusätze für weitere 48 h kultiviert. Nach jeweils 24 und 48 h wurden je 30 µl des Kulturüberstands abgenommen.

4.2.6.4.3 *Probenvorbereitung und Gelpräparation*

Proben des Kulturüberstands der RCC-53 Zellen wurde mit LDS-Ladepuffer versetzt und je 10 µl in die Taschen eines kommerziellen Zymographiegels pipettiert. Zusätzlich wurde konditionierter Überstand von HT1080-Zellen, sowohl ohne als auch mit APMA-Aktivierung, als Positivkontrolle (siehe Kapitel 4.2.6.4.1) verwendet. Außerdem wurde ein gefärbter Größenstandard zur Kontrolle der Elektrophorese aufgetragen. Das Gel lief 90 min bei 120 V und wurde anschließend 2x 15 min in 100 ml Renaturierungspuffer auf dem Schüttelmischer inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit Wasser wurde das Gel für 72 h in Entwicklungspuffer bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde eine Coomassiefärbung durchgeführt. Hierfür wurde das Gel zuerst 30 Minuten in Fixierungslösung inkubiert und anschließend bis zur gewünschten Färbung in Coomassie-Färbelösung geschüttelt (3-6 h). Es folgte eine Entfärbung des Hintergrundes in der Fixierungslösung für 10- 30 min und eine Inkubation in Entfärbelösung für 30 min. Anschließend wurde das Gel mit Wasser gewaschen und mithilfe eines Flachbettscanners eingescannt. Eine densitometrische Quantifizierung erfolgte mithilfe der Bildbearbeitungssoftware *ImageJ*.

4.2.6.5 **Bestimmung der Proliferationsaktivität von Nierenkarzinomzellen**

5×10^4 Zellen in 200 µl Medium wurden für 6 bis 8 h in Flachboden-Mikrotiterplatten kultiviert, um stabil wachsende, adhärenente Zellen zu erhalten. Nach Abnahme des Überstands wurden die Zellen für eine Stunde mit den Proteinen und Kontrollen in unterschiedlichen Konzentrationen im Brutschrank inkubiert. Hierfür wurden kurz zuvor Verdünnungen der Proteine in serumfreien RPMI angesetzt und je 100 µl davon auf die Zellen gegeben. Für jeden Ansatz wurden Vierfachwerte gemessen. Es erfolgte ein Medienwechsel in Proliferationsmedium mit 2% FBS, welches farblos war, um die spätere Absorptionsmessung nicht zu beeinträchtigen. Anschließend wurden die Zellen für weitere 24, 48 und 72 h kultiviert. Nach entsprechender Inkubationszeit wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 50 µl MTT-Färbelösung für drei Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren bei 600 x g für zehn Minuten wurde der Über-

stand vorsichtig abpipettiert und die entstandenen Formazankristalle in 100 µl Isopropanol mit 40 mM HCl auf einem Schüttler gelöst. Die Absorption wurde am Plattenlesegerät bei 570 nm gemessen.

4.2.6.6 Bestimmung der Migrationsaktivität von Fibrosarkomzellen

HT1080 Zellen mit 80% Konfluenz wurden abgelöst, bei 220 x g für 3 min zentrifugiert und anschließend unter Verwendung von Trypanblau gezählt. Die Zellsuspension wurde auf 3×10^6 /ml eingestellt und je 7 µl der Suspension in die drei Kammern eines Kollagen-beschichteten Chemotaxis-Objektträgers pipettiert. In der untenstehenden Abbildung (Abb. 9) ist der Aufbau der Migrationskammern zur Veranschaulichung dargestellt:

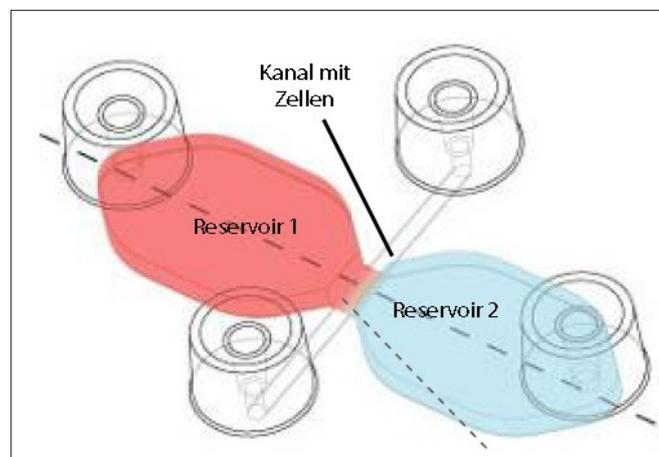


Abbildung 9: Aufbau einer Migrationskammer.

Die Tumorzellen wachsen in dem gekennzeichneten Kanal. Die Reservoire werden mit Medium befüllt, zu dem je nach Versuchsansatz ein Chemoattraktants gegeben werden kann. Die vier Adapter, seitlich des Zellkanals und an den Reservoiren, dienen der Befüllung der verschiedenen Teile der Kammer. Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Firma Ibbidi.

Die Befüllung der Kammern wurde nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Hierzu wurden zunächst 7 µl der Zellsuspension luftblasenfrei in den Kanal der Versuchskammern pipettiert und für vier Stunden in einer feuchten Kammer im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Im Anschluss daran wurden die adhärennten Zellen zwei Mal mit je 10 µl RPMI ohne weitere Zusätze gewaschen. Anschließend wurden je 25 µl Proteinverdünnung mit 1,4 nM TIMP-1-GPI, N-TIMP-1-GPI oder VV-TIMP-1-GPI in den Zellkanal pipettiert. Zur Kontrolle wurden Ansätze mit L-α-Phosphatidylinositol (L-α-PI) in äquimolarem Verhältnis zu den GPI-verankerten TIMP Varianten, Säulenpuffer im selben Volumenverhältnis wie bei den Proteinverdünnungen, oder unbehandelten Zellen durchgeführt. Um Luftblasen zu vermeiden, wurden die Lösungen dabei auf der einen Seite auf den Adapter pipettiert und von der anderen Seite die gleiche Men-

ge Medium abpipettiert. So wurde das Medium, das sich auf den Zellen befand, ausgewaschen und der Kanal über den Zellen mit der Proteinlösung befüllt. Nach einer einstündigen Inkubation der Zellen mit den Proteinen, welche in einer feuchten Kammer stattfand, wurden die Zellen erneut zwei Mal mit RPMI gewaschen und die Reservoirs befüllt. Dabei wurde bei den behandelten Zellen jeweils ein Reservoir mit 45 µl RPMI ohne Zusätze befüllt und das andere mit RPMI mit 10% FBS als Chemoattraktants. Als Kontrollen wurden zusätzlich Ansätze pipettiert, in denen unbehandelte Zellen entweder auf beiden Seiten Chemoattraktant (plus/plus-Kontrolle) oder auf beiden Seiten serumfreies RPMI (minus/minus-Kontrolle) erhielten.

Zwei Chemotaxis-Objektträger mit je drei Kammern wurden in einer Inkubationskammer mit einem konstanten CO₂-Gehalt von 5% und einer konstanten Temperatur von 37°C über Nacht mikroskopiert. Dabei wurde über 24 h alle 10 min ein Foto des Zellkanals bei vierfacher Vergrößerung gemacht. Eine Skalierung der Bilder wurde mithilfe einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt, um den Skalierungsfaktor µm/Pixel zu bestimmen, der zur späteren Umrechnung der Parameter notwendig ist. Mithilfe des Plugins „*Manual Tracking*“ für das kostenlose Programm *ImageJ* wurde der Pfad von 20-40 Zellen pro Versuchsansatz manuell verfolgt und mit einer von der Firma Ibidi entwickelten Software analysiert.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Software *GraphPad Prism 4.0*. Dabei wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) für unabhängige nicht-parametrische Daten verwendet, der sogenannte Kruskal-Wallis-Test. Dieser trifft eine Aussage darüber, ob sich die Mittelwerte der verschiedenen Gruppen signifikant voneinander unterscheiden und setzt dabei keine Normalverteilung der Daten voraus. Ein p-Wert kleiner als 0,05 zeigt einen signifikanten Unterschied der Mittelwerte an.

5 ERGEBNISSE

5.1 Planung und Klonierung der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten

TIMP-1 ist in seiner nativen Form ein sezerniertes Protein, welches nur über Wechselwirkungen mit anderen Proteinen an die Zelloberfläche gebunden wird. In dieser Arbeit wurde TIMP-1 mit einem GPI-Anker kombiniert, um die Aktivität von TIMP-1 auf die Zelloberfläche zu fokussieren. Gleichzeitig wurden verschiedene Varianten des GPI-verankerten TIMP-1 hergestellt, um den Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion des Proteins genauer zu untersuchen. Hierfür wurden die in Abb. 10 gezeigten Varianten hergestellt.

TIMP-1-GPI besteht aus einer Signalsequenz zur Sekretion (in der Abbildung grün, Basen 7-75 in den Sequenzen im Anhang der Arbeit, Kapitel 7.3), sowie der N- und der C-terminalen Domäne von TIMP-1 (dunkelblau und hellblau, Basen 76-463 und 464-627), einem Doppel-mycTag (rot, Basen 634-693) und der Signalsequenz für den GPI-Anker von LFA-3 (grau, Basen 700-804).

Um die inhibitorische Aktivität des N-Terminus zu beeinflussen, wurde eine Mutante mit zwei zusätzlichen Valinresten am N-Terminus hergestellt, VV-TIMP-1-GPI. Die eingeführten Aminosäuren wurden nach der Signalsequenz zur Sekretion an die N-terminale Domäne angefügt und sind in Abb. 10 rot markiert. Sie liegen in der MMP-Bindungsregion und können deshalb die Affinität des TIMP-1 Proteins zu seinem Substrat beeinflussen.

Um die Aktivität der N-terminalen Domäne getrennt von der der C-terminalen Domäne beobachten zu können, wurde in der N-TIMP-1-GPI-Variante der C-Terminus des TIMP-1-Proteins entfernt. Das Konstrukt besteht aus ungefähr zwei Dritteln der ursprünglichen TIMP-1 Sequenz, den Aminosäuren 1-126, die der N-terminalen Domäne entsprechen und zusätzlich drei Aminosäuren als kurze Verbindungsregion. Dabei wurde das Cys127 durch einen Aminosäureaustausch im Rückwärts-Oligonukleotid zu einem Serin mutiert, da im N-TIMP-1 das Cys174 fehlt, mit dem das Cys127 im vollständigen TIMP-1-Protein eine Disulfidbrücke bildet. So wurde ein freies Cystein im Protein vermieden, das zu unerwünschten Wechselwirkungen mit anderen Proteinen führen könnte.

Eine dreidimensionale Darstellung der Konstrukte ist in Abb. 10 unten gezeigt. Das Modell von TIMP-1 wurde nach dem Modell in der Proteindatenbank „RCSB Protein Data Bank“ (1UEA) mit der Software *Pymol* erstellt, die an der MMP-Bindung beteiligten Aminosäuren sind bunt markiert. Das mycTag ist in der Abbildung rot, die nach dem Abspalten der GPI-Anker Signalsequenz

von LFA-3 am Protein verbleibenden Aminosäuren sind grün dargestellt. Hierbei handelt es sich um sechs Aminosäuren, wie in der Publikation von Medof für LFA-3 beschrieben (Medof et al., 1996). Das Modell des hier gezeigten GPI-Ankers entstammt der Publikation von Collinge (Collinge 2005).

Die Vorgehensweise bei der Klonierung ist in Abb. 11 schematisch dargestellt.

Alle Konstrukte wurden, wie in Kap 4.2.2.11 angegeben, mittels PCR amplifiziert und in den Expressionsvektor pEF_{DHFR} eingefügt. TIMP-1-GPI wurde bereits in Vorarbeiten des Labors hergestellt, N-TIMP-1 mittels PCR von TIMP-1, und VV-TIMP-1 aus einer anderen Mutante, MA-TIMP-1, mittels Mutagenese-PCR herstellt.

Abbildung 11 zeigt exemplarisch die Klonierung von N-TIMP-1-GPI. Das Doppel-mycTag wurde mittels PCR aus dem Vektor MP71 gp100 amplifiziert und über die gleichzeitig eingeführten Restriktionsschnittstellen *Xba*I und *Nhe*I in ein pUC19-Plasmid mit der GPI-Anker Signalsequenz aus LFA-3 ligiert. Die zunächst in pUC19 hergestellten TIMP-1-Varianten wurden mittels Restriktionsenzymen ausgeschnitten und in das oben beschriebene pUC19-myc-GPI Plasmid ligiert. Die so entstandenen TIMP-1-GPI-Varianten wurden zur Expression in CHO-Zellen in den pEF_{DHFR} Vektor subkloniert.

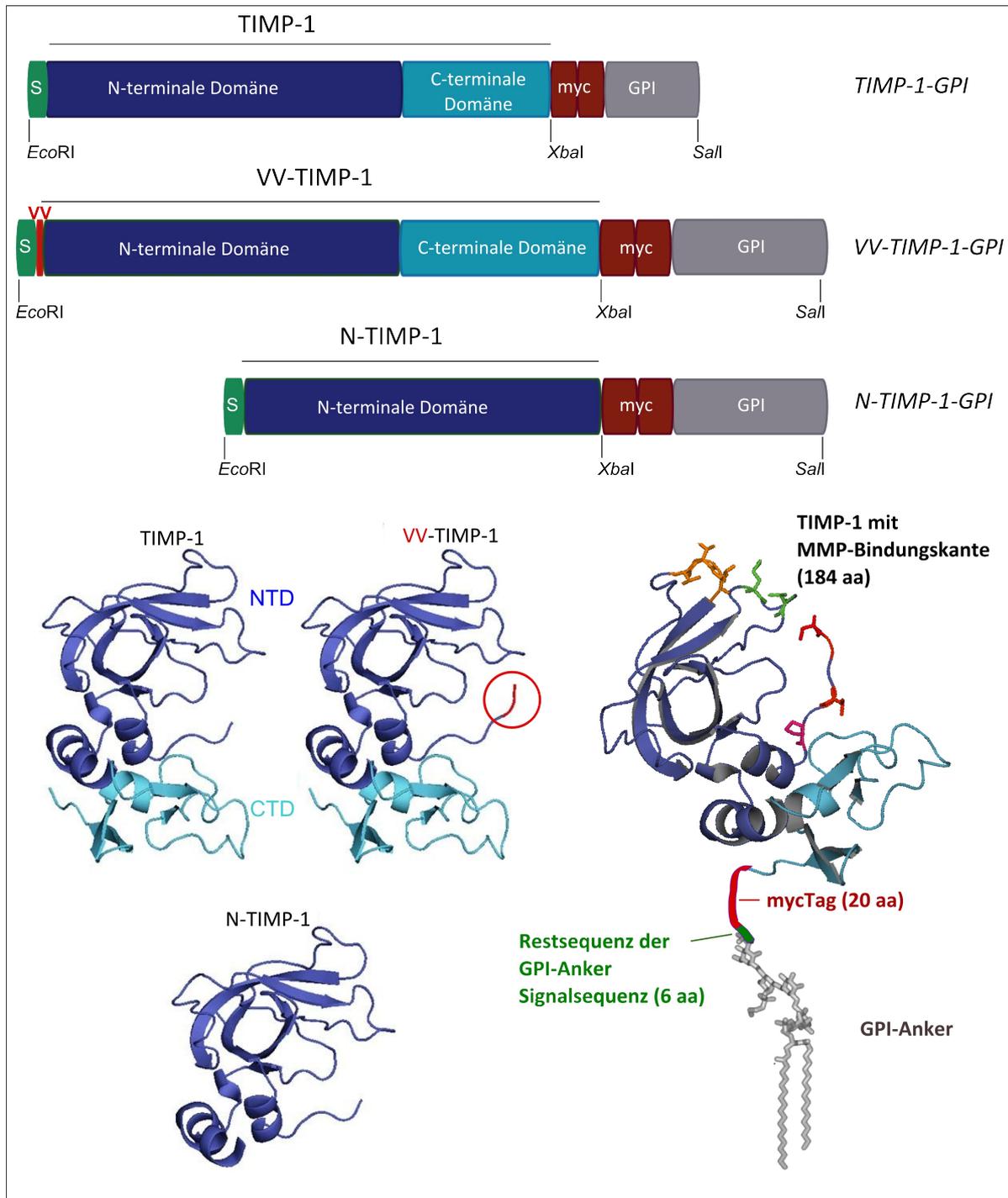


Abbildung 10: Aufbau der geplanten GPI-verankerten TIMP-1-Varianten.

Oben: Alle gezeigten Konstrukte enthalten am N-Terminus eine Signalsequenz zur Sekretion (S, grün). TIMP-1 wurde mit einem Doppel-mycTag (rot) und der Signalsequenz für den GPI-Anker von LFA-3 (grau) kombiniert (siehe Abbildung ganz oben, TIMP-1-GPI). Um die Funktion der beiden Domänen (N-terminale Domäne (NTD) und C-terminale Domäne (CTD), dunkelblau und hellblau) zu untersuchen, wurden entweder zwei Valinreste am N-Terminus eingeführt (rot, VV-TIMP-1-GPI), oder die CTD entfernt (N-TIMP-1-GPI). Auch diese Varianten von TIMP-1 wurden mit dem mycTag und der GPI-Anker Signalsequenz kombiniert. Die Aminosäuresequenzen der Konstrukte sind im Anhang (Kapitel 7.3) dargestellt.

Unten: Dreidimensionale Modelle der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten.

Die Bandstruktur-Modelle wurden mit der Vorlage von TIMP-1 aus der Bibliothek „RCSB Protein Data Bank“ (1UEA) mit der Software *Pymol* erstellt. Sie verdeutlichen die Zwei-Domänenstruktur von TIMP-1, wobei die N-terminale Domäne (NTD) dunkelblau und die C-terminale Domäne (CTD) hellblau dargestellt ist. Nicht dargestellt sind Disulfidbrücken. Das rechte Modell zeigt ein Modell von TIMP-1-GPI. Aminosäuren der MMP-Bindungskante sind bunt dargestellt. Zusätzlich wurden der Rest der GPI-Anker-Signalsequenz, der am Protein verbleibt (6 aa, grün), das mycTag (20 aa, rot) sowie der posttranslational angefügte GPI-Anker modelliert. Das Modell des GPI-Ankers wurde aus Collinge, 2005 übernommen.

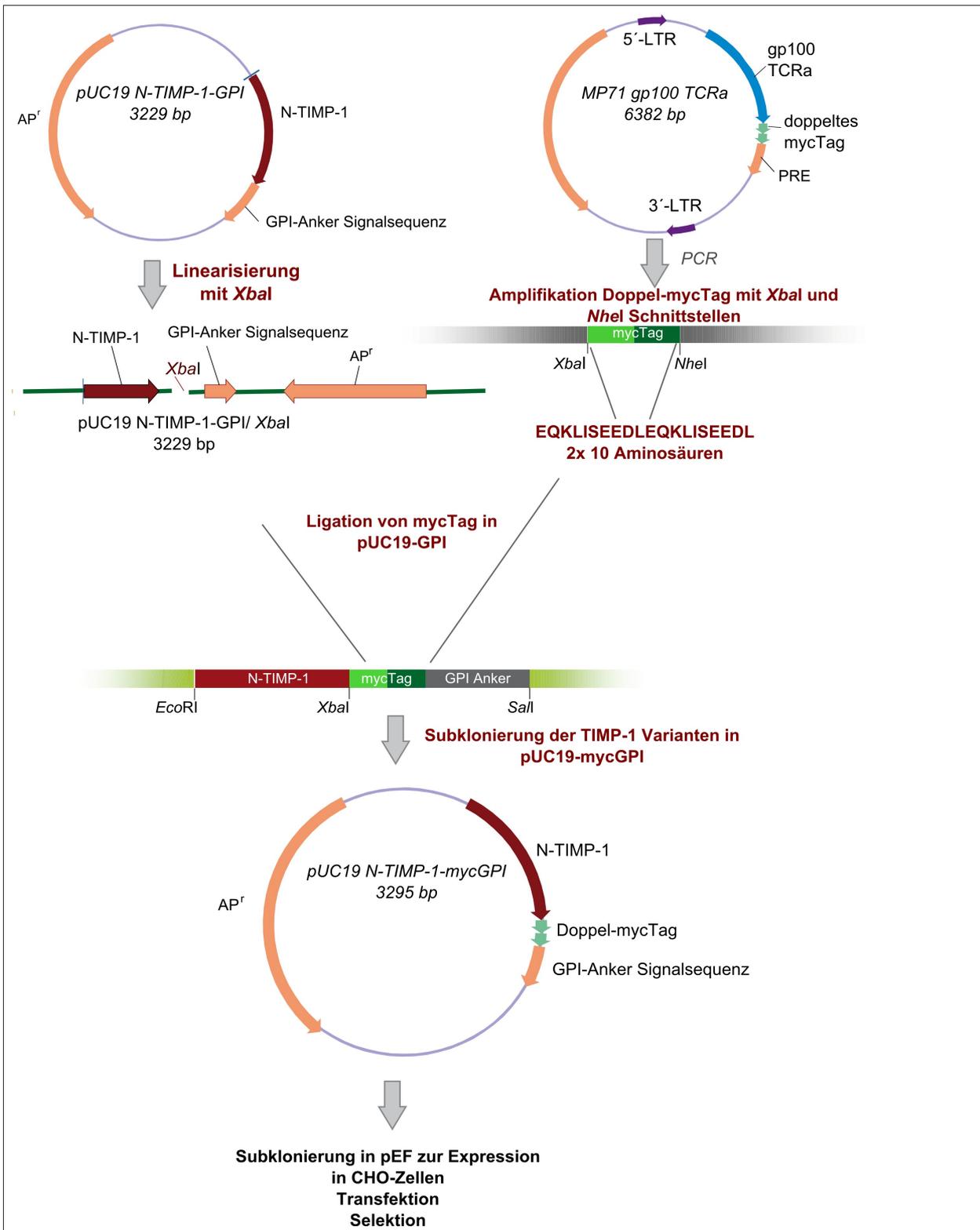


Abbildung 11: Vorgehensweise bei der Klonierung der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten.

Alle TIMP-1-Varianten wurden mittels PCR oder Mutagenese-PCR aus TIMP-1 in pUC19 hergestellt (in der Abbildung nicht gezeigt, Vorarbeiten des Labors). Das Doppel-mycTag wurde aus MP71 amplifiziert und dabei Schnittstellen für *XbaI* und *NheI* eingeführt. Nachdem das mycTag in pUC19 vor die GPI-Anker Signalsequenz kloniert wurde, wurden anschließend alle TIMP-1-Varianten in das pUC19-mycGPI Plasmid kloniert. Anschließend wurden die Konstrukte in den Expressionsvektor pEF für die stabile Transfektion in CHO-Zellen subkloniert (AP^r= Ampizillinresistenz; LTR= LTR-Element, *long terminal repeats*, PRE= *post-transcriptional regulatory element*).

Abb. 12 zeigt einen analytischen Restriktionsverdau der pEFDHFR Plasmide mit den verschiedenen TIMP-1-GPI-Varianten:

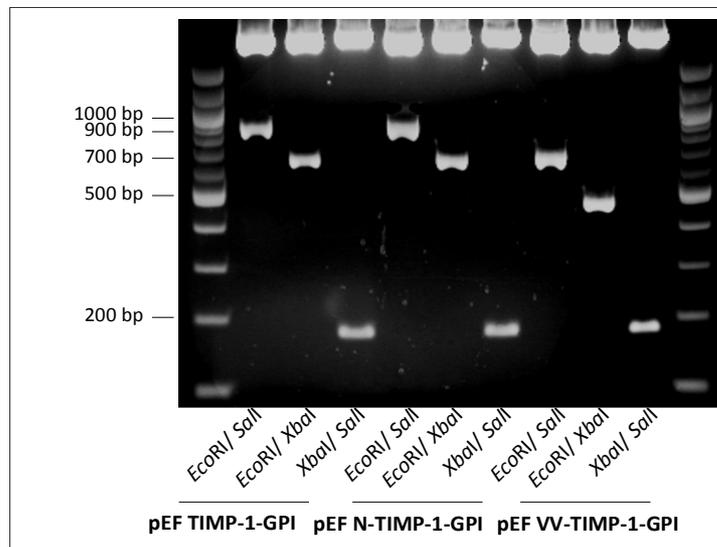


Abbildung 12: Darstellung eines analytischen Restriktionsverdaus der klonierten TIMP-1-Varianten.

Die Plasmide pEFDHFR TIMP-1-GPI, pEFDHFR N-TIMP-1-GPI und pEFDHFR VV-TIMP-1-GPI wurden mit den o.g. Enzymkombinationen verdaut. Anschließend wurden die DNS-Fragmente in einem 1% Agarosegel aufgetrennt. Nach dem Verdau mit *EcoRI* und *SalI* ist jeweils das vollständige, GPI-verankerte TIMP-1-Konstrukt zu sehen, *EcoRI* in Kombination mit *XbaI* zeigt die TIMP-1 Domäne ohne mycTag und GPI-Anker, *XbaI* und *SalI* zeigt das Fragment aus mycTag und Signalsequenz für den GPI-Anker. Der Längenunterschied zwischen N-TIMP-1 und den vollständigen TIMP-1-Konstrukten ist nach dem Verdau mit *EcoRI* und *SalI*, sowie nach dem Verdau mit *EcoRI* und *XbaI* zu erkennen. Während das vollständige TIMP-1-GPI aus insgesamt 806 bp besteht, verbleiben in N-TIMP-1-GPI 459 bp.

Der Längenunterschied zwischen N-TIMP-1 und den beiden anderen Varianten war nach dem Ausschneiden des gesamten Fragments aus dem Plasmid durch die Enzyme *EcoRI* und *SalI* zu sehen. TIMP-1-GPI und VV-TIMP-1-GPI wiesen eine Länge von 806 bp sowie 812 bp auf, während N-TIMP-1-GPI durch die Entfernung des C-Terminus von TIMP-1 nur noch 459 bp lang war. Das Einfügen der für die beiden Valinreste codierenden Basen in VV-TIMP-1-GPI war im Agarosegel aufgrund des geringen Größenunterschieds nicht zu sehen. Durch den Verdau mit den Restriktionsenzymen *XbaI* und *SalI* war in allen drei Konstrukten das Doppel-mycTag, verbunden mit der GPI-Anker-Signalsequenz, mit 177 bp zu erkennen. Ein Verdau mit *EcoRI* und *XbaI* schnitt die für die jeweilige TIMP-1-Variante codierende Domäne ohne mycTag und GPI-Anker-Signalsequenz aus und zeigte 627 bp für TIMP-1, 633 bp für VV-TIMP-1 und 462 bp für N-TIMP-1.

5.2 Expression der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten in CHO-Zellen

Die TIMP-1-Varianten wurden über die Schnittstellen *EcoRI* und *SalI* in das Expressionsplasmid pEFDHFR myc-GPI ligiert und in CHO-Zellen transfiziert. Nach dreiwöchiger Selektion durch die

Dihydrofolatreduktase, die durch das pEF-Plasmid in transfizierte Zellen eingebracht wurde, wurden die Zellen erstmals auf die Expression der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten untersucht. Dies erfolgte sowohl mittels FACS und Western-Analyse als auch mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie. Um zunächst mittels Western-Analyse zu zeigen, dass die transfizierten CHO-Zellen die Proteine produzieren, wurden Zellextrakte hergestellt, die einer Western-Analyse unterzogen wurden. In Abbildung 13 ist sowohl die Färbung mit dem anti-hTIMP-1 als auch die mit mycTag-spezifischem Antikörper zu sehen:

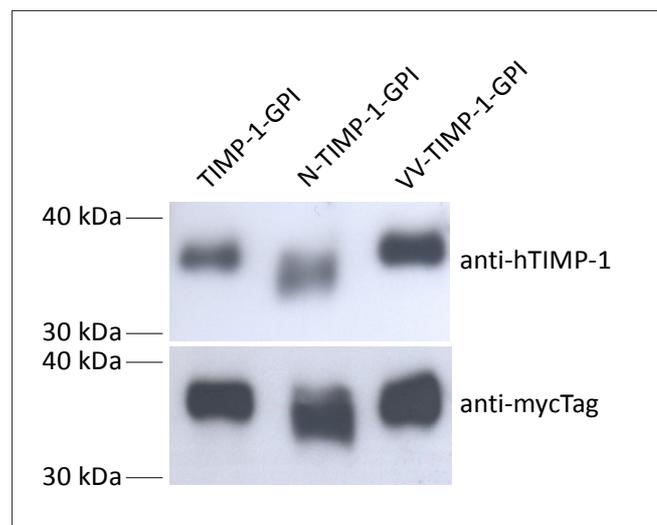


Abbildung 13: Western-Analyse der Proteinexpression in CHO-Zellen.

Zellextrakte aus $1,5 \times 10^8$ CHO-Zellen wurden hergestellt, $0,4 \mu\text{g}$ Proteinextrakt pro Spur in einem 12% SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit den Antikörpern anti-h-TIMP-1 oder anti-mycTag gefärbt und die Proteine durch Färbung mit dem Sekundärantikörper anti-maus/HRP und Entwicklung mit einem ECL-System auf Röntgenfilmen nachgewiesen.

Proteinextrakte aus $1,5 \times 10^8$ CHO-Zellen wurden hergestellt und je $0,4 \mu\text{g}$ der Extrakte unter reduzierenden Bedingungen nach einer Elektrophorese auf eine PVDF-Membran transferiert. Anschließend wurde die Membran mit anti-hTIMP-1 oder anti-mycTag Antikörper gefärbt und die Proteine mittels eines Chemilumineszenz-Systems und Röntgenfilmen nachgewiesen.

Die Analyse zeigte unter reduzierenden Bedingungen je eine Bande für die drei untersuchten Proteine. TIMP-1-GPI und VV-TIMP-1-GPI wiesen ein Molekulargewicht von ungefähr 35 kDa auf, für N-TIMP-1-GPI war eine deutlich kleinere Bande bei ungefähr 32 kDa zu sehen.

Um die Expression der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten in den CHO-Zellen genauer zu analysieren, wurden FACS-Messungen durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen abgelöst, gezählt und anschließend in zwei Proben zu je 5×10^5 Zellen aufgeteilt, wovon eine für eine Stunde mit der Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase-C (PI-PLC) behandelt wurde. Diese schneidet

zwischen dem Diazylglyzerol und dem Phosphatrest des Phosphatidylinositols des GPI-Ankers, so dass das Protein von der Zellmembran gelöst wurde und nicht mehr auf der Zelloberfläche nachweisbar war. Dieser enzymatische Verdau diente als Nachweis der GPI-Verankerung der Proteine. Die Zellen wurden nach der Inkubation mit dem Enzym gewaschen und mit anti-myc-Tag Antikörper oder einer Isotypkontrolle (mIgG), sowie anschließend dem Sekundärantikörper anti-mIg/RPE gefärbt und am FACS-Gerät gemessen. Abbildung 14 A zeigt die mit der Software *FlowJo* erstellten Histogramme der gemessenen Fluoreszenzwerte eines beispielhaften Experiments.

Je 1×10^5 lebende Zellen, die nach der Färbung mit 7-AAD keine Fluoreszenz im FL-3 Kanal zeigten, wurden ausgewertet und die Fluoreszenzwerte dieser Zellen im FL-2 Kanal graphisch in einem Histogramm dargestellt. Die Kurve der Färbung mit dem mycTag-spezifischen Antikörper wurde zum Vergleich über die der Kontrollfärbung mit mIgG gelegt. Die gemessenen Fluoreszenzwerte (geometrisches Mittel) im FL-2 Kanal sind als Differenz aus Antikörperfärbung und Isotypkontrolle (mittlerer Fluoreszenzindex, MFI) in die Abbildung eingefügt. Eine deutliche Rechtsverschiebung der Fluoreszenzkurve nach der Färbung mit anti-mycTag Antikörper im Vergleich zur Isotypkontroll-Färbung (mIgG) ist bei den drei Zelllinien CHO TIMP-1-GPI, CHO N-TIMP-1-GPI und CHO VV-TIMP-1-GPI zu sehen. Diese Rechtsverschiebung wurde durch die vorhergehende Behandlung mit der PI-spezifischen PLC deutlich verringert, was nachwies, dass das Oberflächensignal für das mycTag durch die über den GPI-Anker in die Zellmembran eingebauten TIMP-1 Varianten hervorgerufen wurde. Auf der Oberfläche der drei transfizierten CHO-Zelllinien war eine starke Fluoreszenz nach der Färbung mit dem mycTag-spezifischen Antikörper messbar (MFI=936- 1079). Diese Signale wurden durch die Behandlung der Zellen mit PI-PLC deutlich reduziert (MFI= 41- 80).

Dabei nahmen die Signale für TIMP-1-GPI um 95,4%, für N-TIMP-1-GPI um 92% und für VV-TIMP-1-GPI um 95,4% ab.

Ein Nachweis der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten war gleichzeitig auch mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie möglich (Abb. 14 B). Durch diese Technik konnten die Ergebnisse der FACS-Analyse bestätigt und besser veranschaulicht werden.

Die transfizierten CHO-Zellen, sowie untransfizierte CHO-Zellen als Kontrolle, wurden in Schälchen im adhärenen Zustand mit anti-mycTag Antikörper und einem RPE-konjugierten Sekundärantikörper gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop fotografiert.

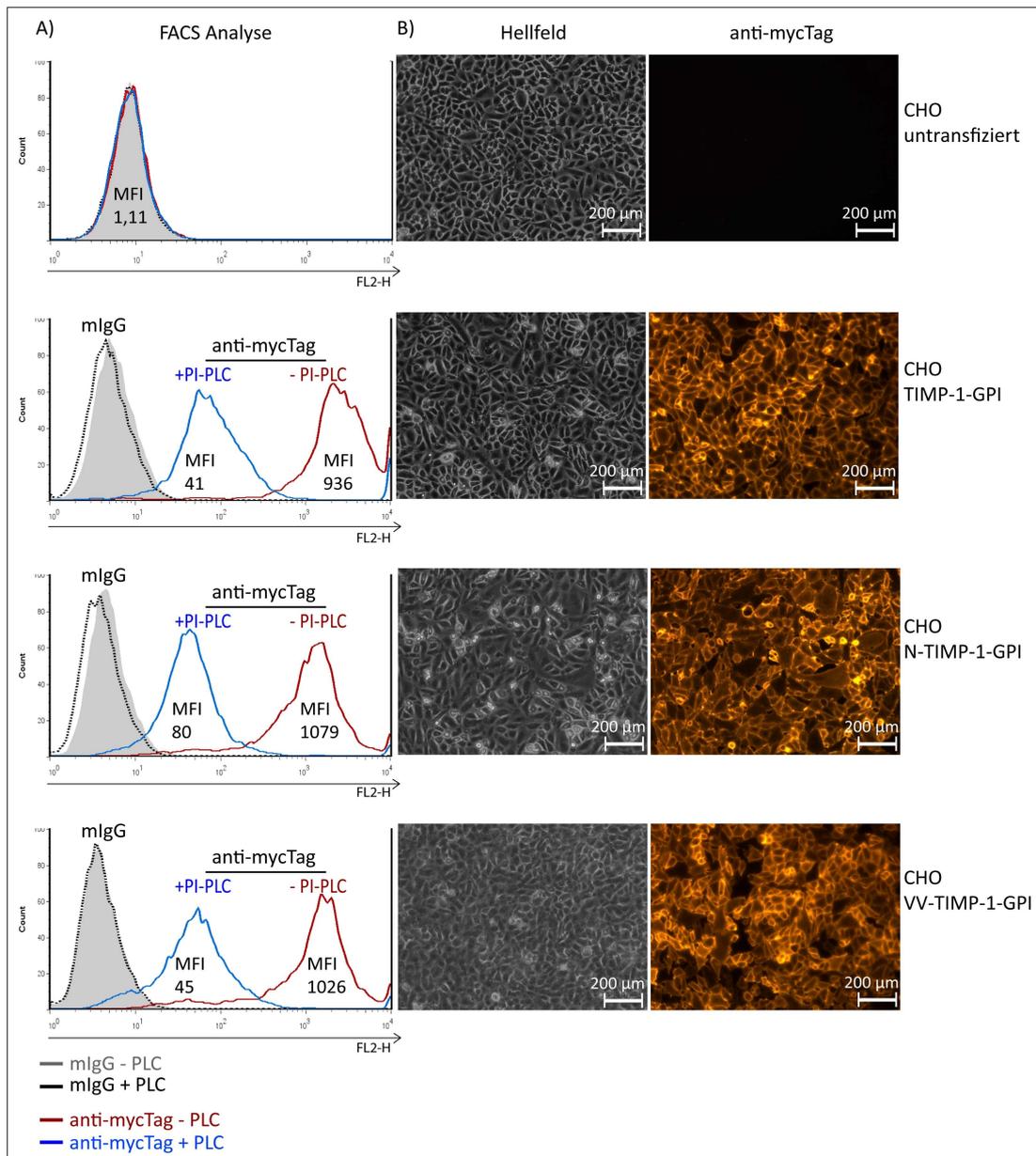


Abbildung 14: Die CHO-Zelllinien exprimieren die GPI-verankerten TIMP-1-Varianten auf der Zelloberfläche.

A) FACS-Analyse. Die transfizierten Zellen sowie untransfizierte CHO-Zellen als Kontrolle wurden abgelöst und je die Hälfte der Zellen für eine Stunde mit 0,1 U PI-PLC behandelt. Alle Ansätze wurden mit mlgG (grau hinterlegt bzw. schwarze Linie) oder mycTag-spezifischem Antikörper (blau mit PLC-Behandlung, rot ohne PLC-Behandlung) sowie anti-mIg/RPE als Sekundärantikörper gefärbt und anschließend am FACS-Gerät analysiert. Die gemessenen Fluoreszenzwerte im FL-2 Kanal sind als Differenz des geometrisches Mittels aus Antikörperfärbung und Isotypkontroll-Färbung (mittlerer Fluoreszenzindex, MFI) angegeben. Gezeigt ist ein beispielhaftes Experiment, welches insgesamt dreimal durchgeführt wurde.

B) Immunfluoreszenz-Mikroskopie. Die transfizierten Zellen sowie untransfizierte CHO-Zellen als Kontrolle wurden in Schälchen mit mycTag-spezifischem Antikörper, anti-mIg/Biotin und Streptavidin-RPE gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop bei fünffacher Vergrößerung fotografiert. Links ist jeweils das Hellfeld-Bild zu dem rechts davon gezeigten Fluoreszenzbild dargestellt. Dabei wurde eine Belichtungszeit von 600 ms gewählt. Der Balken in den Bildern zeigt eine Länge als 200 µm als Skalierungsfaktor an.

Die untransfizierten CHO-Zellen wiesen kein Fluoreszenzsignal auf, die transfizierten Linien zeigten ein deutliches Fluoreszenzsignal, das auf die Membran der Zellen begrenzt war. Hiermit

wurde veranschaulicht, dass die in der FACS-Analyse gemessene Fluoreszenz von den GPI-verankerten TIMP-1-Varianten in der Zellmembran bzw. auf der Oberfläche der CHO-Zellen stammte. Alle transfizierten CHO-Zelllinien exprimierten das jeweilige Protein auf ihrer Zelloberfläche. Die drei Zelllinien der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten exprimierten die Proteine mit gleicher Intensität. Die hydrophobe Signalsequenz am N-Terminus der Proteine wurde nach der Translation im Endoplasmatischen Retikulum (ER) erkannt, abgeschnitten und dafür der vorgefertigte GPI-Anker an den C-Terminus des Proteins angefügt. Anschließend wurden die Proteine in die äußere Schicht der Zellmembran eingebaut und waren auf der Zelloberfläche nachweisbar. Im Folgenden wird beschrieben, wie die GPI-verankerten TIMP-1-Varianten zur Verwendung für die folgenden Versuche aus der Membran der CHO-Zellen extrahiert und gereinigt wurden.

5.3 Ergebnisse der Proteinsequenzierung

Mit dem von Pehr Edman entwickelten Edman-Abbau kann die Sequenz der Aminosäuren in einer Peptidkette bestimmt werden. Dabei erfolgt eine Markierung der N-terminalen Aminosäure durch Zugabe von Phenylisothiocyanat (PITC) in basischem Milieu. Anschließend wird ein saures Milieu hergestellt und die Peptidbindung hinter dieser N-terminalen Aminosäure gespalten. Es entstehen dabei eine PITC-Aminosäure und das Restpeptid. Dieser Zyklus wird wiederholt und so die Reihenfolge der N-terminalen Aminosäuren eines Proteins bestimmt (Edman 1949).

Die GPI-verankerten Proteine TIMP-1 und VV-TIMP-1 wurden mittels Immunpräzipitation mit mycTag-spezifischem Antikörper aus Proteinextrakten aus je 2×10^8 transfizierten CHO-Zellen isoliert und nach Trennung mittels SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran übertragen. Ein kleiner Teil der Probe wurde nach dem Transfer mit Antikörpern gefärbt, um die zu den TIMP-Proteinen korrespondierenden Banden in der Coomassiefärbung der Sequenzierprobe identifizieren zu können. Abbildung 15 zeigt den Vergleich von Immunfärbung und Coomassiefärbung der Membran am Beispiel von TIMP-1-GPI.

Die prominentesten Banden, die sowohl in der Antikörperfärbung als auch in der Coomassiefärbung zu sehen sind, entsprechen der leichten (25 kDa) und schweren (55 kDa) Kette des für die Präzipitation verwendeten mycTag-spezifischen Antikörpers.

Der Teil der Membran, der die in der Abbildung rot markierte Bande enthielt, wurde ausgeschnitten und zur Sequenzierung geschickt.

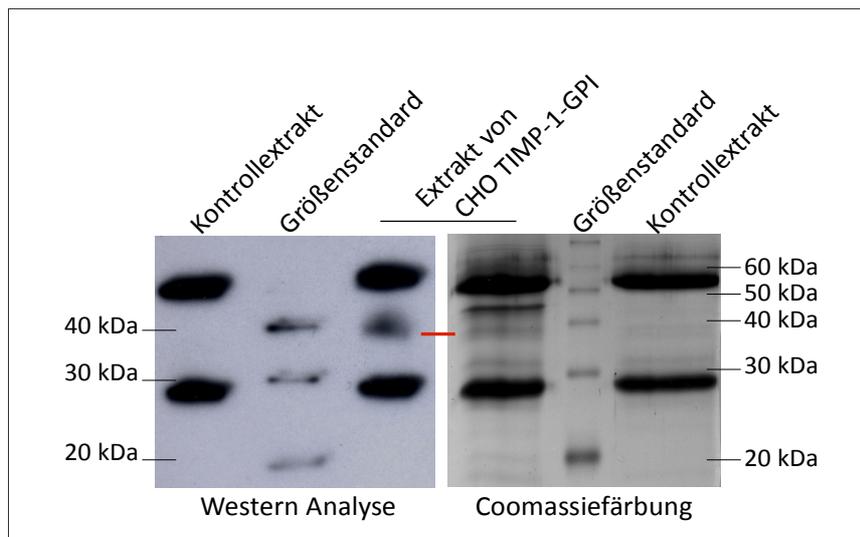


Abbildung 15: Immunpräzipitation von TIMP-1-GPI für die Edman-Sequenzierung.

Zur Vereinfachung der Abbildung wird das Ergebnis der Immunpräzipitation nur für TIMP-1-GPI gezeigt. TIMP-1-GPI wurde aus Extrakten von 2×10^8 transfizierten CHO-Zellen isoliert. Hierfür wurden die Proteine aus den Zellextrakten an mycTag-spezifischen Antikörper gebunden und die Protein-Antikörperkomplexe durch die Bindung an ProteinG-Kügelchen gereinigt. Die Proben wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran mit der zu sequenzierenden Probe eine Coomassiefärbung sowie mit einem kleinen Teil der Probe eine Antikörperfärbung mit mycTag-spezifischem Antikörper zur Kontrolle durchgeführt.

Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden von Herrn Mentele aus dem MPI in Martinsried ausgewertet. Es konnten jeweils die ersten vier Aminosäuren am Aminoterminus der beiden Proteine sequenziert werden. Da es sich bei den Aminosäuren 1 und 3 des unmodifizierten TIMP-1 um Cysteine handelt, welche sehr schwer zu sequenzieren sind, war dies ein gutes Ergebnis. Die in der Abbildung rot markierte Bande entsprach der gewünschten Aminosäuresequenz von TIMP-1 oder der Mutante VV-TIMP-1. Die Signalsequenz zur Sekretion wurde bei beiden Proteinen an der richtigen Position abgespalten, die Sequenzierung ergab für TIMP-1-GPI die erwarteten Aminosäuren Cys1Thr2Cys3Val4. Bei der Sequenzierung des Proteins VV-TIMP-1-GPI konnten die eingeführten Valinreste nachgewiesen werden, es ergab sich somit die Sequenz Val1Val2Cys3Thr4 für das Protein.

5.4 Reinigung der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten

Die GPI-verankerten Proteine wurden mit Laurylmaltosid aus den Membranen von $1,5 \times 10^8$ CHO-Zellen extrahiert und über eine anti-mycTag-Affinitätssäule gereinigt. Anschließend wurden die gesammelten Fraktionen des Eluats mittels Western-Analyse untersucht, die TIMP-enthaltenden Fraktionen vereint, eine Silberfärbung durchgeführt und die Konzentration mittels ELISA bestimmt. In Abb. 16 ist ein exemplarisches Chromatogramm eines FPLC-Laufs von der

Reinigung von TIMP-1-GPI und der zugehörigen Analyse gezeigt. Dabei zeigt die blaue Linie die UV-Absorption gemessen in der Einheit mAU (Milli-Absorptionseinheiten), die braune Linie die Salzkonzentration in mS/cm als Maß für die elektrische Leitfähigkeit, die vom FPLC-System gemessen wurde.

Das Chromatogramm zeigte eine sehr hohe Proteinmenge im Durchlauf der Säule, es wurden also viele Proteine, die nicht an die Säule binden, abgetrennt. In der Western-Analyse wurde TIMP-1-GPI mit einem starken Signal bei unter 40 kDa nachgewiesen, sowie eine schwächere Bande zwischen 60 und 70 kDa. Es war zu erkennen, dass in der Durchlauffraktion auch etwas TIMP-1-GPI verloren gegangen war. Dies ist damit zu erklären, dass eine große Menge Proteinextrakt appliziert wurde und die Bindekapazität der Säule möglicherweise eine Sättigung erreicht hatte. In der Waschschriftfraktion war kein TIMP-1-GPI nachweisbar, die Spitze im Chromatogramm zeigte jedoch, dass andere Proteine bei diesem Waschschrift von der Säule gelöst wurden, was eine höhere Reinheit für das gewünschte Protein zur Folge hatte. Die Analyse der Elutionsfraktionen zeigte, dass die GPI-verankerten TIMP-1-Varianten nicht konzentriert von der Säule gelöst werden konnten.

Dies ist einerseits mit den sehr milden Elutionsbedingungen zu erklären, andererseits auch mit dem Detergensanteil im Elutionspuffer. Möglicherweise stört dieser die Bindung des Peptids an den Antikörper. Die Zugabe des Detergens ist aber notwendig, um das Membranprotein in Lösung zu halten. Daher wurden nach der Western-Analyse der Fraktionen nur die mit den stärksten TIMP-1 Signalen vereinigt, im Fall dieses beispielhaften Chromatogramms entsprach dies den Elutionsfraktionen 2 bis 7. Die in der Silberfärbung bei ca. 30 kDa sichtbare Bande entsprach nicht TIMP-1-GPI. Dies wird in der folgenden Abbildung (Abb. 17) genauer untersucht. TIMP-1-GPI war aufgrund der Nachweisgrenze einer Silberfärbung bei 5 ng Protein nicht zu sehen.

Eine Konzentrationsbestimmung erfolgte mit einem ELISA-System, welches speziell für diese Proteine im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurde. Hierbei wurden die GPI-verankerten TIMP-1-Varianten durch einen mycTag-spezifischen Antikörper an die Platte gebunden und der Nachweis erfolgte durch einen biotinylierten anti-hTIMP-1 Antikörper. Eine Standardkurve wurde mit VV-TIMP-1, der löslichen Variante von VV-TIMP-1-GPI, erstellt. Mit diesem ELISA-System konnte die Konzentration der drei TIMP-1-GPI-Varianten bestimmt werden und korrelierte mit den Ergebnissen von Western-Analyse und Reinkorporierung, die mit jeweils anderen Antikörpern durchgeführt wurden.

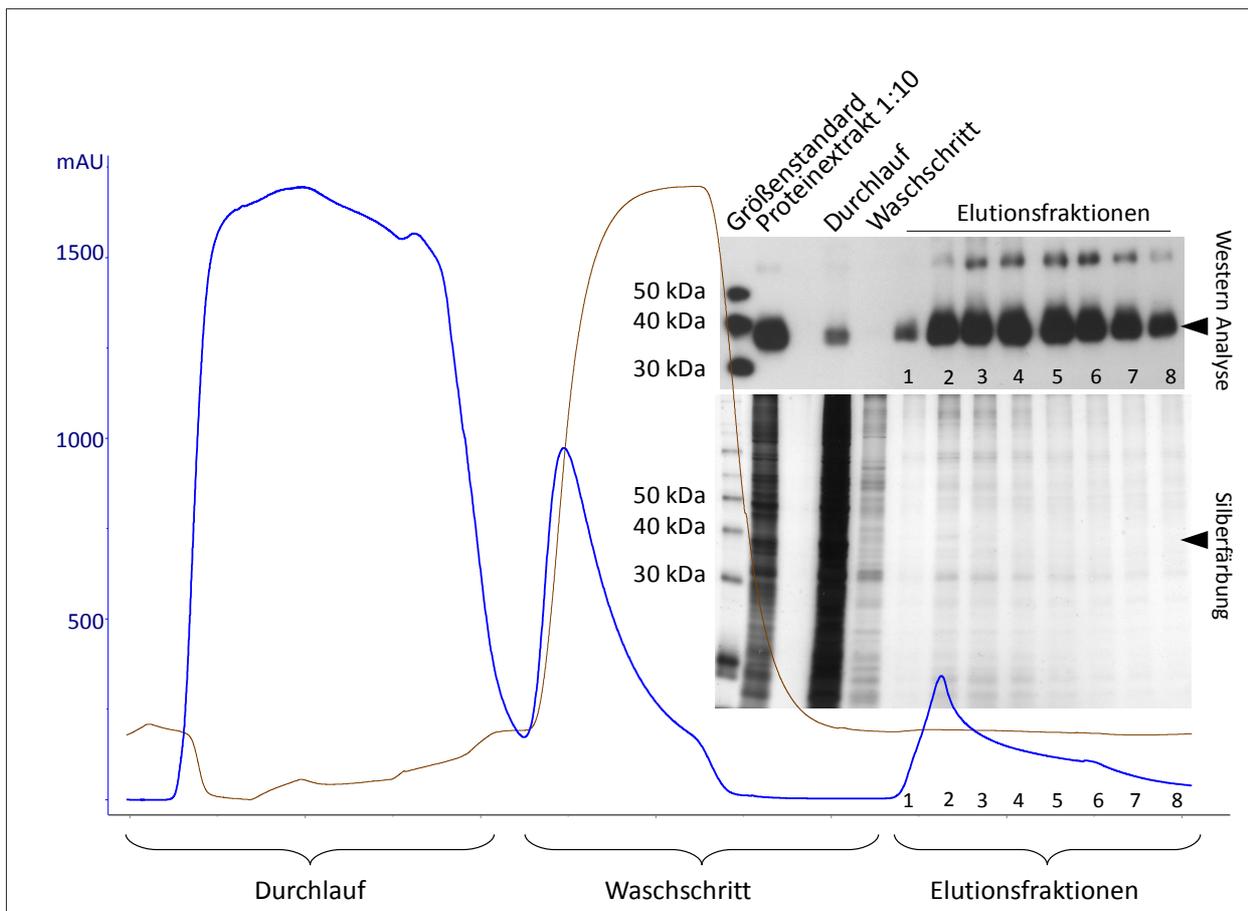


Abbildung 16: Reinigung der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten am Beispiel von TIMP-1-GPI.

Extrakte aus $1,5 \times 10^8$ CHO-Zellen wurden über eine myc-Antikörpersäule gereinigt und mittels kompetitiver Elution mit Peptid das GPI-verankerte TIMP-1, welches ein mycTag enthält, eluiert. Das oben gezeigte Chromatogramm zeigt exemplarisch die Reinigung von TIMP-1-GPI. Die blaue Linie zeigt die UV-Absorption, gemessen in mAU (*milli absorption units, Milli-Absorptionseinheiten*), die braune Linie die Salzkonzentration, angegeben durch die elektrische Leitfähigkeit in mS/cm, die vom FPLC-System gemessen wurde. Anschließend wurden die Fraktionen in einer Western-Analyse mit TIMP-1-spezifischem Antikörper (rechts oben) und die Reinheit in einer Silberfärbung (rechts unten) untersucht. Hierfür wurde der Proteinextrakt 1:10 vorverdünnt und von allen Proben je 10 μ l aufgetragen. In der Abbildung kennzeichnet ein Pfeil die zu TIMP-1-GPI korrespondierende Bande bei unter 40 kDa sowohl bei der Western-Analyse als auch bei der Silberfärbung. Die Fraktionen mit dem stärksten TIMP-1 Signal wurden vereinigt und einer Konzentrationsbestimmung mittels ELISA unterzogen.

Die Reinigung der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten ergab Proteinkonzentrationen zwischen 100 und 300 ng/ml, was einer Ausbeute von durchschnittlich 10% des Proteinextrakts entsprach. Im Folgenden werden die Konzentrationen der Proteine mit der Einheit nM angegeben, um zu verdeutlichen, dass jeweils äquimolare Mengen verwendet wurden. Dabei entsprechen 40 ng/ml der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten 1,4 nM. Um die Reinheit der verschiedenen TIMP-1-Varianten miteinander zu vergleichen, wurden die Proteine gemeinsam in einer Silberfärbung und zur Kontrolle in einer Western-Analyse untersucht. Die Färbung des Gels und der Membran ist in Abbildung 17 dargestellt.

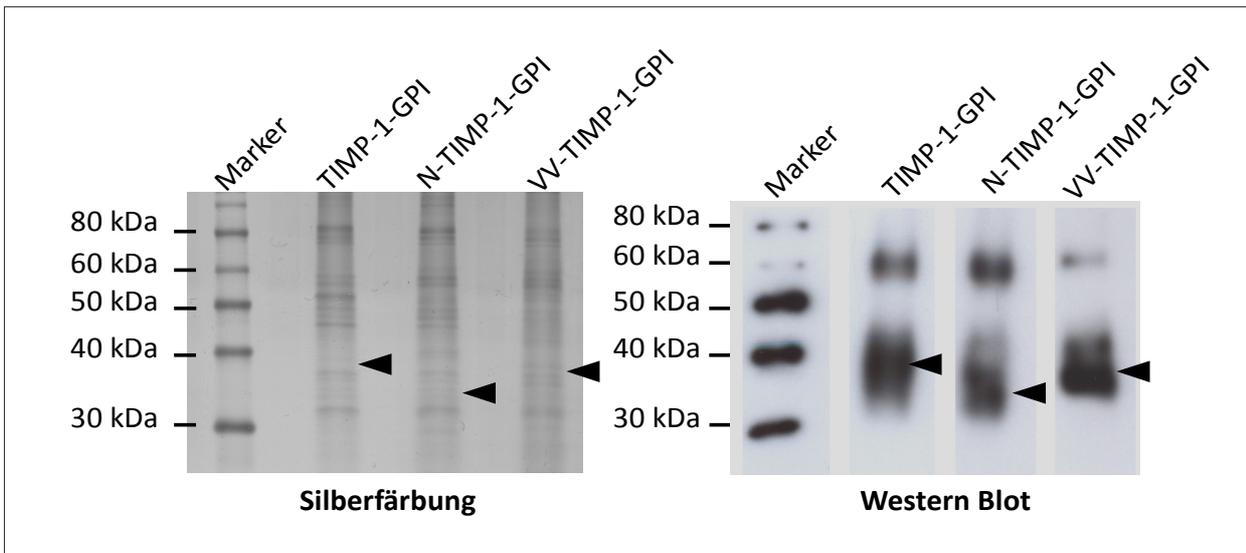


Abbildung 17: Vergleich der Silberfärbungen der gereinigten TIMP-1-GPI-Varianten.

Proben der GPI-verankerten Proteine wurden nach der Reinigung mittels FPLC in einer Silberfärbung untersucht. Hierfür wurden je 10 µl der vereinigten Elutionsfraktionen in einer 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend eine Silberfärbung unter Verwendung eines kommerziellen Reagenzienpakets durchgeführt. Zum Vergleich wurden je 5 µl der Proben einer Western Analyse unterzogen. Die in den Bildern abgebildeten Pfeile zeigen das jeweilige Protein in der Silberfärbung dort an, wo es in der Western Analyse nachgewiesen wurde.

Die Silberfärbung der gereinigten Proteine zeigte vergleichbare Banden in den drei Proteinlösungen der TIMP-1-Varianten nach der Chromatographie. Auch die zuvor bei der Proteinreinigung erwähnte, unspezifische Bande bei knapp über 30 kDa war in allen drei Proteinlösungen nachweisbar. Die GPI-verankerten TIMP-1-Varianten konnten im Gel nicht identifiziert werden, da die Silberfärbung eine Nachweisgrenze von 5 ng Protein hat. Die jeweiligen Pfeile zeigen die Position der Proteine, verglichen zu der Western-Analyse, an. Da die nachgewiesenen Verunreinigungen jedoch in allen drei Proteinlösungen zu sehen waren, beeinflussen sie nicht den Vergleich der drei Proteine in den Versuchen, die in den folgenden Kapiteln dargestellt sind.

5.5 Analyse der Glykosylierung der TIMP-1-Varianten

In Kapitel 5.4 wurde gezeigt, dass die drei GPI-verankerten TIMP-1-Varianten in der Western-Analyse jeweils zwei Banden aufwiesen. Diese Banden waren im Fall von TIMP-1-GPI und VV-TIMP-1-GPI auf der Höhe von ungefähr 35 und 70 kDa, bei dem kleineren N-TIMP-1-GPI bei 30-35 und bei ungefähr 60 kDa. TIMP-1 hat ein physiologisches Molekulargewicht von 28,5 kDa und ist doppelt N-glykosyliert. Beide Glykosylierungsstellen liegen in der N-terminalen Domäne des Proteins, an den Aminosäuren 30 und 78 (Caterina et al. 1998). Physiologisch werden auch an beiden Stellen Zuckerreste angehängt, dies ist aber keine Voraussetzung für die inhibitorischen

sche Funktion des Proteins (Bodden et al. 1994). Vielmehr ist die Glykosylierung für die korrekte und vollständige Faltung des Proteins essentiell. Um das Glykosylierungsschema der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten zu untersuchen und auszuschließen, dass es sich bei den beiden in der Antikörperfärbung nachgewiesenen Banden um unterschiedliche Isoformen der Proteine handelt, wurden die transfizierten CHO-Zellen in der Gegenwart des Enzyms Tunicamycin kultiviert. Tunicamycin ist ein Gemisch verschiedener Antibiotika, die eine Phosphotransferase hemmen, welche den ersten Schritt der Glykoproteinsynthese katalysiert. Dies hat eine Blockade der N-Glykosylierung und einen Arrest der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus zur Folge. Dem Kulturmedium von transfizierten CHO-Zellen der Linien TIMP-1-GPI, N-TIMP-1-GPI und VV-TIMP-1-GPI wurde für 24 h 1 µg/ml Tunicamycin zugegeben. Als Kontrolle wurden Zellen mit dem äquivalenten Volumen DMSO inkubiert, in welchem das Tunicamycin gelöst war. Anschließend wurden Zellextrakte hergestellt, die mittels Western-Analyse mit dem anti-hTIMP-1 Antikörper untersucht wurden. Abb. 18 zeigt die Western-Analyse der Proben von N-TIMP-1-GPI exemplarisch für die drei TIMP-1-Varianten.

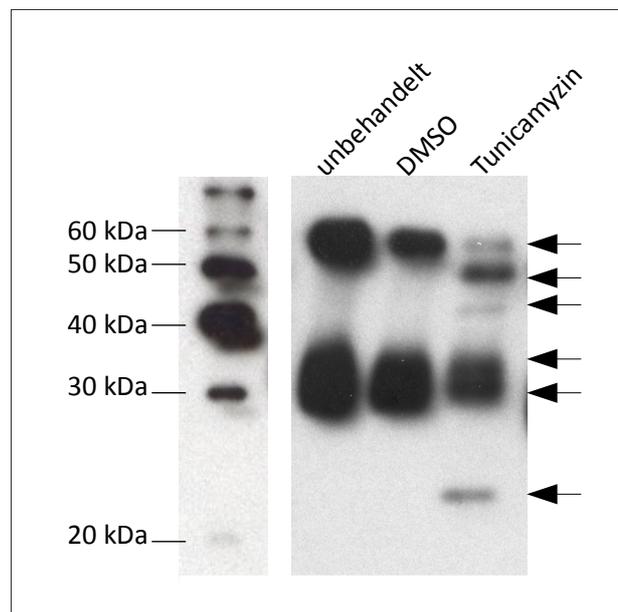


Abbildung 18: Analyse der Glykosylierung von N-TIMP-1-GPI.

Transfizierte CHO-Zellen wurden für 24 h mit DMSO oder 1 µg/ml Tunicamycin inkubiert und Zellextrakte aus 2×10^6 Zellen hergestellt. 0,5 µg der Zellextrakte wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und diese mittels Western-Analyse mit anti-hTIMP-1 Antikörper gefärbt.

Die Färbungen der beiden anderen Linien zeigten vergleichbare Ergebnisse und werden deshalb zur Vereinfachung der Darstellung nicht gezeigt. In der Western-Analyse der Zellextrakte unbehandelter und DMSO-behandelter Zellen waren die beiden, vorher bereits beobachteten, Banden bei etwas über 30 und 60 kDa zu sehen. Beide Banden teilten sich nach der Inkubation der

Zellen mit Tunicamycin auf: zusätzlich zu der oberen Bande bei ungefähr 60 kDa wurden durch die Inkubation mit Tunicamycin zwei weitere, kleinere Banden sichtbar, die bei ungefähr 50 und zwischen 40 und 45 kDa lagen. Auch zu der unteren Bande kamen zwei neue Signale hinzu, welche bei 30 und bei ungefähr 20-25 kDa lagen. Diese Western-Analyse zeigte, dass beide Banden, die in unbehandelten Zellen nachgewiesen wurden, keine unterschiedlichen Glykosylierungsformen von TIMP-1 darstellten; beide Banden ließen sich durch eine Hemmung der N-Glykosylierung in je drei Signale aufspalten. Vielmehr sprach das Molekulargewicht der beiden Banden dafür, dass sich in der oberen Bande ein Dimer von N-TIMP-1-GPI findet, da die Größe der Bande in etwa dem doppelten Molekulargewicht der unteren Bande entspricht. Die SDS-PAGE wurde unter nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Somit besteht die Möglichkeit, dass sich ein Proteindimer mit diesen Bedingungen nicht auftrennen ließ.

5.6 Die GPI-verankerten TIMP-1-Varianten können in die Membran von Tumorzellen reinkorporiert werden

Der Nachweis der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten nach der Reinkorporierung in die Membran von Tumorzellen wurde mittels FACS-Analyse und Immunfluoreszenz-Mikroskopie erbracht. Für die Analyse der Oberflächensignale mittels FACS wurden je 1×10^6 Zellen nach einer einstündigen Inkubation mit den Proteinen in einer Konzentration von 1 nM mit anti-hTIMP-1 Antikörpern gefärbt, gefolgt von anti-mIg/RPE zum Nachweis der gebundenen Primärantikörper. Die Analyse der Reinkorporierung der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten erfolgte auch mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie. Hierfür wurden Zellen, die in speziellen Mikroskopschälchen gewachsen waren, mit den Proteinen inkubiert, fixiert und anschließend eine Färbung mit myc-Tag-spezifischem Antikörper, anti-mIg/Biotin und Streptavidin-RPE durchgeführt. Danach wurden Bilder am Fluoreszenzmikroskop erstellt. Die durch FACS gemessenen Oberflächensignale sowie die exemplarischen Bilder der Fluoreszenzmikroskopie sind in Abb. 19 A und B dargestellt. In der Abbildung der FACS-Analyse (Abb. 19 A) sind die Histogramme der Reinkorporierung von GPI-verankerten TIMP-1-Varianten in Tumorzellen der Linie RCC-53 im Vergleich zur Pufferkontrolle gezeigt. Je 2×10^4 Zellen wurden am FACS-Gerät gemessen und die erhaltenen Daten mit der Software *FlowJo* ausgewertet. Hierfür wurden lebende Zellen, die nach der Färbung mit 7-AAD keine Fluoreszenz im FL-3 Kanal zeigten, ausgewertet und die Fluoreszenzwerte dieser Zellen im FL-2 Kanal graphisch in einem Histogramm dargestellt.

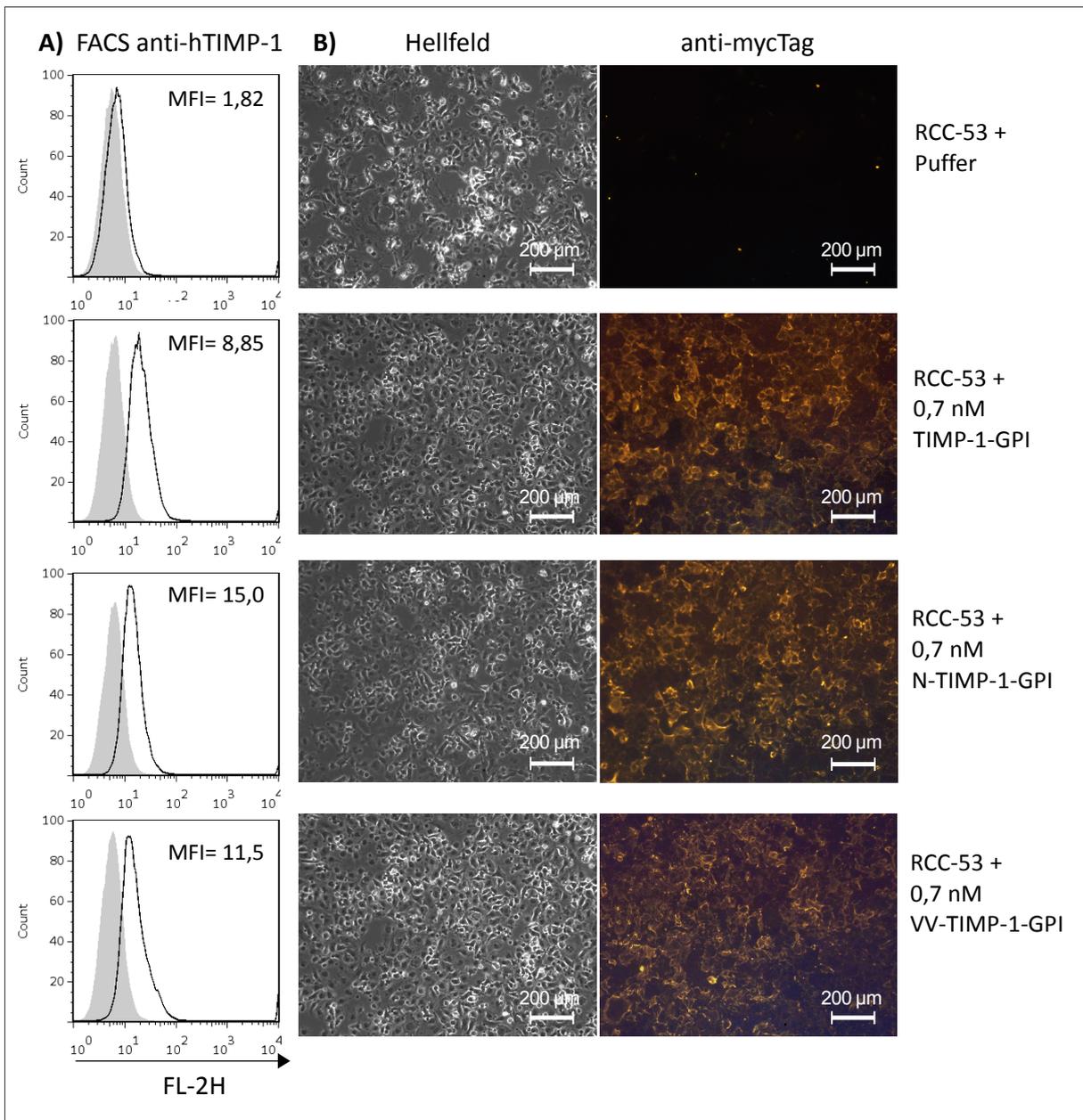


Abbildung 19: Die GPI-verankerten TIMP-1-Varianten können in die Zellmembran von Tumorzellen reinkorporiert werden.

A) FACS-Analyse: Je 1×10^6 Zellen der Linie RCC-53 wurden nach dem Ablösen für eine Stunde mit den GPI-verankerten TIMP-1-Varianten in einer Konzentration von je 1 nM, oder Puffer als Kontrolle, behandelt, anschließend mit anti-hTIMP-1 und anti-mIg/RPE gefärbt und am FACS-Gerät analysiert. Die gemessenen Fluoreszenzwerte wurden als Histogramme dargestellt und dabei das Bild der Antikörperfärbung (schwarze Linie) über das der Isotypkontrolle (grau) gelegt. Die errechneten Unterschiede im Fluoreszenzwert sind in den Zahlenwerten im jeweiligen Histogramm angegeben. Der Wert wurde dabei als Differenz der gemessenen Fluoreszenzwerte aus Antikörperfärbung und Isotypkontrolle (MFI) berechnet.

B) Immunfluoreszenz-Mikroskopie: Zellen der Linie RCC-53 wurden im adhärenenten Zustand in speziellen Mikroskopschälchen für eine Stunde mit den GPI-verankerten TIMP-1-Varianten in einer Konzentration von 1 nM oder Puffer als Kontrolle behandelt und anschließend mit anti-mycTag, anti-mIg/Biotin und Streptavidin-RPE gefärbt. Hellfeldbilder und Fluoreszenzbilder wurden bei fünffacher Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop aufgenommen; der eingezeichnete Marker stellt 200 μm dar.

Die Kurve der Färbung mit dem anti-hTIMP-1 Antikörper wurde zum Vergleich über die der Kon-

trollfärbung mit mIgG gelegt. In der Abbildung ist eine Rechtsverschiebung der Fluoreszenzkurve nach der Färbung mit anti-hTIMP-1 Antikörper im Vergleich zur Isotypkontroll-Färbung (mIgG) bei den mit je 1 nM TIMP-1-GPI, N-TIMP-1-GPI und VV-TIMP-1-GPI inkubierten Ansätzen zu sehen. Die mit Puffer behandelten Zellen zeigten keine Verschiebung der Fluoreszenzkurve im Vergleich zur Isotypkontrolle. Die berechneten MFI-Werte lagen dabei zwischen 9 und 15.

Die mittels FACS-Analyse erhaltenen Daten konnten mit der Immunfluoreszenz-Mikroskopie bestätigt werden. Die gefärbten Zellen wurden am Fluoreszenzmikroskop bei einer Belichtungszeit von 600 ms fotografiert und anschließend Hellfeldaufnahmen des gleichen Bereichs erstellt. Beim Vergleich der Bilder war nach der Inkubation der Tumorzellen mit den TIMP-1-GPI-Varianten ein Signal des RPE-konjugierten Antikörpers auf der Oberfläche zu sehen, welches auf die Membran der Zellen begrenzt war (Abb. 19 B). Dieses Signal war nach der Behandlung mit dem Kontrollpuffer nicht nachweisbar und stellte demnach ein spezifisches Signal für TIMP-1 dar.

Der Nachweis, dass das Signal auf der Zelloberfläche aus dem Einbau des GPI-Ankers in die Membran resultiert, erfolgte mittels Spaltung des GPI-Ankers durch die Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase-C (PI-PLC), wie in Kapitel 5.2 beschrieben. Abbildung 20 zeigt eine Darstellung der gemessenen Werte als Histogramm.

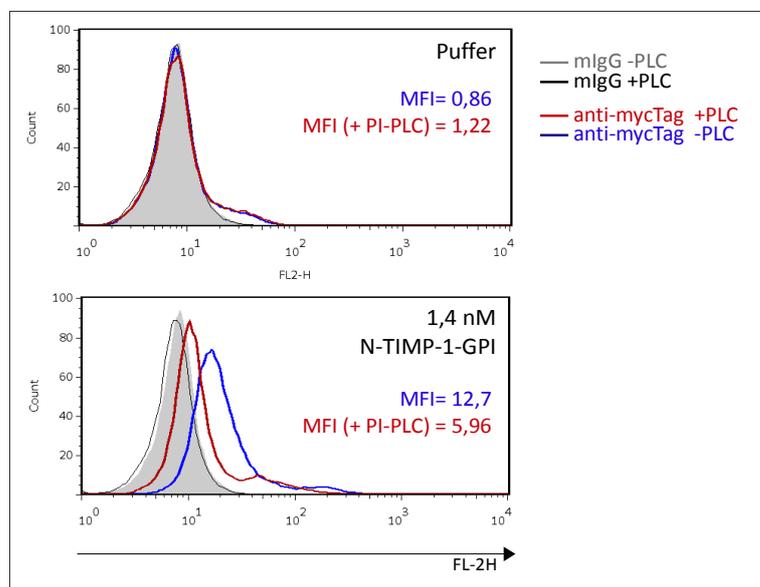


Abbildung 20: PI-PLC-Verdau nach der Reinkorporierung von N-TIMP-1-GPI.

Nach der Inkubation mit 1 nM N-TIMP-1-GPI wurde die Hälfte der RCC-53 Zellen, $1,5 \times 10^6$ Zellen, für eine weitere Stunde mit 0,1 U PI-PLC inkubiert und anschließend eine Färbung mit dem anti-hTIMP-1 Antikörper durchgeführt. Die Fluoreszenz von je 3×10^4 Zellen wurden am FACS-Gerät gemessen und die Werte von Isotypkontrolle (grau bzw. schwarze Linie) und Antikörperfärbung sowie mit (rote Linie) und ohne (blaue Linie) PI-PLC Behandlung in einem Histogramm übereinander gelegt. Die gemessenen Fluoreszenzwerte wurden als mittlerer Fluoreszenzindex (MFI) angegeben, der aus der Differenz aus spezifischer Antikörperfärbung und Isotypkontrolle berechnet wird.

Aus den gemessenen Fluoreszenzwerten wurde jeweils der mittlere Fluoreszenzindex, MFI, berechnet, wie oben beschrieben. Nach der Inkubation mit 1 nM N-TIMP-1-GPI wiesen die Zellen im Vergleich zu der Kontrollfärbung mit mIgG1 ein deutlich erhöhtes Oberflächensignal für TIMP-1 auf, was sich im Histogramm als starke Rechtsverschiebung der geometrischen Mittelwerte der Fluoreszenzkurve von 7,74 auf 20,44 darstellen lässt (MFI 12,7, Abb. 20). Dieses Signal wurde durch eine Behandlung mit 0,1 U PI-PLC nach der Reinkorporierung deutlich reduziert, es fand nur noch eine Verschiebung der geometrischen Mittelwerte der gemessenen Fluoreszenz von 7,14 auf 13,1 statt (MFI 5,96, Abb.20). Der MFI verringerte sich nach der Inkubation mit PI-PLC um mehr als die Hälfte (53%). Nach der Inkubation der Zellen mit dem gleichen Volumen Puffer wurde nur ein sehr schwaches Fluoreszenzsignal gemessen (MFI 0,86), und das Signal änderte sich auch kaum nach der Behandlung mit PI-PLC (MFI 1,22). Insgesamt ergab sich für die Pufferkontrolle nach der Behandlung mit PI-PLC eine Änderung um 40%, das Signal wurde leicht verstärkt.

Auf der Oberfläche der Nierenkarzinomzellen konnte somit nach einstündiger Behandlung mit den GPI-verankerten TIMP-1-Varianten ein Fluoreszenzsignal für TIMP-1 mittels FACS-Analyse sowie ein Signal für das mycTag mittels Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden. Der GPI-Anker der TIMP-1-Proteinvarianten verankert die Proteine dabei in der äußeren Schicht der Zellmembran (Medof et al. 1996). Der Nachweis dafür, dass die Signale durch eine GPI-Verankerung der Proteine in der Membran entstehen, konnte durch eine enzymatische Behandlung mit PI-PLC nach der Reinkorporierung erbracht werden.

Im Folgenden wurde der Einfluss der verschiedenen Domänen von TIMP-1 auf die proteolytische Umgebung der Tumorzellen nach der Reinkorporierung der GPI-verankerten Varianten in die Zellmembran untersucht.

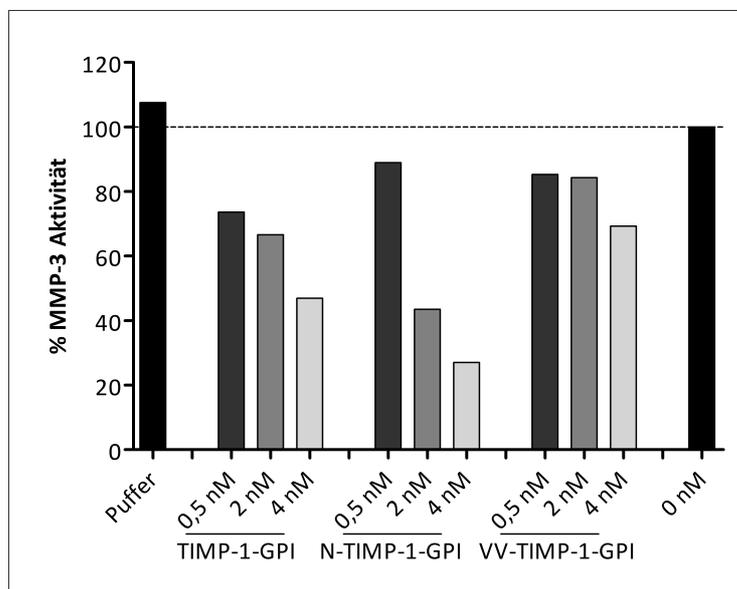
5.7 Eine intakte NTD in TIMP-1 ist notwendig und ausreichend für die effektive Inhibition der Aktivität von MMP-3

Die N-terminale Domäne von TIMP-1 ist notwendig für die Inhibition der Proteaseaktivität von MMP. Dabei werden bis zu 70% aller Kontakte zwischen der Protease und ihrem Inhibitor durch die N-terminale Domäne vermittelt. Verschiedene Gruppen haben die Interaktion zwischen MMP-3 und TIMP-1 genau untersucht und auch die Kristallstruktur eines MMP-3- TIMP-1-Komplexes wurde gelöst (Gomis-Ruth et al. 1997; Huang et al. 1997).

Um die Aktivität der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten genauer zu untersuchen, wurden die

Proteine mit der katalytischen Domäne von MMP-3 in einer Konzentration von 10 nM für eine Stunde inkubiert und anschließend die Proteaseaktivität mit einem fluorogenen Substrat gemessen. Die folgende Abbildung zeigt beispielhaft das Ergebnis einer Messung, wobei der Versuch insgesamt dreimal durchgeführt wurde und jedes Mal den gleichen Trend zeigte.

Die Fluoreszenzwerte wurden in Abbildung 21 prozentual zur Proteaseaktivität ohne Inkubation mit einer GPI-verankerten TIMP-1-Variante oder Puffer dargestellt (in der Abbildung ganz rechts, 0 nM Inhibitor). Zusätzlich wurde eine Kontrolle mit dem Säulenpuffer in äquimolarem Volumen zu den Proteinen durchgeführt (im Folgenden „Puffer“ genannt). Die dargestellten Werte wurden aus der Messung 30 Minuten nach der Zugabe des Substrats errechnet.



	∅	Puffer	TIMP-1-GPI			N-TIMP-1-GPI			VV-TIMP-1-GPI		
Konzentration Inhibitor (nM)	0	-	0,5	2	4	0,5	2	4	0,5	2	4
% Aktivität (10 nM MMP-3)	100	107,5	73,6	66,6	46,9	88,9	43,5	27	85,3	84,3	69,3

Abbildung 21: TIMP-1-GPI und N-TIMP-1-GPI, nicht aber die VV-Mutante von TIMP-1, inhibieren die proteolytische Aktivität von MMP-3.

Dieser Versuch wurde im Labor der AG Chr. Ries zweimal durchgeführt und führte dabei zum gleichen Trend. Für den Aktivitätsversuch wurden verschiedene Konzentrationen der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten eingesetzt, mit der katalytischen Domäne von MMP-3 in einer Konzentration von 10 nM inkubiert und anschließend die Aktivität bei der Proteolyse eines fluoreszenzmarkierten Peptids gemessen. Hierfür wurde ein Plattenlesegerät verwendet und bei einer Anregungswellenlänge von 320 nm die Emission bei 405 nm gemessen. Als Kontrollen dienen Ansätze ohne Probe („0 nM Inhibitor“) oder mit Säulenpuffer in äquimolarem Volumen zu der höchsten Proteinkonzentration („Puffer“). Die Aktivität der eingesetzten 10 nM MMP-3 nach Inkubation ohne eine Probe („0 nM“ Inhibitor, ganz rechts in der Abbildung) wurde gleich 100% Aktivität gesetzt (Siehe gestrichelte Linie in der Abbildung) und alle gemessenen Proben prozentual dazu berechnet.

Nach Inkubation von MMP-3 mit dem Säulenpuffer wurde keine deutlich veränderte Proteaseaktivität gemessen (107%). Die leichte Erhöhung des Signals lag dabei im Rahmen der natürli-

chen Schwankungen des Experiments von ungefähr 10%. TIMP-1-GPI und N-TIMP-1-GPI zeigten im Gegensatz zu VV-TIMP-1-GPI eine deutliche Inhibition von MMP-3. TIMP-1-GPI bewirkte nach einer Inkubation mit der Protease eine dosisabhängige Hemmung der Proteolyse des Substrats. Nach Zugabe von 0,5 nM war im Vergleich zu der unbehandelten Protease nur noch 73,6 % der Proteaseaktivität messbar. Die Aktivität wurde durch die Zugabe von 2 nM TIMP-1-GPI auf 66,6 % und durch 4 nM auf 46,9 % verringert. Auch die GPI-verankerte N-terminale Domäne von TIMP-1 verringerte die Aktivität von MMP-3 dosisabhängig auf 88,9 % mit 0,5 nM, 43,5 % mit 2 nM Inhibitor und 27 % nach der Zugabe von 4 nM N-TIMP-1-GPI. Dabei wurde festgestellt, dass N-TIMP-1-GPI eine stärkere Inhibition von MMP-3 zur Folge hat als das vollständige TIMP-1-GPI. Dies wurde in früheren Versuchen anderer Gruppen bereits festgestellt und wird in der Diskussion genauer erläutert. Nach der Inkubation mit der VV-Mutante von TIMP-1-GPI wurde keine effektive Hemmung der Proteaseaktivität von MMP-3 gemessen. Inkubation mit 0,5 nM des Proteins führte zu einer MMP-3 Aktivität von 85,3 %, 2 nM zu 84,3 % und 4 nM zu 69,3 %. Die Aktivität war demnach deutlich höher als nach der Inkubation mit den beiden anderen TIMP-1-Varianten. Nach der Inkubation mit der höchsten Proteinkonzentration wurde eine leicht verringerte MMP-3 Aktivität gemessen, was darauf hindeutete, dass VV-TIMP-1-GPI zwar in seiner inhibitorischen Funktion gestört ist, die Proteinaktivität aber möglicherweise nicht vollständig verhindert wird.

5.8 Die N-terminale Domäne des GPI-verankerten TIMP-1 vermittelt die Inhibition von MMP-2 und MMP-9

Die N-terminale Domäne (NTD) von TIMP-1 vermittelt zwei Drittel der Kontakte mit den Matrix-Metalloproteasen und enthält die hauptsächlich inhibitorische Aktivität. Für die C-terminale Domäne (CTD) hingegen wurde gezeigt, dass sie einen nicht-inhibitorischen Komplex mit der CTD von proMMP-9 eingeht. Die NTD von TIMP-1 bleibt dabei ungebunden und kann gleichzeitig andere, aktive MMP binden und inhibieren (Roderfeld et al. 2007).

Eine Variation der Zymographie-Methode (siehe Kapitel 5.9) kann für die Analyse der inhibitorischen Aktivität von Proteinen der TIMP-Familie gegen die Gelatinasen MMP-2 und -9 verwendet werden: die Reverse Zymographie. Hierbei wird neben der Gelatine als Substrat auch die aktive Protease in ein SDS-Gel eingegossen und Proben des Inhibitors unter nicht-reduzierenden Bedingungen im Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach einer Renaturierung durch Auswaschen des denaturierenden SDS aus dem Gel wird das Gel für mehrere Stunden in einem Puffer entwi-

ckelt, der optimal die MMP-Aktivität unterstützt. Dabei zersetzen die Gelatinasen das Substrat im Gel, wobei Bereiche, in denen ein Inhibitor aufgetrennt wurde, davor geschützt sind. In einer anschließenden Coomassie-Färbung erscheinen diese Bereiche dunkler auf hellem Hintergrund. Die inhibitorische Aktivität der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten gegen MMP-2 und MMP-9 wurde mittels Reverser Zymographie untersucht. Hierfür wurden die Proteasen in ein 10%iges SDS-Gel, das 0,5 mg/ml Gelatine enthielt, eingegossen und die TIMP-1-Varianten elektrophoretisch im Gel aufgetrennt.

In Abbildung 22 sind die Zymogramme mit aktiver MMP-2 und MMP-9 nach Auftrennung von je 6 pmol TIMP-1-, N-TIMP-1- und VV-TIMP-1-GPI dargestellt. Diese Gelbilder stehen beispielhaft für diesen Aktivitätsversuch, der insgesamt fünfmal durchgeführt wurde und dabei immer den gleichen Trend zeigte.

Die Coomassie-gefärbten Zymogramme zeigten dunkle Banden bei ungefähr 35 kDa und 60- 70 kDa, die nach Zugabe von TIMP-1-GPI jeweils etwas höher waren als bei N-TIMP-1-GPI. Diese Banden entsprachen dem Molekulargewicht der beiden Proteine (ungefähr 35 kDa für TIMP-1-GPI, 30-35 kDa für N-TIMP-1-GPI) und wiesen darauf hin, dass sowohl das GPI-verankerte TIMP-1 als auch die kleinere, GPI-verankerte N-terminale Domäne (NTD), N-TIMP-1-GPI, gegen die Proteasen aMMP-2 sowie aMMP-9 inhibitorische Aktivität besitzen.

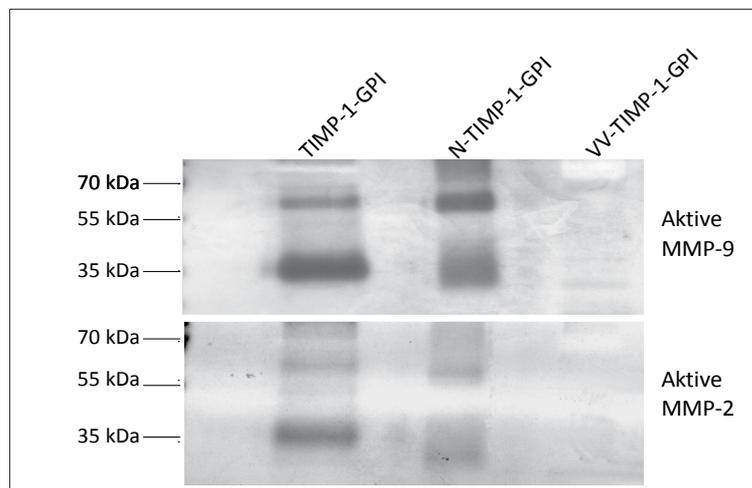


Abbildung 22: Reverse Zymographie: TIMP-1-GPI und N-TIMP-1-GPI inhibieren die Aktivität von MMP-2 und MMP-9.

6 pmol der GPI-verankerten Proteine wurden in 10%igen SDS-Gelen, die 0,5 mg/ml Gelatine und je 100 ng der aktiven Proteasen rhMMP-2 oder rhMMP-9 pro 5 ml Gellösung enthielten, aufgetrennt und nach einer Renaturierung in Triton X-100-haltigem Puffer und einer Entwicklung für 36 h in einem speziellen Puffer für MMP-Aktivität mit Coomassie gefärbt. Bereiche, in denen die Proteaseaktivität im Gel gehemmt wurde, erscheinen nach Abbau der Gelatine in der Färbung als dunkle Bereiche auf dem hellen Hintergrund und erscheinen auf Höhe des jeweiligen Inhibitors.

Zusätzlich zeigte dies, dass jeweils beide Banden, die auch in der Western-Analyse der GPI-verankerten Proteine nachgewiesen wurden, inhibitorische Aktivität gegen die Gelatinasen vermitteln. Im Gegensatz dazu konnte durch Auftrennung von VV-TIMP-1-GPI in der gleichen Konzentration keine dunkle Bande im Gel nachgewiesen werden. Das GPI-verankerte VV-TIMP-1 wies keine inhibitorische Aktivität gegenüber MMP-2 oder MMP-9 auf und hatte keinen Einfluss auf den Abbau der Gelatine.

Aus den Beobachtungen ließ sich schließen, dass die Hemmung der aktiven Proteasen MMP-2 und MMP-9 bei den GPI-verankerten TIMP-1-Varianten durch die N-terminale Domäne vermittelt wird und die C-terminale Domäne, die in VV-TIMP-1-GPI im Vergleich zu TIMP-1-GPI nicht modifiziert wurde, bei der Inhibition der untersuchten Gelatinasen keine Rolle spielt.

5.9 Durch die Reinkorporierung von TIMP-1-GPI und N-TIMP-1-GPI, nicht aber von der VV-Mutante, in die Membran von Tumorzellen, wird die MMP-Aktivität im Überstand der Zellen verringert

MMP-Aktivität im Kulturüberstand von Zellen kann mittels der Substratzymographie analysiert werden. Diese Technik identifiziert MMP-2 und -9, die der Untergruppe der Gelatinasen zugeordnet werden, sowohl als aktive Proteasen als auch als Proenzyme mittels Abbau ihres spezifischen Substrats Gelatine und ihres Molekulargewichts. Die Proteine werden hierfür elektrophoretisch unter denaturierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Trennung erfolgt in einem SDS-Polyacrylamidgel, in das Gelatine als Substrat für die Proteasen eingegossen wurde. Während der Elektrophorese denaturiert das SDS, welches in Gel und Puffer enthalten ist, die Proteasen reversibel und sie werden dadurch inaktiv. Nach der Auftrennung folgt eine Entwicklung des Gels und eine Aktivierung der MMP-Aktivität durch Auswaschen des SDS durch das im Puffer enthaltene Triton X-100 (Woessner 1995). Zusätzlich werden latente MMP, ohne eine Abspaltung des Propeptids, durch Autokatalyse aktiviert (Oliver et al. 1997 und Kapitel 2.2.3). Im darauf folgenden Entwicklungsschritt wird das Gel 72 Stunden in Entwicklungspuffer bei 37°C inkubiert. Dabei bauen die Gelatinasen die im Gel enthaltene Gelatine ab, was bei der anschließenden Coomassiefärbung als klare Banden im blau gefärbten Gel sichtbar wird. Diese Banden können mit der Software *ImageJ* densitometrisch ausgewertet werden.

TIMP-1 bindet und hemmt nahezu alle MMP. Dabei vermittelt die N-terminale Domäne (NTD) bis zu 70% aller Kontakte und besitzt die hauptsächliche inhibitorische Aktivität. Die C-terminale Domäne (CTD) von TIMP-1 bindet mit einem einzigartigen Mechanismus an proMMP-9, wobei

dieser Komplex nicht-inhibitorisch ist (siehe Kapitel 6). Die Gruppe um Zucker zeigte 2009, dass TIMP-1 auch in einem Komplex mit proMMP-2 gefunden werden kann, was über die Hämopexindomäne oder die Verbindungsregion (*hinge region*) der Protease vermittelt wird. Bisher wurden hierzu keine weiteren Daten gezeigt.

In Vorversuchen unseres Labors wurde durch die Reinkorporierung von TIMP-1-GPI in Tumorzellmembranen eine Reduktion von proMMP-2 und -9 im Kulturüberstand der Zellen nachgewiesen (Djafarzadeh 2004, 2006, 2009).

Um zu untersuchen, ob die GPI-verankerten TIMP-1-Varianten in der Tumorzellmembran MMP binden können und welche Domäne des GPI-verankerten TIMP-1 die Bindung vermittelt, wurden Zellen der Linie RCC-53 oder A-498 für eine Stunde mit den Proteinen oder den entsprechenden Kontrollen behandelt und anschließend für weitere 72 Stunden in serumfreiem Medium kultiviert. Als Kontrollen dienten denaturierte Proben der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten (siehe Kapitel 4.2.5.5), rhTIMP-1 und Phosphatidylinositol (L- α -PI) als Kontrolle für den GPI-Anker in äquimolaren Konzentrationen zu den Proteinen sowie der Säulenpuffer im selben Volumenverhältnis. In diesem Versuch wurde mit beiden Nierenkarzinom-Zelllinien gearbeitet, da in Vorversuchen gezeigt wurde, dass die Linie RCC-53 eine deutlich höhere Expression von MMP-2 und -9 und die Linie A-498 eine höhere MMP-7 Expression aufweist. Dabei werden in diesem Kapitel beispielhafte Gelbilder gezeigt, wobei jeder Versuch dreimal wiederholt wurde. Nach 48 Stunden wurden Proben der Überstände entnommen und die MMP-Konzentration mittels Zymographie analysiert. Zur Untersuchung der Gelatinaseaktivität von MMP-2 und -9 wurden Überstände der Zelllinie RCC-53 analysiert. Abbildung 23 A zeigt das Gelbild sowie die densitometrische Auswertung des Zymogramms. Zur Analyse von MMP-7 wurden die Überstände aus den Experimenten mit A-498 Zellen in einem SDS-Gel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen, und mit einem Primärantikörper gegen hMMP-7 gefärbt. Abbildung 23 B zeigt den anschließend mit einem Chemilumineszenz-System entwickelten Röntgenfilm und die zugehörige densitometrische Auswertung.

Konditionierter Überstand von HT1080 Zellen wurde als Positivkontrolle in der Zymographie verwendet. Er wurde vor der Analyse mit APMA (Aminophenyl-Quecksilberazetat) aktiviert um neben den pro-Gelatinasen auch aktive Gelatinasen (MMP-2, 62 kDa und MMP-9, 84 kDa) zu erhalten (siehe Kapitel 4.2.6.4.1, sowie Beschreibung der MMP-Aktivierung in Kapitel 2.2.3). Auch inaktive Vorstufenproteasen (proMMP-2, 72 kDa und proMMP-9, 92 kDa) sind im Gel nach der Aktivierung noch zu erkennen, da keine vollständige Aktivierung der MMP stattfindet. Diese vier

klaren Banden auf dunklem Hintergrund dienen als Größenstandard zur Bestimmung der unterschiedlichen Proteasen im Überstand der behandelten Zellen.

Im Kulturüberstand der RCC-53 Zellen konnten mittels Zymographie überwiegend die latenten Proteasen proMMP-2 und -9 nachgewiesen werden. So sind in den Kontrollproben von unbehandelten (Medium) und Puffer-behandelten Zellen deutlich lytische Banden im Bereich von proMMP-9 (92 kDa) und proMMP-2 (72 kDa) zu sehen. Zellen, die mit 0,7 nM rhTIMP-1 oder L- α -Phosphatidylinositol (L- α -PI) als Kontrolle für den Lipidanker behandelt wurden, zeigten keine Unterschiede in der Gelatinase-Aktivität im Vergleich zu den unbehandelten Zellen.

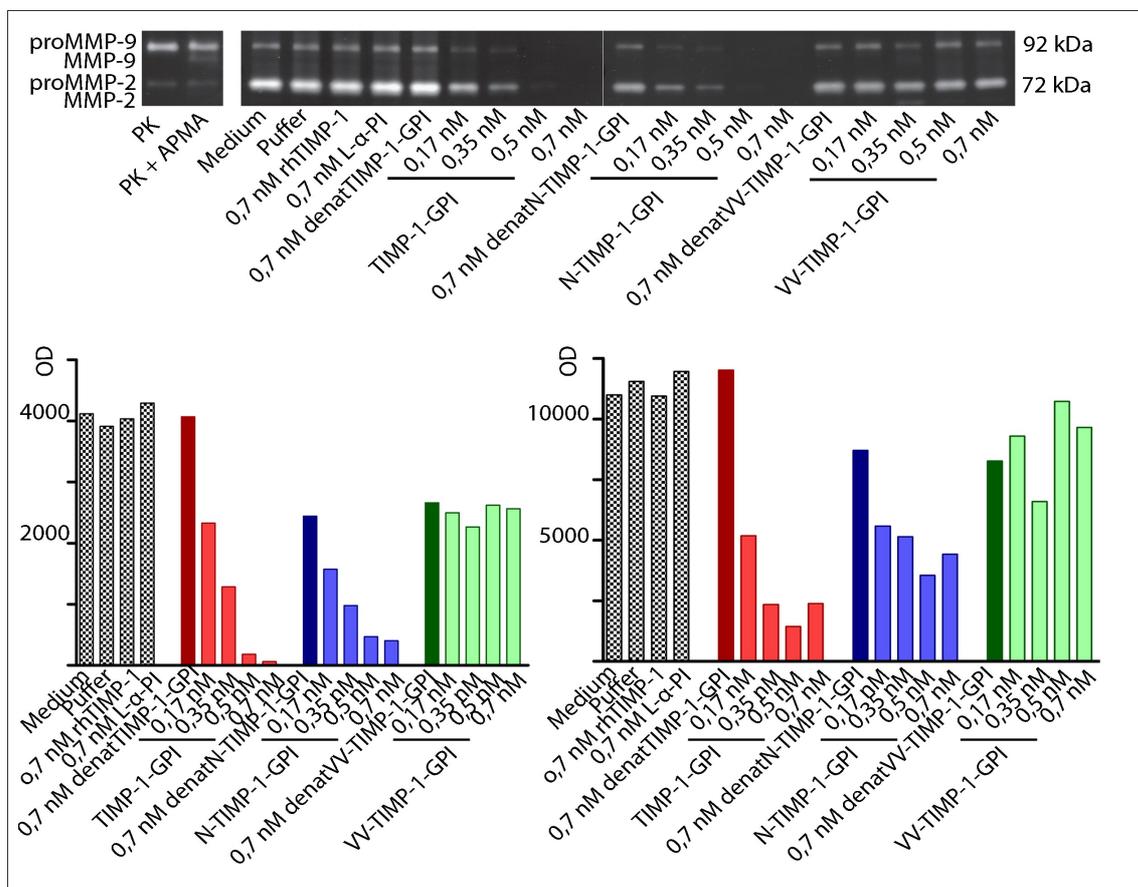


Abbildung 23 A: TIMP-1-GPI und N-TIMP-1-GPI, nicht aber VV-TIMP-1-GPI, verringern MMP-2 und -9 Aktivität im Überstand von Nierenkarzinomzellen.

Zellen der Linie RCC-53 wurden für 1 h mit steigenden Konzentrationen der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten behandelt. Als Kontrollen dienten denaturierte Proben der Proteine (siehe Kapitel 4.2.5.5), rhTIMP-1 und Phosphatidylinositol (L- α -PI) in äquimolaren Konzentrationen zu den Proteinen sowie Säulenpuffer im selben Volumenverhältnis. Anschließend wurden die Zellen für weitere 48 h in serumfreiem Medium kultiviert. Je 10 μ l der konditionierten Überstände der Zellen wurden in einem Zymographie-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und nach einer Entwicklungszeit von 36 h mit Coomassie gefärbt. Als Positivkontrolle wurde konditionierter Überstand von Fibrosarkomzellen verwendet (erste Spur, PK und PK + APMA). Banden proteolytischer Aktivität erscheinen als helle, lytische Bereiche im dunkelblau gefärbten Gel. Abkürzungen: PK: Positivkontrolle, APMA: Aminophenyl-Quecksilberazetat (Aktivierung der MMP, Kapitel 2.2.3), OD: optische Dichte (Extinktion)

Ebenso gab es keinen Einfluss durch die Behandlung der Zellen mit den denaturierten GPI-verankerten TIMP-1-Varianten in der höchsten Konzentration, 0,7 nM. Im Gegensatz dazu zeigten die Kulturüberstände von Zellen, die mit steigenden Konzentrationen des vollständigen GPI-verankerten TIMP-1 oder der GPI-verankerten N-terminalen Domäne, N-TIMP-1-GPI, behandelt wurden, eine deutliche Abnahme der Gelatinase-Aktivität. Dabei nahm die Aktivität beider proMMP dosisabhängig ab, wobei bereits nach der Behandlung mit der geringsten Konzentration, 0,17 nM, ein Effekt zu sehen ist. Diese Verringerung der MMP-Aktivität wurde mit zunehmender Konzentration der beiden GPI-verankerten TIMP-1-Varianten verstärkt, wobei nach der Behandlung mit 0,35 nM kaum mehr Banden im Gel zu sehen waren. Das Fehlen lytischer Banden nach der Reinkorporierung mit höheren Konzentrationen der Proteine bedeutete, dass die enthaltene MMP-Menge unter der Nachweisgrenze der Zymographie lag. Nach Behandlung der Zellen mit der VV-Variante des GPI-verankerten TIMP-1 war keine Abnahme der MMP-Aktivität im Kulturüberstand der Zellen zu erkennen. Die Gelatinase-Aktivität im Überstand der behandelten Nierenkarzinomzellen blieb auch nach der Behandlung mit 0,7 nM VV-TIMP-1-GPI unverändert. Der in diesem Kapitel beschriebene Trend war in allen durchgeführten Experimenten derselbe. Durch die Reinkorporierung von TIMP-1-GPI oder N-TIMP-1-GPI in die Membran der Nierenkarzinomzellen konnte die proteolytische Umgebung der Tumorzellen verändert werden: es wurde eine verringerte Konzentration an MMP-2, -7 und -9 nachgewiesen.

Die Western-Analyse der Überstände von Nierenkarzinomzellen der Linie A-498 zeigte ein ähnliches Ergebnis für die Sekretion von MMP-7 (Abb. 23 B). Im Überstand der Zellen war ausschließlich proMMP-7, nicht aber die aktive Form, nachweisbar.

Nach der Behandlung mit dem Puffer wies die Probe eine leicht verringerte proMMP-7 Konzentration auf, was aber auf eine experimentelle Schwankung zurückzuführen war, da dieses Phänomen nicht in jedem Experiment zu sehen war. Während die Werte der anderen Kontrollansätze (je 0,7 nM rhTIMP-1, L- α -PI, denaturiertes TIMP-1-GPI) keine deutlichen Unterschiede zueinander zeigten, nahm das Signal für proMMP-7 in den Überständen der Zellen, die mit TIMP-1-GPI oder N-TIMP-1-GPI behandelt wurden, deutlich ab. Diese Verringerung war dosisabhängig und verstärkte sich, je mehr Protein zu den Zellen gegeben wurde. Vergleichbar mit den Ergebnissen der Zymographie war auch in der Western-Analyse eine deutliche Abnahme schon nach Inkubation mit 0,17 nM der beiden Proteine zu erkennen, nach der Reinkorporierung mit 0,35 nM war kein proMMP-7 Signal mehr detektierbar.

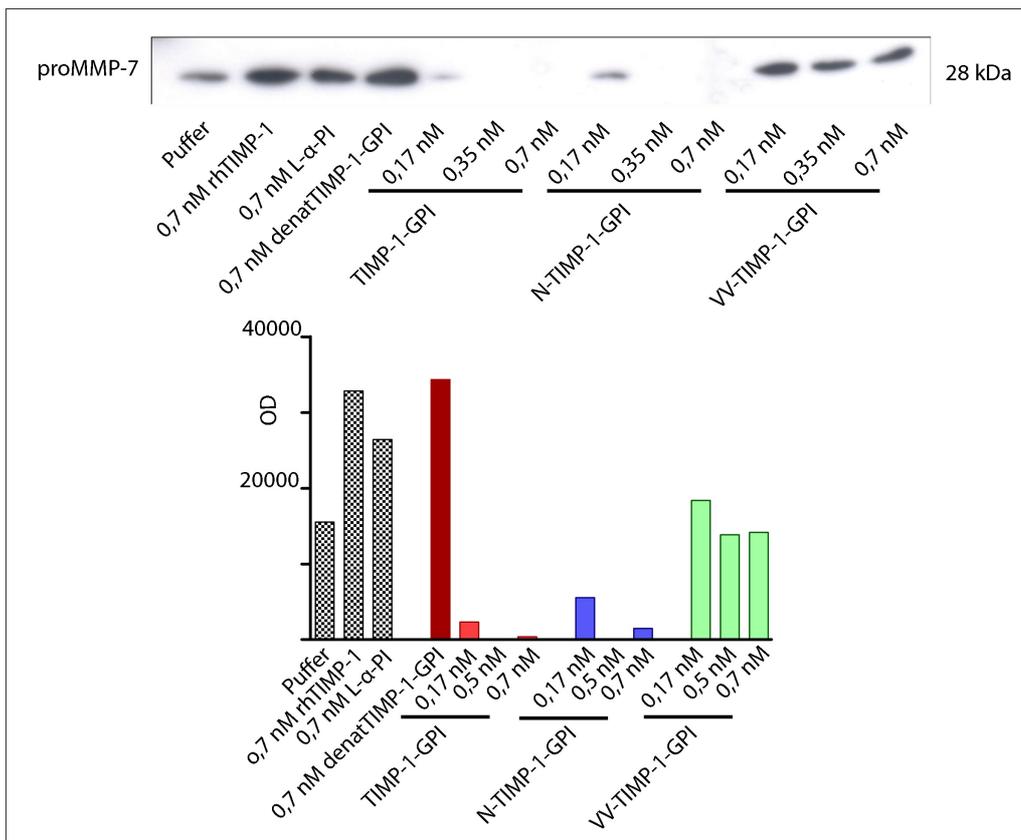


Abbildung 23 B: TIMP-1-GPI und N-TIMP-1-GPI, nicht aber VV-TIMP-1-GPI, verringern MMP-7 Aktivität im Überstand von Nierenkarzinomzellen.

Der Versuch wurde wie in Abb. 23 A beschrieben durchgeführt. Für eine Western-Analyse der Überstände von A-498 Zellen wurden je 10 µl Überstand in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und nach der anschließenden Antikörper-Färbung mit anti-hMMP-7 und anti-mIg/HRP mit einem Chemilumineszenz-System auf Röntgenfilmen entwickelt.

Diese deutliche Reduktion konnte nach der Inkubation mit VV-TIMP-1-GPI nicht nachgewiesen werden, was mit den Ergebnissen der Zymographie korrelierte.

Das Ergebnis der Western-Analyse unterstützte somit das der zymographischen Analyse der Überstände, in denen gezeigt werden konnte, dass TIMP-1 und N-TIMP-1, nicht aber die VV-Mutante, die Aktivität von MMP-2 und MMP-9 im Überstand der Nierenkarzinomzellen verringern. Durch die Reinkorporierung von TIMP-1-GPI oder N-TIMP-1-GPI in die Membran der Nierenkarzinomzellen konnte die proteolytische Umgebung der Tumorzellen verändert werden: es wurde eine verringerte Konzentration an MMP-2, -7 und -9, nachgewiesen. Dabei ist zu bemerken, dass es sich bei den in den Gelen nachgewiesenen Proteasen hauptsächlich um die Vorstufenenzyme, proMMP, handelte. TIMP-1 bindet über C-terminale Kontakte an proMMP-9. Eine Bindung an proMMP-2 wurde in einer Studie 2009 nachgewiesen; diese Wechselwirkung findet durch die Hämopexindomäne oder die Verbindungsregion von proMMP-2 statt (Zucker et al.

2009). Eine Diskussion dieses Effekts findet in Kapitel 6 statt. Welchen Einfluss die Veränderung der proteolytischen Umgebung der Tumorzellen auf wichtige biologische Prozesse der Tumorbio-
logie hat, wird in den folgenden Kapiteln dieser Arbeit dargestellt.

5.10 Reinkorporierung der TIMP-1-GPI-Varianten in die Membran von Tumorzellen vermittelt eine Bindung verschiedener MMP an die Zelloberfläche

Die Proteine der MMP-Familie sind sezernierte Proteine, die im peri- und extrazellulären Raum aktiv sind. TIMP-1 bindet nahezu alle Mitglieder dieser Familie und inhibiert ihre Aktivität. Die Analyse der Kulturüberstände der Nierenkarzinomzellen zeigte verringerte Aktivität von MMP-2, -7 und -9 nach der Inkorporierung von TIMP-1- und N-TIMP-1-GPI. Basierend darauf sollte im Folgenden untersucht werden, ob diese Aktivitätsreduktion durch eine Bindung der MMP an die Oberfläche der Zellen zustande kam. Hierfür wurden je 2×10^6 Nierenkarzinomzellen der Linie RCC-53 mit einer hohen Konzentration der Proteine (10 nM) inkubiert und für 24 h in serumfreiem Medium belassen. Anschließend wurde eine FACS-Analyse der Zelloberfläche nach verschiedenen MMP durchgeführt.

Abbildung 24 zeigt die erstellten Histogramme. Dargestellt sind die übereinandergelegten Diagramme aus Isotypkontroll-Ansätzen (grau hinterlegt) und Färbungen mit den spezifischen Antikörpern gegen hTIMP-1, hMMP-1, -3 oder -7 (schwarze Linien). Zusätzlich wurde jeweils der mittlere Fluoreszenzindex (MFI) als Differenz aus dem Fluoreszenzwert der spezifischen Antikörperfärbung und der Isotypkontrollfärbung berechnet. Dieser Wert ist im rechten oberen Eck des jeweiligen Histogramms angegeben.

Nach der Reinkorporierung der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten wurden auf der Oberfläche der Zellen in allen Proben Fluoreszenzsignale nach der Färbung von TIMP-1, MMP-1, MMP-3 und MMP-7 gemessen. Die MFI-Werte bei der Pufferkontrolle lagen zwischen 0,03 (anti-hMMP-7) und 0,77 (anti-hTIMP-1), waren also kaum messbar. Im Gegensatz dazu lagen alle MFI-Werte für TIMP-1 24h nach der Reinkorporierung der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten zwischen 47 (VV-TIMP-1-GPI) und 84 (TIMP-1- und N-TIMP-1-GPI) auf der logarithmischen Achse. Die Werte der MMP-Färbungen korrelierten mit denen des TIMP-1 Signals: Nach dem Einbau der VV-Mutante wurden die geringsten Fluoreszenzwerte gemessen (MFI=35-40), wobei hier auch der geringste Wert für TIMP-1 auf der Oberfläche gemessen wurde. Nach Einbau von TIMP-1-GPI oder N-TIMP-1-GPI wurden höhere Werte gemessen, die alle um einen MFI von 60 schwankten. Verglichen zu den gemessenen Fluoreszenzwerten der anti-hTIMP-1 Färbung war

kein Unterschied zwischen der VV-Mutante und den Varianten mit einer intakten N-terminalen Domäne messbar. Dies wird in Kapitel 6 genauer diskutiert.

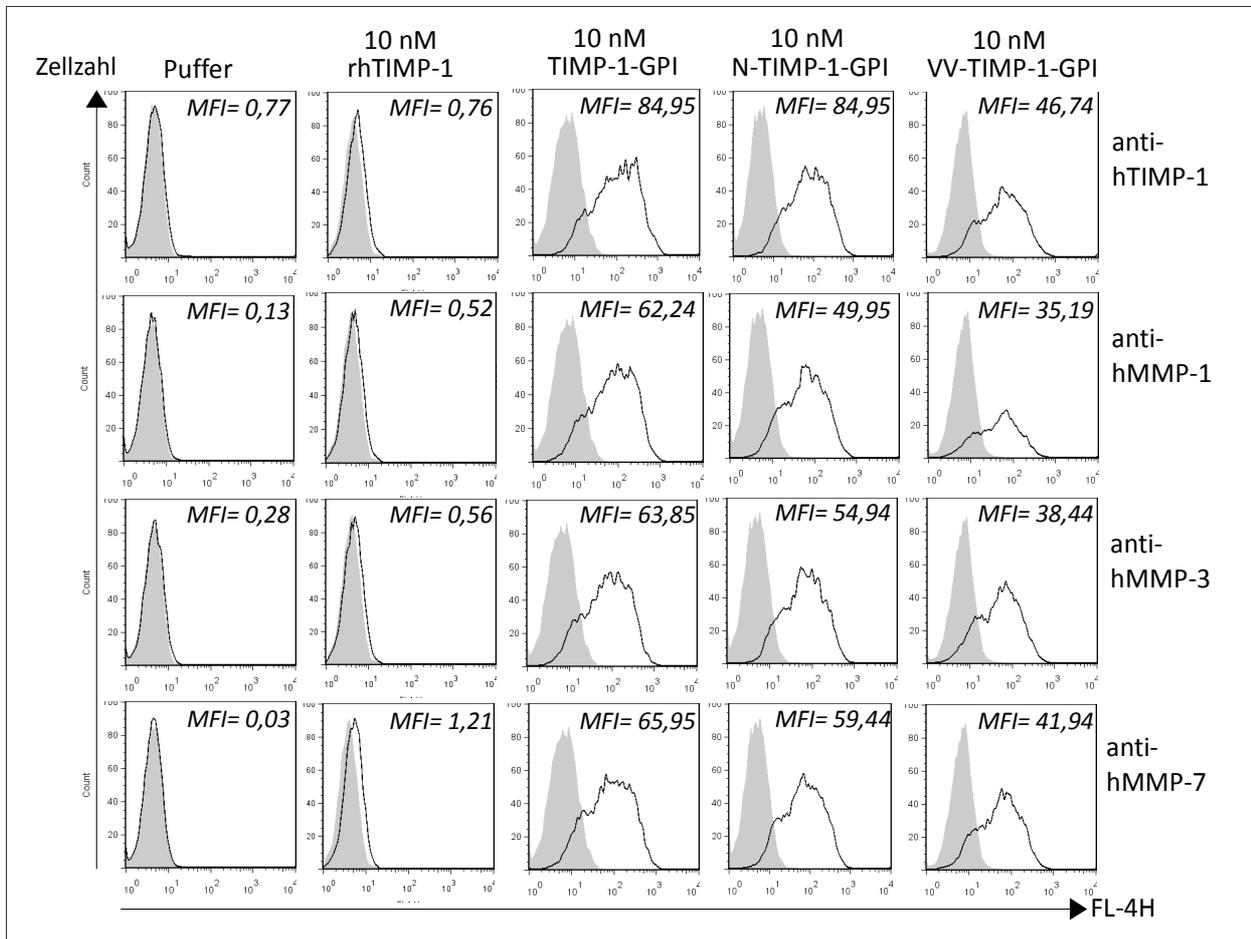


Abbildung 24: Inkorporierung der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten führt zu erhöhten Oberflächensignalen von MMP auf Nierenkarzinomzellen.

2x10⁶ Zellen der Linie RCC-53 wurden mit 10 nM der TIMP-1-GPI Derivate, sowie Puffer oder 10 nM rhTIMP-1 als Kontrolle behandelt. Nach einer Inkubation von 24 h in serumfreiem Medium wurden extrazelluläre FACS-Analysen mit Antikörpern gegen hTIMP-1, hMMP-1, hMMP-3 und h-MMP-7 durchgeführt. Die Primärantikörper wurden durch anti-mIg/Biotin und Streptavidin-APC nachgewiesen und die Fluoreszenz von 2x10⁴ Zellen am FACS-Gerät im FL-4 Kanal gemessen. Tote Zellen wurden zuvor durch eine Färbung mit Propidiumiodid ausgeschlossen. Die mit der Software FlowJo erstellten Histogramme aus Isotypkontrollfärbung (grau hinterlegt) und Antikörperfärbung (schwarze Linien) wurden übereinander gelegt. Der mittlere Fluoreszenzindex, MFI, wurde aus der Differenz der Fluoreszenzwerte im FL-4 Kanal von spezifischer Antikörperfärbung und Isotypkontrollfärbung berechnet und ist jeweils im rechten oberen Eck des Histogramms angegeben.

Zusätzlich wurden FACS-Analysen nach der Behandlung der Zellen mit 0,7 nM L-α-PI sowie unbehandelten Zellen durchgeführt. Diese Werte wurden zur Vereinfachung nicht dargestellt. Bei diesen Zellen wurden keine Oberflächensignale für TIMP-1 oder MMP gemessen, was für eine spezifische Bindung der Antikörper an die Moleküle spricht. Außerdem zeigte es, dass durch die Inkorporierung der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten eine Bindung der untersuchten MMP stattgefunden hatte.

Für die Analyse weitere Mitglieder der MMP-Familie konnten keine geeigneten Antikörper gefunden werden (siehe Kapitel 6, Diskussion).

Es wurde gezeigt, dass die drei GPI-verankerten TIMP-1-Varianten in die Membran von Nierenkarzinomzellen eingebaut werden können. Dadurch kam es zu einer Bindung verschiedener Proteasen an die Zelloberfläche. Proteine mit einer intakten N-terminalen Domäne vermittelten außerdem eine Veränderung der proteolytischen Umgebung der Zellen durch eine verringerte Aktivität der MMP im Überstand (siehe Kapitel 5.9). Im Folgenden sollte deshalb der Einfluss der GPI-verankerten TIMP-1-Derivate auf verschiedene Schritte des Tumorzellwachstums untersucht werden.

5.11 Die Hemmung der Proliferation von Nierenkarzinomzellen wird durch eine intakte N-terminale Domäne des GPI-verankerten TIMP-1 vermittelt

3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) wird für die quantitative Bestimmung zellulärer Proliferation oder Aktivierung genutzt. Der Versuchsaufbau basiert darauf, dass das gelbe Tetrazoliumsalz MTT in metabolisch aktiven Zellen in das purpurfarbene Formazan umgewandelt wird. Dieser Vorgang wird durch Sukzinat-Dehydrogenasen, die Teil der Atmungskette in aktiven Mitochondrien sind, katalysiert. In wässriger Umgebung sind die Formazankristalle nicht löslich und fallen aus. Entstandene Kristalle können mit Isopropanol gelöst und eine photometrische Quantifizierung am ELISA-Lesegerät durchgeführt werden. Eine Zu- oder Abnahme proliferierender Zellen resultiert so in einer Zu- oder Abnahme der Absorption. Bereits 1992 wurde von Hayakawa gezeigt, dass die C-terminale Domäne von TIMP-1 wachstumsfaktorähnliche Aktivität hat, die abhängig vom Zelltyp stimulierend oder inhibitorisch sein kann (Hayakawa et al. 1992). Unsere Gruppe konnte zeigen, dass GPI-verankertes TIMP-1 abhängig vom untersuchten Zelltyp einen stimulierenden (Keratinocyten) oder inhibitorischen (verschiedene Tumorzellarten, Myofibroblasten) Einfluss auf die Proliferationsaktivität haben kann (Djafarzadeh et al. 2004; Djafarzadeh et al. 2006; Djafarzadeh et al. 2009 und unveröffentlichte Daten). Um zu untersuchen, welcher Teil des GPI-verankerten Proteins dabei eine Rolle spielt, wurden Nierenkarzinomzellen eine Stunde mit den Proteinen und Kontrollen behandelt und anschließend für 24, 48 und 72 Stunden weiter kultiviert. Die gemessenen Absorptionswerte wurden jeweils prozentual zum Wert der unbehandelten Zellen ("Medium") zum Zeitpunkt 24 h berechnet. Der Versuch wurde sowohl mit der Linie RCC-53 als auch mit der Linie A-498 je dreimal durchgeführt. Tabelle 1 zeigt die berechneten Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander

durchgeführten Experimenten mit der Zelllinie RCC-53. Abbildung 25 stellt die Mittelwerte der Replikate sowie die Standardfehler der Mittelwerte graphisch dar.

Alle Ansätze wurden vor Beginn der MTT-Färbung unter dem Mikroskop betrachtet. Hierbei waren keine Unterschiede in der Zahl der toten, abgelösten Zellen zu sehen. Da MTT proliferierende Zellen färbt, ist davon auszugehen, dass es sich bei der Abnahme der gemessenen Absorption um die Abnahme proliferierender Zellen handelt.

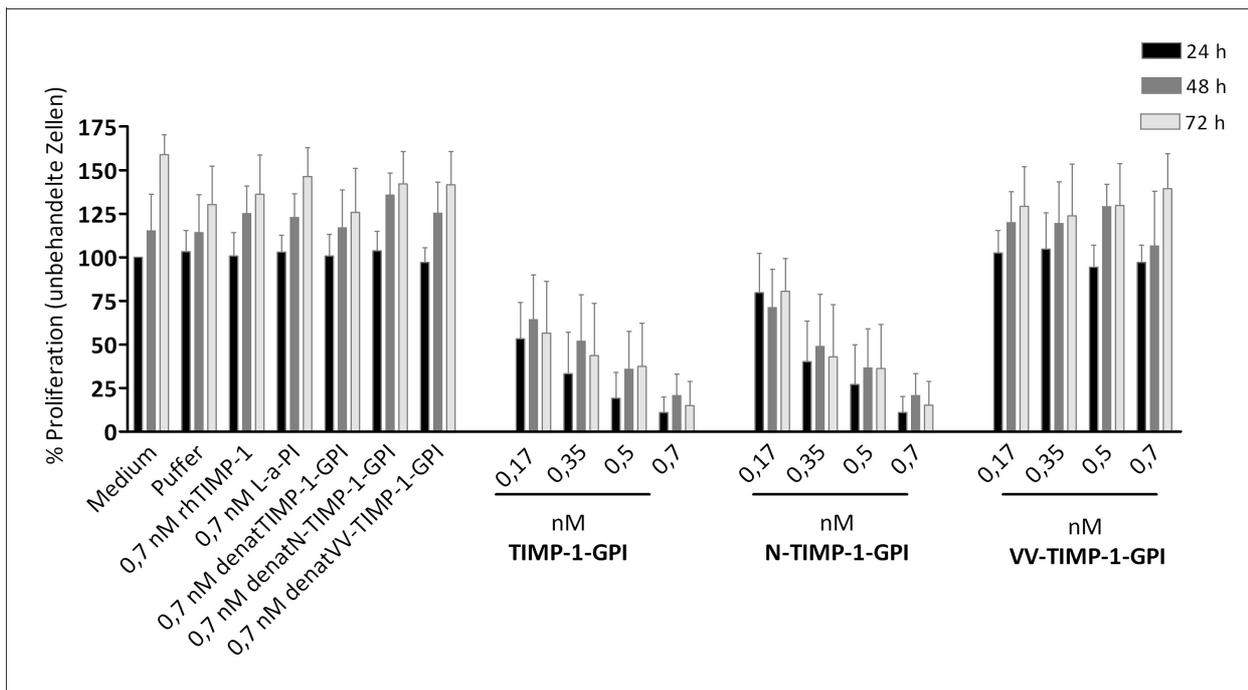


Abbildung 25: Die Hemmung der Proliferation von Nierenkarzinomzellen wird durch eine intakte N-terminale Domäne des GPI-verankerten TIMP-1 vermittelt.

RCC-53 Zellen in Mikrotiterplatten wurden mit den GPI-verankerten TIMP-1-Varianten in aufsteigenden Konzentrationen bis zu 0,7 nM oder Kontrollen mit 0,7 nM behandelt und anschließend für weitere 24, 48 oder 72 h kultiviert. Als Kontrollen dienten rhTIMP-1, L-α-PI, Puffer sowie denaturierte TIMP-1-GPI-Derivate. Zum Zeitpunkt der Messung wurde der Überstand durch MTT-Färbelösung ersetzt und nach einer dreistündigen Inkubationszeit im Brutschrank die entstandenen Formazankristalle in Isopropanol gelöst. Die Absorption der Lösungen wurde im Plattenlesegerät gemessen und graphisch dargestellt. Die Balken stellen die Mittelwerte aus drei Experimenten dar, die Fehlerbalken die Standardfehler der Mittelwerte. Der Versuch wurde mit den beiden Nierenkarzinomzelllinien je dreimal durchgeführt, die Ergebnisse zeigten dabei stets den gleichen Trend. *Abkürzungen: denat: denaturiert.*

Zellen, die mit 0,7 nM rhTIMP-1 oder dem Puffer als Kontrolle behandelt wurden, wiesen keine deutliche Veränderung der Proliferationsaktivität im Vergleich zu den unbehandelten Zellen auf. Zusätzlich wurde durch Inkubation der Zellen mit 0,7 nM L-α-Phosphatidylinositol (L-α-PI) eine Kontrolle für den GPI-Anker der Proteine durchgeführt. Auch diese Behandlung der Zellen führte nicht zu einer deutlichen Änderung der Proliferationsaktivität der Tumorzellen. Insgesamt wiesen die Messwerte der Kontrollen zum Zeitpunkt 24 h keine Unterschiede, zum Zeitpunkt

48 h Werte zwischen 114 und 125% und nach 72 h Werte zwischen 130 und 146%, verglichen zu den unbehandelten Zellen zum Zeitpunkt 24 h auf. Die unbehandelten Zellen selbst proliferierten ebenfalls, nach 48 h wurden 115%, nach 72 h 159% aktive Zellen gemessen.

<i>Bedingung</i>	<i>Konzentration</i>	<i>% Proliferation 24 h</i>	<i>% Proliferation 48 h</i>	<i>% Proliferation 72 h</i>
Medium		100,0	115,1	158,9
Puffer		103,2	114,2	130,4
rhTIMP-1	0,7 nM	100,7	125,1	136,1
L-α-PI	0,7 nM	103,1	123,0	146,4
denatTIMP-1-GPI	0,7 nM	100,8	117,0	125,9
denatN-TIMP-1-GPI	0,7 nM	103,8	135,7	142,2
denatVV-TIMP-1-GPI	0,7 nM	97,0	125,4	141,7
TIMP-1-GPI	0,17 nM	53,2	64,1	56,7
	0,35 nM	33,2	51,9	43,7
	0,5 nM	19,2	35,7	37,5
	0,7 nM	10,9	20,6	15,06
N-TIMP-1-GPI	0,17 nM	79,7	71,2	80,6
	0,35 nM	40,0	48,9	42,8
	0,5 nM	27,1	36,5	36,2
	0,7 nM	11,0	20,7	15,1
VV-TIMP-1-GPI	0,17 nM	102,6	120,0	129,4
	0,35 nM	104,7	119,5	123,8
	0,5 nM	94,4	129,2	129,8
	0,7 nM	97,0	106,5	139,4

Tabelle 1: Absorptionswerte der MTT-Färbung. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, prozentual zu dem gemessenen Wert der unbehandelten Zellen nach 24 h. Die Versuche wurden wie im Text von Abb.25 beschrieben durchgeführt.

Während nach der Inkubation mit dem vollständigen und dem N-terminalen Teil von TIMP-1 eine deutliche Abnahme proliferierender Zellen in Dosis- und zeitlicher Abhängigkeit zu beobachten war, hatte die VV-Mutante keine inhibitorische Aktivität auf die Zellproliferation. Das Wachstum der mit VV-TIMP-1-GPI behandelten Zellen war vergleichbar zu dem der mit Kontrollen behandelten Zellen und lag nach 48 h bei Werten zwischen 107 und 129% und nach 72 h zwischen 124 und 140%, verglichen zu den unbehandelten Zellen nach 24 h. Je höher die Konzentration von TIMP-1-GPI und N-TIMP-1-GPI bei der Reinkorporierung in die Membran der Nierenkarzinomzellen, desto stärker war der gemessene inhibitorische Einfluss auf die Proliferationsaktivität der Zellen. Nach Behandlung mit der höchsten Konzentration, 0,7 nM, wurde das

Zellwachstum im Durchschnitt auf bis zu 11% der unbehandelten Zellen verringert, auch die niedrigste Konzentration von 0,17 nM hatte eine Verringerung auf 53% (TIMP-1-GPI) und 80% (N-TIMP-1-GPI) zur Folge. Dieser Einfluss hielt über den Zeitraum der Messung an und führte dazu, dass die gemessenen Absorptionswerte bei den behandelten Zellen nicht mehr deutlich anstiegen. Nach 72 h wurden nach Behandlung mit 0,7 nM TIMP-1- oder N-TIMP-1-GPI jeweils Werte von 15% proliferierenden Zellen, verglichen zu den unbehandelten Zellen zum Zeitpunkt 24 h, gemessen.

Alle drei denaturierten Proteine (denatTIMP-1-, denatN-TIMP-1- und denatVV-TIMP-1-GPI) hatten keinen Effekt auf das Tumorzellwachstum. 72 h nach der Behandlung mit je 0,7 nM der Proteine stiegen die gemessenen Absorptionswerte auf bis zu 142%. Dies gab einen Hinweis darauf, dass die Aktivität der intakten TIMP-1-Proteine einen spezifischen Einfluss auf die Zellen hatte. Außerdem gab der fehlende Einfluss der VV-Mutante des Proteins einen Hinweis darauf, dass die Aktivität der NTD von TIMP-1 den inhibitorischen Effekt auf die Zellen vermittelte. Wurde diese Domäne durch Einführung der beiden Valinreste verändert, blieb der inhibitorische Einfluss aus.

Die Beobachtung in den vorherigen Versuchen, dass die VV-Variante des GPI-verankerten TIMP-1 keine oder nur noch wenig MMP-Inhibition aufweist, deutet auf eine Beteiligung der Proteasen an der Proliferation der Zellen hin. In diesem Versuch wurde somit gezeigt, dass auch die N-terminale Domäne von TIMP-1 und die damit verbundene Bindung und gleichzeitige Inhibition der MMP eine Rolle bei der Proliferation von Nierenkarzinomzellen spielt. Eine intakte C-terminale Domäne kann diesen Effekt nicht vermitteln, die NTD ist notwendig und ausreichend für diesen hemmenden Einfluss.

5.12 Die CTD der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten vermittelt eine Hemmung der gerichteten Chemotaxis von Fibrosarkomzellen

Der Begriff Chemotaxis bezeichnet das Phänomen einer gerichteten Bewegung von Zellen auf einen bestimmten Stimulus hin. Der zugrunde liegende Mechanismus spielt eine wichtige Rolle bei der Metastasierung und kann in Tumorzellen verändert sein. Vor allem Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte sind *in vivo* an der Regulation des Migrationsprozesses in Richtung organspezifischer Lockstoffe, der Chemokine, beteiligt. Die zelluläre Migration ist ein komplexer Prozess, der verschiedenste Komponenten mit einbezieht, die über diverse Signalwege verknüpft sind. Die Migration von Tumorzellen kann als Prozess betrachtet werden, der sowohl von matrixab-

bauenden Proteasen, als auch von Integrinen und anderen Zelladhäsionsmolekülen gesteuert wird (Chapman 1997). Dabei sind die Vorgänge eng miteinander verknüpft. Die Migration von Tumorzellen beinhaltet koordinierte Adhäsion sowie proteolytische Interaktion mit den Substraten der EZM, was zum Abbau interstitieller Gewebebarrieren führt (Stetler-Stevenson et al. 1993). Während einer voranschreitenden Krebserkrankung sind verschiedene matrixabbauende Enzyme, wie zum Beispiel MMP, hochreguliert (Chapman 1997, Birkedal-Hansen et al. 1995).

Auf der einen Seite ist die Migration abhängig von einer Substratproteolyse und somit von der Aktivität der MMP. Obwohl die Proteasen vor allem bei der Wanderung durch dreidimensionale Matrices benötigt werden, wurde auch die zweidimensionale Fortbewegung von Zellen auf Substratbeschichtungen als ein proteolyseabhängiger Prozess identifiziert. *In vivo* sind Zellen bei dem Wanderungsprozess mit verschiedenen Substraten konfrontiert. Zweidimensionale Barrieren im Körper stellen dabei vor allem Basalmembranen dar, die dünne Schichten aus Laminin, Kollagen und anderen Strukturproteinen sind, sowie Blut- und Lymphgefäße (Wolf et al. 2009). Diese Bewegungsart erfordert vor allem eine Proteolyse des Substrats direkt unter dem Zellkörper, die durch die Ausbildung von Lamellipodien und Podosomen vermittelt wird. Während Lamellipodien ausgebildet werden, akkumulieren EZM-bindende Rezeptoren, wie z.B. β 1- oder β 3-Integrine, an der Kontaktstelle. Zusätzlich werden Proteasen wie MT1-MMP oder MMP-2 zu dieser Stelle rekrutiert und vermitteln dort die Proteolyse des Substrats (Wolf et al. 2009). In einem zweidimensionalen Modell wurde gezeigt, dass MMP-2 ein Schlüsselregulator der Migration von Astrozyten ist. Zusätzlich wurde gezeigt, dass MMP-2 mit β 1-Integrin am leitenden Ende der Zelle assoziiert und so Einfluss auf das Aktin-Zytoskelett der Zellen nimmt (Ogier et al. 2006). Außerdem erhöht MMP-1 z.B. die Motilität von Karzinomzellen und ermöglicht so eine Migration (Lee et al. 2008). TIMP-1 hemmt die Migration von Endothelzellen durch einen Mechanismus, der die direkte Inhibition der Proteaseaktivität beinhaltet und durch synthetische Inhibitoren nachgestellt werden kann (Ikenaka et al. 2003, Guedez et al. 2001).

Andererseits wurde jedoch gezeigt, dass die Blockade von MMP oder Serinproteasen die Migration nicht vollständig verhindern kann (Hiraoka et al. 1998; Wolf et al. 2003). *In vivo* wurde in verschiedenen Tiermodellen und klinischen Studien ein sehr geringer Vorteil durch die Behandlung mit MMP-Inhibitoren erreicht (Zucker et al. 2000; Coussens et al. 2002; Wolf et al. 2003). Die Studien ließen die Vermutung zu, dass andere Proteasen die Funktion der MMP übernehmen oder dass die Zellen einen anderen, proteolyseunabhängigen Mechanismus besitzen, der

ihnen eine Migration erlaubt (Wolf et al. 2003). Vor allem Integrine und die Zell-Matrix-Adhäsion spielen dabei eine entscheidende Rolle (Brooks et al. 1996; Palecek et al. 1997).

Die Mitglieder der TIMP-Familie haben dabei unterschiedliche Funktionen in der Regulation des Migrationsprozesses. CD63 wurde als Oberflächenrezeptor für TIMP-1 identifiziert, der Proteaseinhibitor verändert dabei durch die Bindung seiner C-terminalen Domäne die Wechselwirkung von CD63 mit Integrinen, was einen Einfluss auf das Zytoskelett der Zellen und somit auf die Motilität hat (Jung et al. 2006).

Verschiedene Mechanismen, die einerseits abhängig, andererseits unabhängig von der Proteolyse sind, nehmen demnach Einfluss auf die Migration von Zellen. Da der Vorgang der Migration ein kritischer Schritt in einer voranschreitenden Krebserkrankung ist, stellt die Inhibition der Migration ein interessantes therapeutisches Ziel dar (Bjorklund und Koivunen 2005).

Nach der Einführung der beiden Valinreste am N-Terminus zeigte VV-TIMP-1-GPI keine inhibitorische Aktivität gegen MMP-2 und -9, die eine wichtige Rolle bei der Migration von verschiedenen Zelltypen spielen (Bjorklund und Koivunen 2005; Masson et al. 2005; Wang et al. 2006; Luo et al. 2009). Um den Einfluss der verschiedenen GPI-verankerten TIMP-1-Varianten auf den Migrationsprozess, und somit auch die Abhängigkeit des Migrationsprozesses von einer proteolytischen MMP-Aktivität zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit Migrationsversuche durchgeführt. Da die NTD in N-TIMP-1-GPI die hauptsächliche inhibitorische Aktivität gegen die Proteasen besitzt und VV-TIMP-1-GPI in dieser Funktion deutlich gestört ist, sollte der Einfluss der beiden Domänen des GPI-verankerten TIMP-1 auf die Migration untersucht werden. In diesem Versuch wurde mit der Fibrosarkomzelllinie HT1080 gearbeitet, die ein etabliertes Modell für Migrations- und Invasionsversuche darstellt (Horino et al. 2001). Diese Zelllinie kann durch die Zugabe von FBS zu einer gerichteten Bewegung in Richtung des Serumgradienten stimuliert werden. Darüber hinaus weisen diese Zellen eine hohe MMP-Expression auf.

Die Fibrosarkomzellen wurden in kollagenbeschichteten Migrationskammern der Firma *Ibidi* kultiviert und für eine Stunde mit Lösungen, die je 1,4 nM der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten, sowie Puffer oder Phosphatidylinositol (L- α -PI) zur Kontrolle enthielten, behandelt. Anschließend wurden die Zellen über 24 h fotografiert. Die Wanderung der Tumorzellen wurde dabei als Reaktion auf 10% FBS als Chemoattraktant in einem der beiden Reservoirs untersucht. Anschließend wurden die Wege einzelner, zufällig ausgewählter Zellen in den Kanälen von Bild zu Bild analysiert. Abbildung 26 zeigt ein exemplarisches Beispiel eines Versuchs. Zusätzlich zur graphi-

schen Darstellung der analysierten Pfade berechnete die Software einige, für die zelluläre Migration relevante Parameter, die in Tabelle 2 aufgelistet sind.

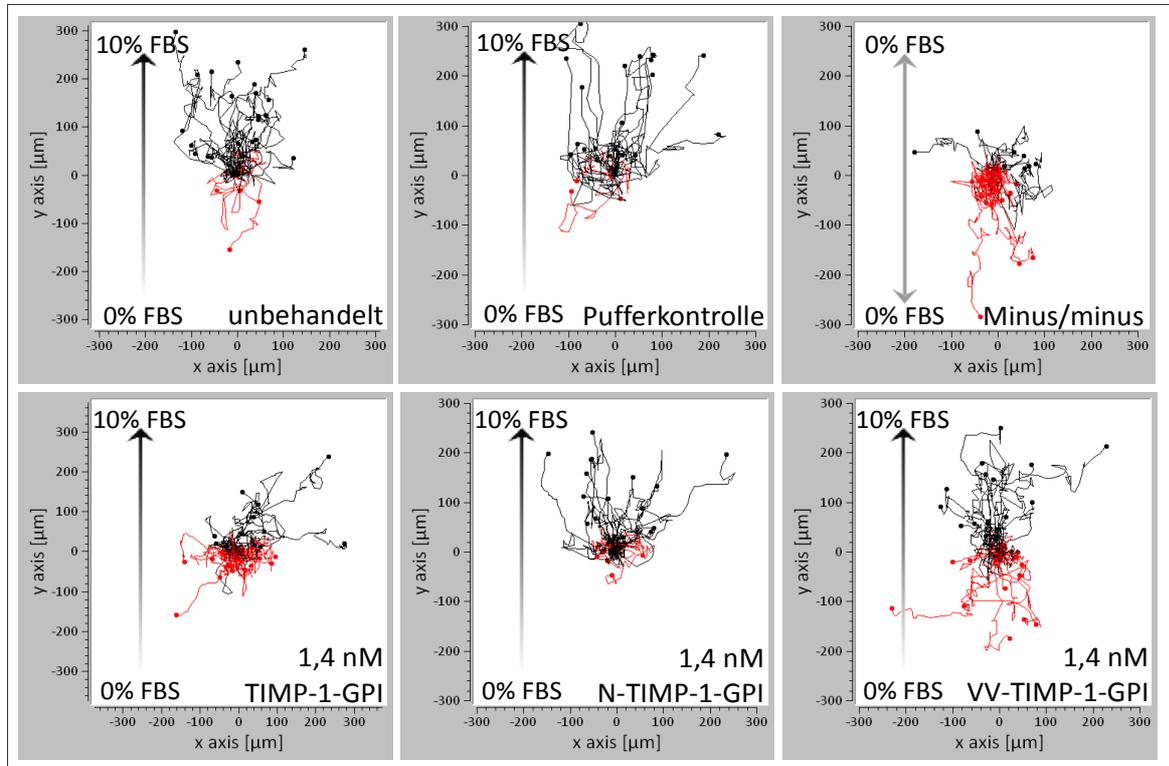


Abbildung 26: TIMP-1-GPI und VV-TIMP-1-GPI hemmen die Migration von Fibrosarkomzellen.

Tumorzellen der Linie HT1080 wurden in kollagenbeschichteten Chemotaxis-Kammern für eine Stunde mit je 1,4 nM TIMP-1-GPI, N-TIMP-1-GPI oder VV-TIMP-1-GPI, sowie Puffer inkubiert. Anschließend wurden die Reservoirs der Kammern mit RPMI mit oder ohne 10% FBS befüllt und die Kammern über 24 h in regelmäßigen Abständen fotografiert. Als zusätzliche Kontrolle wurden unbehandelte Zellen ohne Zugabe von FBS in eines der Reservoirs verwendet (minus/minus, in der Abbildung rechts oben). Die Pfeile an den linken Bildrändern stellen den Serumgradienten des jeweiligen Ansatzes dar. Die von den Zellen zurückgelegten Pfade wurden mit Hilfe einer Software verfolgt und gemessen und die erhaltenen Daten mit einer speziell für diesen Versuch entwickelten Software der Herstellerfirma Ibidi ausgewertet. Alle Pfade wurden in der x-y-Ebene auf den Nullpunkt normalisiert. Eine Nettobewegung der Zellen in Richtung des Chemoattraktants wurde schwarz, in die Gegenrichtung rot markiert.

Die von der Software analysierten Daten wurden graphisch dargestellt, wobei eine Netto-Bewegung in Richtung des Chemoattraktants als schwarzer Pfad, und eine Netto-Bewegung in die entgegengesetzte Richtung als roter Pfad dargestellt wurde. Die Wege der Zellen wurden für eine einfachere Darstellung alle auf den gemeinsamen Startpunkt 0/0 in der x-y-Achse normalisiert, der sich in der Mitte der Grafik als Nullpunkt befindet.

Als zusätzliche Kontrollen wurden unbehandelte Zellen entweder ohne die Zugabe von FBS (minus/minus) oder mit Zugabe von FBS in beide Reservoirs (plus/plus) eingesetzt. Auch die Daten der plus/plus-Kontrolle sind im Anhang beigefügt, da sie denen der minus/minus-Kontrolle entsprachen. Zur Vereinfachung des Versuchs werden im folgenden Abschnitt die Daten der mit

1,4 nM L- α -PI behandelten Zellen und der plus/plus-Kontrolle, bei der in beide Reservoirs FBS zugegeben wurde, nur im Anhang dargestellt, da sie vergleichbar mit denen der Pufferkontrolle und den unbehandelten Zellen waren.

Eine statistische Analyse der Daten (genaue Beschreibung siehe Kapitel 4.2.6.6) erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test.

Bei unbehandelten Zellen, die 10% FBS als Chemoattraktant im oberen Reservoir erhielten, ist eine eindeutige Aufwärtsbewegung der Zellen zu sehen. Die Zellen, die mit dem Kontrollpuffer behandelt wurden, zeigten keinen Unterschied im Migrationsverhalten verglichen mit den unbehandelten Zellen (Abb. 26 links oben). Sowohl die Zellen der minus/minus-Kontrolle (Abb. 26, rechts oben) als auch die der plus/plus-Kontrolle (Daten im Anhang) zeigten keine deutliche Aufwärtsbewegung, was für eine spezifische Chemotaxis der Zellen in Richtung des FBS in den Ansätzen von Pufferkontrolle und unbehandelten Zellen sprach.

Nach der Inkubation der Zellen mit 1,4 nM TIMP-1-GPI (Abb. 26, unten links) und VV-TIMP-1-GPI (Abb. 26, unten rechts) war die Migration der Zellen in Richtung des Serumgradienten gestört. Die Grafik zeigt, dass ebenso viele Zellen in Richtung des Serumgradienten wie in die entgegengesetzte Richtung wanderten. Insgesamt erschien die Bewegung ungerichtet in alle Richtungen. Die Bewegung der Zellen war also nicht insgesamt eingeschränkt, nur eine gerichtete Bewegung auf den Serumgradienten zu war nicht mehr zu erkennen. Die Reinkorporierung von N-TIMP-1-GPI (Abb. 26, unten Mitte) zeigte im Gegensatz zu den beiden anderen TIMP-1-Varianten keinen deutlichen Einfluss auf die Bewegung der Zellen. Die Netto-Bewegung verlief auch trotz der Behandlung mit dem Protein gerichtet in Richtung des Gradienten.

Diese Ergebnisse lieferten einen ersten Hinweis darauf, dass die N-terminale Domäne des GPI-verankerten TIMP-1 keinen Einfluss auf die gerichtete Chemotaxis der Fibrosarkomzellen zu haben scheint. Um die beobachteten Ergebnisse genauer zu analysieren, wurden weitere Parameter mit der frei erhältlichen Software „*Chemotaxis and Migration Tool*“ der Firma Ibidi errechnet, die in der unten stehenden Tabelle 2 zusammengefasst sind. Zur besseren Veranschaulichung werden die Parameter im Anschluss an die Tabelle einzeln diskutiert.

	Pufferkontrolle	Minus/minus-Kontrolle	TIMP-1-GPI	N-TIMP-1-GPI	VV-TIMP-1-GPI
Index Auf-/Abwärtsbewegung	7,22	0,87	2,00	4,12	2,59
Vorwärts-Migrationsindex FMI(Y)	0,23	-0,03	0,04	0,16	0,07
Rayleigh-Test, p-Wert	3,5e-005	3,2e-001	5,9e001	6,6e-003	3,4e-001
Akkumulierte Distanz (µm)	355	340	435	344	403
Euklidische Distanz (µm)	115	80	83	91	108
Geschwindigkeit (µm/min)	0,22	0,24	0,31	0,26	0,31

Tabelle 2: Zusammenfassung der mit der Ibidi-Software berechneten Parameter zu den Migrationsversuchen. Mithilfe der frei erhältlichen Software „Migration and Chemotaxis Tool“ wurden diverse Parameter der durchgeführten Migrationsversuche berechnet. Die hier angegebenen Werte stellen jeweils die Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten dar und werden im folgenden Abschnitt der Arbeit genauer beschrieben.

Die errechneten Parameter werden im folgenden Abschnitt einzeln diskutiert. Alle Parameter entsprechen den Mittelwerten aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mittels des Kruskal-Wallis-Test (siehe Kapitel 4.2.6.6).

Index aus positiven und negativen Pfaden:

Es wurde berechnet, bei wie vielen der ausgewerteten Zellen insgesamt eine Auf- oder Abwärtsbewegung gemessen wurde, wobei sich das FBS im oberen Reservoir befand. Die Zellen der Pufferkontrolle zeigten siebenmal häufiger eine Aufwärtsbewegung (Index 7,22), während bei den Zellen der minus/minus-Kontrolle insgesamt mehr Abwärtsbewegungen messbar waren (Index kleiner als 1, bei 0,87). Der Index war bei allen, mit Protein behandelten Zellen kleiner als bei der Pufferkontrolle, jedoch nach der Reinkorporierung von N-TIMP-1-GPI (Index 4,12) fast doppelt so hoch wie nach der Reinkorporierung der beiden anderen TIMP-1-Varianten (TIMP-1-GPI: 2, VV-TIMP-1-GPI: 2,59). Es wanderten insgesamt mehr Zellen in Richtung des Serumgradienten, wenn die Zellen mit N-TIMP-1-GPI behandelt wurden, was wiederum für eine Chemotaxis der Zellen sprach.

Vorwärts-Migrationsindex (Forward migration index) FMI(Y):

Ein weiterer Parameter, der von der Software berechnet wurde, ist der FMI(Y)-Wert. Der Vorwärts-Migrationsindex (FMI) beschreibt das Verhältnis aus der Nettodistanz, die auf der Achse zurückgelegt wurde, und der akkumulierten Distanz, also dem tatsächlichen Weg, den die Zelle

unter Berücksichtigungen der Abweichungen in alle Richtungen zurückgelegt hat (genaue Beschreibung siehe Anhang). Ein positiver FMI(Y) bedeutet eine Bewegung nach oben (Y), ein negativer, dass die Zelle nach unten gewandert ist. Die folgende Abb. 27 A zeigt die Mittelwerte der berechneten FMI(Y)-Werte der drei durchgeführten Versuche:

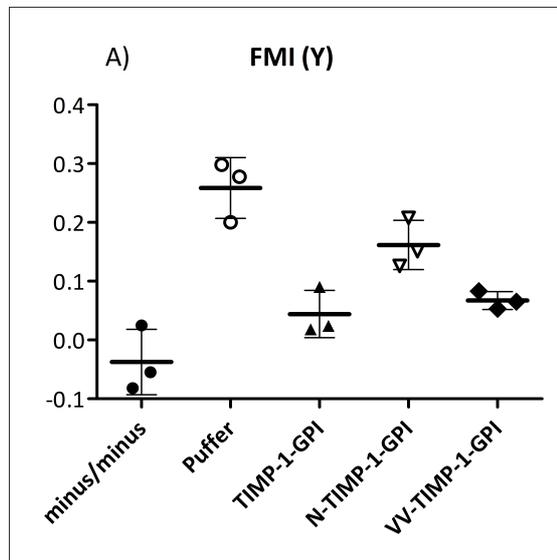


Abbildung 27 A: Darstellung des FMI(Y)-Werts des Migrationsversuchs.

Mit der Software von Ibidi wurde der Vorwärtsmigrationsindex (FMI) in Y-Richtung berechnet und graphisch dargestellt. Der Index gibt die tatsächliche Vorwärtsbewegung der Zellen in Richtung der Y-Achse in Relation zur Gesamtstrecke wieder. Dargestellt sind jeweils die Werte aus drei Versuchen mit Mittelwert +/- Standardabweichung. Eine statistische Analyse ergab mit Ausnahme des signifikanten Unterschieds zwischen den Mittelwerten von Pufferkontrolle und minus/minus-Kontrolle keine signifikant unterschiedlichen Werte (Kruskal-Wallis-Test, siehe Kap. 4.2.6.6).

Mit Puffer behandelte Zellen ($FMI(Y) = 0,233$) zeigten einen positiven $FMI(Y)$, also eine Nettobewegung in Richtung des Chemoattraktants. Die minus/minus-Kontrolle wies mit $FMI(Y) = -0,028$, verglichen mit der Pufferkontrolle, einen ungefähr zehnmal niedrigeren $FMI(Y)$ -Wert auf, es war demnach kaum mehr eine Netto-Bewegung in Richtung des Serums messbar. Der Unterschied dieser Mittelwerte war signifikant ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis-Test). Auch die Protein-behandelten Zellen wiesen deutlich niedrigere $FMI(Y)$ -Werte auf als die Puffer-behandelten Zellen. Allerdings lagen die Werte für TIMP-1-GPI ($FMI(Y) = 0,044$) und VV-TIMP-1-GPI ($FMI(Y) = 0,067$) deutlich unter dem Wert für N-TIMP-1-GPI ($FMI(Y) = 0,161$). Der $FMI(Y)$ der mit N-TIMP-1-GPI behandelten Zellen war demnach drei- bis viermal höher als der Wert für die beiden anderen Proteine. Zellen, die mit der GPI-verankerten NTD von TIMP-1 behandelt wurden, zeigten demnach trotz der Reinkorporierung des Proteins eine deutlich positive Bewegung in Richtung des Chemoattraktants, während dies bei den TIMP-1- bzw. VV-TIMP-1-GPI behandelten Zellen gestört wurde. Die Unterschiede dieser Werte zueinander waren allerdings nicht signifikant.

Akkumulierte und euklidische Distanz:

Zusätzlich wurden sowohl die akkumulierte als auch die euklidische Distanz berechnet, die die Zellen zurückgelegt hatten. Die Ergebnisse sind in Abb. 27 B und 27 C dargestellt.

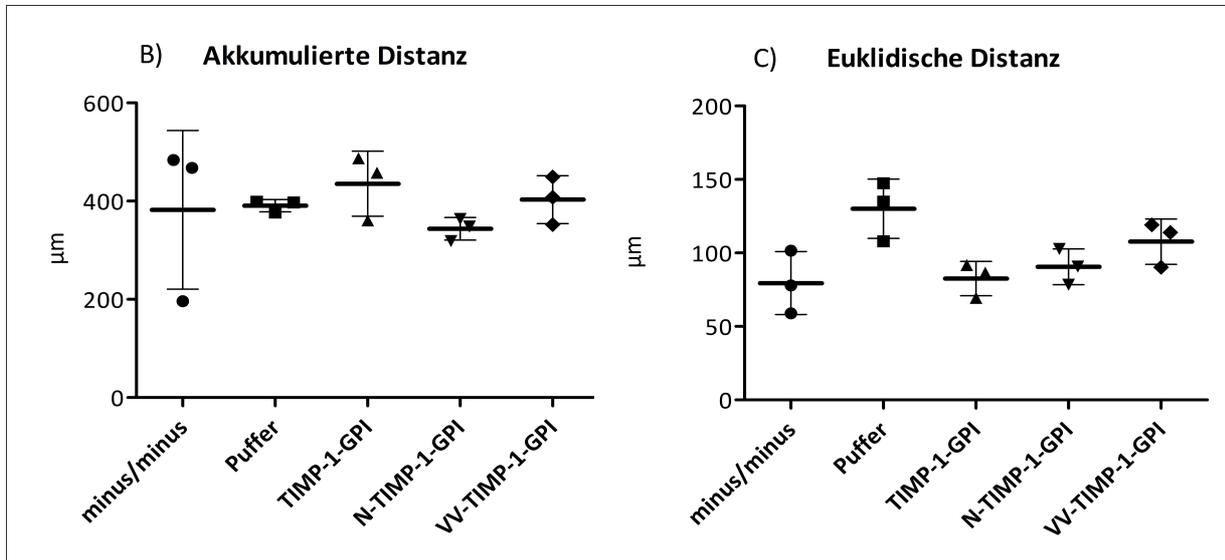


Abbildung 27 B und 27 C: Vergleich der zurückgelegten Distanzen im Migrationsversuch.

Die akkumulierte Distanz berechnet die Summe der Strecken, die die Zellen in alle Richtungen zurückgelegt haben, wohingegen die euklidische Distanz lediglich die tatsächliche Verschiebung in y-Richtung wiedergibt. Beide Werte wurden in der Einheit µm berechnet. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus drei Versuchen mit Mittelwert +/- Standardabweichung (Beschreibung der berechneten Parameter siehe Anhang). Eine statistische Analyse zeigte, dass diese Werte nicht signifikant unterschiedlich waren (Kruskal-Wallis-Test, siehe Kap. 4.2.6.6).

Die akkumulierte Distanz gibt die Länge des tatsächlich zurückgelegten Pfades in der Einheit µm wieder und berücksichtigt dabei auch alle Richtungswechsel der Zellen. Die euklidische Distanz berechnet sich im Gegensatz dazu lediglich aus den Endpunkten der y-Achse, gibt also die Netto-Strecke zwischen Start- und Zielpunkt der Zelle wieder.

Die Berechnung der akkumulierten Distanz (siehe Abb. 27 B), die die Zellen in den Chemotaxis-Kammern zurücklegten, ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den unbehandelten (Daten nicht gezeigt), Puffer-behandelten (355 µm +/- 146) oder mit GPI-verankerten TIMP-1-Varianten behandelten Zellen. Die Mittelwerte der Zellen, die mit dem vollständigen TIMP-1-GPI (435 µm +/- 166), sowie der VV-Mutante (404 µm +/- 184) behandelt wurden, waren im Vergleich zu den Kontrollen erhöht. Die Standardabweichungen dieser Mittelwerte waren allerdings sehr hoch, da der Mittelwert alle Daten der Messungen einbezog und die Wege einzelner Zellen sehr unterschiedlich waren, so dass keine deutliche Veränderung der akkumulierten Distanz berechnet werden konnte. Die euklidische Distanz (siehe Abb. 27 C) erschien bei den Zellen, die die TIMP-1-GPI-Varianten in ihre Zellmembran inkorporiert hatten, kleiner (83 µm +/- 59

für TIMP-1-, $91 \mu\text{m} \pm 68$ für N-TIMP-1-, $108 \mu\text{m} \pm 70$ für VV-TIMP-1-GPI) als die der Zellen, die mit Puffer behandelt wurden ($115 \mu\text{m} \pm 62$). Die minus/minus-Kontrolle wies eine deutlich verringerte euklidische Distanz auf ($80 \mu\text{m} \pm 59$), die Werte waren vergleichbar mit denen der Zellen, die mit den TIMP-1-Varianten inkubiert worden waren. Die Standardabweichungen dieser Mittelwerte waren sehr hoch, da der Mittelwert alle Daten der Messungen einbezog und die Migrationswege einzelner Zellen sehr unterschiedlich waren. Insgesamt erschienen die akkumulierten Wege der Zellen, die mit TIMP-1- oder VV-TIMP-1-GPI behandelt wurden, unverändert, während die euklidischen Entfernungen in allen mit Protein behandelten Proben verringert waren. Die Unterschiede dieser Werte zueinander waren allerdings nicht signifikant.

Rayleigh-Test:

Zusätzlich wurde mit den Daten ein Rayleigh-Test durchgeführt. Dieser Test beschreibt die Verteilung der Endpunkte der gewanderten Zellen in der Kammer und wurde ursprünglich für die zirkuläre Verteilung von Datenpunkten entwickelt. Der ausgegebene p-Wert beschreibt die Signifikanz, mit der die Zellen nach der Migration eher homogen oder inhomogen in der Kammer verteilt sind. Nach einer gerichteten Chemotaxis sind die Endpunkte eher inhomogen verteilt, also auf der Seite der Kammer, zu der das Chemoattraktants zugegeben wurde (genaue Erklärung siehe Anhang). Abb. 27 D zeigt die berechneten p-Werte.

Ist der errechnete p-Wert größer als 0,05 bedeutet dies eine homogene Verteilung der Endpunkte der Zellen, und somit eine ungerichtete, eher zufällige Wanderung in der Kammer. Dies war bei der minus/minus-Kontrolle ($p=3,19e-001$), sowie bei den Zellen, die mit TIMP-1-GPI ($p=5,92e-001$) oder VV-TIMP-1-GPI ($p=3,35e-001$) inkubiert worden waren, der Fall. Die Endpunkte der Pfade waren demnach über die ganze Fläche verteilt, die Zellen wanderten somit in alle Richtungen und es fand keine gerichtete Bewegung statt.

Liegt der p-Wert unter 0,05, spricht dies für eine inhomogene Verteilung der Endpunkte, was im Fall der mit Puffer behandelten Zellen ($p=3,52e-005$) zu sehen war. Auch nach der Reinkorporierung von N-TIMP-1-GPI in die Membran der Fibrosarkomzellen wurde das Mittel des p-Werts des Rayleigh-Tests mit deutlich niedrigeren Werten als nach der Reinkorporierung der beiden anderen Proteine berechnet ($p=6,6e-003$). Die Werte lagen unterhalb der Grenze von 0,05; es konnte von einer inhomogenen Verteilung der Zellen nach der Migration und somit einer gerichteten Wanderung ausgegangen werden.

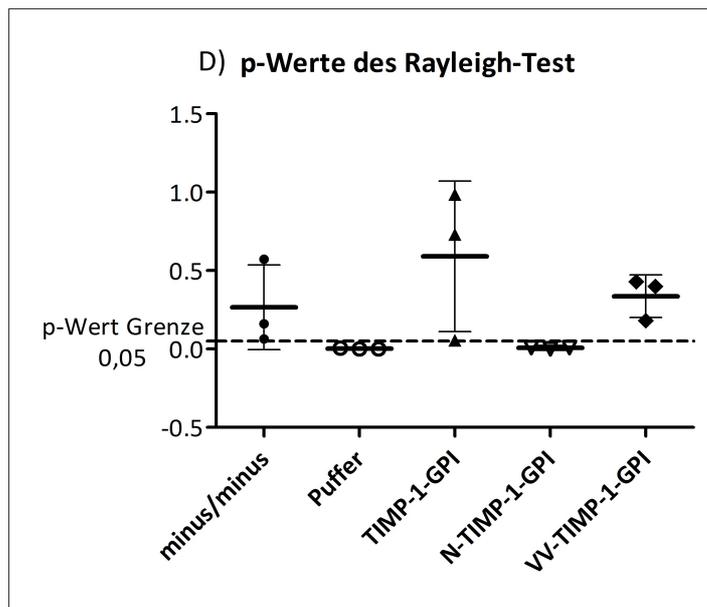


Abbildung 27 D: Darstellung der p-Werte des Rayleigh-Tests.

Mit den berechneten Werten der Zellmigration wurde ein Rayleigh-Test durchgeführt. P-Werte > 0,05 sprechen für eine homogenen Verteilung der Endpunkte der Zellen, p-Werte < 0,05 für eine inhomogene Verteilung der Endpunkte (im Falle einer gerichteten Migration in eine Richtung). Dargestellt sind jeweils die Werte der drei Versuche mit Mittelwert +/- Standardabweichung. Eine statistische Analyse zeigte, dass diese Werte nicht signifikant unterschiedlich waren (Kruskal-Wallis-Test, siehe Kap. 4.2.6.6).

Die Auswertung der p-Werte des Rayleigh-Tests zeigte, dass TIMP-1-GPI und VV-TIMP-1-GPI die gerichtete Bewegung der Fibrosarkomzellen in Richtung des Serumgradienten beeinflussen, während die GPI-verankerte N-Terminale Domäne dies nicht vermittelte. Die Unterschiede dieser Werte zueinander waren allerdings nicht signifikant.

Aus den gemessenen Parametern wurde mithilfe der Software auch die Geschwindigkeit der Zellen in $\mu\text{m}/\text{min}$ berechnet. Die Werte zeigten keinen Unterschied zwischen den verschiedenen Ansätzen (siehe Tabelle 2).

Zusammenfassend deuteten die Ergebnisse des Migrationsversuchs mit den Fibrosarkomzellen auf eine Beteiligung der C-terminale Domäne von TIMP-1-GPI am inhibitorischen Einfluss auf die gerichtete Chemotaxis der Zellen hin. Die Bewegung in Richtung des Chemoattraktants war nach der Reinkorporierung von VV-TIMP-1-GPI oder TIMP-1-GPI in die Membran der Tumorzellen deutlich verringert. Ein Einfluss der GPI-verankerten N-terminalen Domäne des Proteins alleine konnte nicht festgestellt werden.

Ein möglicher Mechanismus hierfür wird im folgenden Kapitel der Diskussion (Kap. 6) erörtert.

6 DISKUSSION

Proteaseaktivität ist für die dynamische Regulation der Zellfunktion und für die Modulation der zellulären Umgebung essentiell (Overall und Kleinfeld 2006). Die Regulation des Gleichgewichts der Aktivität von Matrix-Metalloproteasen (MMP) und deren Inhibitoren, den Proteinen der TIMP-Familie, spielt eine entscheidende Rolle in der Tumorgenese. MMP wurden zuerst als matrixabbauende zinkabhängige Endopeptidasen beschrieben, die es Krebszellen ermöglichen, Gewebegrenzen zu überschreiten (Hornebeck et al. 2005). Eine Überexpression dieser Proteasen ist oft sogar charakteristisch für maligne Tumore und von prognostischer Bedeutung (Murray et al. 1998). MMP fördern das Vorschreiten der Tumorerkrankung aber nicht nur durch den Abbau der extrazellulären Matrix (EZM), sondern auch durch das Auslösen diverser Signalwege (McCawley und Matrisian 2001; Parks et al. 2004). Sie wirken Apoptosemechanismen entgegen, fördern die Angiogenese, regulieren die angeborene Immunantwort und fördern die Metastasierung und das Tumorwachstum (Overall und Kleinfeld 2006). Aber auch wirtsspezifische Schutzmechanismen werden durch diese Proteasen vermittelt: So spalten und inaktivieren sie z.B. Chemokine und Wachstumsfaktoren (McQuibban et al. 2001).

Synthetische Breitspektrum-Inhibitoren gegen die Mitglieder der MMP-Familie, wie z.B. Marimastat, zeigten keine ausreichende Wirkung in klinischen Studien der Phase III und nur wenige Inhibitoren konnten letztendlich für den Markt zugelassen werden (Hu et al. 2007). Im Gegensatz zu Proteaseinhibitoren, die z.B. gegen mikrobiologische Proteasen entwickelt wurden, beeinflussen MMP-Inhibitoren immer auch physiologische Prozesse und haben daher starke Nebenwirkungen (Hu et al. 2007). Eine Lösung für dieses Problem könnte die Entwicklung modifizierter Inhibitoren mit einem eingeschränkten Substratspektrum bringen. In einigen Tumormodellen in ersten Tierversuchen zeigten die modifizierten Inhibitoren eine deutlich verbesserte Wirkung. So hat ein spezifischer MMP-9 Inhibitor die Anzahl von Lebermetastasen in einem Mausmodell um die Hälfte reduziert (Arlt et al. 2002). Vor allem die Applikation des Inhibitors stellt noch eine Herausforderung dar: eine Verabreichung erfolgt meist oral oder intravenös, so dass die Wirkung des Medikaments danach nicht lokal begrenzt bleibt, weil eine systemische Verteilung in den gesamten Kreislauf erfolgt.

Das proteolytische Gleichgewicht in der Mikroumgebung eines Tumors ist durch die Überexpression von MMP häufig in Richtung der Proteasen verschoben. Um diese Balance wieder her-

zustellen, wurde in unserem Labor ein GPI-verankertes TIMP-1 entwickelt. Hiermit ergab sich die Möglichkeit, die Aktivität des Proteaseinhibitors durch eine Reinkorporierung auf die Oberfläche von Tumorzellen zu fokussieren. Diese Methode stellt eine Alternative zu konventionellen Methoden wie z.B. dem Gentransfer dar und bietet zudem große Vorteile: Zum einen findet eine sofortige Veränderung der Zellmembran statt, zum anderen kann die applizierte Menge leichter kontrolliert werden. Zusätzlich stellt die Verankerung des Proteins eine Möglichkeit dar, die Aktivität des Inhibitors *in vivo* lokal zu begrenzen. Dieses GPI-verankerte TIMP-1 zeigte in Studien, die in unserem Labor und mit Kooperationspartnern durchgeführt wurden, eine starke antitumorale Aktivität. Im Mausmodell konnte bereits ein inhibitorischer Einfluss von TIMP-1-GPI auf das Wachstum eines Kolonkarzinoms nach der peritumoralen Injektion von TIMP-1-GPI nachgewiesen werden (Raggi et al. 2009). Auch in *in vitro* Versuchen wurde eine vielversprechende inhibitorische Aktivität gegen Tumorzellen nachgewiesen. Nierenkarzinomzellen wiesen nach der Reinkorporierung von TIMP-1-GPI eine erhöhte Sensitivität für FAS-vermittelte Apoptose auf (Djafarzadeh et al. 2006). Melanomzellen, die normalerweise besonders resistent gegen diesen Apoptosemechanismus sind, konnten nach der Behandlung in Kombination mit einem Hitzeschock sehr effektiv sensibilisiert werden (Djafarzadeh et al. 2009).

Die verschiedenen Domänen des GPI-verankerten Proteins haben dabei möglicherweise unterschiedliche, voneinander unabhängige Funktionen, die in dieser Arbeit analysiert wurden. Hierfür wurden zusätzlich zu TIMP-1-GPI, jeweils in GPI-verankerter Form, ein verkürztes TIMP-1 ohne die C-terminale Domäne sowie eine Mutante mit zwei zusätzlichen Valinresten am N-Terminus kloniert, in der die eingefügten Aminosäuren die inhibitorische Funktion der N-terminalen Domäne des Proteaseinhibitors stören. Die Expression der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten erfolgte in CHO-Zellen, die die Proteine auf der Zelloberfläche exprimierten. Dies ließ sich sowohl mittels FACS-Analyse der Zelloberfläche als auch durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie nachweisen. Dabei wurden alle drei rekombinanten Proteine mit anti-hTIMP-1 und einem myc-Tag-spezifischen Antikörper gefärbt und keine Unterschiede in der Fluoreszenzintensität festgestellt. Die Reinigung der GPI-verankerten TIMP-Proteine aus dem Extrakt der CHO-Zellen erfolgte über eine anti-mycTag Antikörpersäule. Nach der kompetitiven Elution der Proteine durch Zugabe eines c-myc-Peptids wurden deren Reinheit und spezifische Konzentration bestimmt. Dabei wurden ähnliche Verunreinigungen in einer Gegenüberstellung der gereinigten Proteine in der Silberfärbung eines SDS-Gels festgestellt. Daher konnten die Funktionen der Proteine unter-

einander trotz vorhandener Verunreinigungen verglichen werden. Durch ein zuvor im Rahmen dieser Arbeit erarbeitetes Protokoll, in dem ein zusätzlicher Reinigungsschritt durch Heparin-Chromatographie eingefügt worden war, konnte in früheren Versuchen der Reinheitsgrad der Proteine deutlich gesteigert werden. Durch Untersuchungen der Reinkorporierung der TIMP-1-Varianten mittels FACS-Analyse sowie entsprechende ELISA-Analysen wurde jedoch festgestellt, dass die Stabilität der Proteine in der Lösung durch einen erhöhten Reinheitsgrad verringert war. Die Anwesenheit anderer Proteine erhöht die Stabilität eines Proteins. In einer nicht-nativen Umgebung sind Proteine häufig instabil, sie verlieren durch Aggregation oder Proteolyse an Aktivität (Pierce 2005, L&K Biosciences 2011). Gerade Membranproteine sind dafür bekannt, in Lösung zu aggregieren, was eine natürliche Folge ihrer Hydrophobizität darstellt. Die Stabilität der Proteine konnte durch kommerzielle Stabilisatoren zwar beeinflusst werden, allerdings ergab sich ein neues Problem: die genaue Zusammensetzung des Reagenz wird von der Herstellerfirma geheim gehalten. Aufgrund dieser Tatsache wäre eine spätere *in vivo* Anwendung nicht möglich, da hierfür die tatsächlichen Inhaltsstoffe der verwendeten Reagenzien bekannt sein müssen. Daher wurde in dieser Arbeit das beschriebene Reinigungsprotokoll trotz der übrigen Verunreinigungen verwendet. Im Durchschnitt wurden nach der Reinigung mit diesem Protokoll 10% des im Zellextrakt enthaltenen rekombinanten TIMP-1-Derivats im Eluat gemessen und für die Versuche höchstens über einen Zeitraum von zwei Wochen verwendet.

Die Avidität der Bindung von TIMP-1 an MMP ist für die Regulation der perizellulären und extrazellulären Proteolyse entscheidend. Die Proteine der TIMP-Familie sind langsame, aber stark bindende Inhibitoren der MMP, die diese typischerweise in niedrig-nanomolaren Bereichen binden (Wu et al. 2011). Das native TIMP-1 bindet sowohl die aktiven Formen von MMP-2, -7 und -9 als auch proMMP-9. Die Wechselwirkung zwischen der aktiven Protease und Inhibitoren findet hauptsächlich über die N-terminale Domäne des Inhibitors statt, während die Bindung an proMMP-9 zusätzlich von der C-terminalen Domäne vermittelt wird (Willenbrock et al. 1993). Der proMMP-9-TIMP-1 Komplex wird durch die Wechselwirkung der C-terminalen Hämopexin-(PEX-) Domäne des Zymogens und der C-terminalen Domäne des Inhibitors gebildet (Murphy et al. 1991; Fridman et al. 1992; Stetler-Stevenson et al. 1993; Willenbrock et al. 1993). Während TIMP-1 in diesem Komplex gebunden ist, kann es zusätzlich aktive MMP binden und inhibieren, da der N-Terminus des Proteins nicht am Komplex beteiligt ist (Ogata et al. 1995). Im Komplex mit TIMP-1 ist proMMP-9 resistent gegen die Aktivierung durch MMP-3 (Ogata et al. 1995).

Auch proMMP-2 wurde mittlerweile in einem Komplex mit TIMP-1 nachgewiesen, wobei die Verbindungsregion oder die PEX-Domäne der Protease daran beteiligt ist (Zucker et al. 2009). Dies führt zu einer zusätzlichen Komplexität in der Regulation der proteolytischen Umgebung von Zellen.

Um die inhibitorische Aktivität der gereinigten TIMP-1-GPI Derivate zu analysieren, wurden Aktivitätstests durchgeführt. Während das GPI-verankerte TIMP-1-Protein und dessen isolierte N-terminale Domäne eine deutliche Hemmung der beiden aktiven Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 aufwies, konnte diese Aktivität für VV-TIMP-1-GPI nicht gezeigt werden. Auch die Inhibition der katalytischen Domäne von MMP-3 war durch das Einfügen der Valinreste stark beeinträchtigt. Bei letzterem Versuch zeigte sich zudem eine erhöhte inhibitorische Aktivität von N-TIMP-1-GPI verglichen zu TIMP-1-GPI. Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits in einer der ersten Aktivitätsstudien von der Gruppe um Murphy gemacht (Murphy et al. 1991). In dieser Studie wies die isolierte N-terminale Domäne, verglichen mit dem Wildtyp-TIMP-1, eine um ungefähr das Doppelte erhöhte Aktivität gegen MMP-3 auf, was mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit korreliert. Eine Erklärung fand die oben genannte Gruppe dafür nicht, denkbar wäre jedoch eine räumliche Veränderung im Protease-Inhibitor-Komplex durch fehlende Wechselwirkungen mit den anderen, in N-TIMP-1 fehlenden Kontaktstellen. Insgesamt zeigte dieser Versuch, dass die inhibitorische Aktivität von TIMP-1, auch im GPI-verankerten Protein mit myc-Tag, hauptsächlich in der N-terminalen Domäne lokalisiert ist. Eine Entfernung der C-terminalen Domäne hatte in den in dieser Arbeit durchgeführten Analysen keinen Einfluss auf die inhibitorische Aktivität des Proteins gegenüber den untersuchten Mitgliedern der MMP-Familie. Wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben, findet zwischen Protease und Inhibitor eine Wechselwirkung statt, an der fünf verschiedene Regionen der Polypeptidkette von TIMP-1 beteiligt sind. Dabei werden zwei Drittel aller Kontakte durch die Interaktionsregionen IR I und II vermittelt, die beide zur N-terminalen Domäne des Proteins gehören. Somit stimmt diese Beobachtung mit den aufgrund der strukturellen Eigenschaften der TIMP-MMP-Interaktion zu erwartenden Ergebnissen überein. Die Hemmung der Proteaseaktivität findet statt, indem das erste Cystein, Cys1, mit dem katalytischen Zinkatom der Protease in Wechselwirkung tritt. Sowohl die N-Aminogruppe als auch das Sauerstoffatom der Carbonylgruppe des Cysteins interagieren mit dem Zinkion und verdrängen dabei ein Wassermolekül der Protease, welches das Enzym für die Hydrolyse von Peptidbindungen benötigt (Murphy et al. 1999). Ein freier Aminoterminus des Cysteins stellt dafür eine Grundvoraussetzung dar, die durch die Einfügung der beiden Valinreste verhindert wird.

Andere Forschungsgruppen beschäftigten sich mit einer nicht MMP-inhibitorischen TIMP-2 Mutante, Ala-TIMP-2, die ein zusätzliches Alanin am N-Terminus enthält. Diese Mutante wurde von der Gruppe um Wingfield 1999 erstmals beschrieben (Wingfield et al. 1999). Dieses „Analog-TIMP-2“, wie die Gruppe es benannt hat, besaß keine inhibitorische Funktion gegen MMP-2. Das Protein wurde ohne eine Sekretions-Signalsequenz mit den zusätzlichen Aminosäuren Methionin und Alanin in *E. coli* produziert. In unserem Labor wurde für die Untersuchung der TIMP-1 Funktion zunächst ebenfalls eine Mutante mit Methionin und Alanin am N-Terminus kloniert. Erste Aktivitätsversuche mit dieser TIMP-1 Mutante zeigten allerdings keinen Unterschied in der inhibitorischen Funktion des Proteins (Daten nicht gezeigt). Bei einer Analyse mit der Software „*Protparam*“ des Schweizer Instituts für Bioinformatik wurde berechnet, dass die eingefügten Aminosäuren Met und Ala gemeinsam mit der Signalsequenz zur Sekretion, die für die Expression unseres GPI-verankerten TIMP-1 notwendig war, von der Signalpeptidase abgespalten wurden. Aus diesem Grund wurden die Experimente mit dieser TIMP-1-Variante eingestellt und stattdessen die VV-TIMP-1-Variante kloniert, wobei die Aminosäuren Met und Ala durch zwei Valinreste ersetzt wurden. Eine Analyse mit der o.g. Software zeigte, dass die Valinreste nicht zur Signalsequenz gezählt werden und somit im reifen Protein erhalten bleiben. Zusätzlich konnte eine Sequenzierung mittels Edman-Abbau nachweisen, dass das Protein die beiden Valinreste an seinem N-Terminus enthielt.

Nachdem gezeigt worden war, dass die VV-Mutante von TIMP-1-GPI in ihrer Fähigkeit, MMP-2, -3 und -9 zu inhibieren eingeschränkt ist, wurde der Einfluss der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten auf die proteolytische Umgebung von Nierenkarzinomzellen untersucht. Nach der Inkorporierung der Proteine in die Membranen von Zellen der Linien A-498 zur Untersuchung von MMP-7 und RCC-53 zur Untersuchung von MMP-2 und -9 wurden diese in serumfreiem Medium für weitere zwei Tage kultiviert. Die Aktivität von proMMP-2 und proMMP-9 sowie proMMP-7 wurde dosisabhängig durch die reinkorporierten Proteine TIMP-1-GPI und N-TIMP-1-GPI gehemmt, VV-TIMP-1-GPI hingegen hatte keinen Einfluss auf die MMP-Aktivität im Überstand der Zellen. Somit hatten nur das vollständige, GPI-verankerte TIMP-1 und dessen isolierte N-terminale Domäne einen Einfluss auf die proteolytische Umgebung der Tumorzellen und verschoben das Gleichgewicht in Richtung des Inhibitors, erkennbar durch eine Abnahme der Aktivität der MMP. Dies stellt einen weiteren wichtigen Beweis für die Funktion der N-terminalen Domäne des GPI-verankerten TIMP-1 in der Beeinflussung von Tumorzellen dar.

Um die Bindungsfähigkeit der drei Proteine an verschiedene MMP und die Veränderung der proteolytischen Umgebung der Zellen zu untersuchen, wurden die Proteine in die Membran von Nierenkarzinomzellen reinkorporiert und nach einer 24-stündigen Kultivierung eine FACS-Analyse auf das Vorhandensein verschiedener Mitglieder der MMP-Familie auf der Zelloberfläche durchgeführt. Dabei wurden deutlich höhere Konzentrationen der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten (10 nM) als in anderen Versuchen dieser Arbeit verwendet, um auch nach der Inkubationszeit von 24 h ein starkes Signal der Proteine in der FACS-Analyse nachweisen zu können. Da die Proteasen der MMP-Familie physiologisch sezernierte Proteine sind, und somit keine für FACS getesteten Antikörper kommerziell erhältlich sind, mussten hierfür eine Vielzahl verschiedener Antikörper getestet werden, um ein für diese Methode funktionierendes Reagenz zu finden. Eine zusätzliche Herausforderung bei der Suche nach kompatiblen Antikörpern war, dass die Proteine im komplexierten Zustand mit TIMP-1 nachgewiesen werden mussten, so dass die Möglichkeit bestand, dass das Epitop für die Antikörperbindung durch die Bindung an TIMP-1 verdeckt war. Für MMP-2 und MMP-9 konnten für diese Analyse keine geeigneten Antikörper gefunden werden. MMP-1, MMP-3 sowie MMP-7 waren auf der Zelloberfläche von reinkorporierten Zellen gut nachweisbar. Die Fluoreszenzsignale entsprachen dabei dem gemessenen anti-hTIMP-1 Signal. Es konnte allerdings kein Unterschied im Bindungsverhalten der verschiedenen TIMP-1-Varianten nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass auch die VV-TIMP-1-GPI-Variante an verschiedene Mitglieder der MMP-Familie bindet. Betrachtet man den Mechanismus der biochemischen Wechselwirkung zwischen MMP und TIMP-1 genauer, so liefert dies eine Erklärung für die Ergebnisse der FACS-Analyse. Die Bindungskante in TIMP-1 wird von fünf verschiedenen Kettenteilen gebildet, wobei vor allem die ersten fünf Aminosäuren des Proteins eine wichtige Rolle spielen. Jedoch sind auch zwei flankierende Schleifen aus der CTD des Proteins an der Bindung beteiligt. Das Einfügen der beiden Valinreste in VV-TIMP-1-GPI führte dazu, dass der Cysteinrest, welcher sich bei der Interaktion direkt über dem katalytischen Zinkion der Protease befindet, mit diesem nicht mehr in Wechselwirkung treten kann. Da die Bindung zwischen Protease und Inhibitor aber multivalent ist, kann das veränderte Protein die Protease immer noch binden. Eine Beeinträchtigung der Affinität zwischen Protease und Inhibitor ist dabei denkbar, da die Veränderung des Proteins direkt in der wichtigsten Interaktionsregion liegt. Tatsächlich wurden bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten FACS-Analysen Schwankungen des MMP-7 Signals nach der Inkorporierung von VV-TIMP-1-GPI festgestellt. Die FACS-Analyse ermöglicht allerdings keine quantitative Untersuchung der Bindungsaffinität und verschie-

dene Antikörper können dabei verschieden starke Signale liefern. Theoretisch wäre eine 1:1 Stöchiometrie zwischen TIMP-1-GPI und der untersuchten Protease denkbar. Ob dann beim Nachweis des Komplexes mittels FACS-Analyse niedrigere Signale für MMP zu erwarten wären, da ein TIMP-Molekül jeweils nur ein MMP-Molekül der Familie binden kann und auf den reinkorporierten Zellen mindestens drei verschiedene MMP nachgewiesen wurden, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht vollständig geklärt werden. Die Tatsache, dass weniger Proteasen in den Kulturüberstand abgegeben und gleichzeitig auf der Zelloberfläche gemessen wurden, ist sicherlich auch das Ergebnis vieler, miteinander verknüpfter Mechanismen. Da FACS keine quantitative Methode darstellt konnte dies im Rahmen dieser Arbeit nicht genauer untersucht werden.

Insgesamt erscheint die Tatsache, dass die VV-Mutante noch die Fähigkeit besitzt, MMP zu binden, nicht unlogisch. Aus der Multivalenz der Bindung und dem bereits beschriebenen Mechanismus der Inhibition des katalytischen Zinks kann man schließen, dass eine Bindung nicht automatisch eine Inhibition zur Folge hat. Allerdings liefern diese Ergebnisse keine ausreichende Erklärung für die Veränderung der proteolytischen Umgebung der Zellen, welche durch Zymographie und Western-Analyse der Kulturüberstände ausschließlich nach der Inkorporierung von TIMP-1-GPI oder N-TIMP-1-GPI gezeigt werden konnte. Hierfür wären weiterführende Studien über den Einfluss der Proteine auf das Tumorzellwachstum notwendig.

TIMP-1 wurde als Wachstumsfaktor in humanem Serum identifiziert (Hayakawa et al. 1992) und besitzt eine stimulierende Aktivität auf die Proliferation verschiedener Zelltypen (Hayakawa et al. 1994). Das Ala-TIMP-2, das bereits im Abschnitt über die Untersuchung der inhibitorischen Aktivität der Proteine diskutiert wurde, erzeugt ebenfalls eine mitogene Reaktion in serumgehungerten, ruhenden Fibroblasten. Verglichen mit Wildtyp-TIMP-2 wurde dabei kein Unterschied in der proliferationsstimulierenden Aktivität auf ruhende Fibroblasten festgestellt und MMP-Inhibitoren wie Barimastat hatten keinen Einfluss auf diese Aktivität. Dies wies die Wachstumsstimulation von Fibroblasten als MMP-unabhängigen Prozess aus, der auch durch die Ala-TIMP-2 Mutante ausgelöst werden konnte (Wingfield et al. 1999).

Der Einfluss des in unserem Labor hergestellten TIMP-1-GPI auf das Zellwachstum wurde in früheren Studien ebenfalls untersucht. Dabei hatte das Protein eine hemmende Wirkung auf das Wachstum aller untersuchten Tumorzelllinien, jedoch eine stimulierende Wirkung auf die Proliferation von Keratinozyten und primären Fibroblasten. Die Aktivität des Proteins ist demnach abhängig vom untersuchten Zelltyp. Um zu analysieren, welche Domäne des GPI-verankerten

TIMP-1 den inhibitorischen Einfluss auf Tumorzellen vermittelt, wurden Nierenkarzinomzellen mit steigenden Konzentrationen der drei GPI-verankerten TIMP-1- Varianten inkubiert und anschließend MTT-Färbungen zur Analyse metabolisch aktiver Zellen durchgeführt. Sowohl TIMP-1 als auch die N-terminale Domäne des Proteins vermittelten einen inhibitorischen Einfluss auf das Wachstum der Zellen, der dosis- und zeitabhängig war. Je höher die Dosis des Proteins, desto weniger metabolisch aktive Zellen waren messbar. Dieser Effekt war 24 h nach der Behandlung der Zellen deutlich zu sehen und die Zellen wuchsen im Anschluss daran weiterhin langsamer. Die VV-Mutante von TIMP-1-GPI hatte im Gegensatz zu den beiden anderen Varianten keinen Einfluss auf das Zellwachstum. Eine intakte N-terminale Domäne ist somit essentiell für den hemmenden Einfluss auf das Tumorzellwachstum.

Diese Ergebnisse widersprechen anderen Studien, in denen die wachstumsfaktorähnliche Aktivität von TIMP-1 als funktionell von der Hemmung der Proteolyse unabhängige Aktivität des Proteins beschrieben wurde (Chesler et al. 1995). Viele andere Moleküle, wie z.B. Thrombin oder Plasmin, zeigen sowohl Effekte auf proteolytische Prozesse als auch auf das zelluläre Wachstum. Diese bifunktionellen Proteine haben pleiotrope Rollen in der Regulation zellulärer Prozesse und sind überwiegend Mitglieder der Serinproteasen oder deren Inhibitoren. Dabei verhalten sich die proteolytischen und mitogenen Aktivitäten der Proteine zueinander unabhängig und sind oft auch räumlich voneinander getrennt (Chesler et al. 1995). Im Gegensatz zu diesen Proteinen vermittelt die isolierte N-terminale Domäne in TIMP-1-GPI neben der inhibitorischen Funktion auch eine Hemmung der Proliferation von Nierenkarzinomzellen.

Die EZM dient neben ihrer Rolle als strukturelle Basis für die Zellen auch als Reservoir für Wachstumsfaktoren, die erst durch den Abbau der Matrix freigesetzt werden und so aktiv wirken können (Hoffmann 2003). Durch die Hemmung der MMP durch TIMP-1-GPI und N-TIMP-1-GPI wird der Umbau der EZM ebenfalls verlangsamt oder verhindert. Eine somit verhinderte Freisetzung von Wachstumsfaktoren kann ein Grund für eine verlangsamte Proliferation der Tumorzellen sein. Die fehlende Hemmung der MMP-Aktivität durch VV-TIMP-1-GPI würde demnach die Freisetzung und Aktivierung von Wachstumsfaktoren zulassen. Zusätzliche Studien sind notwendig, um diesen Prozess genauer zu untersuchen und die Hypothese zu bestätigen. Die hemmende Wirkung der TIMP-1-GPI-Varianten auf das Wachstum von Nierenkarzinomzellen wurde in dieser Arbeit als unabhängig von der C-terminalen Domäne und vermittelt durch eine funktionelle N-terminale Domäne gezeigt.

Ob dieser Effekt ausschließlich abhängig von einer Hemmung der proteolytischen Aktivität der

MMP ist, kann nur durch weitere Studien analysiert werden.

Zusätzlich bieten die mit diesem Versuch erhaltenen Daten eine Erklärung für die veränderte proteolytische Umgebung der Zellen, die nach der Untersuchung von Kulturüberständen mittels Zymographie und Western-Analyse festgestellt wurde. Hierbei zeigte sich, dass eine intakte N-terminale Domäne von TIMP-1-GPI eine Abnahme der MMP-Aktivität im Überstand der Zellen zur Folge hat. Dies kann auch zumindest teilweise auf den antiproliferativen Effekt der Proteine auf die untersuchten Tumorzellen zurückgeführt werden: Die Variante VV-TIMP-1-GPI zeigte keinen Einfluss auf die Proliferation der Tumorzellen. Die Zellzahl in den verschiedenen Ansätzen des Zymographieversuchs spielt eine Rolle für die MMP-Konzentration und -aktivität im Überstand der Zellen: eine dosisabhängige Reduktion der Zellzahl durch eine verringerte Proliferationsrate hat auch eine verringerte MMP-Konzentration zur Folge. Obwohl bei Zymographieversuchen mit serumfreiem Medium gearbeitet wird, welches das Wachstum der Zellen stark einschränken, kann ein Einfluss der Proliferation der Zellen auf die MMP-Aktivität im Überstand nicht ausgeschlossen werden. In einer Untersuchung des Zellzyklus von verschiedenen Tumorzellen wurde gezeigt, dass nach einer Serumdepletion über 48 h nicht alle Tumorzellen in ihrem Zellzyklus angehalten worden waren. Teilweise hat der Entzug der Wachstumsfaktoren im Serum überhaupt keine Wirkung auf die Zellen (Davis et al. 2001). Der Einfluss der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten auf die MMP-Aktivität im Überstand kann demnach auch ein begleitender Effekt des Einflusses auf die Proliferation der Zellen sein. Es ist wahrscheinlich, dass eine Kombination aus der Bindung der MMP an die Zelloberfläche und anderen Einflüssen auf die Biologie der Zellen für die Abnahme der MMP-Aktivität im Kulturüberstand verantwortlich ist.

Auch die dosisabhängige Hemmung der Proliferation der Tumorzellen kann eine Kombination verschiedener, zusammen arbeitender Mechanismen sein. Für einige Mitglieder der TIMP-Familie wurde ein Einfluss auf die Apoptose verschiedener Zelltypen gezeigt. Für TIMP-3 z.B. wurde ein Mechanismus entschlüsselt, der über die Aktivierung von Caspasen verläuft. Diese Induktion der Apoptose verläuft hierbei über den FAS-Signalweg (Herouy et al. 2004). TIMP-1 hingegen zeigte eine überwiegend anti-apoptotische Wirkung in mehreren Studien zu verschiedenen Zelltypen. Es blockiert die Apoptose in Burkitt's Lymphomzellen (Guedez et al. 1998) und verhält sich als Überlebensfaktor in B-Zellen (Gaudin et al. 2000). Außerdem inhibiert das Protein die Apoptose in Brustepithelzellen (Li et al. 1999). Obwohl die meisten Studien TIMP-1 als anti-apoptotischen Faktor identifizierten, zeigte unsere Gruppe in früheren Studien, dass das GPI-verankerte TIMP-1 eine starke proapoptische Wirkung auf Tumorzellen hat. Sowohl Melanom-

zellen als auch Nierenkarzinomzellen wurden für den FAS-vermittelten Apoptoseweg sensibilisiert (Djafarzadeh et al. 2006; Djafarzadeh et al. 2009). Welche genaue Rolle das GPI-verankerte TIMP-1 bei der Induktion der Apoptose spielt, wurde bisher nicht untersucht. Die Hemmung der Proliferation könnte jedoch mit dem Einfluss auf die Apoptosesensibilität der Zellen in Zusammenhang stehen. Neben einer Wirkung auf den Zellzyklus wäre dies eine weitere Erklärung für eine geringere Proliferationsrate. Oft stehen Überlebenssignale und Apoptosesignale in engem Wechselspiel miteinander. Ein Beispiel hierfür ist der Transkriptionsfaktor p53, der z.B. bei einem DNA-Schaden zu einem Zellzyklusarrest und Apoptose, bei einer Stimulation durch Zytokine wie z.B. TNF- α jedoch zur Proliferation von Zellen führt (Weber und Zambetti 2003). Eine Untersuchung der in dieser Arbeit verwendeten TIMP-1-GPI-Varianten in Bezug auf die Induktion von Apoptose und Zellzyklusarrest wäre eine interessante Ergänzung zu dieser Arbeit.

Ein weiterer Prozess, der als sowohl als MMP-abhängig als auch -unabhängig beschrieben wurde, ist die Migration von Tumorzellen. Dabei spielen Kontakte zwischen der EZM und Zelladhäsionsmolekülen, wie z.B. Integrinen, eine wichtige Rolle (Brooks et al. 1996). Eine Beteiligung der MMP durch ihre proteolytische Funktion wurde durch diverse Studien bestätigt (Palmisano und Itoh 2010). Jedoch haben andere Studien zusätzlich gezeigt, dass Migrationsprozesse mancher Zellen nicht durch synthetische MMP-Inhibitoren beeinflusst werden können (Hiraoka et al. 1998; Wolf et al. 2003). Andere Aktivitäten der MMP, die nicht über Proteolyse vermittelt werden, haben somit einen Einfluss auf die Zellmigration, wobei der genaue Mechanismus hierfür noch nicht entschlüsselt wurde (Dufour et al. 2008). Letztere Gruppe konnte zeigen, dass die PEX-Domäne von MMP-9 eine Voraussetzung für eine durch MMP-9 erhöhte Migration von Tumorzellen ist, dies aber unabhängig von Proteolyse ist.

Ein proteolyseunabhängiger Mechanismus, der in aktuellen Studien untersucht wird, konzentriert sich auf die Wechselwirkung von TIMP-1 mit Integrinen, die ihrerseits extrazellulär mit der EZM und intrazellulär mit dem Zytoskelett der Zellen verbunden sind. Um zu analysieren, ob die Migration von Fibrosarkomzellen ein MMP-abhängiger Prozess ist, wurden in dieser Arbeit Migrationsversuche durchgeführt. Die Zellen wurden zuvor mit den GPI-verankerten TIMP-1-Varianten inkubiert, um den Einfluss der verschiedenen Domänen von TIMP-1-GPI auf den Migrationsprozess zu untersuchen. Im Experiment zeigten sowohl TIMP-1-GPI als auch VV-TIMP-1-GPI eine Hemmung der chemotaktischen Wanderung der Fibrosarkomzellen in Richtung des angesetzten Serumgradienten. Diese Aktivität konnte für N-TIMP-1-GPI nicht gemessen werden. Die

Auswertung einzelner Parameter konnte einen Trend in dieselbe Richtung zeigen. Der Index aus aufwärts- und abwärts-gewanderten Zellen zeigte nach der Reinkorporierung von N-TIMP-1-GPI den höchsten Wert, ebenso der Vorwärts-Migrationsindex $FMI(Y)$. Der $FMI(Y)$ -Wert gibt das Verhältnis aus der Netto-Distanz auf der y-Achse und der tatsächlichen, akkumulierten Distanz wieder und liefert somit nicht nur einen Wert für die Bewegung der Zellen in Richtung des Serumgradienten, sondern gleichzeitig auch für die Direktionalität dieser Bewegung. Je kleiner die akkumulierte Distanz, desto geradliniger der Pfade der Zellen und desto höher der $FMI(Y)$ -Wert. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass die mit N-TIMP-1-GPI behandelten Zellen die Fähigkeit, zielstrebig in Richtung des Serumgradienten zu wandern, nicht vollständig verloren hatten. Die N-terminale Domäne allein scheint demnach nicht in der Lage zu sein, die gerichtete Bewegung der Zellen zu verhindern. Vielmehr scheint hierfür eine intakte C-terminale Domäne notwendig und ausreichend zu sein, wie die Ergebnisse mit VV-TIMP-1-GPI zeigen, dessen N-terminale Domäne durch die Einführung der Valinreste in ihrer Aktivität stark eingeschränkt ist.

Durch den Rayleigh-Test wurde die Verteilung der Zellen in der Kammer zum Endpunkt der Messung berechnet. Dabei wurde eine Grenze für den berechneten p-Wert bei 0,05 festgesetzt, wie es in der Literatur beschrieben wurde (Moore et al. 1980). Die berechneten Werte waren für die mit TIMP-1-GPI oder VV-TIMP-1-GPI behandelten Zellen höher als bei allen anderen Proben und lagen über dem Grenzwert von 0,05. Dies deutete eher auf eine homogene Zellverteilung nach der Zellwanderung und somit auf eine ungerichtete Wanderung hin. Im Gegensatz dazu lagen alle p-Werte nach der Behandlung der Zellen mit N-TIMP-1-GPI unter der Grenze von 0,05, vergleichbar mit der Pufferkontrolle. Eine gerichtete Wanderung der Zellen nach der Behandlung mit der N-terminalen Domäne allein schien daher wahrscheinlich. Auch hier zeigte sich also, dass die GPI-verankerte N-terminale Domäne allein nicht in der Lage ist, die gerichtete Bewegung der Zellen zu verhindern. Vielmehr ist für diesen Prozess eine intakte CTD erforderlich.

Die Ergebnisse dieses Versuchs zeigten somit insgesamt, dass die N-terminale Domäne von TIMP-1, obwohl sie die volle inhibitorische Aktivität gegen Proteasen beinhaltet (vorliegende Arbeit und Murphy et al. 1991), keinen inhibitorischen Einfluss auf die gerichtete Migration von Tumorzellen besitzt. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Hemmung der gerichteten Chemotaxis durch TIMP-1-GPI ein proteolyseunabhängiger Prozess ist. Zusätzlich legt dieses Ergebnis nahe, dass die CTD des Proteins bei der Hemmung der Migration eine entscheidende Rolle spielt. Eine Inhibition der proteolytischen Aktivität der MMP scheint also für die Hemmung des

Migrationsprozesses der Tumorzellen nicht entscheidend zu sein. Dieser Einfluss stellt eine Aktivität des Proteins dar, deren genauer Signalweg noch nicht bekannt ist.

Ursprünglich hielt man die Mitglieder der TIMP-Familie ausschließlich für endogene Inhibitoren der MMP-Aktivität und die zelluläre Migration für einen MMP-abhängigen Prozess, der durch den Abbau der EZM an der Migrationsseite der Zelle zustande kommt (Vanhoutte und Heymans 2010). In den letzten beiden Jahrzehnten erkannte man einige MMP-unabhängige Funktionen der TIMP-Familie, die über Rezeptorsignale vermittelt werden. 2006 wurde CD63, ein Mitglied der Tetraspanin-Familie, als Oberflächenrezeptor für TIMP-1 identifiziert (Jung et al. 2006). TIMP-1 kolokalisiert mit dem β 1-Integrin, vermittelt eine Aktivierung des Integrin-Signalwegs und verstärkt sowohl Überlebens-Signalwege als auch die Inhibition von Apoptosemechanismen. Der intrazelluläre Teil von CD63 interagiert mit Signalmolekülen wie FAK (fokale Adhäsionskinase) und reguliert so die Rekrutierung und Aktivierung von Src (eine Tyrosinkinase) und der Phosphatidylinositolkinasen PI3K und PI4-Kinase. Diese aktivieren Akt (eine Serin-Threoninkinase), welches das proapoptotische Bad phosphoryliert und so antiapoptotische Proteine der bcl-Familie aktiviert. Weitere Signalwege, die an der Umgestaltung des Zytoskeletts beteiligt sind (Berditchevski et al. 1997) werden durch die Bindung von zytoskelettassoziierten Proteinen wie Talin (Tal), Paxillin (Pax) oder Vinculin (Vin) an FAK aktiviert. Durch die Bindung an CD63 kann TIMP-1 die Interaktion von CD63 mit Integrinen verändern und so Einfluss auf diese Signalwege nehmen (Jung et al. 2006). Die Zelle erhält Überlebenssignale und kann ihr Zytoskelett modulieren, wodurch die Migration von Zellen ermöglicht wird. Alternativ kann die Wechselwirkung von TIMP-1 und CD63 die Verteilung von Integrinen auf der Zelloberfläche verändern. Die Interaktion von TIMP-1 und CD63 findet über die CTD von TIMP-1 statt, wie in Abb. 28 dargestellt ist.

In mikrovaskulären Endothelzellen verursacht TIMP-1 auch eine MMP-unabhängige Dephosphorylierung von FAK und Paxillin, einem Protein des Zytoskeletts, das mit fokalen Adhäsionen assoziiert ist, was zu einer reduzierten Anzahl von F-Aktin Stressfasern und fokalen Adhäsionen führt. Zusätzlich stimuliert TIMP-1 die Expression von PTEN, einer Phosphatase, und führt somit zu einer reduzierten Phosphorylierung von FAK, einem Umbau des Zytoskeletts und in der Folge zu einer reduzierten Migration der Zellen (Akahane et al. 2004).

Begleitend zu dem in dieser Arbeit beschriebenen Projekt wurden in einer kooperativen Studie zur Erstellung einer medizinischen Doktorarbeit von Susan Notohamiprodo Genexpressionsana-

lysen über den Einfluss von TIMP-1-GPI auf verschiedene Signalwege in Nierenkarzinomzellen durchgeführt. Dabei wurde auch der Akt-Signalweg untersucht und es zeigte sich, dass dieser Signalweg nach der Reinkorporierung von TIMP-1-GPI in den Nierenkarzinomzellen der Linie RCC-53 reguliert war. Ob eine Interaktion der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten mit CD63 über ihren C-Terminus stattfindet und so eine Hemmung der Migration der Tumorzellen ausgelöst werden kann, muss in weiteren Studien untersucht werden.

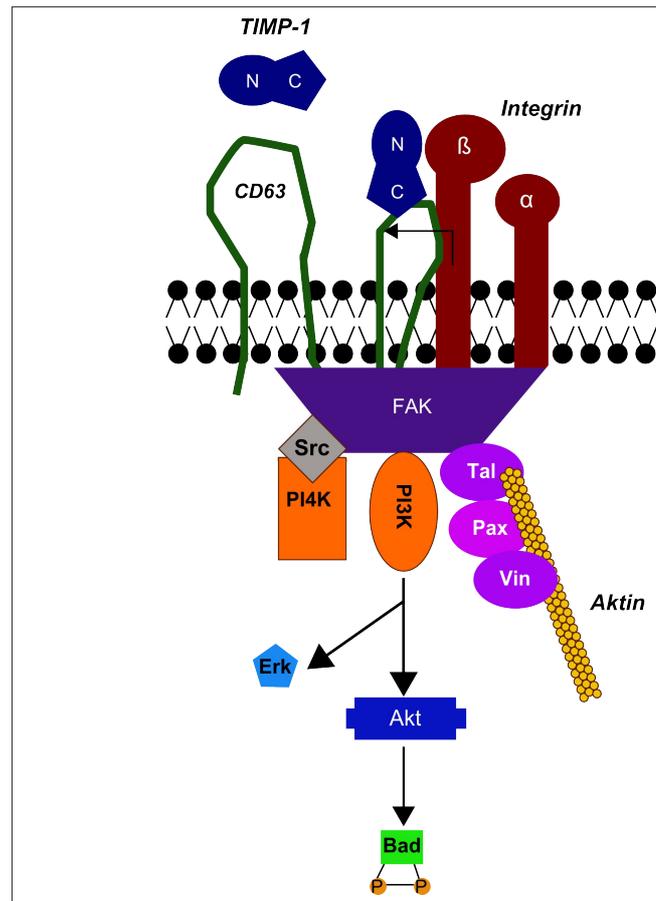


Abbildung 28: Ein Modell für die dynamischen Interaktionen zwischen TIMP-1 und CD63.

Die CTD von TIMP-1 bindet an CD63, welches mit der β -Kette eines Integrins in Verbindung steht. Der intrazelluläre Teil von CD63 interagiert mit FAK, welche durch das Integrinsignal autophosphoryliert wird und anschließend Src rekrutieren kann. Nach einer anschließenden Phosphorylierung durch Src agiert FAK als Adaptermolekül für die Phosphatidylinositolkinasen PI3K und PI4K, deren Signale zur Aktivierung der Akt-Kinase und somit zur Phosphorylierung von Bad führen. Dies stellt ein Überlebenssignal für die Zelle dar. Auch die Aktivierung von Erk führt letztendlich zu einer Phosphorylierung von Bad. Zusätzlich werden aktinassoziierte Proteine wie Talin durch FAK gebunden und assoziieren wiederum mit anderen zytoskelettassoziierten Proteinen wie Vinculin (Vin) oder Paxillin (Pax). Somit wird das Integrinsignal mit dem Zytoskelett verbunden und führt zur Modulation des Zytoskeletts, einem wichtigen Schritt bei der zellulären Migration. So beeinflusst TIMP-1 die Signalwege der Integrine, die über verschiedene Kinasen Einfluss auf das Zytoskelett, Apoptose und Überlebenssignale der Zelle haben. Akt= Akt-Kinase, Erk= Erk-Kinase, FAK= Fokale Adhäsionskinase, P= Phosphat, Pax= Paxillin, PI3K= Phosphatidylinositol-3-Kinase, PI4K= Phosphatidylinositol-4-Kinase, Src= Src-Kinase, Tal= Talin, Vin= Vinculin

Dieser Mechanismus zeigt aber in jedem Fall, dass die Proteine der TIMP-Familie vielfältige Funktionen und Einflüsse bei verschiedensten Prozessen und Signalwegen haben.

Das humane Nierenzellkarzinom ist nach dem Prostatakarzinom und dem Harnblasenkarzinom das dritthäufigste urologische Malignom (Gumpp 2010). Dabei macht das klarzellige Nierenkarzinom ungefähr 75% aller Nierentumore aus, die Zahl der Neuerkrankungen lag laut dem Robert-Koch-Institut Berlin 2002 für Männer bei 21,3 und für Frauen bei 10 auf 100000 Einwohner in Deutschland. Begrenzte Therapiemöglichkeiten aufgrund einer hohen Resistenz gegenüber Chemo- und Strahlentherapie machen meist eine vollständige Entfernung der Niere und des umliegenden Gewebes notwendig (Lau et al. 2002; Ghaffar et al. 2007). In den letzten Jahren wurde die sogenannte „*Nephron sparing surgery*“ etabliert, also die ausschließliche Entfernung des tumoralen Gewebes. Hierbei wird versucht, den nicht betroffenen Teil der Niere zu erhalten. Dies hat für den Patienten auf lange Zeit gesehen viele Vorteile. Hierbei stellt sich allerdings das Problem, dass der Tumor so vorsichtig wie möglich entfernt werden muss und dabei möglicherweise nicht alle malignen Zellen entfernt werden. Die Behandlung der Wundhöhle mit GPI-verankertem TIMP-1 kann eine adjuvante Therapie nach dieser Operation darstellen.

Die Aktivität des Proteins bliebe dabei an der Stelle, an der es zugegeben wurde, da es sich in Zellmembranen inkorporierte. Das Protein würde in der Folge die proteolytische Umgebung der betroffenen Zellen verändern. Zusätzlich würden die in dieser Arbeit nachgewiesenen inhibitorischen Effekte auf die Proliferation und die Migration von Tumorzellen die Hemmung eines erneuten Tumorwachstums unterstützen. Bei der lokalen Behandlung des Tumorherdes muss jedoch auch berücksichtigt werden, dass das umliegende Gewebe ebenfalls mit dem Protein in Kontakt kommen würde und somit dessen Aktivität ausgesetzt wäre. Deshalb ist es wichtig, die Auswirkung von TIMP-1-GPI auf andere Zelltypen zu analysieren. Im Labor von Dr. Nelson wurde zu diesem Zweck nicht nur der Einfluss auf Tumorzellen verschiedenster Herkunft (Kolonkarzinom, Melanom, Nierenkarzinom) untersucht, sondern auch auf nicht-maligne Zellen, die im umliegenden Gewebe des Tumors eine Rolle spielen: mikrovaskuläre Endothelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten. Während TIMP-1-GPI z.B. einen hemmenden Einfluss auf die Migration von Endothelzellen hat, stimulierte es deren Proliferation (Djafarzadeh et al. 2004).

Die übergreifende Rolle von TIMP-1 in der Tumorbilogie bleibt Gegenstand vieler sich widersprechender Studien, die auf sowohl antitumorale als auch tumorprogressive Wirkungen hinweisen, wobei jeweils unterschiedliche Mechanismen daran beteiligt sind (Hayakawa et al.

1992; Ikenaka et al. 2003). Die Biologie dieses Proteins wird dabei in der Forschung genau ausgewertet, um neue therapeutische Strategien entwickeln zu können. Dabei besteht die Hoffnung, durch Veränderung der MMP/ TIMP-Balance das Voranschreiten einer Erkrankung zu verzögern (Djafarzadeh et al. 2004). Zu diesem Zweck hat die lokale Erhöhung der TIMP-1 Konzentration durch die exogene Administration ein hohes klinisches Potenzial.

Da die breite Inhibition aller MMP zu starken Nebenwirkungen beim Patienten führt, stellt die selektive Veränderung des Substratspektrums des GPI-verankerten TIMP-1 ein vielversprechendes Forschungsziel dar. Einige Arbeitsgruppen beschäftigen sich bereits mit der gezielten Mutation der N-terminalen Domäne, vor allem aber der MMP-Bindungskante von TIMP-1 (Murphy et al. 1991; Meng et al. 1999; Arlt et al. 2002). Auch in unserem Labor wurde aus diesem Grund eine Mutante des GPI-verankerten TIMP-1 entwickelt, bei der Threonin an der Position 2 durch Glyzin (Thr2Gly) ausgetauscht wurde. Diese Mutante wurde von zwei Gruppen kontrovers diskutiert. Meng et al. zeigten 1999, dass eine Substitution von Thr2 zu Gly eine 17-fache Reduktion der Inhibitionsaktivität gegen MMP-1, -2, und -3 zur Folge hat. Durch die Analyse vieler verschiedener Mutationen an derselben Stelle im Protein zeigten sie, dass eine Seitenkette an dieser Stelle für die Inhibition der MMP essentiell ist (Meng et al. 1999). Dabei sind Größe, elektrostatische Ladung und Polarität der Aminosäure entscheidend. Murphy nutzte die Thr2Gly-Mutante als „nicht-proteolytische“ TIMP-1-Variante, um andere Funktionen des Proteins genauer untersuchen zu können und stellte dabei einen antiapoptotischen Einfluss auf Sternzellen der Leber fest, der von der Thr2Gly-Variante nicht vermittelt wurde und deshalb als abhängig von der proteolytischen Aktivität der MMP bezeichnet wurde (Murphy et al. 2002). Eine andere Gruppe untersuchte ebenfalls diese Mutante und stellte dabei fest, dass die Mutation die inhibitorische Aktivität von TIMP-1 nicht vollständig zerstört. Vielmehr beschrieben sie dieses Derivat als selektiven Inhibitor, der MMP-9 mit einem K_i -Wert von 2,1 nM und MMP-2 mit einem Wert größer 40 μ M inhibiert. Je höher der K_i -Wert, desto schwächer ist die Bindung zwischen Protease und Inhibitor. Dies zeigte, dass spezifisch veränderte TIMP-Proteine zwischen Mitgliedern der gleichen Subklasse der MMP-Familie unterscheiden können (Hamze et al. 2007). Diese Mutation bringt einen sehr starken und vor allem selektiven Inhibitor für MMP-9 hervor. Auch andere Aminosäureaustausche wurden untersucht, z.B. brachte die Thr2Lys/ Val4Ser Mutation einen starken Inhibitor für MMP-2 hervor. Die Studien der in unserem Labor hergestellten Thr2Gly-Variante von TIMP-1-GPI waren zum Zeitpunkt der Beendigung dieser Arbeit leider noch nicht abgeschlossen.

Eine spezifische Hemmung verschiedener Prozesse der Tumorentstehung und des Tumorwachstums mit einem Inhibitor, dessen Domänen und deren Auswirkung auf die einzelnen Schritte der Tumorgenese gut charakterisiert sind, stellt ein überzeugendes Werkzeug für die zielgerichtete, adjuvante Therapie in Patienten mit Nierenzellkarzinom dar. In der vorliegenden Arbeit konnten die Funktionen der Domänen von TIMP-1-GPI genauer analysiert werden, was in Zukunft zur Entwicklung eines spezifischen, leicht applizierbaren Reagenz beitragen kann.

7 ANHANG

7.1 Zusätzliche Daten des Migrationsversuchs

Um einen Einfluss des GPI-Ankers auf die gerichtete Migration der Fibrosarkomzellen auszu-schließen, wurden Zellen mit 1,4 nM Phosphatidylinositol (L- α -PI), in äquimolarem Verhältnis zu den GPI-verankerten TIMP-Varianten, inkubiert. Die Abbildung 29 zeigt das Ergebnis der Pfad-auswertung.

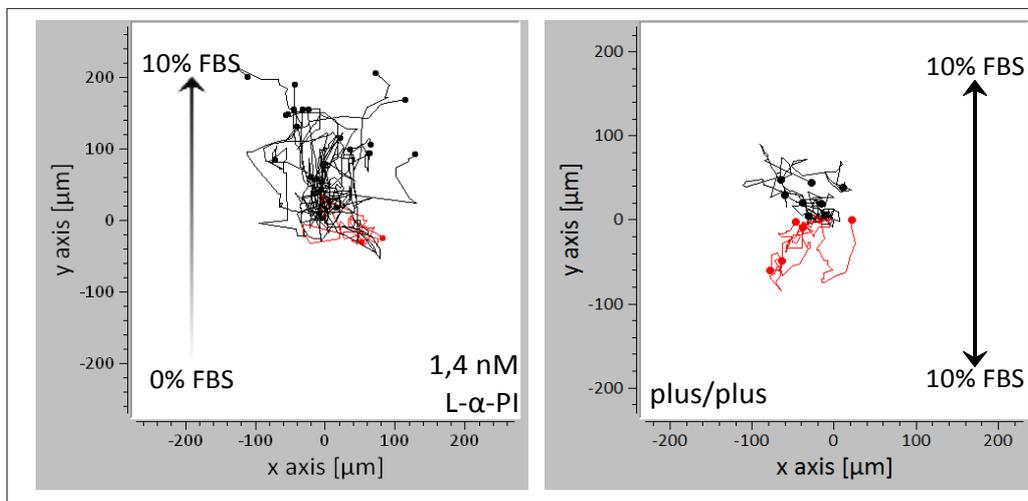


Abbildung 29: Zusätzliche Daten des Migrationsversuchs.

Als zusätzliche Kontrollen zu den in Kapitel 5.12 dargestellten Daten wurden bei den Migrationsversuchen Zellen für eine Stunde mit 1,4 nM L- α -PI als Kontrolle für den Lipidanker inkubiert. Außerdem wurden unbehandelte Zellen beobachtet, deren Reservoire auf beiden Seiten 10% FBS als Chemoattraktant enthielten (plus/plus Kontrolle). Diese Ansätze wurden wie in Abb. 26 beschrieben über 24 Stunden regelmäßig am Mikroskop in einer Inkubationskammer fotografiert und die Wege der Zellen mit der Software der Herstellerfirma Ibidi ausgewertet. Eine Nettobewegung nach oben ist mit schwarzen Pfaden, eine Nettobewegung nach unten mit roten Pfaden dargestellt. Die Pfeile am Bildrand stellen den Serumgradienten des jeweiligen Ansatzes dar.

Die Behandlung der Zellen mit 1,4 nM L- α -PI übte keine negative Beeinflussung auf die Migration in Richtung Chemoattraktants aus und zeigte somit, dass der nachgewiesene Effekt der TIMP-1-GPI-Varianten ein spezifischer Effekt der TIMP-1 Aktivität und somit unabhängig vom GPI-Anker ist.

Des Weiteren wurden Kontrollen mit unbehandelten Zellen mit 10% FBS in beiden Reservoiren durchgeführt (plus/plus-Kontrolle). Die Ergebnisse waren vergleichbar mit denen der minus/minus-Kontrolle, welche in Kapitel 5.12 dargestellt ist: die Bewegung der Zellen war eingeschränkt, die Wege kürzer und es war keine gerichtete Migration sichtbar. Vielmehr wanderten die Zellen sowohl auf- als auch abwärts.

7.2 Erklärung der Parameter des Migrationsversuchs

7.2.1 Akkumulierte und euklidische Distanz sowie Vorwärts-Migrationsindex

Die euklidische Distanz ist die Nettodistanz in μm , die bezogen auf die y-Achse zurückgelegt wurde (rote Linie, Abb. 30). Die akkumulierte Distanz entspricht dem tatsächlich zurückgelegten Pfad der Zellen und stellt die Länge des Pfads in μm dar. Sie berücksichtigt alle Richtungswechsel (blaue Linie, Abb. 30).

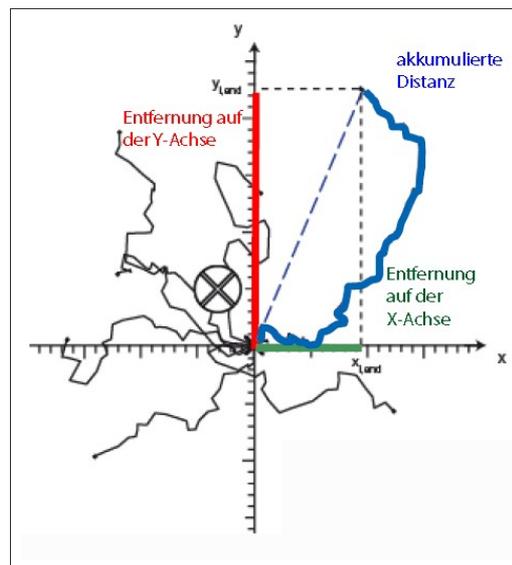


Abbildung 30: Darstellung der möglichen Distanzen des Migrationsversuchs.

Sowohl in der x- als auch der y-Ebene kann die zurückgelegte Distanz auf die Achse bezogen (euklidische Distanz, rote Linie) oder die akkumulierte Distanz (blaue Linie) berechnet werden. Ein Index aus diesen beiden Parametern ergibt den Vorwärtsmigrationsindex (*forward migration index*, FMI).

Der Vorwärtsmigrationsindex $FMI(Y)$ ist der Quotient aus euklidischer Distanz (in Abb. 30 rot) und akkumulierter Distanz (in Abb. 30 blau) bezogen auf die Y-Achse. Der Index wird mit folgender Formel berechnet:

$$FMI = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{\text{euklidische Distanz}}{\text{akkumulierte Distanz}}$$

Der FMI eines Versuchsansatzes wird aus der Summe aller Quotienten aus euklidischer und akkumulierter Distanz berechnet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nur der $FMI(Y)$, also der Index in Richtung Y-Achse, analysiert, da sich das Chemoattraktants im oberen Reservoir befand. Der $FMI(Y)$ gibt nicht nur einen Wert für die Aufwärtsbewegung in Richtung Chemoattraktants an, sondern lässt auch eine Aussage über die Zielstrebigkeit der Zellen zu. Je kürzer die akkumulierte Distanz, desto geradliniger der Weg der Zellen, desto höher der $FMI(Y)$ -Wert.

7.2.2 Rayleigh-Test

Mit dem Rayleigh-Test wird die Wahrscheinlichkeit, mit der die Endpunkte der Zellen in der Migrationskammer nach der Wanderung entweder homogen oder inhomogen verteilt sind, berechnet. Der statistische Test wurde von Moore 1980 so modifiziert, dass er auf Vektordaten anwendbar ist (Moore 1980). Abbildung 31 zeigt Beispiele für die beiden möglichen Situationen im Migrationsexperiment:

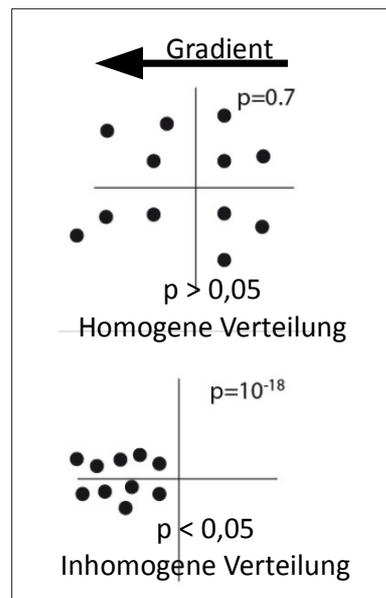


Abbildung 31: Beispiele für die Endpunktverteilung der Zellwanderung.

Sind die Zellen nach der Wanderung homogen in der Kammer verteilt wird mit dem Rayleigh-Test ein p-Wert größer als 0,05 berechnet (Abb. 31 unten). Sind sie nach einer gerichteten Chemotaxis inhomogen, also auf einer Seite der Kammer verteilt, wird mit dem Rayleigh-Test ein p-Wert kleiner 0,05 berechnet (Abb. 31 oben).

Findet eine gerichtete Migration der Zellen statt, so wandern sie gezielt in Richtung des Chemotaktants. Die Zellen verteilen sich inhomogen in der Kammer, alle gewanderten Zellen befinden sich am Ende des Versuchs auf der Seite mit dem höheren Gradienten (Abbildung 31, unterer Teil). Der berechnete p-Wert des Rayleigh-Tests ergibt Werte, die kleiner sind als 0,05. Findet keine gerichtete Chemotaxis statt, wandern die Zellen in alle Richtungen der Oberfläche. Ihre Endpunkte sind am Ende der Messzeit homogen in der Kammer verteilt (Abbildung 31, oben) und der berechnete p-Wert ergibt Werte über 0,05. Der genauen Berechnung des p-Wertes liegt ein komplizierter Rechenweg zugrunde, der in der Publikation von Moore nachgelesen werden kann (Moore 1980).

7.3 Sequenzen der TIMP-1-GPI-Varianten

TIMP-1-GPI

1 **EcoRI Signalpeptid zur Sekretion**
 GAATTCATGGCCCCCTTTGAGCCCCTGGCTTCTGGCATCCTGTTGTTGCTGTGGCTGATA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CTTAAGTACCGGGGAAACTCGGGGACCGAAGACCGTAGGACAACAACGACACCGACTAT
 M--A--P--F--E--P--L--A--S--G--I--L--L--L--L--W--L--I--

61 **TIMP-1**
 GCCCCAGCAGGGCCTGCACCTGTGTCCCACCCACCCACAGACGGCCTTCTGCAATTCC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CGGGGGTTCGTCGGACGTGGACACAGGGTGGGGTGGGTGCTGCCGGAAGACGTTAAGG
 A--P--S--R--A--C--T--C--V--P--P--H--P--Q--T--A--F--C--N--S--

121 GACCTCGTCATCAGGGCCAAGTTCGTGGGGACACCAGAAGTCAACCAGACCACCTTATAC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CTGGAGCAGTAGTCCCGGTTCAAGCACCCCTGTGGTCTTTCAGTTGGTCTGGTGAATATG
 D--L--V--I--R--A--K--F--V--G--T--P--E--V--N--Q--T--T--L--Y--

181 CAGCGTTATGAGATCAAGATGACCAAGATGTATAAAGGGTTCCAAGCCTTAGGGGATGCC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTCGCAATACTCTAGTTCTACTGGTTCTACATATTTCCCAAGGTTCCGAATCCCCTACGG
 Q--R--Y--E--I--K--M--T--K--M--Y--K--G--F--Q--A--L--G--D--A--

241 GCTGACATCCGGTTCGTCTACACCCCGCCATGGAGAGTGTCTGCGGATACTTCCACAGG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CGACTGTAGGCCAAGCAGATGTGGGGCGGTACCTCTCACAGACGCCTATGAAGGTGTCC
 A--D--I--R--F--V--Y--T--P--A--M--E--S--V--C--G--Y--F--H--R--

301 TCCCACAACCGCAGCGAGGAGTTTCTCATTGCTGGAAAACCTGCAGGATGGACTCTTGCAC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AGGGTGTGGCGTTCCTCAAAGAGTAACGACCTTTTGGACGTCCTACCTGAGAACGTG
 S--H--N--R--S--E--E--F--L--I--A--G--K--L--Q--D--G--L--L--H--

361 ATCACTACCTGCAGTTTTCGTGGCTCCCTGGAACAGCCTGAGCTTAGCTCAGCGCCGGGGC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TAGTGATGGACGTCAAAGCACCGAGGGACCTTGTTCGACTCGAATCGAGTCGCGGCCCGG
 I--T--T--C--S--F--V--A--P--W--N--S--L--S--L--A--Q--R--R--G--

421 TTCACCAAGACCTACACTGTTGGCTGTGAGGAATGCACAGTGTTCCTGTTTATCCATC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AAGTGGTTCTGGATGTGACAACCGACACTCCTTACGTGTACAAAGGGACAAATAGGTAG
 F--T--K--T--Y--T--V--G--C--E--E--C--T--V--F--P--C--L--S--I--

481 CCCTGCAAACCTGCAGAGTGGCACTCATTGCTTGTGGACGGACCAGCTCCTCCAAGGCTCT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GGGACGTTTTCAGTCTCACCGTGAGTAACGAACACCTGCCTGGTTCGAGGAGGTTCCGAGA
 P--C--K--L--Q--S--G--T--H--C--L--W--T--D--Q--L--L--Q--G--S--

541 GAAAAGGGCTTCCAGTCCCGTCACCTTGCTGCCTGCCTCGGGAGCCAGGGCTGTGCACC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CTTTTCCCGAAGGTCAGGGCAGTGAACGGACGGACGGAGCCCTCGGTCCCGACACGTGG
 E--K--G--F--Q--S--R--H--L--A--C--L--P--R--E--P--G--L--C--T--

```

601 TGGCAGTCCCTGCGGTCCCAGATAGCCXbaI mycTag TCTAGAGAACAGAAGCTGATCAGCGAGGAGGAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACCGTCAGGGACGCCAGGGTCTATCGGAGATCTCTTGTCTTCGACTAGTCGCTCCTCCTG
W--Q--S--L--R--S--Q--I--A--S--R--E--Q--K--L--I--S--E--E--D--

```

```

661 CTGGAGCAGAAGTTGATCAGCGAGGAGGACCTGGCTAGAACCAACCTGTATCCCAAGCAGC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GACCTCGTCTTCAACTAGTCGCTCCTCCTGGACCGATCTTGTGGACATAGGGTTTCGTCTG
L--E--Q--K--L--I--S--E--E--D--L--A--R--T--T--C--I--P--S--S--

```

```

721 GGTCATTCAAGACACAGATATGCACTTATAACCATAACCATTAGCAGTAATTACAACATGT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCAGTAAGTTCTGTGTCTATAACGTGAATATGGGTATGGTAATCGTCATTAATGTTGTACA
G--H--S--R--H--R--Y--A--L--I--P--I--P--L--A--V--I--T--T--C--

```

```

781 ATTGTGCTGTATATGAATGTATTATAGSaI GTCGAC 812 bp
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAACACGACATATACTTACATAATATCAGCTG
I--V--L--Y--M--N--V--L--stop

```

Beschreibung der TIMP-1-GPI-Sequenz:

Nach der Schnittstelle für *EcoRI* (Basen 1-6) folgt die Signalsequenz zur Sekretion aus dem humanen TIMP-1 mit 23 aa (Basen 7-75). Die Sequenz für TIMP-1 ist 184 aa lang (Basen 76-627). Nach der Schnittstelle für *XbaI* (Basen 628-633) schließen sich 20 aa an, die für das mycTag codieren (Basen 634-693). Danach sind 6 Basen (Basen 694-699) zu sehen, die aus der Ligation von *XbaI* und *NheI* zur Verbindung des mycTags mit der Signalsequenz für den GPI-Anker von LFA-3 stammen. Das Ende der Sequenz besteht aus 35 aa, die die Signalsequenz für die Transamidase zum Anfügen des GPI-Ankers darstellen (Basen 700-804) sowie der Sequenz für das Stopcodon TAG (Basen 805-807). Sechs der Aminosäuren (TTCIPS) verbleiben dabei am reifen Protein. Nach dem Stopcodon ist noch die Sequenz für die *SaI* Schnittstelle zu sehen (Basen 807-812).

N-TIMP-1-GPI

```

1 EcoRI Signalpeptid zur Sekretion
GAATTCATGGCCCCCTTTGAGCCCCTGGCTTCTGGCATCCTGTTGTTGCTGTGGCTGATA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTTAAGTACCGGGGAAACTCGGGGACCGAAGACCGTAGGACAACAACGACACCGACTAT
M--A--P--F--E--P--L--A--S--G--I--L--L--L--L--L--W--L--I--

```

```

61 TIMP-1
GCCCCAGCAGGGCCTGCACCTGTGTCCCACCCACCCACAGACGGCCTTCTGCAATTCC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGGGGGTTCGTCCTCCGACGTGGACACAGGGTGGGGTGGGTGCTGCCGGAAGACGTTAAGG
A--P--S--R--A--C--T--C--V--P--P--H--P--Q--T--A--F--C--N--S--

```

```

121 GACCTCGTCATCAGGGCCAAGTTCGTGGGGACACCAGAAGTCAACCAGACCACCTTATAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTGGAGCAGTAGTCCCGGTTC AAGCACCCCTGTGGTCTTCAGTTGGTCTGGTGAATATG
D--L--V--I--R--A--K--F--V--G--T--P--E--V--N--Q--T--T--L--Y--

181 CAGCGTTATGAGATCAAGATGACCAAGATGTATAAAGGGTCCAAGCCTTCGGGGATGCC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTCGCAATACTCTAGTTCTACTGGTTCTACATATTTCCCAAGGTTTCGGAAGCCCCTACGG
Q--R--Y--E--I--K--M--T--K--M--Y--K--G--F--Q--A--F--G--D--A--

241 GCTGACATCCGGTTCGTCTACACCCCGCCATGGAGAGTGTCTGCGGATACTTCCACAGG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGACTGTAGGCCAAGCAGATGTGGGGGCGGTACCTCTCACAGACGCCTATGAAGGTGTCC
A--D--I--R--F--V--Y--T--P--A--M--E--S--V--C--G--Y--F--H--R--

301 TCCCACAACCGCAGCGAGGAGTTTCTCATTGCTGGAAAACGCAGGATGGACTCTTGCAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGGGTGTGGCGTTCCTCAAAGAGTAACGACCTTTTGACGTCCTACCTGAGAACGTG
S--H--N--R--S--E--E--F--L--I--A--G--K--L--Q--D--G--L--L--H--

361 ATCACTACCTGCAGTTTCGTGGCTCCCTGGAACAGCCTGAGCTTAGCTCAGCGCCGGGGC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAGTGATGGACGTCAAAGCACCGAGGGACCTTGTCGGACTCGAATCGAGTCGCGGCCCCG
I--T--T--C--S--F--V--A--P--W--N--S--L--S--L--A--Q--R--R--G--

421 TTCACCAAGACCTACACTGTTGGCTCTGAGGAATCCACAGTGTCTAGAGAACAGAAGCTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAGTGGTTCGGATGTGACAACCGAGACTCCTTACGTGTACAGATCTCTTGTCTTCGAC
F--T--K--T--Y--T--V--G--S--E--E--S--T--V--S--R--E--Q--K--L--
XbaI mycTag

481 ATCAGCGAGGAGGACCTGGAGCAGAAGTTGATCAGCGAGGAGGACCTGGCTAGAACAACC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAGTCGCTCCTCCTGGACCTCGTCTTCAACTAGTCGCTCCTCCTGGACCGATCTTGTTGG
I--S--E--E--D--L--E--Q--K--L--I--S--E--E--D--L--A--R--T--T--
GPI-Sig

541 TGTATCCCAAGCAGCGGTCATTCAAGACACAGATATGCACTTATACCCATACCATTAGCA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACATAGGGTTTCGTCGCCAGTAAGTTCTGTGTCTATACGTGAATATGGGTATGGTAATCGT
C--I--P--S--S--G--H--S--R--H--R--Y--A--L--I--P--I--P--L--A--
nalsequenz

601 GTAATTACAACATGTATTGTGCTGTATATGAATGTATTATAGTCGAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CATTAATGTTGTACATAACACGACATATACTTACATAATATCAGCTG
V--I--T--T--C--I--V--L--Y--M--N--V--L--stop
Sali 646 bp

```

Beschreibung der N-TIMP-1-GPI-Sequenz:

Nach der Schnittstelle für *EcoRI* (Basen 1-6) folgt die Signalsequenz zur Sekretion aus dem humanen TIMP-1 mit 23 aa (Basen 7-75). Die Sequenz für den N-Terminus von TIMP-1 ist 129 aa lang (Basen 76-462). Dies beinhaltet 3 aa, die als Verbindungsregion belassen wurden (Basen 454-462). Die Aminosäure Serin, codiert von den Basen 454-456, entspricht dem Cystein in TIMP-1- und VV-TIMP-1-GPI und wurde ausgetauscht, um ein freies Cystein im Protein zu vermeiden. Nach der Schnittstelle für *XbaI* (Basen 463-468) schließen sich 20 aa an, die für das

mycTag codieren (Basen 469-528). Danach sind 6 Basen (Basen 529-534) zu sehen, die aus der Ligation von *Xba*I und *Nhe*I zur Verbindung des mycTags mit der Signalsequenz für den GPI-Anker von LFA-3 stammen. Das Ende der Sequenz besteht aus 35 aa, die die Signalsequenz für die Transamidase zum Anfügen des GPI-Ankers darstellen (Basen 535-638) sowie der Sequenz für das Stopcodon TAG (Basen 639-641). Sechs der Aminosäuren (TTCIPS) verbleiben dabei am reifen Protein. Nach dem Stopcodon ist noch die Sequenz für die *Sa*II Schnittstelle zu sehen (Basen 641-646).

VV-TIMP-1-GPI

```

1  EcoRI Signalpeptid zur Sekretion
   GAATTCATGGCCCCCTTTGAGCCCCTGGCTTCTGGCATCCTGTTGTTGCTGTGGCTGATA
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CTTAAGTACCGGGGAAACTCGGGGACCGAAGACCGTAGGACAACAACGACACCGACTAT
   M--A--P--F--E--P--L--A--S--G--I--L--L--L--L--W--L--I--
                                     TIMP-1
61  GCCCCAGCAGGGCCGTGGTA TGCACCTGTGTCCCACCCACCCACAGACGGCCTTCTGC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CGGGGGTCGTCCCGGCTCCATACGTGGACACAGGGTGGGGTGGGTGTCTGCCGGAAGACG
   A--P--S--R--A--V--V--C--T--C--V--P--P--H--P--Q--T--A--F--C--
121 AATTCCGACCTCGTCATCAGGGCCAAGTTCGTGGGGACACCAGAAGTCAACCAGACCACC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TTAAGGCTGGAGCAGTAGTCCCAGTTCAAGCACCCCTGTGGTCTTCAGTTGGTCTGGTGG
   N--S--D--L--V--I--R--A--K--F--V--G--T--P--E--V--N--Q--T--T--
181 TTATACCAGCGTTATGAGATCAAGATGACCAAGATGTATAAAGGGTTCCAAGCCTTAGGG
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   AATATGGTTCGCAATACTCTAGTTCTACTGGTCTACATATTTCCCAAGGTTCGGAATCCC
   L--Y--Q--R--Y--E--I--K--M--T--K--M--Y--K--G--F--Q--A--L--G--
241 GATGCCGCTGACATCCGGTTCGTCTACACCCCGCCATGGAGAGTGTCTGCGGATACTTC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CTACGGCGACTGTAGGCCAAGCAGATGTGGGGGCGGTACCTCTCACAGACGCCTATGAAG
   D--A--A--D--I--R--F--V--Y--T--P--A--M--E--S--V--C--G--Y--F--
301 CACAGGTCCCACAACCGCAGCGAGGAGTTTCTCATTGCTGGAAAACCTGCAGGATGGACTC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   GTGTCCAGGGTGTGGCGTCGTCCTCAAAGAGTAACGACCTTTTGACGTCCTACCTGAG
   H--R--S--H--N--R--S--E--E--F--L--I--A--G--K--L--Q--D--G--L--
361 TTGCACATCACTACCTGCAGTTTCGTGGCTCCCTGGAACAGCCTGAGCTTAGCTCAGCGC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   AACGTGTAGTGATGGACGTCAAAGCACCGAGGGACCTTGTCCGACTCGAATCGAGTCGCG
   L--H--I--T--T--C--S--F--V--A--P--W--N--S--L--S--L--A--Q--R--
421 CGGGGCTTCACCAAGACCTACACTGTTGGCTGTGAGGAATGCACAGTGTTCCTGTTTA
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   GCCCCGAAGTGGTCTGGATGTGACAACCGACACTCCTTACGTGTCACAAAGGGACAAAT
   R--G--F--T--K--T--Y--T--V--G--C--E--E--C--T--V--F--P--C--L--

```

```

481  TCCATCCCCTGCAAAGTGCAGAGTGGCACTCATTTGCTTGTGGACGGACCAGCTCCTCCAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGGTAGGGGACGTTTGACGTCTCACCGTGAGTAACGAACACCTGCCTGGTTCGAGGAGGTT
S--I--P--C--K--L--Q--S--G--T--H--C--L--W--T--D--Q--L--L--Q--

541  GGCTCTGAAAAGGGCTTCCAGTCCCGTCACCTTGCTGCCTGCCTCGGGAGCCAGGGCTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCGAGACTTTTCCCGAAGGTCAGGGCAGTGGAACGGACGGACGGAGCCCTCGGTCCCGAC
G--S--E--K--G--F--Q--S--R--H--L--A--C--L--P--R--E--P--G--L--

601  TGCACCTGGCAGTCCCTGCGGTCCAGATAGCCXbaITCTAGAmycTagGAACAGAAGCTGATCAGCGAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACGTGGACCGTCAAGGACGCCAGGGTCTATCGGAGATCTCTTGTCTTCGACTAGTCGCTC
C--T--W--Q--S--L--R--S--Q--I--A--S--R--E--Q--K--L--I--S--E--

661  GAGGACCTGGAGCAGAAGTTGATCAGCGAGGAGGACCTGGPI-SignalsequenzGCTAGACAACCTGTATCCCA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTCCTGGACCTCGTCTTCAACTAGTCGCTCCTCCTGGACCGATCTTGTGGACATAGGGT
E--D--L--E--Q--K--L--I--S--E--E--D--L--A--R--T--T--C--I--P--

721  AGCAGCGGTCATTCAAGACACAGATATGCACTTATACCCATACCATTAGCAGTAATTACA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TCGTGCCAGTAAGTTCTGTGTCTATACGTGAATATGGGTATGGTAATCGTCATTAATGT
S--S--G--H--S--R--H--R--Y--A--L--I--P--I--P--L--A--V--I--T--

781  ACATGTATTGTGCTGTATATGAATGTATTATASaIGTCGAC 818 bp
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGTACATAACACGACATATACTTACATAATATCAGCTG
T--C--I--V--L--Y--M--N--V--L--stop

```

Beschreibung der VV-TIMP-1-GPI-Sequenz:

Nach der Schnittstelle für *EcoRI* (Basen 1-6) folgt die Signalsequenz zur Sekretion aus dem humanen TIMP-1 mit 23 aa (Basen 7-75). Anschließend folgen die eingefügten Basen 76-81, die für die beiden Valinreste (pink dargestellt) codieren. Die Sequenz für TIMP-1 ist 184 aa lang (Basen 82-633). Nach der Schnittstelle für *XbaI* (Basen 634-639) schließen sich 20 aa an, die für das mycTag codieren (Basen 640-699). Danach sind 6 Basen (Basen 700-705) zu sehen, die aus der Ligation von *XbaI* und *NheI* zur Verbindung des mycTags mit der Signalsequenz für den GPI-Anker von LFA-3 stammen. Das Ende der Sequenz besteht aus 35 aa, die die Signalsequenz für die Transamidase zum Anfügen des GPI-Ankers darstellen (Basen 706-810) sowie der Sequenz für das Stopcodon TAG (Basen 811-813). Sechs der Aminosäuren (TTCIPS) verbleiben dabei am reifen Protein. Nach dem Stopcodon ist noch die Sequenz für die *SaI* Schnittstelle zu sehen (Basen 813-818).

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

a	aktiv
aa	<i>amino acid</i> , Aminosäure
Abb	Abbildung
ADAM	<i>a disintegrin and metalloprotease</i>
AG	Arbeitsgruppe
Ala	Alanin
APMA	4-Aminophenyl-Quecksilberazetat
AP _R	Ampizillinresistenz
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
bp	Basenpaar
CHO	<i>chinese hamster ovary</i> , chinesische Hamsterovar-
CTD	C-terminale Domäne
CV	<i>column volumina</i> , Säulenvolumen
Cys	Cystein
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i> , verbesserte Chemilumineszenz
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i> , Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
ER	endoplasmatisches Retikulum
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	<i>Fluorescence activated cell scanner</i>
FBS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FMI	<i>forward migration index</i> , Vorwärts-Migrationsindex
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
FW	<i>forward</i> , vorwärts
GAG	Glukosaminoglykan
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GlcNAc	N-Azetylglukosamin
HBSS	Hank's Buffer salt solution
HRP	Horseradish Peroxidase
HT	Hypoxanthin
Ig	Immunglobulin
IR	Interaktionsregion
kat	katalytisch
k _i	Inhibitionsindex
L- α -PI	L- α -Phosphatidylinositol
LB-Medium	Luria-Bertoni-Medium
LTR	<i>long terminal repeats</i> , DNA-Wiederholungseinheit
Man	Mannose
mAU	<i>milli absorbtion units</i> , Milli-Absorptionseinheiten
MFI	mittlerer Fluoreszenzindex
MMP	Matrix-Metalloprotease

mS/cm	Einheit für die elektrische Leitfähigkeit, Milli-Siemens pro cm
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren
NTD	N-terminale Domäne
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEX	Hämopexindomäne
PFA	Paraformaldehyd
PI-PLC	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C
PS	Penizillin/ Streptomycin
PITC	Phenylisothiocyanat
PMA	Phorbolmyristatazetat
Pro	Prolin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RCC	<i>renal cell carcinoma</i> , Nierenzellkarzinom
RNS	Ribonukleinsäure
RPE	R-Phycoerythrin
RV	<i>reverse</i> , rückwärts
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Ser	Serin
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> , Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween ²⁰
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Thr	Threonin
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloprotease</i> , gewebespezifischer Metalloproteaseinhibitor
V	Volumen/ Valin
VV-	zwei Valinreste
VE	Volumeneinheit
Zn	Zink

9 LITERATURVERZEICHNIS

- Akahane, T., M. Akahane, et al.** (2004). *TIMP-1 inhibits microvascular endothelial cell migration by MMP-dependent and MMP-independent mechanisms*. *Exp Cell Res* 301(2): 158-167.
- Alberts B, J. A., Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P** (2002). *Molecular Biology of the cell*, Garland Science.
- Arlt, M., C. Kopitz, et al.** (2002). *Increase in gelatinase-specificity of matrix metalloproteinase inhibitors correlates with antimetastatic efficacy in a T-cell lymphoma model*. *Cancer Res* 62(19): 5543-5550.
- Berditchevski, F., K. F. Talias, et al.** (1997). *A novel link between integrins, transmembrane-4 superfamily proteins (CD63 and CD81), and phosphatidylinositol 4-kinase*. *J Biol Chem* 272(5): 2595-2598.
- Birkedal-Hansen, H.** (1995). *Matrix Metalloproteinases*. *Adv Dent Res* 9 (3 Suppl): 16.
- Bjorklund, M. and E. Koivunen** (2005). *Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells*. *Biochim Biophys Acta* 1755(1): 37-69.
- Blavier, L., P. Henriët, et al.** (1999). *Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in cancer*. *Ann N Y Acad Sci* 878: 108-119.
- Bodden, M. K., G. J. Harber, et al.** (1994). *Functional domains of human TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases)*. *J Biol Chem* 269(29): 18943-18952.
- Bode, W.** (2003). *Structural basis of matrix metalloproteinase function*. *Biochem Soc Symp*(70): 1-14.
- Brew, K., D. Dinakarpanthian, et al.** (2000). *Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function*. *Biochim Biophys Acta* 1477(1-2): 267-283.
- Brew, K. and H. Nagase** (2010). *The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity*. *Biochim Biophys Acta* 1803(1): 55-71.
- Brooks, P. C., S. Stromblad, et al.** (1996). *Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3*. *Cell* 85(5): 683-693.
- Brown, D. A., B. Crise, et al.** (1989). *Mechanism of membrane anchoring affects polarized expression of two proteins in MDCK cells*. *Science* 245(4925): 1499-1501.
- Caterina, N. C., L. J. Windsor, et al.** (1998). *Glycosylation and NH2-terminal domain mutants of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1)*. *Biochim Biophys Acta* 1388(1): 21-34.
- Chapman, H. A.** (1997). *Plasminogen activators, integrins, and the coordinated regulation of cell adhesion and migration*. *Curr Opin Cell Biol* 9(5): 714-724.
- Chesler, L., D. W. Golde, et al.** (1995). *Metalloproteinase inhibition and erythroid potentiation are independent activities of tissue inhibitor of metalloproteinases-1*. *Blood* 86(12): 4506-4515.
- Chirco, R. et al.** (2006). *Novel functions of TIMPs in cell signaling*. *Canc Met Rev* 25(1): 99-113.
- Chow, A. K., J. Cena, et al.** (2007). *Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature*. *Br J Pharmacol* 152(2): 189-205.
- Collinge, J.** (2005). *Molecular Neurology of Prion disease*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76: 906-919.

- Coussens, L. M., B. Fingleton, et al. (2002). *Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations*. *Science* 295(5564): 2387-2392.
- Curran, S. und G. I. Murray (2000). *Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis*. *Eur J Cancer* 36(13 Spec No): 1621-1630.
- Das, S., M. Mandal, et al. (2003). *Structure and evolutionary aspects of matrix metalloproteinases: a brief overview*. *Mol Cell Biochem* 253(1-2): 31-40.
- Davis, P. K., A. Ho, et al. (2001). *Biological methods for cell-cycle synchronization of mammalian cells*. *Biotechniques* 30(6): 1322-1326, 1328, 1330-1321.
- Deutzmann, B.-T., Bruckner (2007). *Binde- und Stützgewebe*. Biochemie und Pathobiochemie, Springer Verlag.
- Djafarzadeh, R., A. Mojaat, et al. (2004). *Exogenously added GPI-anchored tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) displays enhanced and novel biological activities*. *Biol Chem* 385(7): 655-663.
- Djafarzadeh, R., E. Noessner, et al. (2006). *GPI-anchored TIMP-1 treatment renders renal cell carcinoma sensitive to FAS-mediated killing*. *Oncogene* 25(10): 1496-1508.
- Djafarzadeh, R., V. Milani, et al. (2009). *TIMP-1-GPI in combination with hyperthermic treatment of melanoma increases sensitivity to FAS-mediated apoptosis*. *Cancer Immunol Immunother* 58(3): 361-371.
- Dufour, A., N. S. Sampson, et al. (2008). *Role of the hemopexin domain of matrix metalloproteinases in cell migration*. *J Cell Physiol* 217(3): 643-651.
- Edman, P. (1949). *A method for the determination of amino acid sequence in peptides*. *Arch Biochem* 22: 2.
- Egeblad, M. and Z. Werb (2002). *New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression*. *Nat Rev Cancer* 2(3): 161-174.
- Eichelberg, C., K. Junker, et al. (2009). *Diagnostic and prognostic molecular markers for renal cell carcinoma: a critical appraisal of the current state of research and clinical applicability*. *Eur Urol* 55(4): 851-863.
- Fridman, R., T. R. Fuerst, et al. (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(22): 15398-15405.
- Fridman, R., M. Toth, et al. (1995). *Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP-2)*. *Cancer Res* 55(12): 2548-2555.
- Gaudin, P., C. Trocme, et al. (2000). *TIMP-1/MMP-9 imbalance in an EBV-immortalized B lymphocyte cellular model: evidence for TIMP-1 multifunctional properties*. *Biochim Biophys Acta* 1499(1-2): 19-33.
- Ghaffar, F., M. A. Sajid, et al. (2007). *Transperitoneal approach for radical nephrectomy: five years experience at Pakistan Institute of Medical Sciences, Islamabad, Pakistan*. *J Ayub Med Coll Abbottabad* 19(3): 15-18.
- Gomez, D. E., D. F. Alonso, et al. (1997). *Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions*. *Eur J Cell Biol* 74(2): 111-122.
- Gomis-Ruth, F. X., K. Maskos, et al. (1997). *Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1*. *Nature* 389(6646): 77-81.

- Guede, L., W. G. Stetler-Stevenson, et al.** (1998). *In vitro suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1*. J Clin Invest 102(11): 2002-2010.
- Gump, V., Henß, H** (2010). *Klinisches Krebsregister-Kodierhilfe*. Tumorzentrum Ludwig Heilmeyer Freiburg.
- Hamze, A. B., S. Wei, et al.** (2007). *Constraining specificity in the N-domain of tissue inhibitor of metalloproteinases-1; gelatinase-selective inhibitors*. Protein Sci 16(9): 1905-1913.
- Hasaneen, N. A., S. Zucker, et al.** (2005). *Cyclic mechanical strain-induced proliferation and migration of human airway smooth muscle cells: role of EMMPRIN and MMPs*. FASEB J 19(11): 1507-1509.
- Hayakawa, T., K. Yamashita, et al.** (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(1): 29-32.
- Hayakawa, T., K. Yamashita, et al.** (1994). *Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2)*. J Cell Sci 107: 2373-2379.
- Hemmerlein, B., U. Johanns, et al.** (2004). *The balance between MMP-2/-9 and TIMP-1/-2 is shifted towards MMP in renal cell carcinomas and can be further disturbed by hydrogen peroxide*. Int J Oncol 24(5): 1069-1076.
- Herouy, Y., B. Kahle, et al.** (2004). *Venous leg ulcers and apoptosis: a TIMP-3-mediated pathway?* J Invest Dermatol 123(6): 1210-1212.
- Hiraoka, N., E. Allen, et al.** (1998). *Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins*. Cell 95(3): 365-377.
- Hoffmann, O.** (2003). *Zelluläre und molekulare Mechanismen der Tumormetastasierung in den Knochen*. Journal für Mineralstoffwechsel 10(2): 12-15.
- Horino, K., A. L. Kindezelskii, et al.** (2001). *Tumor cell invasion of model 3-dimensional matrices: demonstration of migratory pathways, collagen disruption, and intercellular cooperation*. FASEB J 15(6): 932-939.
- Hornebeck, W., E. Lambert, et al.** (2005). *Beneficial and detrimental influences of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in tumor progression*. Biochimie 87(3-4): 377-383.
- Hu, J., P. E. Van den Steen, et al.** (2007). *Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases*. Nat Rev Drug Discov 6(6): 480-498.
- Huang, W., Q. Meng, et al.** (1997). *Mutational study of the amino-terminal domain of human tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) locates an inhibitory region for matrix metalloproteinases*. J Biol Chem 272(35): 22086-22091.
- Ii, M., H. Yamamoto, et al.** (2006). *Role of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human cancer invasion, apoptosis, growth, and angiogenesis*. Exp Biol Med (Maywood) 231(1): 20-27.
- Ikenaka, Y., H. Yoshiji, et al.** (2003). *Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) inhibits tumor growth and angiogenesis in the TIMP-1 transgenic mouse model*. Int J Cancer 105(3): 340-346.
- Jeziarska, A. and T. Motyl** (2009). *Matrix metalloproteinase-2 involvement in breast cancer progression: a mini-review*. Med Sci Monit 15(2): RA32-40.
- Jung, K. K., X. W. Liu, et al.** (2006). *Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein*. EMBO J 25(17): 3934-3942.

- Kern, B., J. Shen, et al.** (2001). *Cbfa1 contributes to the osteoblast-specific expression of type I collagen genes.* J Biol Chem 276(10): 7101-7107.
- Knauper, V., S. Cowell, et al.** (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(12): 7608-7616.
- Kessebrock, K., Plak, V. Und Werb, Z.** (2010). *Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment.* Cell 141(1): 52-67.
- Lau, W. K., J. C. Cheville, et al.** (2002). *Prognostic features of pathologic stage T1 renal cell carcinoma after radical nephrectomy.* Urology 59(4): 532-537.
- Lee, M. H., S. Atkinson, et al.** (2007). *Identification of the extracellular matrix (ECM) binding motifs of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3 and effective transfer to TIMP-1.* J Biol Chem 282(9): 6887-6898.
- Lee, Ch., et al.** (2008). *Upregulation of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) expression in oral carcinomas of betel liquid (BQ) users: Roles of BQ ingredients in the acceleration of tumour cell motility through MMP-1.* Arch Oral Biol. (2008) 53(9): 810-818.
- Legler, D. F., M. A. Doucey, et al.** (2005). *Differential insertion of GPI-anchored GFPs into lipid rafts of live cells.* FASEB J 19(1): 73-75.
- Li, G., R. Fridman, et al.** (1999). *Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 inhibits apoptosis of human breast epithelial cells.* Cancer Res 59(24): 6267-6275.
- Lisanti, M. P., I. W. Caras, et al.** (1989). *A glycosphospholipid membrane anchor acts as an apical targeting signal in polarized epithelial cells.* J Cell Biol 109(5): 2145-2156.
- Ljungberg, B., D. C. Hanbury, et al.** (2007). *Renal cell carcinoma guideline.* Eur Urol 51(6): 1502-1510.
- L&K Biosciences** (2011). *The L&K Process Guide- The tool for biopharmaceutical drug development.* <http://www.lk-processguide.com>
- Luo, Y., F. Liang, et al.** (2009). *PRL1 promotes cell migration and invasion by increasing MMP2 and MMP9 expression through Src and ERK1/2 pathways.* Biochemistry 48(8): 1838-1846.
- Malemud, C. J.** (2006). *Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview.* Front Biosci 11: 1696-1701.
- Marchenko, G. N. and A. Y. Strongin** (2001). *MMP-28, a new human matrix metalloproteinase with an unusual cysteine-switch sequence is widely expressed in tumors.* Gene 265(1-2): 87-93.
- Masson, V., L. R. de la Ballina, et al.** (2005). *Contribution of host MMP-2 and MMP-9 to promote tumor vascularization and invasion of malignant keratinocytes.* FASEB J 19(2): 234-236.
- Mayor, S. and H. Riezman** (2004). *Sorting GPI-anchored proteins.* Nat Rev Mol Cell Biol 5(2): 110-120.
- McCawley, L. J. and L. M. Matrisian** (2001). *Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore!* Curr Opin Cell Biol 13(5): 534-540.
- McQuibban, G. A., G. S. Butler, et al.** (2001). *Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1.* J Biol Chem 276(47): 43503-43508.
- Medof, M. E., S. Nagarajan, et al.** (1996). *Cell-surface engineering with GPI-anchored proteins.* FASEB J 10(5): 574-586.

- Meng, Q., V. Malinovskii, et al.** (1999). *Residue 2 of TIMP-1 is a major determinant of affinity and specificity for matrix metalloproteinases but effects of substitutions do not correlate with those of the corresponding P1' residue of substrate.* J Biol Chem 274(15): 10184-10189.
- Moore, B.** (1980). *A modification of the Rayleigh test for vector data.* Biometrika 67(1): 15.
- Murphy, G., A. Houbrechts, et al.** (1991). *The N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases retains metalloproteinase inhibitory activity.* Biochemistry 30(33): 8097-8102.
- Murphy, G., H. Stanton, et al.** (1999). *Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation.* APMIS 107(1): 38-44.
- Murphy, F. R., R. Issa, et al.** (2002). *Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis.* J Biol Chem 277(13): 11069-11076.
- Murphy, G. and H. Nagase** (2008). *Progress in matrix metalloproteinase research.* Mol Aspects Med 29(5): 290-308.
- Murphy, G. and H. Nagase** (2011). *Localizing matrix metalloproteinase activities in the pericellular environment.* FEBS J 278(1): 2-15.
- Murray, G. I., M. E. Duncan, et al.** (1998). *Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in oesophageal cancer.* J Pathol 185(3): 256-261.
- Nagase, H., K. Suzuki, et al.** (1992). *Activation mechanisms of the precursors of matrix metalloproteinases 1, 2 and 3.* Matrix Suppl 1: 237-244.
- Nagase, H. and J. F. Woessner, Jr.** (1999). *Matrix metalloproteinases.* J Biol Chem 274(31): 21491-21494.
- Ogata, Y., Y. Itoh, et al.** (1995). *Steps involved in activation of the pro-matrix metalloproteinase 9 (progelatinase B)-tissue inhibitor of metalloproteinases-1 complex by 4-aminophenylmercuric acetate and proteinases.* J Biol Chem 270(31): 18506-18511.
- Ogier C, Bernard A, Chollet AM, LE Diguardher T, Hanessian S, Charton G, Khrestchatisky M, Rivera S.** (2006). *Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) regulates astrocyte motility in connection with the actin cytoskeleton and integrins.* Glia 54(4): 272-84.
- Oliver, G. W., J. D. Leferson, et al.** (1997). *Quantitative reverse zymography: analysis of picogram amounts of metalloproteinase inhibitors using gelatinase A and B reverse zymograms.* Anal Biochem 244(1): 161-166.
- Overall, C. M.** (2002). *Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites.* Mol Biotechnol 22(1): 51-86.
- Overall, C. M. and O. Kleinfeld** (2006). *Tumour microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy.* Nat Rev Cancer 6(3): 227-239.
- Palecek, S. P., J. C. Loftus, et al.** (1997). *Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness.* Nature 385(6616): 537-540.
- Palmisano, R. and Y. Itoh** (2010). *Analysis of MMP-dependent cell migration and invasion.* Methods Mol Biol 622: 379-392.
- Parks, W. C., C. L. Wilson, et al.** (2004). *Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity.* Nat Rev Immunol 4(8): 617-629.

- Pierce Biotechnology** (2005). *Protein Stability and Storage*. Technical resource TR0043.1. <http://www.piercenet.com/files/TR0043-Protein-storage.pdf>
- Premkumar, D. R., Y. Fukuoka, et al.** (2001). *Properties of exogenously added GPI-anchored proteins following their incorporation into cells*. *J Cell Biochem* 82(2): 234-245.
- Raggi, M. C., R. Djafarzadeh, et al.** (2009). *Peritumoral administration of GPI-anchored TIMP-1 inhibits colon carcinoma growth in Rag-2 gamma chain-deficient mice*. *Biol Chem* 390(9): 893-897.
- Roderfeld, M., J. Graf, et al.** (2007). *Latent MMP-9 is bound to TIMP-1 before secretion*. *Biol Chem* 388(11): 1227-1234.
- Roomi, M. W., V. Ivanov, et al.** (2006). *Modulation of human renal cell carcinoma 786-0 MMP-2 and MMP-9 activity by inhibitors and inducers in vitro*. *Med Oncol* 23(2): 245-250.
- Sarkissian, G., P. Fergelot, et al.** (2008). *Identification of pro-MMP-7 as a serum marker for renal cell carcinoma by use of proteomic analysis*. *Clin Chem* 54(3): 574-581.
- Stetler-Stevenson, W. G., H. C. Krutzsch, et al.** (1989). *The activation of human type IV collagenase proenzyme. Sequence identification of the major conversion product following organomercurial activation*. *J Biol Chem* 264(3): 1353-1356.
- Stetler-Stevenson, W. G., S. Aznavoorian, et al.** (1993). *Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis*. *Annu Rev Cell Biol* 9: 541-573.
- Stetler-Stevenson, W. G., L. A. Liotta, et al.** (1993). *Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis*. *FASEB J* 7(15): 1434-1441.
- Stetler-Stevenson, W. G.** (2008). *The tumor microenvironment: regulation by MMP-independent effects of tissue inhibitor of metalloproteinases-2*. *Cancer Metastasis Rev* 27(1): 57-66.
- Sumi, T., T. Nakatani, et al.** (2003). *Expression of matrix metalloproteinases 7 and 2 in human renal cell carcinoma*. *Oncol Rep* 10(3): 567-570.
- Tjaderhane, L., H. Larjava, et al.** (1998). *The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions*. *J Dent Res* 77(8): 1622-1629.
- Troeberg, L., Nagase, H.** (2003). *Zymography*. *Curr Prot Prot Scie* 2003: Supp. 33, 21.15.1.
- Van Lint, P. and C. Libert** (2007). *Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation*. *J Leukoc Biol* 82(6): 1375-1381.
- Van Wart, H. E. und H. Birkedal-Hansen** (1990). *The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family*. *PNAS* 87(14): 5578-5582.
- Vanhoutte, D. and S. Heymans** (2010). *TIMPs and cardiac remodeling: 'Embracing the MMP-independent-side of the family'*. *J Mol Cell Cardiol* 48(3): 445-453.
- von Bredow, D. C., A. E. Cress, et al.** (1998). *Activation of gelatinase-tissue-inhibitors-of-metalloproteinase complexes by matrilysin*. *Biochem J* 331 (Pt 3): 965-972.
- Wang, L., Z. G. Zhang, et al.** (2006). *Matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 secreted by erythropoietin-activated endothelial cells promote neural progenitor cell migration*. *J Neurosci* 26(22): 5996-6003.
- Weber, J. D. and G. P. Zambetti** (2003). *Renewing the debate over the p53 apoptotic response*. *Cell Death Differ* 10(4): 409-412.

- Weinl, C.** (2007/ 2009). *Zellbiologie I /Organisation der Zelle*, Universität Tuebingen.
- Willenbrock, F., T. Crabbe, et al.** (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(16): 4330-4337.
- Willenbrock, F., G. Murphy, et al.** (1995). *The second zinc atom in the matrix metalloproteinase catalytic domain is absent in the full-length enzymes: a possible role for the C-terminal domain*. *FEBS Lett* 358(2): 189-192.
- Wingfield, P. T., J. K. Sax, et al.** (1999). *Biophysical and functional characterization of full-length, recombinant human tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) produced in Escherichia coli. Comparison of wild type and amino-terminal alanine appended variant with implications for the mechanism of TIMP functions*. *J Biol Chem* 274(30): 21362-21368.
- Woessner, J. F., Jr.** (1995). *Quantification of matrix metalloproteinases in tissue samples*. *Methods Enzymol* 248: 510-528.
- Wolf, K., I. Mazo, et al.** (2003). *Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-a-moeboid transition after blocking of pericellular proteolysis*. *J Cell Biol* 160(2): 267-277.
- Wolf, K. and Friedl P.** (2009). *Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process*. *Cancer Metastasis Rev* (2009) 28:129–135.
- Wu, Y., S. Wei, et al.** (2011). *Entropy increases from different sources support the high-affinity binding of the N-terminal inhibitory domains of tissue inhibitors of metalloproteinases (N-TIMPs) to the catalytic domains of matrix metalloproteinases (MMPs) -1 and-3*. *J Biol Chem*. 286(19): 16891-16899.
- Zucker, S., M. Drews, et al.** (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(2): 1216-1222.
- Zucker, S., J. Cao, et al.** (2000). *Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment*. *Oncogene* 19(56): 6642-6650.
- Zucker, S., et al. (2009)** *ProMMP-2: TIMP-1 Complexes Identified in Plasma of Healthy Individuals*. *Oncogene* 50(4): 223-231.

10 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: *Aufbau der extrazellulären Matrix (EZM)*..... 3

Abbildung 2: *Proteinstruktur der MMP-Familie*..... 5

Abbildung 3: *Aktivierungsmechanismen der MMP*..... 7

Abbildung 4: *Struktur von TIMP-1*..... 10

Abbildung 5: *Zentraler Teil der TIMP-1-MMP-Binderegion*..... 11

Abbildung 6: *Kristallographisches Bandstrukturmodell des TIMP-1-MMP-3-Komplexes*..... 12

Abbildung 7: *Rolle der MMP in der Tumorbiologie*..... 16

Abbildung 8: *Struktur eines GPI-Ankers*..... 17

Abbildung 9: *Aufbau einer Migrationskammer*..... 56

Abbildung 10: *Aufbau der geplanten GPI-verankerten TIMP-1-Varianten*..... 60

Abbildung 11: *Vorgehensweise bei der Klonierung der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten*..... 61

Abbildung 12: *Darstellung eines analytischen Restriktionsverdaus der klonierten TIMP-1-Varianten*..... 62

Abbildung 13: *Western-Analyse der Proteinexpression in CHO-Zellen*..... 63

Abbildung 14: *Die CHO-Zelllinien exprimieren die GPI-verankerten TIMP-1-Varianten auf der Zelloberfläche*..... 65

Abbildung 15: *Immunpräzipitation von TIMP-1-GPI für die Edman-Sequenzierung*..... 67

Abbildung 16: *Reinigung der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten am Beispiel von TIMP-1-GPI*..... 69

Abbildung 17: *Vergleich der Silberfärbungen der gereinigten TIMP-1-GPI-Varianten*..... 70

Abbildung 18: *Analyse der Glykosylierung von N-TIMP-1-GPI*..... 71

Abbildung 19: *Die GPI-verankerten TIMP-1-Varianten können in die Zellmembran von Tumorzellen reinkorporiert werden*..... 73

Abbildung 20: *PI-PLC-Verdau nach der Reinkorporierung von N-TIMP-1-GPI*..... 74

Abbildung 21: *TIMP-1-GPI und N-TIMP-1-GPI, nicht aber die VV-Mutante von TIMP-1, inhibieren die proteolytische Aktivität von MMP-3*..... 76

Abbildung 22: *Reverse Zymographie: TIMP-1-GPI und N-TIMP-1-GPI inhibieren die Aktivität von MMP-2 und MMP-9*..... 78

Abbildung 23 A: *TIMP-1-GPI und N-TIMP-1-GPI, nicht aber VV-TIMP-1-GPI, verringern MMP-2 und -9 Aktivität im Überstand von Nierenkarzinomzellen*..... 81

Abbildung 23 B: *TIMP-1-GPI und N-TIMP-1-GPI, nicht aber VV-TIMP-1-GPI, verringern MMP-7 Aktivität im Überstand von Nierenkarzinomzellen*..... 83

Abbildung 24: *Inkorporierung der GPI-verankerten TIMP-1-Varianten führt zu erhöhten Oberflächensignalen von MMP auf Nierenkarzinomzellen*..... 85

Abbildung 25: *Die Hemmung der Proliferation von Nierenkarzinomzellen wird durch eine intakte N-terminale Domäne des GPI-verankerten TIMP-1 vermittelt*..... 87

Abbildung 26: *TIMP-1-GPI und VV-TIMP-1-GPI hemmen die Migration von Fibrosarkomzellen*..... 92

Abbildung 27 A:	<i>Darstellung des FMI(Y)-Werts des Migrationsversuchs.....</i>	95
Abbildung 27 B, C:	<i>Vergleich der zurückgelegten Distanzen im Migrationsversuch.....</i>	96
Abbildung 27 D:	<i>Darstellung der p-Werte des Rayleigh-Tests.....</i>	98
Abbildung 28:	<i>Ein Modell für die dynamischen Interaktionen zwischen TIMP-1 und CD63.....</i>	111
Abbildung 29:	<i>Zusätzliche Daten des Migrationsversuchs.....</i>	115
Abbildung 30:	<i>Darstellung der möglichen Distanzen des Migrationsversuchs.....</i>	116
Abbildung 31:	<i>Beispiele für die Endpunktverteilung der Zellwanderung.....</i>	117

11 DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß für die Vertretung dieser Arbeit vor der biologischen Fakultät, für die gute Betreuung, die kritische Beurteilung und die anregenden Diskussionen in ihrem Seminar bedanken.

Bei Prof. Dr. Peter Nelson möchte ich mich dafür bedanken, dass ich die Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen durfte. Danke für den Ansporn und alles, was ich in dieser Zeit lernen durfte!

Den weiteren Gutachtern Prof. Dr. Schleicher, Prof. Dr. Kempkes, Prof. Dr. Nickelsen, Prof. Dr. Böttger und Prof. Dr. Eick danke ich für ihre Arbeit.

Auch ein herzliches Dankeschön an die AG Ries für die Kooperation in diesem Projekt. Der AG Siess danke ich recht herzlich dafür, dass ich ihr Mikroskop mit der Inkubationskammer benutzen durfte.

Ich danke Prof. Dr. Bruno Luckow für viele interessante fachliche und laborweisheitliche Gespräche.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Mitarbeitern für ihre tolle Unterstützung bedanken! Niklas Münchmeier (AEM), ohne den ich das alles wahrscheinlich nicht so toll hinbekommen hätte, für seine unermüdliche fachliche und soziale Unterstützung und seine Geduld...

Anke, Alex, Laura, Moni und Sylke für ihre tolle technische Unterstützung, für die viele Geduld und die fachlichen Diskussionen, die gemütlichen Pausen mit den angebotenen Labor- und Lebensweisheiten und den häufig sehr spontanen Einsatz. Und vielen Dank für das immer-wieder-Mut-machen!

Nicht zuletzt ein großes DANKE an meine Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und auch während der Promotionszeit zu mir standen. Danke an meine Schwester und meine Freunde für die Unterstützung.

An Max fürs Zuhören und Ertragen in dieser Zeit und einfach für Alles und an seine Eltern fürs Zuhören und Ratschläge geben. Und Fritz vielen lieben Dank für die Unterstützung beim Druck dieser Arbeit.

12 CURRICULUM VITAE

PERSÖNLICHE DATEN

Name Nicole Rieth
Geburtsdatum 04.02.1981
Geburtsort München
Staatsangehörigkeit Deutsch

AKADEMISCHE AUSBILDUNG

03/2006 bis 04/2011
Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum der Universität, Abt. Klinische Biochemie, Prof. Dr. P.J. Nelson
Titel: „*Modulation des proteolytischen Mikromilieus von Tumoren mittels GPI-verankerter TIMP-1-Varianten -vom Breitspektrum- zum spezifischen Proteaseinhibitor-*“

10/2000 bis 02/2006
Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München

05/2005 bis 02/2006
Diplomarbeit am Klinikum der Universität, Abt. Klinische Biochemie, Prof. Dr. P.J. Nelson; Titel der Diplomarbeit: „*Die Veränderung der Zelloberflächenkomposition von Endothelzellen durch GPI-verankertes TIMP-1 als Werkzeug zur Beeinflussung einzelner Prozesse der Angiogenese*“

PUBLIKATIONEN

2009
Djafarzadeh R, Milani V, **Rieth N**, von Luettichau I, Skrablin PS, Hofstetter M, Noessner E, Nelson PJ.

„*TIMP-1-GPI in combination with hyperthermic treatment of melanoma increases sensitivity to FAS-mediated apoptosis.*“ Cancer Immunol Immunother. 2009 Mar;58(3):361-71

2009
Raggi MC, Djafarzadeh R, Muenchmeier N, Hofstetter M, Jahn B, **Rieth N**, Nelson PJ. “*Peritumoral administration of GPI-anchored TIMP-1 inhibits colon carcinoma growth in Rag-2 gamma chain-deficient mice.*“ Biol Chem. 2009 Sep;390(9):893-7

2011
Figel A-M, Brech D, Prinz PU, Lettenmeyer U, Hosse J, Turqueti-Neves A, Mysliwietz J, Anz D, **Rieth N**, Münchmeier N, Buchner A, Porubsky S, Siegert S, Segerer S, Nelson PJ, Noessner E. “*Human renal cell carcinoma induces a dendritic cell subset that uses T-cell crosstalk for tumor-permissive milieu alterations.*“ Am J Pathol, online 05/2011

EHRENWÖRTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde.

München, den

(Unterschrift)

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation nicht, ganz oder in wesentlichen Teilen, einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist. Ich habe mich nicht anderweitig einer Doktorprüfung unterzogen.

München, den

(Unterschrift)