

Proteolyse-induzierte Spaltprodukte des Plasminogens:
Entstehung und pathobiochemische Bedeutung für das Entzündungs-
und Tumorgeschehen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Dirk Weimann
aus Friedrichshafen

2002

Aus der
Chirurgischen Klinik und Poliklinik-Innenstadt
der Ludwigs-Maximilians-Universität
München
Direktor: Prof. Dr. W. Mutschler

Proteolyse-induzierte Spaltprodukte des Plasminogens:
Entstehung und pathobiochemische Bedeutung für das Entzündungs-
und Tumorgeschehen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Dirk Weimann
aus Friedrichshafen

2002

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. M. Jochum

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Ostermann

Mitbetreuung durch: Dr. rer. nat. C. Gippner-Steppert

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 11.04.2002

		Seite
A	Zusammenfassung	1
B	Einleitung	3
B.1	Plasminogenaktivierung unter physiologischen Bedingungen	3
B.1.1	Aktivierungswege von Plasminogen zu Plasmin und deren Regulation	4
B.1.1.1	Struktur des Plasminogens und Konformationsänderung bei Aktivierung zu Plasmin	4
B.1.1.2	Aktivierung durch Urokinase	7
B.1.1.3	Aktivierung durch Gewebetyp-Plasminogen-Aktivator	8
B.1.1.4	Aktivierung durch Streptokinase	9
B.1.1.5	Bedeutung von biologischen Oberflächen bei der Aktivierung	10
B.1.1.6	Inhibitoren der Plasminogenaktivierung	11
B.1.1.7	Stabilität und Inhibition von aktivem Plasmin	13
B.1.2	Bedeutung von Plasmin in physiologischen Prozessen	14
B.1.2.1	Substratspezifität von Plasmin	14
B.1.2.2	Fibrinolyse	14
B.1.2.3	Angiogenese	15

B.2	Plasminogenaktivierung unter pathophysiologischen Bedingungen	17
B.2.1	Einfluß von Proteasen auf Entzündungs- und Tumorgeschehen	17
B.2.1.1	Die Serinprotease Elastase aus PMN-Granulozyten	19
B.2.1.2	Matrix-Metallo-Proteinasen	22
B.2.2	Limitierte Proteolyse von Plasminogen durch Proteasen aus Entzündungs- und Tumorzellen	23
B.2.2.1	Miniplasminogen	24
B.2.2.2	Angiostatin	25
B.3	Aufgabenstellung	27
C	Material und Methoden	29
C.1	Material	29
C.1.1	Geräte	29
C.1.1.1	Proteinbestimmung	29
C.1.1.2	Konzentrierung von Proteinlösungen	29
C.1.1.3	Chromatographien	29
C.1.1.4	Elektrophorese, Blottingtechniken	30
C.1.1.5	Enzymimmunoassays	30
C.1.1.6	Weitere Laborgeräte	30
C.1.1.7	EDV	31

C.1.2	Substanzen	31
C.1.2.1	Proteinbestimmung	31
C.1.2.2	Kopplung von Peptiden und Proteinen	31
C.1.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gradientengel- Elektrophorese	32
C.1.2.4	Proteinfärbungen	32
C.1.2.5	Western Blot im Semi-Dry-Verfahren	32
C.1.2.6	Reinigung polyklonaler Antikörper aus Hühnereigelb	32
C.1.2.7	Enzymimmunoassays	33
C.1.2.8	Immunoprint	33
C.1.2.9	Enzymaktivitätsbestimmung und Inhibition	33
C.1.2.10	Granulozytenisolierung	34
C.1.2.11	Weitere Verbrauchsmaterialien	34
C.1.2.12	Diverse Körperflüssigkeiten von Probanden und Patienten	34
C.2	Methoden	35
C.2.1	Proteinchemische Methoden	35
C.2.1.1	Proteinbestimmung nach Kirschenbaum	35
C.2.1.2	Proteinbestimmung nach Bradford	35
C.2.1.2	Konzentrierung von Proteinlösungen	36
C.2.1.2.1	Ultrafiltration	36
C.2.1.2.2	Gefriertrocknung	36
C.2.1.3	Kopplung von Proteinen an Biotin	37
C.2.2.	Elektrophoresen, Proteinfärbungen	39
C.2.2.1	Elektrophoresen	39
C.2.2.1.1	SDS-Polyacrylamid-Gradientengel- Elektrophorese	39
C.2.2.1.2	Zymographie	40

C.2.2.2	Proteinfärbungen	41
C.2.2.2.1	Coomassie-Brillant-Blue-Färbung	41
C.2.2.2.2	Silberfärbung	42
C.2.3	Immunologische Methoden	43
C.2.3.1	Gewinnung von polyklonalen Antikörpern	43
C.2.3.1.1	Isolierung von Antikörpern durch Immunaффinitätschromatographie	43
C.2.3.1.2	Abtrennung kreuzreaktiver Antikörper mittels Immunabsorption	44
C.2.3.1.3	Isolierung von IgGs aus Hühnereigelb- Rohextrakt mittels Dextransulfat-Fällung	45
C.2.3.2	Enzymimmunoassays (ELISAs)	47
C.2.3.2.1	Indirekter ELISA	48
C.2.3.2.2	Sandwich-ELISA (Standardprotokoll)	49
C.2.3.2.3	Sandwich-ELISA zur Quantifizierung von Miniplasminogen	49
C.2.3.2.4	PMN-Elastase-ELISA	50
C.2.3.2.5	Kompetitiver ELISA zur Quantifizierung von Plasminogen	50
C.2.3.3	Western Blot im Semi-Dry-Verfahren	51
C.2.3.4	Immunoprint	52
C.2.4	Enzymaktivitätsuntersuchungen	53
C.2.4.1	Aktivierung von Pro-Matrixmetalloproteinasen (pro-MMPs)	53
C.2.4.2	Aktivierung von Cathepsinen	54
C.2.4.3	Nachweis der Aktivität von MMPs bzw. Cathepsinen	54

C.2.5	Inkubation von Plasminogen mit Granulozyten	55
C.2.5.1	Isolierung segmentkerniger Granulozyten aus EDTA-Vollblut	55
C.2.5.2	Granulozytenstimulation	56
D	Ergebnisse	57
D.1	Optimierung des Sandwich ELISAs für Miniplasminogen	57
D.1.1	Aufreinigung von Hühnerantikörpern durch Affinitätschromatographie bzw. Dextransulfat-Fällung	57
D.1.2	Spezifität des Antikörpers nach Dextransulfat-Fällung	58
D.1.3	Einsatz eines fluoreszierenden Substrates in den ELISA	62
D.1.4	Endversion des verwendeten Sandwich-ELISAs für Miniplasminogen	63
D.2	Versuche zur Entstehung von Miniplasminogen	64
D.2.1	Limitierte Proteolyse von Plasminogen durch verschiedene isolierte Proteasen	64
D.2.1.1	Nachweis der Enzymaktivität	64
D.2.1.2	Plg-Spaltung durch aktive Proteasen	66
D.2.2	Limitierte Proteolyse von Plasminogen durch aktivierte neutrophile Granulozyten	72
D.3	Versuche zur Stabilität von Miniplasminogen	77
D.3.1	Stabilität in Carbonatpuffer	77
D.3.2	Stabilität in Citrat- und EDTA-Plasma	78
D.3.3	Stabilität in Plasma bei Tiefkühlung	80

D.4	Nachweis von Miniplasminogen (MPIg) in systemischen und lokalen Körperflüssigkeiten	82
D.4.1	MPIg bei gesunden Probanden	82
D.4.2	MPIg bei Peritonitispatienten	82
D.4.2.1	MPIg in Blutproben	83
D.4.2.2	MPIg in Exsudatproben	83
	Einzelwertbetrachtungen	84
	Verlaufs-betrachtungen	91
D.4.2.3	MPIg in Urinproben	96
D.4.3	MPIg bei Patienten mit Mamma-Ca	97
D.4.3.1	MPIg in Serumproben	97
D.4.3.2	MPIg in Gewebe-Zytosol	103
E	Diskussion	104
E.1	Optimierung des ELISA	104
	Isolierung spezifischer Antikörper aus Hühnereigelb	104
	Fluoreszierendes Substrat	105
E.2	Entstehung von Miniplasminogen	106
E.3	Messung von Miniplasminogen in verschiedenen Proben	109
E.4	Ausblick	116
F	Literaturverzeichnis	117
G	Abkürzungsverzeichnis	122
	Lebenslauf	123

A Zusammenfassung

Plasminogen wird durch verschiedene Proteasen proteolytisch gespalten. Zu den Enzymen, von denen bekannt ist, daß sie Plasminogen an definierten Peptidbindungen prozessieren können, gehören Elastase aus polymorph-nukleären Neutrophilen (PMN) und Metallo-Elastase aus Makrophagen. Ein Spaltprodukt ist Miniplasminogen, das die proteolytische Domäne und den Kringel 5 umfaßt. Die Spaltstelle bei Val₄₄₁ ist charakterisiert und ein Sandwich-ELISA gegen die Neodeterminante ist etabliert. Das dabei entstehende Counterpart besteht aus den Kringeln 1-4. Es wird Angiostatin genannt, weil es hemmend auf die Neubildung von Gefäßen wirkt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Miniplasminogen unter pathologischen Bedingungen wie Sepsis, Peritonitis und Tumorerkrankungen auftritt, um daraus einerseits den Einfluß der Elastase abzuleiten und Einblicke in die pathophysiologischen Abläufe bei Entzündung und Tumorgeschehen unter Betrachtung der Plasminogenspaltprodukte in Korrelation zu anderen Parametern zu gewinnen.

In Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß unter dem Einfluß von aktivierten polymorph-nukleären Neutrophilen Miniplasminogen aus Plasminogen generiert wird. Von den potentiell an der Proteolyse beteiligten Enzymen konnte *in vitro* nur bei dem Einsatz von PMN-Elastase Miniplasminogen nachgewiesen werden, nicht jedoch von MMP-2, -8 und -9.

In Untersuchungen zur Stabilität von Miniplasminogen unter verschiedenen Blutabnahmebedingungen waren Citrat-Proben den anderen Systemen (EDTA-Plasma, Serum) überlegen. In Proben von gesunden Probanden konnte in keinem Fall Miniplasminogen über der Nachweisgrenze des ELISAs gemessen werden.

Es wurden Proben aus klinischen Studien zu Sepsis, Peritonitis und Mammakarzinom ausgewählt, die auf Grund einer hohen PMN-Elastase-Konzentration ein Entstehen von Miniplasminogen erwarten lassen konnten.

Ein Ausscheiden von Miniplasminogen über die Niere konnte durch Messungen im Urin ausgeschlossen werden.

In Citratplasma-Proben von Peritonitispatienten war kein Miniplasminogen nachweisbar, in Peritonitisexsudaten desselben Patientenkollektivs waren Miniplasminogenwerte bis 90 ng/ml meßbar. Es zeigte sich allerdings keine Korrelation zu anderen Parametern (Elastase-Konzentration, Plasminogenkonzentration). Signifikante Unterschiede der Miniplasminogenkonzentrationen konnten zwischen den Mittelwerten der Proben der Patientengruppe, bei der therapeutisch Fresh-Frozen-Plasma intraabdominell appliziert wurde, und der Kontrollgruppe, sowie zwischen den Gruppen mit und ohne Tumorerkrankung nachgewiesen werden.

Bei der Evaluierung von Serumproben aus einem Mammakarzinom-Kollektiv wurden Werte bis 52 ng/ml gemessen. Eine Korrelation mit anderen Parametern oder signifikante Unterschiede in den verschiedenen Subgruppen konnten auch hier nicht gezeigt werden.

Ein Zusammenhang zwischen der proteolytischen Kapazität in den Exsudaten und der MPiG-Entstehung ließ sich nicht zweifelsfrei beweisen. MPiG ist daher – im Gegensatz zu dem Elastase-spezifischen Spaltprodukt des Fibrinogens (FEP) (Gippner-Steppert, 1991) - als ein spezifisches Spaltprodukt des PiG nicht für den indirekten Nachweis der proteolytischen Aktivität der PMN-Elastase geeignet.

Erfolgversprechend könnten ggf. immunhistochemische Untersuchungen von Tumormaterial in Hinblick auf das lokale Entstehen von Miniplasminogen sein.

B Einleitung

B.1 Plasminogenaktivierung unter physiologischen Bedingungen

Plasmin (Pln), das aktivierte Plasminogen (Plg), ist der wichtigste Faktor für die Auflösung von Blutgerinnseln.

Nach Unterbrechung der Endothelkontinuität durch Verletzung der Gefäßwand kommt es zur raschen Bildung eines Blutgerinnsels, wodurch eine Blutung zum Stillstand gebracht werden kann. Dabei spielen sowohl Zellen, wie das Endothel und die Thrombozyten, als auch humorale und physikalische Faktoren, wie z. B. Gerinnungsproteasen und die Strömungsgeschwindigkeit des Blutes zusammen. Dieses komplexe System wird Hämostase genannt (Abb. 1).

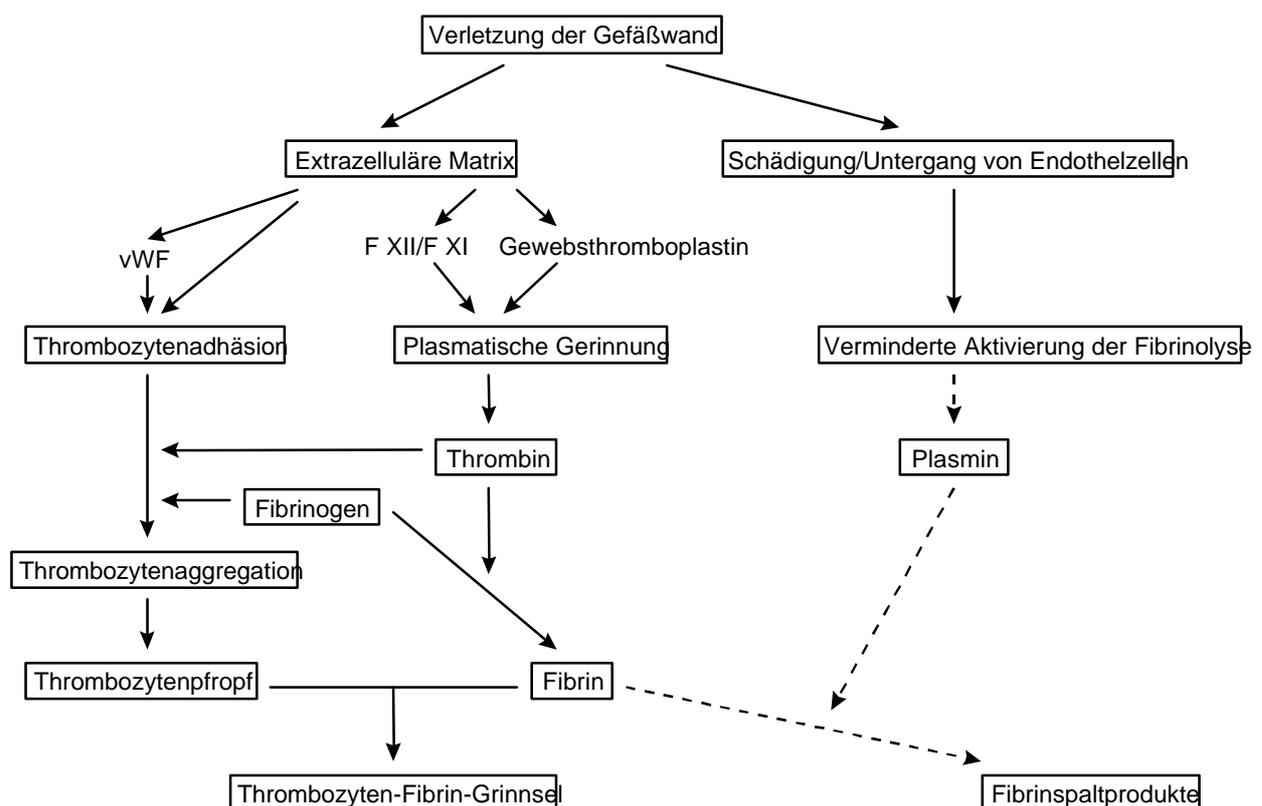


Abb. 1 Schema der Hämostase von Willebrand-Faktor (vWF) (nach Kraus, 1998)

Unter Fibrinolyse versteht man die enzymatische Degradation eines Fibringerinnsels. Sie dient unter physiologischen Bedingungen dazu, die

Gerinnungsbildung örtlich zu begrenzen und das Gerinnsel wieder aufzulösen, wenn dieses seine Rolle im Rahmen der Reparaturvorgänge erfüllt hat. Der Beginn der Aktivierung des Fibrinolyse-Systems ist identisch mit der Auslösung der intrinsischen Gerinnung über Präkallikrein zu Kallikrein unter Beteiligung von hochmolekularem Kininogen (HMK) und Faktor XIIa. Kallikrein kann durch Aktivierung von Plasminogen-Proaktivator zu Plasminogen-Aktivator Plg indirekt in Pln umwandeln, aber auch über Aktivierung der Urokinase (u-PA) den extrinsischen Weg der Plasminogenaktivierung beeinflussen. Damit stehen Gerinnung und Fibrinolyse in einem Gleichgewicht, das bei Überwiegen einer Seite schwerwiegende Folgen für den gesamten Organismus nach sich ziehen kann.

B.1.1 Aktivierungswege von Plasminogen zu Plasmin und deren Regulation

Den wichtigsten, fibrinolytischen Faktor stellt das Pln dar, das in seiner inaktiven Vorstufe als Plg in einer Konzentration von 60 - 250 mg/l (2,1 µmol/l) im Plasma vorliegt (Kraus, 1998). Das Zymogen Plg wird, wie viele Gerinnungsfaktoren auch, in den Hepatozyten synthetisiert. Neben der Funktion in der Fibrinolyse spielt Pln eine wichtige Rolle bei verschiedenen physiologischen und pathologischen Vorgängen, wie z. B. Remodelling der extrazellulären Matrix (Bikfalvi, 1995), Angiogenese (Bussolino et al., 1997; Bikfalvi, 1995), Tumorinvasion oder entzündliche Erkrankungen.

B.1.1.1 Struktur des Plasminogen und Konformationsänderung bei Aktivierung zu Plasmin

Humanes Plg ist ein Polypeptid, das sich aus 790 Aminosäureresten zusammensetzt und eine Molekülmasse von 92 kD aufweist (Abb.2).

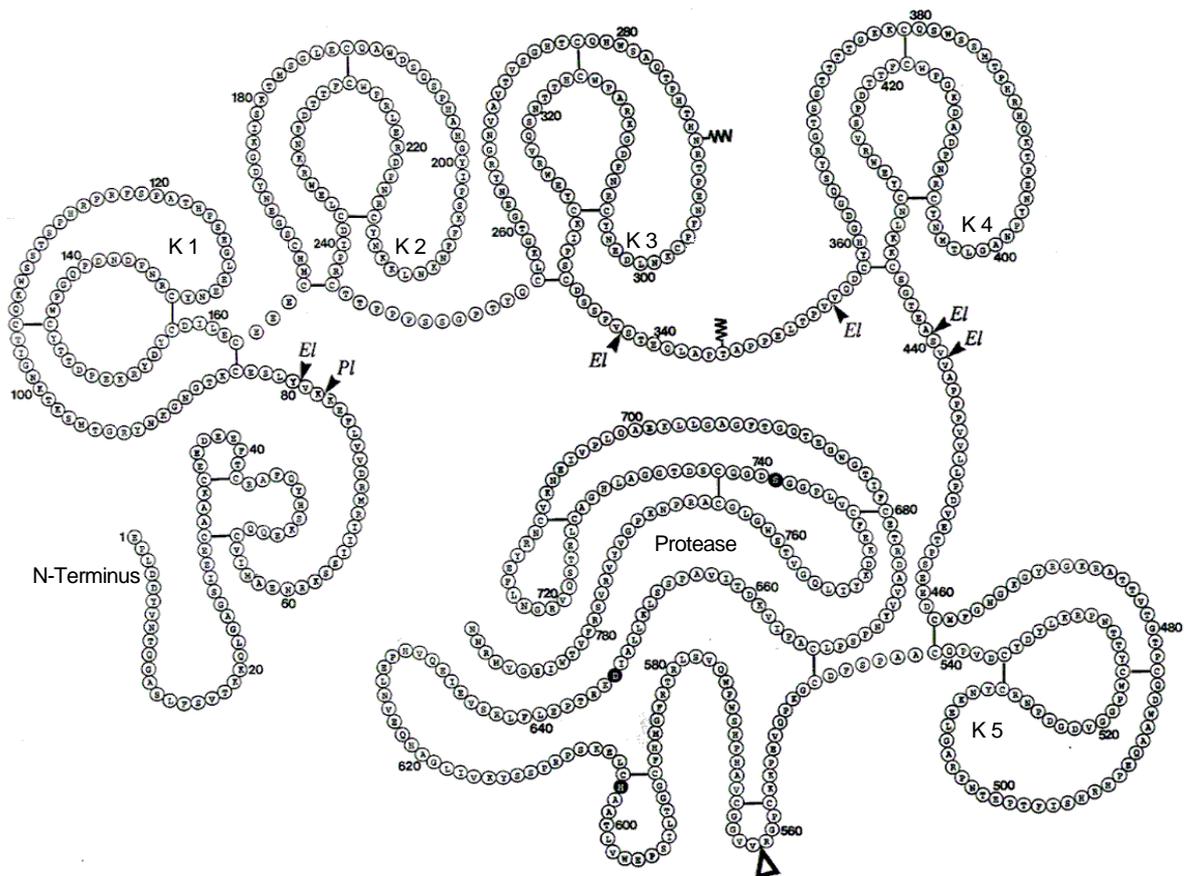


Abb. 2 Primärstruktur des Plg
 Glykolisierungen (ξ), autokatalytischer Spaltstelle (**PI**), Spaltstellen der Elastase (**EI**),
 Spaltstelle für Aktivierung (∇), Aminosäuren des aktiven Zentrums (ausgefüllte Kreise).
 (nach Llinas, 1997)

Die Tertiärstruktur des Plg wird durch 22 Disulfidbrücken und 2 Kohlenhydratseitenketten bestimmt. Von Plg sind zwei Hauptformen (I und II) bekannt, die sich an Hand ihrer Glykolisierung unterscheiden lassen : Bei Plg II ist ein 3- oder 4-fach Zucker an Thr₃₄₅ O-glykosidisch gekoppelt, bei Plg I sind zusätzlich 10 oder 11 Monosaccharide an Asn₂₈₈ N-glykosidisch gebunden (Abb. 2). Beide Glykoformen differieren geringfügig in der Konformation ihrer Kringel (s. u.), wobei Plg I eine höhere Aktivierungsrate als Plg II aufweist (Molgaard et al., 1997).

Plg kommt auch in einer um etwa 70 Aminosäuren verkürzten Version vor. Diese entsteht mittels Autokatalyse durch Pln und wird Lys-Plg genannt (Namengebung nach der Aminosäure, die das neue N-terminale Ende bildet), im Gegensatz zum ursprünglichen Glu-Plg. Diese Reaktion kann auch als

positive Rückkoppelung aufgefaßt werden, da Lys-Plg schneller aktiviert wird als Glu-Plg.

Die Aktivierung von Plg zu Pln erfolgt durch die hydrolytische Spaltung der Bindung zwischen Arg₅₆₀ und Val₅₆₁. Dadurch entstehen zwei Ketten, eine schwerere A-Kette und eine leichtere B-Kette, die über zwei Disulfid-Brücken miteinander verbunden sind. Diese Spaltung führt zu einer Konformationsänderung, so daß in der B-Kette die Aminosäuren His₆₀₂, Asp₆₄₅ und Ser₇₄₀, die das proteolytische Zentrum bilden, eine für Serin-Proteasen typische Konstellation einnehmen können.

Die schwere Kette weist 5 homologe Abschnitte auf, die entsprechend ihrer Konformation Kringel genannt werden. Jeder dieser Kringel umfaßt etwa 80 Aminosäuren und wird durch jeweils 2 Disulfidbrücken stabilisiert (Abb. 2). Durch Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern, die an diese Kringel binden und blockieren können (Holvoet et al., 1986) und an isolierten Kringeln (Chang et al., 1998) konnte gezeigt werden, daß diese Regionen Lysinreste bzw. dessen Derivate, wie z. B. ϵ -Aminocaprinsäure, binden können. Diese sogenannten Lysinbindungsstellen (LBS) vermitteln den Kontakt zu Substraten, Plasminogen-Aktivatoren und -Inhibitoren, was in Studien mit LBS-blockierenden Antikörpern nachgewiesen werden konnte (Church & Messier, 1991). Insbesondere konnte eine Affinität zu Lysinresten für die Kringel 1, 4, 5 nachgewiesen werden. Für Kringel 2 scheint dies nicht zuzutreffen (Castellino & McCance, 1997). Insgesamt konnten 6 LBS identifiziert werden, die unterschiedliche Affinität besitzen. So weist eine LBS, die auf K1 lokalisiert ist, eine doppelt so hohe Affinität ($K_D \sim 2 \mu\text{M}$) zu ϵ -Aminocaprinsäure auf, wie die übrigen LBS ($K_D \sim 5 \mu\text{M}$). Entscheidend für diese Wechselwirkung scheinen die hydrophoben Eigenschaften der in diesen Regionen gelegenen Tryptophan- und Thyrosin-Reste zu sein (Chang et al., 1998; Rejante et al., 1991). Die Affinität dieser LBS zu carboxyterminalen Lysinresten ist dabei besonders hoch. Vermittelt durch die Kringeldomänen bindet Plg an Fibrin, Histidinreiches Glykoprotein, Tetranektin, Thrombospondin, extrazelluläre Matrix (Stack et al., 1992) und vor allem auch an den wichtigsten Pln-Inhibitor, α_2 -Antiplasmin.

B.1.1.2 Aktivierung durch Urokinase

Urokinase (u-PA) wird in einer einkettigen Form als Zymogen Prourokinase (scu-PA) von Epithelzellen des Nierentubulussystems exprimiert und daher in hoher Konzentration im Urin gefunden. Stimulierte Endothelzellen sezernieren scu-PA vor allem nach kontraluminal. Auch Monozyten bilden scu-PA in großen Mengen. scu-PA wird durch Pln oder durch Kallikrein zur aktiven, zweikettigen Form, der u-PA, gespalten. Die Serinprotease u-PA, die eine sehr hohe Substratspezifität aufweist, aktiviert Plg durch Hydrolyse der Bindung zwischen Arg₅₆₀ und Val₅₆₁. (s. Abb. 2).

scu-PA ist ebenfalls in der Lage, Plg durch die Spaltung an der selben Peptidbindung zu aktivieren. Dies erfolgt nach Anlagerung von scu-PA an Plg, die nicht über die LBS vermittelt wird (Lijnen et al., 1985). Obwohl u-PA nicht an Fibrin bindet, führt die Gegenwart von Fibrin zu einer erhöhten Aktivierungsrate von scu-PA.

Im Plasma wird u-PA nur in der einkettigen, inaktiven Form gefunden und aktivierter u-PA wird schnell durch im Überfluß vorhandenen Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) abgefangen. u-PA bindet mit hoher Affinität an spezifische Rezeptoren, die auf einer Vielzahl von Zellen, wie z. B. auf Endothelzellen und Monozyten, exprimiert werden (Abb. 3). Dies führt zu einem engen Kontakt von u-PA mit Plg, dessen Aktivierungsrate dadurch ansteigt (s. B1.1.5) und wodurch der u-PA selbst vor seiner Inaktivierung geschützt wird.

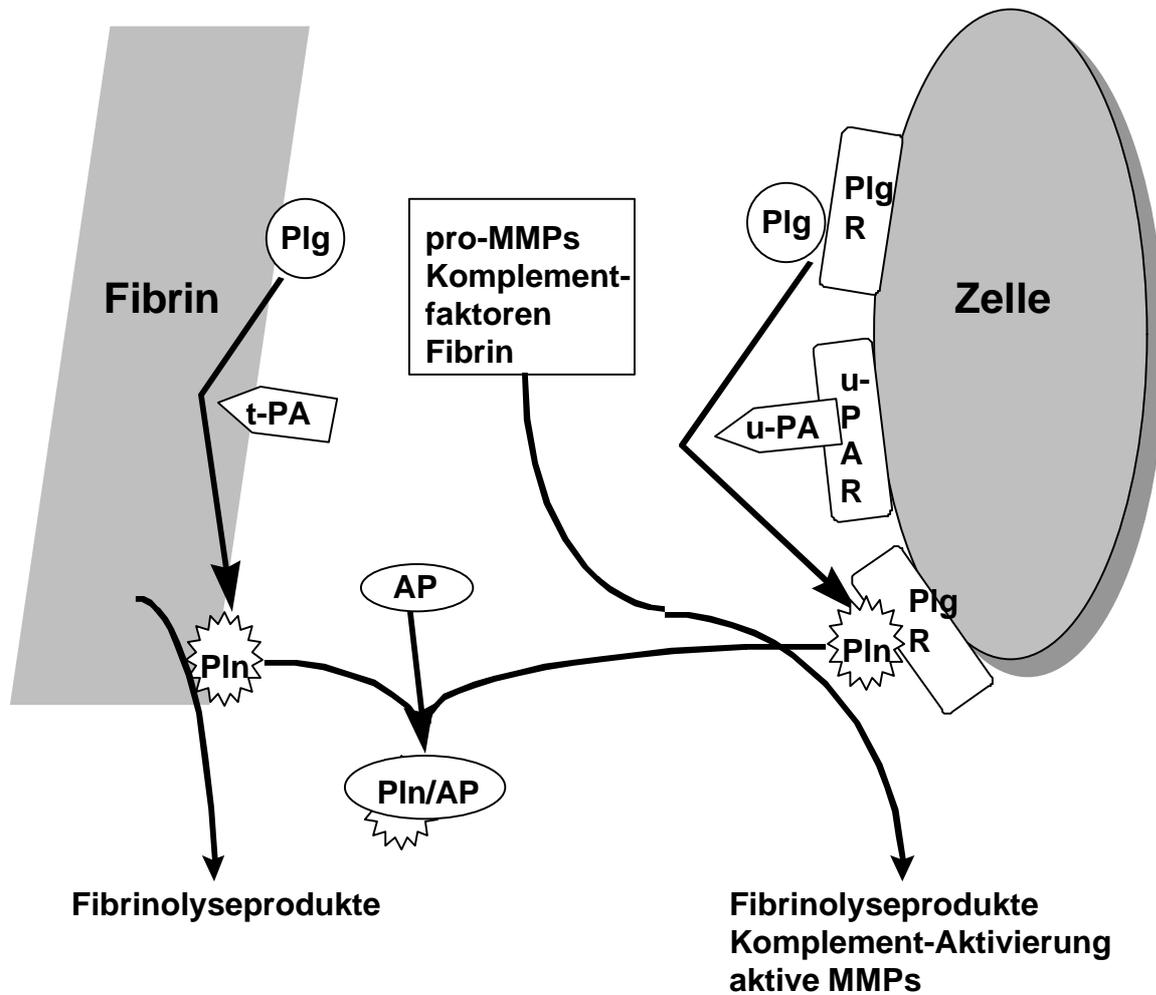


Abb. 3 Aktivierung von Plg
 Plasmin (Pln), α_1 -Antiplasmin (AP), Plg-Rezeptor (PlgR), tissue-type Plg-Aktivator (t-PA), Urokinase (u-PA), Urokinase-Rezeptor (u-PAR), Matrix-Metallo-Proteinase (MMP).

B.1.1.3 Aktivierung durch Gewebetyp-Plasminogen-Aktivator

Gewebetyp-Plasminogen-Aktivator (t-PA) wird in einer Basiskonzentration kontinuierlich von Endothelzellen sezerniert, ist aber tageszeitlichen sowie hormonellen und streßbedingten Schwankungen unterworfen. Dies führt zu einer basalen Aktivierung von Pln, die sich in einer geringen Konzentration an Fibrinspaltprodukten im Plasma ablesen läßt. Hypoxämie oder körperliche Anstrengung führen zu einer vermehrten Ausschüttung von t-PA. Ebenso steigern Thrombin und Faktor Xa die t-PA-Sekretion aus Endothelzellen. Wie u-PA wird auch t-PA als einkettige Form sezerniert und kann auch als "single-chain"-t-PA (sct-PA) Plg in das aktive Pln überführen. Die Konversion

von sct-PA erfolgt unter anderem durch Pln und kann durch Tranexamsäure verhindert werden (Takada & Takada, 1989). Im Plasma liegt t-PA zu 80% an PAI-1 gebunden vor. Die Aktivierung von Plg zu Pln durch t-PA erfolgt nach dem gleichen Prinzip wie bei u-PA. Diese Reaktion läuft in der löslichen Phase nur in sehr geringem Umfang ab, potenziert sich aber in der Gegenwart von Fibrinolyseprodukten (K_m verringert sich um den Faktor 400). Dieser Effekt ist nicht allein auf die räumliche Nähe von t-PA und Plg zurückzuführen, sondern wird auch durch eine Konformationsänderung des Plg nach Bindung an bestimmte Strukturelemente des Fibrinogen bedingt. (Angles-Cano, 1994; Dunn et al., 1984)

U-PA und t-PA sind wie Pln auch Serinproteasen, allerdings mit einer sehr viel höheren Substratspezifität, die nahezu ausschließlich Plg umfaßt. Eine Zusammenfassung der Aktivierung von Plg zeigt Abb. 3.

B.1.1.4 Aktivierung durch Streptokinase

Streptokinase wird von verschiedenen Stämmen grampositiver Kokken sezerniert. Im Gegensatz zu u-PA und t-PA besitzt Streptokinase keine eigene proteolytische Aktivität, sondern bildet mit Plasminogen einen äquimolaren Komplex, indem sie sich an die nicht abgespaltene B-Kette anlagert (Ullberg et al., 1989). Die dadurch entstehende Konformationsänderung bringt die entscheidenden Aminosäuren (Abb. 1) in die proteolytisch aktive Konstellation. In der Folge entsteht Pln, katalysiert durch den 1:1 Streptokinase-Plg-Komplex.

B.1.1.5 Bedeutung von biologischen Oberflächen bei der Aktivierung

Da in intakten Blutgefäßen der Blutstrom durch eine Fibringerinnung nicht gestört werden darf, stellt Fibrin einen der potentesten Stimuli der Aktivierung von Plg dar. Plg und t-PA binden sehr schnell an Fibrin und eine große Menge an aktivem Pln entsteht an der Fibrinoberfläche und steht somit lokal zur Auflösung der Gerinnsel zur Verfügung. Dabei scheint Kringel 5 für die Vermittlung der Bindung von Plg an Fibrin von Bedeutung zu sein, während die Kringel 1-4 auf die Konformationsänderung, die das niedrige K_m bewirkt, Einfluß nehmen (Wu et al., 1990). Eine sehr ähnliche Kringelstruktur enthält Apolipoprotein A, das eng mit dem Auftreten von Atherosklerose assoziiert ist. Dies hat zu der Annahme geführt, daß Apolipoprotein A Plg aus seiner Bindung an Oberflächen verdrängt und dadurch weniger Plg in Pln umgewandelt werden kann und somit für die Fibrinolyse geringere Mengen an Pln zur Verfügung stehen (Edelberg & Pizzo, 1991). Die abgespaltenen Fibrindegradationsprodukte hemmen im Sinne eines negativen Feedbacks die weitere Polymerisation von Fibrin und die Plättchenaggregation.

Von u-PA wird dagegen angenommen, daß er keinen so großen Einfluß auf die intravasale Auflösung von entstandenen Thromben hat, da sich auf einer Vielzahl von Zellen Rezeptoren für u-PA finden, die eine hohe Affinität zu diesem Plasminogen-Aktivator aufweisen. Plg bindet ebenfalls an Rezeptoren der Zelloberfläche, die allerdings nur sehr gering affin sind und eine breite Heterogenität aufweisen. Es scheinen die LBS der einzelnen Kringeldomänen eine wichtige Rolle bei der Bindung von Plg an Zelloberflächen zu haben, da identifizierte PlgR carboxyterminale Lysine aufweisen, wie z. B. die α -Enolase. Diese Bindung wird vor allem durch Kringel 5 vermittelt, wie Untersuchungen der Bindung von Miniplasminogen (MPlg), einem 38 kD Fragment aus Kringel 5 und der leichten Kette des Plg, zeigten (Wu et al., 1992). Durch ihre hohe Dichte auf der Zellmembran (bis zu 210×10^5 Rezeptoren/Endothelzelle) und die hohe Plg-Konzentration im Plasma ist von einer großen Menge an gebundenem Plg auszugehen. Die räumliche Nähe von gebundenem Plg und u-PA verstärkt die Aktivierungsrate von Plg zu Pln enorm und fixiertes Pln

aktiviert wiederum weiteres Plg (Plow et al., 1995; Pepper et al., 1996). Auf der Oberfläche vieler invasiver, pathogener Keime lassen sich Bindungsstellen für Plg nachweisen. Diese Bindung wird über die LBS der Kringle 1-3 vermittelt (Ullberg et al., 1989; Ullberg et al., 1992). Mit der Bindung von Plasmin auf ihrer Oberfläche umgehen die Erreger eine Inaktivierung von Plasmin durch ubiquitär vorkommende Ser-Proteinase-Inhibitoren (Serpine) (s. B.1.1.7.) und bewirken die Proteolyse der sie umgebenden Matrix (s. B.1.2.3.), was die Invasion der Keime ermöglicht.

B.1.1.6 Inhibitoren der Plasminogenaktivierung

Der wichtigste Inhibitor der Plasminogen-Aktivatoren ist Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1). PAI-1 wird von Endothelzellen, und Thrombozyten sezerniert, wobei das Endothel den größeren Anteil davon in den sub-endothelialen Raum freisetzt. Sowohl u-PA als auch t-PA werden von PAI-1 inhibiert, nicht jedoch scu-PA. Es kommt dabei zu einem stöchiometrischen 1:1-Komplex zwischen Aktivator und Inhibitor.

PAI-1 liegt im Plasma in seiner aktiven Form und im Vergleich zu den Aktivatoren in einem zweifachen molaren Überschuß (s. Tab. 1) vor, so daß unter physiologischen Bedingungen keine Aktivierung von Plg zu erwarten ist.

PAI-2 ist unter physiologischen Bedingungen im Blut nicht nachweisbar, es kommt jedoch während der Schwangerschaft zu einem meßbarem Konzentrationsanstieg in der Zirkulation. PAI-1 und PAI-2 gehören zu der Familie der Serpine.

Neben der direkten Hemmung der Plg-Aktivatoren kann die Pln-Generierung auch durch die Blockierung der Interaktion zwischen Plg und seinen Aktivatoren verhindert werden. Zu nennen sind vor allem der C1-Inhibitor, der die LBS des Plg besetzt, und dadurch die Interaktion zwischen Plg und Aktivator reduziert. Auf die selbe Weise inhibieren auch die Faktoren XIIa, XIa und Kallikrein, sowie das Histidin-reiche Glykoprotein die Aktivierung von Plg.

Name	Abkürzung	Molekulargewicht [kD]	Plasmakonzentration [nmol/l]
Plasminogen	Plg	92	2170
Gewebe- Plasminogen- Aktivator	t-PA	68	0,07
Pro-Urokinase	Pro-u-PA	54	0,04
α_2 -Antiplasmin	α_2 AP	70	1000
Plasminogen- Aktivator-Inhibitor Typ-1	PAI-1	52	0,2
Typ-2	PAI-2	60	0

Tab. 1 Komponenten des Fibrinolyse-Systems (nach Müller-Berghaus, 1998)

Hingegen fördert an Oberflächen gebundenes Histidin-reiches Glykoprotein die Aktivierung von Plg durch t-PA durch die Herstellung räumlicher Nähe zwischen Plg und t-PA, ähnlich wie Fibrin (Borza & Morgan, 1997). Neuere Arbeiten berichten auch über eine beschleunigte Aktivierung von Plg durch t-PA nach einer Bindung an die Komplementfaktoren C7 und C9 des Membran-attackierenden Komplexes C5b-9. Diese Bindung sei durch ϵ -Amino-capronsäure oder Tranexamsäure inhibierbar, was auf eine Interaktion mit den LBS hinweist (Christiansen et al., 1997; Reinartz et al., 1995). Darüber hinaus gibt eine Reihe von synthetischen Lysin-Analoga wie z. B. ϵ -Amino-capronsäure oder Tranexamsäure, die durch Besetzung der LBS eine Aktivierung von Plg verhindern. Diese Substanzen werden zum Teil bei der Hyperfibrinolyse mit therapeutischem Nutzen eingesetzt.

B.1.1.7 Stabilität und Inhibition von aktivem Plasmin

Pln stellt aufgrund seiner geringen Substratspezifität (s. B.1.2.1.) in ungebundener Form eine Gefahr für die Integrität der Gefäßwand wie der extrazellulären Matrix dar. Deshalb stehen im Plasma verschiedene Inhibitoren zur Verfügung. Der wichtigste unter ihnen ist α_2 -Antiplasmin (α_2 AP), das in der Zirkulation mit einer Konzentration von $1\mu\text{mol/l}$ vorkommt (s. a. Tab. 1). Es inaktiviert Pln, indem es einen äquimolaren, kovalenten Komplex mit dieser Serinprotease eingeht. Diese Reaktion läuft mit einer halbmaximalen Inhibierungsgeschwindigkeit von 0,1 s ab und ist damit die schnellste Neutralisierungsreaktion einer Protease durch ihren Inhibitor, die bis jetzt bekannt ist. α_2 AP wird von Faktor XIIIa an Fibrin quervernetzt, was einen Schutz für über längere Zeit bestehende Gerinnsel bedeutet, die bei Gefäßverletzungen entstehen können. Die Interaktion von Pln und α_2 AP kann durch Lysin-Analoga abgeschwächt werden.

Einen weiteren Inhibitor der fibrinolytischen Aktivität von Pln stellt α_2 -Makroglobulin (α_2 M) dar. Die Reaktion läuft aber langsamer ab als bei α_2 AP und ist nicht so spezifisch. Komponenten der plasmatischen Gerinnung werden dabei ebenfalls inaktiviert.

B.1.2 Bedeutung von Plasmin in physiologischen Prozessen

Wenngleich Pln bei der Auflösung von Blutgerinnseln mit die wichtigste Rolle spielt, ist es an einer Vielzahl weiterer zellulärer Mechanismen beteiligt, wie z. B. an der Zellmigration sowie bei der Aktivierung von Makrophagen oder von Proteasen.

B.1.2.1 Substratspezifität von Plasmin

Pln ist eine Serinprotease mit einer sehr geringen Substratspezifität. Eine hervorragende Rolle spielt die proteolytische Aktivität des Pln bei der Thrombolyse. Es konnte aber auch gezeigt werden, daß extrazelluläre Matrixproteine von Pln aufgeschlossen werden, wie z. B. Kollagen, Elastin, Fibronectin, Laminin oder Vitronectin (Saksela & Rifkin, 1988). Außerdem ist die Aktivierung von Vorstufen der Matrix-Metallo-Proteinasen (pro-MMP) durch Pln beschrieben worden (Henkin et al., 1991).

B.1.2.2 Fibrinolyse

Quervernetztes, unlösliches Fibrin ist für Pln unter physiologischen Bedingungen das vorrangige Substrat. Nach der Aktivierung von Thrombin über die gemeinsame Endstrecke der plasmatischen Gerinnung entsteht durch Abspaltung der Fibrinopeptide A und B aus Fibrinogen das noch lösliche Fibrinmonomer. Unter Ausbildung eines regelmäßigen Fibringerüsts aggregieren die Fibrinmonomere auf Grund von elektrischen Wechselwirkungen. Die Stabilisierung zu unlöslichem Fibrin erfolgt durch Verknüpfung zuerst zwischen den γ - und später zwischen den α -Ketten des Fibrinmoleküls. Diese peptid-ähnlichen Bindungen werden durch Faktor XIIIa hergestellt.

Bei der Auflösung eines derartig vernetzten Fibringerinnsels durch Pln werden verschiedene Spaltprodukte freigesetzt, in denen als gemeinsames Strukturelement D-Dimer enthalten ist. Tritt Pln im Überschuß auf, so kommt es auch zur Proteolyse von Fibrinogen. Dabei hydrolysiert Plasmin bevorzugt an Arginyl- oder Lysinyl-Resten. Insgesamt sind ungefähr 60 Positionen bekannt,

an denen Plasmin Fibrinogen spalten kann (Gaffney, 1971; Mihalyi et al., 1976).

B.1.2.3. Angiogenese

Der Vorgang der Aussprossung von Gefäßen aus einem vorbestehenden Gefäßlumen wird durch den Begriff Angiogenese beschrieben. Sie ist ein Beispiel für ein ausgeglichenes Zusammenspiel zwischen extrazellulärer Proteolyse und deren Inhibition. Angiogenese stellt eine unabdingbare Voraussetzung für Wachstum und Reproduktionszyklus dar. Eine effektive Wundheilung ist ohne Einsprossung von neuen Gefäßen in das Wundbett nicht denkbar. So kann die Sauerstoffversorgung in einem Gewebe durch eine höhere Gefäßdichte verbessert werden, die durch Aussprossung neuer Gefäße erzielt wird. Induziert wird diese Neubildung von Gefäßen durch bestimmte lösliche Faktoren, vor allem durch basic Fibroblast-Growth-Faktor (bFGF) und Vascular-Endothelial-Growth-Faktor (VEGF). Bei unkontrollierter Zellteilung, wie z. B. unter Bedingungen des Tumorwachstums, wird die wachsende Gewebemasse unweigerlich den Punkt erreichen, an der es zu einer Unterversorgung mit Sauerstoff kommt und somit an die Grenze des Wachstums, die ohne eine Neubildung der Infrastruktur des Gewebes, also der Gefäßversorgung, nicht überschritten werden kann.

Die Angiogenese startet mit einem begrenzten Untergang der Basalmembran durch Proteolyse ihrer Bestandteile, gefolgt von der Auswanderung von Endothelzellen aus dem Gefäßlumen. Anschließend proliferieren diese Zellen in die sie umgebenden Matrix und bilden ein neues Lumen. Die Proteolyse der extrazellulären Matrix wird von zahlreichen Proteasen geleistet, wobei insbesondere das Plasminogen-Aktivatoren/Pln-System sowie die Elastase der neutrophilen Granulozyten und die Matrix-Metallo-Proteinasen (MMP) eine Rolle spielen.

Die Bedeutung des Plasminogen-Aktivatoren/Pln-Systems für die Angiogenese wird schon lange untersucht, ausgehend von der Beobachtung einer fibrinolytischen Aktivität in der Umgebung von sich neu bildenden Gefäßen in Fibrin-

gerinnenseln (Clark et al., 1998; Kwaan & Astrup, 1969). Eine extravasale Fibrinansammlung kann Ausdruck einer Verletzung sein oder Folge einer Hyperpermeabilität, wie man sie bei Entzündung oder Tumorgeschehen findet.

Entscheidend für die Ausformung eines Gefäßes scheint die lokale Begrenzung der Proteolyse zu sein, wie *in vitro*-Untersuchungen nahe legen. So wachsen stimulierte Endothelzellen, die auf einem Fibringel aufgebracht wurden, in Gegenwart eines unspezifischen Serinproteinaseinhibitors wie Aprotinin in Form von Kapillaren, während sie ohne Inhibitor das gesamte Gel auflösen. Eine ähnliche Beobachtung machte man an Hand eines *in vitro*-Endothelium-Modells. Transfizierte Zellen exprimierten im Gegensatz zu unbehandelten Zellen ein Übermaß an u-PA bei verringerter PAI-1-Expression, was zur Formation von Zysten-ähnlichen Hohlräumen im Fibringel führte. Nach der Zugabe von Aprotinin oder α_2 AP zum Ansatz wuchsen die Zellen wie im Rahmen der physiologischen Angiogenese. Die selbe Beobachtung konnte nach der Zugabe von blockierenden Antikörpern gegen u-PA gemacht werden (Pepper et al., 1996; Montesano et al., 1990). Diese Befunde lassen erkennen, wie wichtig eine lokal begrenzte Proteolyse für die Angiogenese ist.

B.2 Plasminogenaktivierung unter pathophysiologischen Bedingungen

Unter pathologischen Bedingungen können die oben beschriebenen Vorgänge aus dem Gleichgewicht geraten, was zu schweren Folgen führen kann.

B.2.1 Einfluß von Proteasen auf Entzündungs- und Tumorgeschehen

Deutlich sichtbar wird der schädigende Einfluß von Proteasen bei Fehlen eines entsprechend potenten Inhibitors, wie dies z. B. bei einem Mangel an α_1 PI der Fall ist. α_1 PI ist der Archetyp der Serpine und der bedeutendste Inhibitor von Elastase, Cathepsin G und Proteinase 3 aus neutrophilen Granulozyten. Bei Patienten mit einem Nullphenotyp entwickelt sich im Alter zwischen 20 und 30 Jahren ein Lungenemphysem, das auf die freie, proteolytische Aktivität lysosomaler Proteasen auf neutrophilen Granulozyten zurückgeführt werden kann. Die gleiche Schädigung des Lungengerüsts kann in Versuchstieren herbeigeführt werden, indem man hohe Dosen freier Elastase endotracheal verabreicht (Hautamaki et al., 1997). Es wird angenommen, daß die Pathogenese der Lungengerüstveränderungen auf der Degradation von elastischen Fasern und damit der Zerstörung von Alveolarsepten beruht (Brantly et al., 1997; Perlmutter, 1998). Es wurde auch von einer Mutation berichtet, wo durch Austausch von nur einer Aminosäure (Met durch Arg an Position 358) aus α_1 -Antitrypsin, einem Elastase-Inhibitor, ein heparin-unabhängiger Thrombin-Inhibitor entsteht, der Ursache für das Auftreten rezidivierender Blutungen ist (Owen et al., 1983).

Während schwerer Entzündungsvorgänge (z. B. Multiorganversagen nach Polytrauma, Sepsis, Peritonitis) kommt es zur Ausschüttung verschiedener Mediatoren und Effektoren. Die Stellung der freigesetzten humoralen und zellulären Proteasen in diesen Vorgängen ist Gegenstand intensiver Untersuchungen (Jochum et al., 1999). Von einigen Proteasen der humoralen Kaskadensysteme ist bekannt, daß sie unter unzureichender Inhibition durch die Bildung von zusätzlichen Entzündungsmediatoren das Geschehen unterhalten und ausweiten können. Dazu gehören proinflammatorische

Zytokine, vasoaktive Kinine, Arachidonsäurederivate, gerinnungshemmende und die Ödembildung fördernde Fibrinmonomere und -peptide sowie anaphylatisch wirksame Komplementfaktoren (C3a, C4s, C5a). Einige dieser Proteasen sind an der Chemotaxis beteiligt, indem die selber chemotaktische Eigenschaften besitzen, oder diese über die proteolytische Freisetzung von Proteinfragmenten (Fibrin- und Fibronektinspaltprodukte) vermitteln (Jochum et al., 1994; Redl et al., 1994).

Primäre Entzündungszellen wie Neutrophile und Monozyten/Makrophagen dienen der Phagozytose von proinflammatorischen, partikulären Stimuli, wobei sie während dieses Vorgangs neben Sauerstoffradikalen auch große Mengen an Proteasen in das extrazelluläre Milieu sezernieren. Bei moderatem Verlauf einer Entzündung wird die Aktivität der proteolytisch und oxidativ wirksamen Faktoren von Proteinaseinhibitoren und Antioxidantien abgefangen. Überschießende oder persistierende Entzündungsprozesse bergen jedoch die Gefahr einer lokalen Erschöpfung der endogenen Schutzmechanismen infolge der massiven oder anhaltenden Freisetzung lysosomaler Inhaltsstoffe. So sind insbesondere die unspezifisch wirksamen Serinproteinasen Elastase und Cathepsin G aus Granulozyten beziehungsweise die Cysteinproteinasen Cathepsin B und L aus Monozyten und Makrophagen potentiell für den Verlust von antiproteolytischer Aktivität verantwortlich, weil sie zahlreiche Inhibitoren durch Proteolyse inaktivieren können. Kann freie Enzymaktivität nicht mehr neutralisiert werden, führt dies zu massiven Schädigungen von weiteren humoralen und strukturellen Proteinen und in der Folge zu einer Perpetuierung des Entzündungsgeschehens. Der Nachweis von Fragmenten von Immunglobulin-G, Komplementfaktor C3 und Fibrinogen in peritonealen Exsudatproben von Peritonitispatienten sprechen für diese Annahme (Jochum et al., 1999; Gippner-Steppert, 1991).

Auch bei invasivem Tumorwachstum bedienen sich die entarteten Zellen proteolytischer Systeme. Um in das sie umgebende Stroma einwandern oder wie bei Karzinomen die Basalmembran durchbrechen zu können, ist eine kontrollierte Degradation der extrazellulären Matrix notwendig. Eine Reihe von Proteinasesystemen konnte bei invasivem Tumorwachstum nachgewiesen

werden. So zeigte sich bei invasiven Brusttumoren eine im Vergleich zu gutartigen Geschwulsten erhöhte Plg-Expression, die sich in den Bereichen invasivem Wachstums konzentrierte (Clavel et al., 1986). Ebenso ist eine vermehrte Expression von Proteasen aus der Familie der MMPs zu beobachten, die eng mit der Tumorinvasion und Metastasierung assoziiert ist (Westermarck & Kahari, 1999). Darüber hinaus wurde auch eine Assoziation von Aspartat- oder Cysteinproteinasen mit Tumorzellinvasion beschrieben.

B.2.1.1 Die Serinprotease Elastase aus neutrophilen Granulozyten

Der Elastase aus polymorph-nukleären Granulozyten (PMN-Elastase), die im Vergleich zu Cathepsin B und L in phagozytierenden Zellen in deutlich höherer Konzentration vorliegt (3-5 $\mu\text{g}/10^6$ Zellen), kommt im Entzündungsprozeß besondere Bedeutung zu (Jochum et al., 1994). Die verschiedenen Elastasen bilden eine Enzymfamilie, die sich durch ihre Eigenschaft, Elastin in lösliche Fragmente zu spalten, definiert sind und deren Vertreter auch in Pankreas, Leber, Aorta, Haut, Thrombozyten, Makrophagen sowie in Schlangengiften und einigen Mikroorganismen gefunden werden. Bis auf wenige Ausnahmen (Elastasen aus Makrophagen, s. B.2.1.2., und Mikroorganismen) sind alle Elastasen Serinproteinasen, die sich in ihren physikochemischen Eigenschaften unterscheiden (Bieth et al., 1968).

Die PMN-Elastase, die im inflammatorischen Geschehen eine herausragende Rolle spielt, ist ein einkettiges Glykoprotein mit einer Molekülmasse von ungefähr 30 kD. Aufgrund ihrer stark basischen Eigenschaften (isoelektrischer Punkt bei pH 10-11) bindet sie an Membranen oder andere Oberflächen mit negativer Ladung. Unter Berücksichtigung des unterschiedlichen Kohlenhydratgehalts lassen sich mehrere Isoenzyme unterscheiden, die allerdings in Proteinstruktur und Katalysemechanismus identisch sind.

Als vergleichsweise unspezifische Protease kann PMN-Elastase eine Vielzahl von Substraten spalten, zu denen sowohl Strukturproteine als auch Plasmaproteine zählen. Neben Elastin werden weitere Gewebeproteine der extrazellulären Matrix wie Kollagen, Proteoglykane und Fibronectin von Elas-

tase in vitro aufgeschlossen. Zu den humoralen Proteinsubstraten zählen Immunglobuline (IgG, IgM), Komplementfaktoren (C1-C5, C9), Gerinnungs- und Fibrinolysefaktoren (II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, Fibrin(ogen), Plasminogen), Proteinaseinhibitoren (α_2 -Makroglobulin, Antithrombin III, α_2 -Plasmininhibitor, α_1 -Antichymotrypsin, C1-Inaktivator, Inter- α -Trypsininhibitor) sowie weitere Proteine (Kinin(ogen), Ovalbumin, Insulin, Kollagenase, Gelatinase, Plasma-Lipoprotein, Transferrin). Selbst die Proteolyse von Zellen (Thrombozyten, Epithel- und Endothelzellen, B-Lymphozyten, Monozyten) wurde in vitro beobachtet (Jochum et al., 1994).

Als primärer, physiologischer Hemmstoff der Elastase gilt der α_1 -Proteinase-Inhibitor (α_1 PI), der nicht nur in der Zirkulation in hoher Konzentration (50 μ M) vorliegt, sondern auch in interstitiellen Flüssigkeiten, im Alveolarraum und in mukösen Sekreten gefunden wird. Die Bindung an das aktive Zentrum der Elastase hat irreversiblen Charakter. Durch die lysosomalen Cysteinproteinasen Cathepsin B und K kann α_1 PI gespalten und inaktiviert werden. Eine Oxidation von Met₃₅₈ zu Methioninsulfoxid im aktiven Zentrum des α_1 PI führt ebenfalls zu einem Verlust an inhibitorischer Potenz. Als Oxidantien kommen dabei Sauerstoffradikale beziehungsweise Wasserstoffperoxid und Chloridionen in der Gegenwart von Myeloperoxidase in Frage, wie sie während des "respiratory burst" von Granulozyten auftreten.

Ein weiterer, wichtiger Inhibitor der Elastase im Plasma ist α_2 -Makroglobulin (α_2 M), das ein bis zwei Enzymmoleküle durch Einschluß in seine käfigartige Struktur an der Umsetzung von Makromolekülen hindern kann, während Peptide von geringerer Molekularmasse noch gespalten werden (Gippner-Stepert, 1991; McRae et al., 1980).

Die hohe intrazelluläre Konzentration, eine geringe Substratspezifität und die potentielle oxidative und proteolytische Inaktivierung von α_1 PI sind Eigenschaften, die eine herausragende Bedeutung der PMN-Elastase für den Entzündungsprozeß nahelegen. Verschiedene klinische Studien (Jochum et al., 1994; Jochum et al., 1999; Nast-Kolb et al., 1997) konnten die destruktive Rolle der PMN-Elastase im Entzündungsgeschehen belegen. So wurde bei

Sepsis und nach Polytrauma parallel zum Anstieg der Elastasewerte eine Abnahme der Konzentrationen einer Reihe von Plasmaproteinen (z. B.: Antithrombin III, Faktor XIII, α_2 -Makroglobulin) beobachtet. Diese Proteine erwiesen sich *in vitro* als gute Substrate der Elastase (Jochum et al., 1994), so daß auch eine Spaltung *in vivo* durch PMN-Elastase als wahrscheinlich angenommen werden muß.

Beweisen läßt sich der elastolytische Abbau von Plasmaproteinen *in vivo* jedoch nur durch Nachweis von spezifischen Spaltprodukten und eine signifikante Korrelation zwischen den Konzentrationen an degradierender Elastase und entstandenen Fragmenten. Bisher war es möglich, Spaltprodukte von IgG und Komplement C3 in Exsudaten mit hohen Elastasekonzentrationen nachzuweisen (Billing et al., 1991; Jochum et al., 1999). Das Auftreten der Fragmente konnte allerdings nicht eindeutig auf die alleinige proteolytische Aktivität der PMN-Elastase zurückgeführt werden, da das Testsystem weder eine nähere Charakterisierung der Spaltstellen noch die Untersuchung einer größeren Probenzahl zuließ. Es gibt aber einen hochspezifischen ELISA für den Nachweis eines Elastase-spezifischen Spaltproduktes der A α -Kette des Fibrinogens, das sog. Fibrinopeptid A α 1-21. Mit diesem Test war es möglich, dieses Fibrinopeptid in systemischen und lokalen Körperflüssigkeiten von Peritonitis-, Sepsis- und Polytraumapatienten in Korrelation zur extrazellulären Freisetzung der PMN-Elastase und zum Schweregrad der Entzündung nachzuweisen. Damit konnte die Hypothese von der proinflammatorischen, proteolytischen Wirkung der PMN-Elastase auf das Gerinnungssystem *in vivo* erhärtet werden (Jochum et al., 1999) (Gippner-Steppert, 1991).

Obwohl bereits ein Prototyp eines hochspezifischen ELISAs für das Elastase-induziertes Fragment des Plg, das sog. Val₄₄₂-Plg oder MPlg, entwickelt wurde, sind Untersuchungen bezüglich des Einflusses der Elastase auf das Fibrinolyse-system bei schweren Entzündungsprozessen bisher nur punktuell durchgeführt worden (Borst M, 1994). Entsprechende Daten sollten deshalb im Rahmen dieser Promotionsarbeit erhoben werden.

B.2.1.2 Matrix-Metallo-Proteinasen

MMPs bilden eine Familie von Zink-abhängigen Enzymen, von denen bisher mehr als 24 verschiedene Endopeptidasen beim Menschen beschrieben wurden (Ravanti & Kahari, 2000). Zusammengenommen verfügen sie über ein sehr weites Substratspektrum, so daß sie nahezu alle Komponenten der extrazellulären Matrix wie Kollagene, Laminin oder Elastin abbauen können. Im Hinblick auf ihre Substratspezifität bzw. Lokalisation werden sie in Kollagenasen, Stromelysine, Gelatinasen/TypIV-Kollagenasen und membran-gebundene MMPs, sog. MT-MMPs, eingeteilt. Außer Stromelysin-3 (MMP-11) und der membranständigen MMP-14, die im Golgi-Apparat der Zelle aktiviert werden, werden alle übrigen MMPs als Zymogene sezerniert und im Extrazellularraum durch Proteolyse aktiviert.

Die Kollagenasen MMP-1, MMP-8 und MMP-13 sind für den proteolytischen Abbau der fibrillären Kollagene vom Typ I, II, III und V verantwortlich, die nach ihrer Spaltung schnell denaturieren und von anderen MMPs (Gelatinasen) weiter degradiert werden. Kollagenasen können immer dann nachgewiesen werden, wenn in der Umgebung ein hoher Umsatz an extrazellulärer Matrix stattfindet.

Stromelysin-1 (MMP-3) und -2 (MMP10) sowie Matrilysin (MMP-7) und die Metallo-Elastase aus Makrophagen (MMP-12) werden zur Subgruppe der Stromelysine zusammengefaßt, da sie sich durch eine besondere Spezifität für Bestandteile der Basalmembran wie Kollagen Typ IV und Fibronectin auszeichnen. Metallo-Elastase und Matrilysin können darüber hinaus auch Elastin proteolytisch abbauen.

Gelatinase A (MMP-2) und Gelatinase B (MMP-9) verdauen Gelatine, Laminin und Nidogen. Gelatinase B wird unter anderem von neutrophilen Granulozyten, aber auch in Tumorzellen gebildet (Westermarck & Kahari, 1999).

Die wichtigsten physiologischen Inhibitoren der MMPs sind die Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases (TIMPs), die mit hoher Affinität an die aktivierten Formen sämtlicher MMPs binden und deren Aktivität blockieren. Sie

bilden einen nicht-kovalenten, äquimolaren Komplex mit der MMP, indem sie sich an das aktive Zentrum der MMPs, der Zink-bindenden Domäne, anlagern. Bis jetzt sind 4 verschiedene TIMPs bekannt (TIMP-1, -2, -3, -4), wobei TIMP-1, -2 und -4 in löslicher Form sezerniert werden, TIMP-3 hingegen an ECM gebunden ist (Kleiner & Stetler-Stevenson, 1999).

Die Überwindung der Basalmembran durch Tumorzellen bedeutet den entscheidenden Schritt hin zum invasiven Tumorwachstum und zur Metastasierung. MMPs besitzen die Möglichkeit, die Komponenten der Basalmembran, vor allem Kollagen Typ IV, zu degradieren. Aber erst eine Veränderung in der Balance zwischen aktiven MMPs und TIMPs wird mit dem Durchbruch durch die Basalmembran in Zusammenhang gebracht (Ray & Stetler-Stevenson, 1994).

Die Bedeutung der MMPs auch hinsichtlich der Entstehung und Potenzierung entzündlicher Erkrankungen, wie z. B. rheumatoider Arthritis, ist zur Zeit Gegenstand sehr intensiver Untersuchungen. Die gegenwärtige Hypothese der Beteiligung von MMPs an verschiedenen destrukturierenden Prozessen kann somit erhärtet werden (Zucker et al., 1999).

B.2.2 Limitierte Proteolyse von Plasminogen durch Proteasen aus Entzündungs- und Tumorzellen

Die proteolytische Spaltung von Plg durch Pankreas-Elastase vom Schwein, mit definierten Spaltstellen zwischen Val₃₃₇ und Ser₃₃₈, Val₃₅₃ und Val₃₅₄, Ala₄₃₉ und Ser₄₄₀ sowie Val₄₄₁ und Val₄₄₂ ist seit längerem bekannt. Die dabei *in vitro* entstehenden Fragmente beinhalten Kringel 1-3, Kringel 1-4, Kringel 4 alleine und Kringel 5 mit der leichten Kette, auch als sog. MPlg bezeichnet (vgl. Abb. B.2) (Sottrup-Jensen et al., 1978). Über die Bedeutung dieser Spaltprodukte *in vivo* war bisher jedoch nur wenig bekannt.

B.2.2.1 Miniplasminogen

Miniplasminogen (MPlg), das aus Kringel 5 und der leichten Kette des Plg besteht, wird auch von der Elastase aus humanen Leukozyten aus Plg freigesetzt und besitzt ein Molekulargewicht von 38 000 Da (Moroz, 1981). Zwar verfügt MPlg mit Kringel 5 über eine LBS, deren Affinität zu den physiologischen Inhibitoren ist aber so schwach, daß eine Hemmung der proteolytischen Aktivität des aktiven Miniplasmins *in vitro* sehr viel langsamer erfolgt (Machovich & Owen, 1989). u-PA wie auch t-PA spalten MPlg schneller zu aktivem Miniplasmin, als dies bei Glu-Plg der Fall ist (Takada et al., 1988). Zu diesen Beobachtungen passen *in vivo* Untersuchungen zur fibrinolytischen Aktivität von Miniplasmin, die eine signifikant höhere Fibrinolyserate im Vergleich zu Lys-PIn zeigten. Allerdings führte die Zugabe von Heparin vor der Applikation von MPlg und Plasminogen-Aktivator zu einem Verlust der fibrinolytischen Aktivität von Miniplasmin (Burke et al., 1996). Aufgrund dieser Eigenschaften von Miniplasmin(ogen) und der *in vitro* beobachteten Inaktivierung von α_2 -AP durch PMN-Elastase wird eine Elastase-induzierte Freisetzung bzw. Aufrechterhaltung von fibrinolytischer Aktivität diskutiert, die ihrerseits inflammatorische Pathomechanismen induzieren und verstärken könnte (Machovich & Owen, 1989). Bisher existieren nur vage Hinweise auf das Auftreten von MPlg *in vivo*. So konnte in Synovialflüssigkeiten von Patienten mit akuter entzündlicher Arthritis MPlg-ähnliche Plg-Fragmente nachgewiesen werden (Moroz et al., 1986). In einer geringen Anzahl von Exsudatproben von Patienten mit einer 4-Quadranten-Peritonitis gelang der Nachweis von MPlg mittels eines hochspezifischen ELISAs, der von M. Borst entwickelt wurde (Borst M, 1994).

B.2.2.2 Angiostatin

Ausgehend von der Beobachtung, daß Metastasen bestimmter maligner Tumoren bei vorhandenem Primärtumor nur langsam wachsen, jedoch nach dessen operativer Entfernung rapide an Größe zunehmen können, wurde die Hypothese aufgestellt, daß der Primärtumor die Neovaskularisation der Metastasen und damit ihr Wachstum unterdrücken kann. In einem Mausmodell mit einem metastasierenden Lungentumor (Lewis-Lung-Karzinom) fand man einen Faktor, der die Angiogenese in den Metastasen unterdrücken konnte. In Sequenzanalysen stellte sich heraus, daß es sich bei diesem angiostatischen Faktor um ein internes, 38 kD großes, Kringel 1-4 umfassendes Fragment des Plg, das sog. Angiostatin, handelt. Bei *in vitro* Versuchen mit Spaltprodukten aus Elastase-induzierter Proteolyse von humanem Plg bzw. der Applikation von Angiostatin konnten die gleichen angiostatischen Effekte wie *in vivo* vor der Entfernung des Primärtumors erzielt werden (O'Reilly et al., 1994). Es konnte bei verschiedenen Tumoren sogar ein therapeutischer Effekt des Angiostatins im Sinne eines verringerten Wachstums des Primärtumors nachgewiesen werden. Das verwendete Angiostatin wurde hierbei aus durch Schweinepankreas-Elastase proteolytisch abgebautem Plg gewonnen (O'Reilly et al., 1996).

Die Kringelstruktur des Angiostatins beinhaltet die LBS 1 des Plg, die in den Kringeln 1-3 angesiedelt ist. Die isolierten Kringel weisen allerdings unterschiedliche Potenz in der Inhibition von Endothelzellproliferation auf. Rekombinante Kringel 1 und 3 zeigen dabei den stärksten Effekt mit einer halbmaximalen Inhibition bei einer Konzentration von 320 nM bzw. 460 nM. Interessanterweise konnte durch den isolierten Kringel 4, der die stärkste LBS der vier Kringel des Angiostatins aufweist, die Proliferation nicht unterdrückt werden. Den ausgeprägtesten, antiproliferativen Effekt von Angiostatin konnte gefunden werden, wenn man ausschließlich Kringel 1-3 applizierte (ED₅₀ 135 nM zu 70 nM) (Cao et al., 1996; Barendsz-Janson et al., 1998). Dagegen erwies sich Kringel 4 als der effektivste Inhibitor der Migration von Endothelzellen (Ji et al., 1998).

Eine direkte proteolytische Aktivität der Tumorzellen des "Lewis-Lung-Karzinoms" konnte nicht nachgewiesen werden. In den Tumor einwandernde Makrophagen exprimieren allerdings die Metallo-Elastase (MMP-12). In einer serumfreien Kokultur von Tumorzellen und Makrophagen konnte nach Zugabe von Plg Angiostatin nachgewiesen werden, was in Einzelkulturen von ausschließlich Tumorzellen oder Makrophagen nicht der Fall war. MMP-7 und MMP-9 sind ebenfalls als Enzyme identifiziert worden, die Plg zu Angiostatin spalten können (Lijnen et al., 1998; Patterson & Sang, 1997). MMP-9 spielt dabei *in vivo* aber keine Rolle (Dong et al., 1997). Angiostatin konnte auch in Gegenwart von freien Sulfhydrylgruppen unter Beteiligung einer Serinproteinase generiert werden. Versuche mit Hemmstoffen ergaben Hinweise auf eine autokatalytische Aktivität von Plasmin nach Reduktion der Disulfidbrücken im Kringel 5 (Gately et al., 1996; Gately et al., 1997; Stathakis et al., 1997; Stathakis et al., 1999). Diese Spaltung ergibt ein in der Struktur anderes Angiostatin im Vergleich zu dem unter elastolytischem Einfluß entstandenen Produkt. Der angiostatische Charakter bleibt allerdings derselbe. Als Nebenprodukt sind Plg-Fragmente mit angiostatischer Wirkung in experimentell ausgelöster Peritonitis bei Mäusen gefunden worden (Falcone et al., 1998).

Neben der hemmenden Wirkung auf die Neubildung von Gefäßen induziert Angiostatin *in vitro* die Apoptose von Endothelzellen und führt zu einer vermehrten Expression von u-PA, u-PA-Rezeptor und PAI-1 auf Endothelzellen (Lucas et al., 1998; Claesson-Welsh et al., 1998).

Nicht nur Kringel 1-4 (Angiostatin) erwies sich als Hemmstoff des Gefäßwachstums, sondern es konnte auch gezeigt werden, daß der isolierte Kringel 5 (MPlg) die Proliferation und Migration von humanen Nabelschnur-Endothelzellen *in vitro* behindern kann (Ji et al., 1998).

B.3 Aufgabenstellung

Mit dem Nachweis der neoantigenen, aminoterminalen Sequenz der Elastase-spezifischen Spaltstelle des MPIg steht eine Möglichkeit zur Verfügung, die Wirkung der PMN-Elastase zu belegen. Wenn MPIg gebildet wird, ließe dies auch indirekte Rückschlüsse auf die Beteiligung der PMN-Elastase an der Prozessierung von PIg zu Angiostatin zu, dessen Counterpart MPIg ist.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, durch Anwendung eines bereits laborintern etablierten ELISA zur quantitativen Detektion von MPIg (Borst M, 1994), dieses Protein in verschiedenen *in vitro*-Ansätzen und *ex vivo* entnommenen Körperflüssigkeiten zu messen und damit Hinweise auf eine eventuelle pathophysiologische Rolle der PMN-Elastase nicht nur bei Entzündung, sondern auch im Tumorgeschehen zu erhalten.

Im Rahmen der vorgesehenen Untersuchungen sollte zunächst das bereits etablierte Testsystem für MPIg optimiert und eine einfache Methode zur Isolierung der aminoterminal-spezifischen MPIg-Antikörper aus Hühnereigelb entwickelt werden.

Im einzelnen sollten dann folgende Fragen geklärt werden:

- Entsteht MPIg in der Gegenwart von aktivierten PMN-Granulozyten?
- Entsteht MPIg nur durch die proteolytische Aktivität der PMN-Elastase oder sind auch andere proteolytische Systeme, wie MMP und Cathepsine, daran beteiligt?
- Wie stabil ist MPIg unter verschiedenen Bedingungen, die die Lagerung von Proben bzw. deren Abnahme betreffen?
- Lassen sich die Pilotergebnisse zum Nachweis von MPIg als Indikator einer Proteolyse assoziierten Entzündungsreaktion bei Peritonitis (Borst M, 1994) auch an einem größerem Probenkollektiv verifizieren?

- Lässt sich MPIg, ähnlich wie für Angiostatin diskutiert, als Marker einer metastasierenden Tumorerkrankung in Blutproben von Mamma-karzinom-Patientinnen nachweisen? Wenn ja, besteht eine Korrelation zu anderen, die Prognose beeinflussenden Faktoren?

C Material und Methoden

C.1 Material

C.1.1 Geräte

C.1.1.1 Proteinbestimmung

UV/VIS-Spektralphotometer: PM 6 (Fa. Zeiss, Oberkochen).

C.1.1.2 Konzentrierung von Proteinlösungen

Rührzelle: Nr. 402 (Fa. Amicon, Witten);
Ultrafiltrationsmembran: Diaflo YM 10 (Fa. Amicon, Witten);
Lyophilisationszentrifuge: Speed Vac Concentrator (Fa. Bachhofer, Reutlingen).

C.1.1.3 Chromatographien

Pumpe: Pump P-1 (Fa. Pharmacia, Freiburg\Brsg.);
Fraktionssammler: GradiFrac (Fa. Pharmacia, Freiburg\Brsg.);
Gradienten-Programmierer: GradiFrac (Fa. Pharmacia, Freiburg\Brsg.);
Durchflußphotometer: ZZ 38 UVICORD S II (Fa. Pharmacia, Freiburg\Brsg.);
Zweikanalschreiber: Rec 102 (Fa. Pharmacia, Freiburg\Brsg.);
Leersäulen: Typ C (Fa. Pharmacia, Freiburg\Brsg.);
Gelfiltrationssäule: HiLoad 26/60 Superdex 75 prep grade (Fa. Pharmacia, Freiburg\Brsg.).

C.1.1.4 Elektrophorese, Blottingtechniken

Elektrophoresekammer:	Vertikalflachgel #2001-001 (Fa. Pharmacia, Freiburg\Brsg.);
Zymographiekammer:	Dual Gel Caster Mighty Small SE 245 (Fa. Hoefer, San Franzisco, USA);
Glasplatten:	#2001-158,16x18 cm (Fa. Pharmacia, Freiburg);
Spannungsquelle:	2197 (Fa. Pharmacia, Freiburg);
Blotapparatur:	Multiphor II 2117 (Fa. Pharmacia, Freiburg);
Microliterspritzen:	710, 1705, 1001 (Fa. Hamilton, Bonaduz,CH);
Taumelgerät:	Polymax 1040 (Fa. Heidolph).

C.1.1.5 Enzymimmunoassays

8-Kanal-Pipette:	(Fa. Dynatech, Denkendorf);
Digital Diluter:	Micro Lab 1000 (Fa. Hamilton, Bonaduz, CH);
Mikrotiterplatten-Waschgerät:	Ultrawash-II AM 56 (Fa. Dynatech, Denkendorf);
Mikrotiterplatten-Photometer:	MR 5000 (Fa. Dynatech, Denkendorf);
Mikrotiterplatten-Schüttler:	Micromix 5 (Fa. DPC Biermann, Bad Nauheim);
Inkubationshaube:	ITE (Fa. Infors, Bottmingen, CH);
Präzisionsbrutschrank:	B 53 (Fa. Binder, Tuttlingen).

C.1.1.6 Weitere Laborgeräte

Pipetten:	P20, P200 P1000, P5000 (Fa. Gilson, Villier-le-Bel, F);
Präzisionswaage:	1219 MP (Fa. Sartorius, Göttingen);
Analysenwaage:	2474 (Fa. Sartorius, Göttingen);
pH-Meter:	pH 391 (Fa. WTW, Weilheim);
Wasserbad:	U3-7A (Fa. Julabo Labortechnik, Seelbach);

Whirlmixer: Paramix II (Fa. Julabo Labortechnik, Seelbach);
Magnetrührer: Variomag mono (Fa. H+P Labortechnik, München).

C.1.1.7 EDV

Hardware: Proline-PC, Pentium 133 MHz (Fa. Schadt Computertechnik, Stuttgart);
Laserjet III P (Fa. Hewlett Packard, Bad Homburg);
Software: Word 6.0 (Fa, Microsoft, Unterschleißheim);
Excel 5.0 (Fa, Microsoft, Unterschleißheim);
MikroWin 3.17 (Fa. Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath),
SPSS, Origin 6.0 (Microcal Software Inc., Worthampton, USA)

C.1.2 Substanzen

C.1.2.1 Proteinbestimmung

Protein Assay Dye Reagent Concentrate, #500-0006 (Fa. Biorad, München);
Rinderserumalbumin (RSA), Fraktion V, #735086 (Fa. Boehringer, Mannheim).

C.1.2.2 Kopplung von Peptiden und Proteinen

D-Biotinoyl- ϵ -Aminocapronsäure-N-Hydroxysuccinimidester, #1008960 (Fa. Boehringer, Mannheim);
Dialysierschlauch Visking 36/32 (Ausschlußgrenze 12-19 kDa), #44120 (Fa. Serva, Heidelberg).

C.1.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gradientengel-Elektrophorese

Acrylamid/Bisacrylamid 19:1, # 130301 (Fa. Appligen Oncor, Gaithersburg, USA);
Natriumdodecylsulfat (SDS), #20760,
Ammoniumpersulfat (AMPS), #13375,
Bromphenolblau, #15375,
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED), #35925,
Glycin, #23390 (alle Fa. Serva, Heidelberg);
Dithiothreitol (DTT), #1661-0611 (Fa. Sigma, Deisenhofen);
SDS-PAGE Standard, niedriger Bereich, #161-0304,
Kaleidoskop-Prestained-Marker, #161-0324 (Fa. Biorad, München).

C.1.2.4 Proteinfärbungen

Coomassie Brilliant Blue R-250, #35051 (Fa. Serva, Heidelberg);
Silbernitrat, #1513, Formaldehydlösung mind. 37%, #4003 (Fa. Merk,
Darmstadt);
Glutardialdehydlösung 40%, # 4995.1 (Fa. Roth, Karlsruhe).

C.1.2.5 Western Blot im Semi-Dry-Verfahren

Immobilon-P Transfer Membran, # IPVH 000 10 (Fa. Millipore, Bedford, GB);
Perhydrol (30% H₂O₂), #7209 (Fa. Merk, Darmstadt);
ε-Aminocaprinsäure, #A-2504, (Fa. Sigma, Deisenhofen).

C.1.2.6 Reinigung polyklonaler Antikörper aus Hühnereigelb

Pefabloc SC, #2839.0100 (Fa. Pentapharm, Basel, Schweiz);
Dialysierschlauch Visking 36/32 (Ausschlußgrenze 12-19 kDa), #44120
(Fa. Serva, Heidelberg).

C.1.2.7 Enzymimmunoassays

Rinderserumalbumin (RSA), Fraktion V, #735986,
2,2'-Azino-di-[3-ethyl-benzthiazolin-sulfonat (6)] (ABTS), #102946 (Fa. Boehringer, Mannheim);
Anti-Human-Plasminogen IgG vom Kaninchen, #A081,
Avidin, POD-konjugiert, #P347 (Fa. DAKO Diagnostica, Hamburg);
Anti-Huhn IgG vom Schwein, POD-konjugiert (Fa. Sigma, Deisenhofen);
Perhydrol (30% H₂O₂), #7209 (Fa. Merck, Darmstadt);
Normalplasma human (Blutbank, Chirurgische Klinik der LMU München, Standort Innenstadt);
Casein, # C340 (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen);
Gelatine, # 0143-01 (Fa. DIFCO-Laboratories, Detroit, USA);
Maxisorp ELISA-Platten, #439454 (Fa. Nunc, Wiesbaden-Biebrich).

C.1.2.8 Immunoprint

4-Chlor-1-Naphthol, #C-6788 (Fa. Sigma, Deisenhofen).

C.1.2.9 Enzymaktivitätsbestimmung und Inhibition

PMN-Elastase human, #324681 (Fa. Calbiochem, San Diego, CA, USA);
Cathepsin G human (Fa. Merck, Darmstadt);
Cathepsin B human, # 219364 (Fa. Calbiochem, San Diego, CA, USA);
Cathepsin H human, # 03-0004 (Fa. RD Laboratories, Diessen/Ammersee);
MMP-2, # 1782916, MMP-9, # 1758900 (Fa. Boehringer, Mannheim);
Urokinase (high molecular weight), #80-13-1401 (Fa. Medor, Herrsching);
Plasminogen, # 020075 (Fa. Medor, Herrsching/Ammersee);
 α_2 -Antiplasmin, # 178221 (Fa. Calbiochem, San Diego, CA, USA);
TIMP-2, # 1782924 (Fa. Boehringer, Mannheim);
Gelatinase-Kit, # 1829742 (Fa. Boehringer, Mannheim).

C.1.2.10 Granulozytenisolierung

Blutabnahmesysteme (Fa. Sarstedt, Nümbrecht);

Percoll (Fa Sigma, Deisenhofen);

Reaktionsgefäße (Fa. Eppendorf, Köln);

Plastik-Pasteurpipetten (Fa. Eppendorf, Köln);

Zymosan, # Z 4250, 250 µg (Fa. Sigma, Deisenhofen);

Medium: EGM, DMEM, Glutamin, Gentamycin (alle Fa. Sigma, Deisenhofen).

C.1.2.11 weitere Verbrauchsmaterialien

Alle weiteren, hier nicht explizit aufgeführten Verbrauchsmaterialien, wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen) und Riedel de Haën (Seelze) bezogen.

C.1.2.12 Diverse Körperflüssigkeiten von Probanden und Patienten

- Normalplasma (Blutbank, Chirurgische Klinik München Innenstadt);
- Blutplasma von gesunden 10 Probanden (Eigene Proben);
- Blutplasma- und Exsudat-Proben aus einer Studie zur Peritonitis-Therapie:
In der Therapiegruppe wurde Fresh-Frozen-Serum (FFS) intraperitoneal nach der ersten Lavage und 6h postoperativ über die Drainagen verabreicht. Der systemische AT-III-Spiegel wurde postoperativ auf 140% der Norm angehoben (Schorr et al., 2000). Aus dem gesamten Patienten-Kollektiv wurden Proben ausgewählt, die eine hohe Konzentration an PMN-Elastase aufwiesen und vor der Bestimmung des Miniplasminogens nicht aufgetaut waren. Neben Exsudatproben wurden EDTA-Plasma, Citrat-Plasma und Serumproben präoperativ sowie 2h, 6h, 8, 12h, 18h, 24h, 30h, 42h, 48h und im folgenden bis Tag 5 zweimal täglich gewonnen.
- Serum-Proben von 40 Mamma-Ca-Patienten, intraoperativ gewonnen (Dr. Funke/Dr. Untsch, Klinikum Grosshadern).
- Zytosol-Proben von Mamma-Ca (J. Foekens, Rotterdam, NL)

C.2 Methoden

C.2.1 Proteinchemische Methoden

C.2.1.1 Proteinbestimmung nach Kirschenbaum

Die Bestimmung einer Proteinkonzentration basiert bei dieser Methode auf dem Absorptionsverhalten von Tyrosin-, Phenylalanin- und Tryptophangruppen bei einer Wellenlänge von 280 nm. Durch den unterschiedlichen Gehalt an diesen aromatischen Aminosäuren ergibt sich für jedes Protein ein individueller Extinktionswert $E^{1\%}_{280}$, der von Kirschenbaum (Kirschenbaum, 1976) für eine Vielzahl von Proteinen bestimmt wurde. Aus dem Extinktionsmesswert einer Proteinlösung bei 280 nm erhält man zusammen mit dem spezifischen Extinktionswert direkt den Proteingehalt.

Diese Methode wurde zur Ermittlung der Ausbeute an gereinigten Antikörpern eingesetzt. Der verwendete, spezifische Extinktionswert betrug $13,6 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

C.2.1.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Bindet Coomassie-Brilliant-Blue-G-250 im sauren pH-Milieu an Protein, verschiebt sich das Absorptionsmaximum der Proteinlösung von 465 nm auf 595 nm. Auf diesem Prinzip beruht diese Proteinbestimmungsmethode, die von Bradford erstmals beschrieben wurde (Bradford, 1976).

5,0 ml eines 1:5 verdünnten Färbereagens der Firma Biorad wurden zu 0,1 ml Probe-, Standard- bzw. Pufferlösung gegeben und vorsichtig vermischt. Nach 5 Minuten wurde die Absorption bei 595 nm gegen die Pufferlösung gemessen. Als Standardprotein diente Rinderserumalbumin in Konzentrationen von 0,2 mg/ml bis 1,4 mg/ml.

C.2.1.2 Konzentrierung von Proteinlösungen

C.2.1.2.1 Ultrafiltration

In einer speziellen Ultrafiltrations-Rührzelle wird die Proteinlösung durch Einleitung von Stickstoff unter Druck gesetzt und durch eine am Boden des Gefäßes angebrachte Filtermembran gepreßt. Kleine Moleküle, die unter der Molekülgrößen-Ausschlußgrenze der jeweils verwendeten Membran liegen, können durch den Filter wandern, während im Überstand die größeren Proteinmoleküle verbleiben. Um die Adhäsion von Protein an das Filtermaterial zu verringern, wird während des gesamten Vorgangs gerührt.

Für die Aufkonzentration von Antikörperlösungen nach der Immunselektion wurde in die Rührzelle eine Membran mit einer Ausschlußgrenze von 10 kDa eingebracht.

C.2.1.2.2 Gefriertrocknung

Diese Methode basiert auf dem Phänomen der Sublimation. Darunter versteht man den Übergang von Wasser aus der festen, gefrorenen Phase in die dampfförmige Phase, ohne sich zu verflüssigen. Entfernt man den entstandenen Wasserdampf durch Anlegen eines bestimmten Drucks, wird einer gefrorenen Proteinlösung das Wasser entzogen. Diese Methode stellt ein schonendes Verfahren zur Trocknung von Proteinen dar und gewährleistet eine gute Löslichkeit der erhaltenen Festsubstanz.

C.2.1.3 Kopplung von Proteinen an Biotin

Um den von Borst (Borst, 1994) etablierten MPIg-ELISA anzuwenden, wurden weitere Mengen von mit Biotin gekoppelten Kaninchen-Antikörpern gegen humanes Plasminogen benötigt. Als Kopplungsreagenz wurde in Anlehnung an die Methode von Bonhard (Bonhard, 1984) D-Biotinoyl- ϵ -Aminocaprinsäure verwendet. Dieser Aminocaprinsäure-Spacer hat den Vorteil, daß bei der Verwendung von biotinylierten Makromolekülen die Bindung an Avidin nicht beeinflusst wird.

Folgende Lösungen wurden verwendet:

A: 100 mM NaHCO₃, pH 8,0

B: 1,375 mM D-Biotinoyl- ϵ -Aminocaprinsäure-N-Hydroxysuccinimid-Ester in DMSO

C: 100 mM NaCl, 100 mM NaH₂PO₄, 100 mM Na₂HPO₄, pH 7,2

Nach Dialyse gegen Puffer A wurde die Antikörperlösung im Verhältnis 21:1 mit Lösung B versetzt, so daß Biotin in einem ca. 10- bis 30-fachen molaren Überschuß vorlag. Der Reaktionsansatz wurde 4 Stunden bei Raumtemperatur unter ständigem Rühren inkubiert und danach gegen Lösung C dialysiert. Eventuelle Niederschläge wurden abzentrifugiert und die Proteinkonzentration durch Messen der Absorption bei 180 nm nach der Methode von Kirschenbaum (s. C.2.1.1.1) bestimmt.

Die Ausbeute der Biotinylierungsreaktion des Antikörpers wurde in einem einfachen Test auf einer Mikrotiterplatte unter Verwendung der folgenden Lösungen bestimmt:

A: 15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9,6

B: 150 mM NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, 10mM Na₂HPO₄, 0,05% (v/v) Tween 20, pH 7,4

C: 2% (w/v) RSA in Lösung B

D: 100 mM Citronensäure, 100 mM Na₂HPO₄, pH 4,5

E: 2% (w/v) ABTS

F: 0,6% (v/v) Perhydrol

G: 19 ml Puffer C + 1 ml Lösung D + 0,4 ml Lösung E

Das Arbeitsvolumen betrug 200 μ l/Kavität.

In die Kavitäten einer Nunc Maxisorp Mikrotiterplatte wurde der biotinylierten Antikörper in einer Verdünnungsreihe (2500 bis 0,3 ng/ml) in Lösung A pipettiert und die Platte über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde fünfmal mit Puffer B gewaschen und die Platte anschließend mit einem Konjugat aus Avidin und Peroxidase (Fa. DAKO, P347, Verdünnung 1:5000 mit Lösung C) beschickt. Die Platte wurde nun für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und danach erneut mit Puffer B gewaschen. Anschließend wurde die Substratlösung G zugegeben und die Platte nochmals für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Photometers wurden die Extinktionen aller Kavitäten bei 405 nm vermessen. Zur graphischen Auswertung wurden die Extinktionen auf die Ordinate gegen die eingesetzten Verdünnungen des biotinylierten Antikörpers auf der Abszisse dargestellt.

C.2.2 Elektrophoresen, Proteinfärbungen

C.2.2.1 Elektrophoresen

C.2.2.1.1 SDS-Polyacrylamid-Gradientengel-Elektrophorese

Diskontinuierliche SDS-Elektrophoresen zur Darstellung von Proteingemischen, aufgetrennt nach ihren Molekülmassen, wurden entsprechend der Methode von Lämmli (Lämmli, 1970) durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte auf Flachgelen mit einem Gehalt von 0,1% SDS (w/v) in einer vertikalen Elektrophoresekammer. Das Sammelgel enthielt 3% Acrylamid, das Trenngel bestand aus einem Gradienten von 5% bis 15% bzw. 10% bis 20% Acrylamid.

Für die Elektrophorese wurden folgende Lösungen verwendet:

A: 250 mM Tris, 4% (w/v) SDS, 10% (w/v) DTT, 20% (w/v) Glycerin, 5% (v/v) gesättigte Bromphenolblau-Lösung, pH 6,8

B: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,4

Vor dem Auftragen wurden die Proben im Verhältnis 1:2 mit Probenpuffer A verdünnt und zur Reduktion der Proteine 5 Minuten in einem siedenden Wasserbad inkubiert. Zur Ableitung der entstehenden Wärme wurde während der Elektrophorese ein Eiswasserbad verwendet. Der Probenpuffer A wurde zur Verfolgung der Wanderungsgeschwindigkeit mit gesättigter wässriger Bromphenolblau-Lösung versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur bei einer Stromstärke von 30 mA (ca. 30 min; Sammelgel) bzw. 50 mA (20 – 130 min, Trenngel) und fixierten Spannungsmaximum von 300 V. Puffer B diente als Elektrodenpuffer. Sobald die Lauffront das Ende des Trenngels erreicht hat, wurden die Stromquelle abgeschaltet, das Gel entnommen und die Proteinbanden mittels Coomassie Brilliant Blue Färbung (s. C.2.2.2.1) oder Silberfärbung (s. C.2.2.2.2) bzw. Western-Blot (s. C.2.2.4) und Immunoprint (s. C.2.3.3) sichtbar gemacht.

C.2.2.1.2 Zymographie

Um proteolytische Aktivität in Proteingemischen nachzuweisen, wurde eine Zymographie mit einem speziellen Substrat im SDS-Polyacrylamid-Gel angewendet, wie sie von Peach und Christianson (1994) beschrieben wurde. Das Trenngel enthielt 12% Polyacrylamid und 0,1% SDS, dem als Substrat 1% (w/v) Gelatine zugefügt wurde. Als Sammelgel wurde ein 3%-iges Polyacrylamidgel ohne Zusatz von Proteinen verwendet.

Dabei wurden folgende Lösungen benötigt:

- A: 125 mM TrisHCl, 4% (w/v) SDS, 20% (w/v) Glycerin, 0,01% (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8;
- B: 25 mM Tris, 190 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,4;
- C: 2,5%(v/v) Triton X-100;
- D: 50 mM TrisHCl, 200 mM NaCl, 10 mM CaCl₂ x 2 H₂O, 0,02% (v/v) Brij 35, pH 7,5.

Die Proben wurden vor dem Auftragen so in Puffer A verdünnt, daß eine Konzentration des proteolytisch aktiven Proteins von ca. 100 ng/µl zu erwarten war. Das Gel wurde mit jeweils 5 µl der Probenlösung beschickt. Lösung B wurde als Elektrodenpuffer verwendet. Das System wurde durch kontinuierlichen Fluß von kaltem Leitungswasser um die Elektrophoresekammer gekühlt. Solange sich die Proben, markiert durch die Bromphenolblaulauffront, im Sammelgel befanden, wurde eine Stromstärke von 25 mA pro Gel angelegt. Nach Erreichen des Trenngels wurde die Stromstärke auf 50 mA pro Gel erhöht. Hatte die Lauffront das Ende des Trenngels erreicht, wurde die Elektrophorese beendet und das SDS durch eine zweimal 15-minütige Inkubation in Lösung C und darauf folgendes Waschen mit Aqua dest. aus dem Gel entfernt. Nach der Renaturierung der Enzyme wurden diese über Nacht in Lösung D bei 37°C inkubiert, wobei die als Substrat angebotene Gelatine verdaut wurde. Bei der nun folgenden Coomassie-Blue-Färbung (C.2.2.2.1) blieben die Banden mit proteolytischer Aktivität ungefärbt.

C.2.2.2 Proteinfärbungen

C.2.2.2.1 Coomassie-Brillant-Blue-Färbung

Proteinbanden im Mikrogramm-Bereich wurden im SDS-Polyacrylamid-Gel mittels Coomassie-Brillant-Blue-R-250 sichtbar gemacht.

Dabei kamen folgende Lösungen zur Verwendung:

A: 10%(v/v) Essigsäure, 10%(v/v) Ethanol;

B: 0,5%(w/v) Serva Blau R-250, 10%(v/v) Essigsäure, 45%(v/v) Ethanol;

C: 10%(v/v) Essigsäure, 25%(v/v) Ethanol;

D: 7%(v/v) Essigsäure, 1%(v/v) Glycerin.

Nach beendeter elektrophoretischer Auftrennung wurde das SDS-Polyacrylamid-Gel zur Fixierung der Proteinbanden 30 bis 60 Minuten in Lösung A inkubiert. Dann wurde das Gel zur Proteinfärbung für ca. 30 Minuten in Lösung eingelegt. Um die unspezifische Färbung des Gelmaterials zu entfernen, wurde das Gel anschließend in Lösung C inkubiert, wobei die Lösung mehrmals mittels eines Aktivkohlefilters regeneriert wurde, bis der Hintergrund völlig entfärbt war. Die nun sichtbaren Proteinbanden wurden zur Dokumentation photographiert. Abschließend wurde das Gel 30 Minuten in der Konservierungslösung D inkubiert und anschließend zur Aufbewahrung in eine Klarsichthülle eingeschweißt. Alle Inkubationsschritte wurden auf einem Taumelgerät durchgeführt, um eine gleichmäßige Benetzung des Gels während des Färbeprozesses zu gewährleisten.

C.2.2.2.2 Silberfärbung

Waren Proteinmengen nur im Nanogramm-Bereich im SDS-Polyacrylamid-Gel zu erwarten, wurde zur Sichtbarmachung der Banden die ultrasensitive Silberfärbung nach der Methode von Heukeshoven (Heukeshoven & Fasman, 1985) angewendet.

Es wurden folgende Lösungen benötigt:

A: 10%(v/v) Essigsäure, 30%(v/v) Ethanol;

B: 30%(v/v) Ethanol, 400 mM Natriumacetat, 1,2%(v/v) Glutardialdehyd, 0,2% (w/v) Natriumthiosulfat x 5 H₂O;

C: 0,1%(w/v) Silbernitrat, 0,022%(v/v) Formaldehyd;

D: 2,5%(w/v) Natriumcarbonat, 0,11%(v/v) Formaldehyd, pH 11,3 - 11,8;

E: 5%(v/v) Essigsäure;

F: 5%(v/v) Glycerin.

Nach beendeter Elektrophorese wurde das Polyacrylamidgel für ca. 3 Stunden in Lösung A fixiert und anschließend 30 Minuten unter reduzierenden Bedingungen in Lösung B inkubiert. Überschüssiges Reagenz wurde durch dreimaliges, gründliches Waschen mit Aqua bidest. entfernt. Dann erfolgte eine 45-minütige Inkubation in der Silbernitratlösung C. Anschließend wurde überschüssiges Silbernitrat kurz mit Aqua bidest. ausgewaschen. Hierauf wurde das Gel in Lösung D entwickelt. War die gewünschte Bandenintensität erreicht (nach ca. 5-15 min), wurde die Reaktion mit der Terminationslösung E und der damit verbundenen pH-Wert-Senkung abgestoppt. Schließlich wurde das Gel nochmals für 30 Minuten mit Aqua bidest gespült und fotografisch dokumentiert. Zur Konservierung und Lagerung wurde das Gel in Lösung F in eine Klarsichthülle eingeschweißt. Alle Inkubationsschritte wurden auf einem Taumelgerät bei Raumtemperatur durchgeführt.

C.2.3 Immunologische Methoden

C.2.3.1 Gewinnung von polyklonalen Antikörpern

C.2.3.1.1 Isolierung von Antikörpern durch Immunaффinitätschromatographie

Spezifische Immunglobuline gegen Miniplasminogen wurden aus Eigelb-Rohextrakt durch Immunaффinitätschromatographie (= Immunselektion) nach Müller-Esterl (Müller-Esterl, 1986) gewonnen.

Die Aufreinigung wurde bei 4°C - 6°C unter Verwendung folgender Lösungen ausgeführt:

A: 150 mM NaCl, 100 mM NaH₂PO₄, 100mM Na₂HPO₄, pH 7,2;

B: 200 mM NaSCN, pH 5,8;

C: 200 mM Glycin, pH 2,2;

D: 1 M HEPES, pH 7,5.

Vor Beginn der Chromatographie wurde die an CNBr-Sepharose gekoppelte Miniplasminogensäule mit dem 10-fachen Säulenvolumen an Lösung A, anschließend mit dem jeweils 5-fachen Säulenvolumen an Lösung B und Lösung C und danach noch einmal mit Lösung A gespült . Die Flußrate betrug dabei konstant 20 ml/h. Vor dem Auftragen von jeweils 5 ml Antiserum bzw. Eigelb-Rohextrakt wurde der Ansatz mit 200 µM Pefabloc SC versetzt, um freie Serinproteaseaktivität zu inhibieren.

Danach wurden das Antiserum bzw. Eigelb-Rohextrakt für ca. 16 bis 20 Stunden kontinuierlich in einem geschlossenem Kreislauf über die Säule gepumpt. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug hierbei 5 ml/h. Daraufhin wurden bei einer Flußrate von 20 ml/h zuerst die ungebundenen Proteine mit Puffer A eluiert und anschließend die unspezifisch gebundenen Proteine sowie schwach bindende Antikörper mit Puffer B entfernt. Die Säule wurde nochmals mit Puffer A gewaschen, bevor schließlich die spezifisch gebundenen Antikörper mit Puffer C bei einer Flußrate von 20 ml/h eluiert werden konnten. Die Absorption der einzelnen Fraktionen wurde bei 280 nm vermessen. Zur raschen Neutralisation

der Puffer C-Eluate wurden je Fraktionsvolumen 1 Teil Lösung D zu 2 Teilen Eluat vorgelegt. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden gepoolt, gegen Lösung A dialysiert und danach der Titer an spezifischem Antikörper durch indirekten ELISA (s. C.2.3.2.1) ermittelt sowie der Proteingehalt nach Kirschenbaum (s. C.2.1.1) bestimmt.

C.2.3.1.2 Abtrennung kreuzreaktiver Antikörper mittels Immunabsorption

Um aus den gewonnenen Antikörpern gegen die neoantigene Determinante des MPLg - von Borst Peptid 3 genannt (Borst M, 1994) - den kreuzreaktiven Anteil gegen Plg abzutrennen, wurde eine zweite Immunaффinitätschromatographie über an CNBr-Sepharose immobilisiertes Plasminogen bei 4°C – 6 °C durchgeführt.

Es wurden die gleichen Lösungen wie bei der Immunselektion (s. C.2.3.1.1) verwendet. Die Säule mit immobilisiertem Plasminogen wurde wie in C.2.3.1.1 durch Waschen mit Lösung A, B, C und wiederum A vorbereitet. Anschließend wurden die in der Immunselektion gegen MPLg isolierten und gegen Lösung A dialysierten Antikörper gegen Peptid 3 über Nacht bei einer Flußrate von 5 ml/h über die Säule rezykliert. Immunglobuline, die mit Plg nicht wechselwirkten wurden mit Lösung A bei einem Durchsatz von 20 ml/h eluiert und durch Ultrafiltration (s. C.2.1.2.1) aufkonzentriert. Der Titer an spezifischem Antikörper wurde im indirekten ELISA (s. C.2.3.2.1) ermittelt und der Proteingehalt nach Kirschenbaum (s. C.2.1.1) bestimmt. Spezifisch bzw. unspezifisch an das Plg der Säule gebundene Antikörper wurden mit Lösung B bzw. C bei einer Durchflußrate von 20 ml/h eluiert.

Nach Konzentrierung des Eigelbs nach der Methode von Schade (Borst M, 1994) wurden für die Antikörper-Aufreinigung die Eigelb-Rohextrakte des Huhns 4 aus der 12. Woche nach Grundimmunisierung verwendet. In einem Durchlauf wurden etwa 140 ml Rohextrakt einer Immunaффinitätschromatographie an 96 µmol immobilisiertes Peptid 3, carboxyterminal an Thiopropyl-Sepharose gekoppelt, unterzogen. Nicht oder unspezifisch gebundenes Material wurde mit NaSCN-Puffer ausgewaschen (NaSCN-Peak). Spezifisch

gebundene Antikörper wurden mit Glycin-Puffer von der Säule eluiert (Glycin-Peak). Um Antikörper zu entfernen, die mit Plasminogen kreuzreagieren, wurde eine zweite Chromatographie über an CNBr-Sepharose immobilisiertes Plg ange-schlossen. Während die mit Plg kreuzreagierenden Antikörper an die Säule gebunden wurden, konnten die spezifisch nur gegen MPlg gerichteten Anti-körper im Durchlauf mit PBS-Puffer detektiert werden (C.2.3.1.2). In allen Fraktionen wurde der Proteingehalt durch Messung der Absorption bei 280 nm (C.2.1.1) und der Titer gegen MPlg durch indirekten ELISA (C.2.3.2.1) bestimmt.

C.2.3.1.3 Isolierung von IgGs aus Hühnereigelb-Rohextrakt mittels Dextransulfat-Fällung

Das als Ausgangsmaterial zur Antikörperisolierung verwendete Rohextrakt aus Hühnereigelb (Borst, 1994) wurde auch mittels einer Dextran- und anschließenden Natriumsulfat-Fällung gereinigt (Jensenius, 1981) und die Ausbeute und Reinheit mit der Affinitätschromatographie (C.2.3.1.1) verglichen.

Für die Fällung wurden folgende Lösungen eingesetzt:

- A: 10 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, pH 7,3;
- B: 10% (w/v) Dextransulfat in Lösung A;
- C 1 M CaCl₂ in Lösung A;
- D 36% (w/v) Na₂SO₄ in Aqua dest.

Im Gegensatz zu der Methode von Jensenius (1981) wurde nicht das Eigelb, sondern ein nach Dr. Schade (Borst M, 1994) gewonnenes Rohextrakt als Ausgangsprodukt verwendet. Jeweils 10 ml dieses Rohextraktes wurden mit Lösung A auf ein Volumen von 50 ml gebracht und 20 min bei 2000 g und 20°C zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet verworfen und der Überstand mit 3 ml Lösung B und 7,5 ml Lösung C nach intensiven Mischen 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde diese Suspension 20 min bei 2000 g und 20°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 ml Lösung A aufgeschwemmt und

erneut 20 min bei 2000g und 20°C zentrifugiert. Die Überstände dieser beiden Zentrifugationsschritte wurden gepoolt, mit Lösung A auf ein Volumen von 100 ml gebracht und mit 20 g Na₂SO₄ (wasserfrei) versetzt. Nachdem diese Suspension 1 h bei Raumtemperatur inkubiert wurde, wurde wiederum für 20 min bei 2000 g und 25°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5-10 ml Puffer A gelöst und über Nacht gegen Puffer A (dreimaliger Pufferwechsel) dialysiert. In dieser Antikörperlösung wurde dann der Proteingehalt mittels der Methode nach Kirschenbaumer (s. C.2.1.1.1.) und der Gehalt an spezifischen Antikörpern gegen MPLg durch indirekten ELISA (s. C.2.3.2.1) ermittelt.

C.2.3.2 Enzyimmunoassays (ELISAs)

Die verwendeten, nicht kommerziell erhältlichen Testsysteme (indirekter ELISA, Sandwich-ELISA und kompetitiver ELISA (Voller, 1980)) wurden unter Einsatz folgender Lösungen durchgeführt:

A: 15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9,6;

B: 150 mM NaCl, 10 mM NaH₂PO₄ x H₂O, 10 mM Na₂HPO₄ x H₂O,
0,05% (v/v) Tween 20, pH 7,4

C1: 2% RSA in Lösung B;

C2: 1% Casein in Lösung B;

C3: 2% Gelatine in Lösung B;

D: 1,0 M NaSCN, 0,1 M ε-Aminocapronsäure, 0,05% (v/v) Tween 20, pH 5,5;

E: 1% Casein in Lösung D;

F: 100 mM Citronensäure, 100 mM Na₂HPO₄, pH 4,5;

G: 2% (w/v) ABTS;

H: 0,6% (v/v) Perhydrol;

I: 19ml Puffer F + 1ml Lösung G + 0.4 ml Lösung H;

K: 10% (w/v) Diethylamin, 0,5 mM MgCl₂, 0,5 mM NaHCO₃, pH 9,8;

L: 200 µg/ml Methyl-Umbelliferyl-Phosphat in Puffer I.

Das Arbeitsvolumen betrug bei allen ELISAs 200µl/Kavität. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wurden die Kavitäten unter Verwendung eines Mikrotiterplatten-Waschgeräts mit jeweils 300 µl Lösung B je Kavität gespült. Während der Inkubationen wurden die Platten mit einer selbstklebenden Klarsichtfolie dicht verschlossen. Die Visualisierung der Immunreaktion erfolgte durch Zugabe von Substratlösung I. Das enthaltene Substrat ABTS wurde dabei unter dem Einfluß von Peroxidase zu einem grünen Farbstoff umgewandelt, dessen Absorption bei 405 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer quantitativ erfaßt wurde. In sämtlichen Tests wurden zur Überprüfung von unspezifischen Bindungen eine Reihe von Leerwerten mitgeführt.

C.2.3.2.1 Indirekter ELISA

Antikörpertiter in den Antiseren, Eigelb-Rohextrakten und gepoolten Fraktionen der Immunaффinitätschromatographie wurden im indirekten ELISA bestimmt.

Eine Maxisorp-Mikrotiterplatte der Firma Nunc wurde mit der entsprechenden Menge Antigen beschickt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Es wurde fünfmal gewaschen und eine serielle Verdünnungsreihe der Antikörperlösung (1:2ⁿ) in Puffer C1 in die Kavitäten gegeben. Nach 2 Stunden Inkubation bei 37°C wurde erneut fünfmal gewaschen und ein Enzym-markierter Antikörper, der gegen das zuvor eingesetzte Immunglobulin gerichtet ist, in geeigneter Verdünnung in Lösung C1 eingesetzt. Die Platte wurde 2 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend fünfmal gewaschen. Kam ein Biotin-gekoppelter Antikörper zur Verwendung, folgte zusätzlich eine halbstündige Inkubation bei 37°C mit einem Konjugat aus Avidin und Peroxidase (DAKO P347) in einer Verdünnung von 1:5000 in Lösung C1. Nach erneutem fünfmaligen Waschen konnte wie im Falle von Peroxidase-markierten Antikörpern mit der Substratreaktion fortgefahren werden. Für die Auswertung wurden die bei 405 nm gemessenen Absorptionen auf der Ordinate gegen den Logarithmus der eingesetzten Antikörperkonzentrationen auf der Abszisse aufgetragen. Die angegebenen Verdünnungen von Fraktionen aus der Immunaффinitätschromatographie wurde stets auf das Volumen an eingesetztem Antiserum bzw. Eigelb bezogen, so daß eine direkte Vergleichbarkeit mit der Ausgangslösung gewährleistet war.

C.2.3.2.2 Sandwich-ELISA (Standardprotokoll)

Der Sandwich-ELISA zur Quantifizierung von MPIg geht von folgendem Standardprotokoll aus:

Die Beschichtung der Mikrotiterplatte mit einer optimierten Konzentration an Primärantikörper in Lösung A erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach fünfmaligem Waschen wurde der Antigen-Standard in einer 8-stufigen Verdünnungsreihe (1:2ⁿ) in Lösung C1 aufgetragen und 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nicht gebundene Proteine wurden in fünf Waschschrritten von der Platte entfernt. Ein mit Biotin gekoppelter Sekundärantikörper, der gegen das eingesetzte Antigen gerichtet ist, wurde in optimierter Konzentration in Lösung C1 auf die Platte gegeben. Nach 2 Stunden bei 37°C wurde die Immunreaktion beendet und wieder fünfmal gewaschen. Nun wurde ein Komplex aus Avidin und Peroxidase (DAKO P347) in einer Verdünnung von 1:5000 in Lösung C1 zugegeben und die Platte bei 37°C inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen wurde die Substratreaktion mit Lösung G eingeleitet und die Absorption bei 405 nm gemessen. Die Extinktionen wurden auf der Ordinate gegen den Logarithmus der als Standard eingesetzten Antigenkonzentration aufgetragen. Über die resultierende Eichkurve ließ sich die jeweilige Konzentration des Antigens in der Probe ermitteln.

C.2.3.2.3 Sandwich-ELISA zur Quantifizierung von Miniplasminogen

Für den quantitativen Nachweis von MPIg durch einen Sandwich-ELISA wurde das Standardprotokoll wie folgt verändert:

Die Beschichtung erfolgte auf Maxisorp Mikrotiterplatten der Firma Nunc. Nach zweimaligem Waschen wurden vor dem Probenauftragen freie Bindungsstellen auf der Platte mit jeweils 250µl Lösung A/Kavität, der 1% (w/v) Casein zugesetzt sind, abgesättigt. Die Platte wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend dreimal gewaschen. Bei Verwendung von Primärantikörpern aus Kaninchen wurde die Probe im Verhältnis 1:5 in Lösung E verdünnt, im Fall von Hühnerantikörpern wurde Lösung C2 verwendet. Wie alle weiteren Inkubationen erfolgte die Reaktion bei Raumtemperatur unter Schütteln (rpm 150). Sowohl der an

Biotin gebundene Sekundärantikörper, als auch das Konjugat aus Avidin und Peroxidase wurde in Lösung C3 verdünnt. Nicht gebundener Antikörper wurde in jeweils 3, überschüssiger Avidin-Peroxidase-Komplex in 10 Waschschritten von der Platte entfernt.

Abweichend von diesem Protokoll wurde bei der Verwendung von fluorogenem Substrat an den biotinylierten Sekundärantikörper ein Avidin-Phosphatase-Komplex gebunden. Nach zehnmaligen Waschen wurde die Substratlösung L aufgetragen. Die gebundene Phosphatase konnte nun das Methyl-Umbelliferyl-Phosphat zu einem fluoreszierenden Agens umsetzen. Die Intensität der Fluoreszenz wurde in einem Fluoreszenz-Reader in Fluorescent Signal Units (FSU) gegen die Antigenkonzentration in semilogarithmischer Weise aufgetragen.

C.2.3.2.4 PMN-Elastase-ELISA

Die Bestimmung des Elastase- α_1 -Proteinase-Inhibitor-Komplexes erfolgte mit einer modifizierten Version (Jochum, 1993; laborinterne Mitteilungen) des kommerziellen "two-site" Sandwich-ELISA der Fa. Merck (PMN-Elastase, 2h-Version, #12589). Die Modifikation bezog sich primär auf die Umsetzung einer Feströhrchenversion auf 96-well Nunc Maxisorp Platten.

C.2.3.2.5 Kompetetiver ELISA zur Quantifizierung von Plasminogen

Nunc Maxisorp Platten wurden mit einem Anti-Plasminogen Immunglobulin G (IgG) in Lösung A beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Es wurde zweimal gewaschen und zur Absättigung freier Bindungsstellen mit jeweils 250 µl Lösung A/Kavität, die 1% Casein enthält, für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Inzwischen wurde die Probe mit einer geeigneten Menge an biotinyliertem Plasminogen versetzt und mit Lösung E im Verhältnis 1:50 verdünnt. Nach 3 Waschvorgängen wurde die vorbereitete Probenlösung bzw. die 8-stufige Standardreihe für 2 Stunden zugegeben und die Platte bei Raumtemperatur unter Schütteln (150 rpm) inkubiert. Nicht gebundenes Probenmaterial wurde in 5 Waschzyklen von der Platte gespült, bevor der Avidin-Peroxidase-Komplex in

einer Verdünnung von 1:5000 in Lösung C3 zugegeben wurde. Die Platte wurde eine halbe Stunde bei 37°C inkubiert und dann zehnmal gewaschen. Nach erfolgter Substratreaktion mit Lösung I wurde für die graphische Auswertung die gemessenen Absorptionen bei 405 nm gegen den Logarithmus der als Standard eingesetzten Antigenkonzentrationen aufgetragen. Dabei ergab sich entsprechend dem Prinzip des kompetitiven ELISAs eine Eichkurve mit inverser Abhängigkeit zwischen Absorptionswert und Antigenkonzentration des Standards.

C.2.3.3 Western Blot im Semi-Dry-Verfahren

Proteine wurden mittels einer SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese aufgetrennt und anschließend nach der Methode von Kyhse-Anderson (Kyhse-Anderson, 1984) im gerichteten, elektrischen Feld auf eine Membran (Immobilon-P) transferiert.

Folgende Lösungen wurden dafür verwendet:

A: 300mM Tris, 20%(v/v) Methanol, pH 10,4;

B: 25 mM Tris, 20%(v/v) Methanol, pH 10,4;

C: 25 mM Tris, 40 mM ϵ -Aminocapronsäure, 20%(v/v) Methanol, pH 9,4.

(Alle Lösungen wurden vor Gebrauch entgast)

Der Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine erfolgte im Semi-Dry-Verfahren zwischen zwei Graphitelektroden. Filterpapiere (Fa. Whatman, Nr.1) und Blot-Membranen wurden jeweils auf die Größe des Elektrophoresegels zugeschnitten. Zur ausreichenden Benetzung war es notwendig, die Immobilon-P-Membran vor Gebrauch in 100% Methanol und danach in Aqua dest. zu inkubieren. Um Kontakt zwischen den Elektroden, dem SDS-Polyacrylamid-Gel und der Blotmembran herzustellen, wurden folgendermaßen vorgegangen: Es wurden 6 Lagen Filterpapier in Lösung A getränkt und luftblasenfrei auf die Anode gelegt. Darüber wurden 3 Lagen Filterpapier geschichtet, die mit Lösung B befeuchtet waren. Hierauf folgte die Blotmembran und anschließend das SDS-Polyacrylamid-Gel, die jeweils zuvor getrennt in Lösung B getränkt worden

waren. Das Gel wurde abschließend mit 9 Lagen in Lösung C getränktem Filterpapier bedeckt. Auf diesem Stapel wurde nun die Kathode aufgebracht. Der Transfer wurde in 90 Minuten bei einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA je cm² Gelfläche durchgeführt. Zur Kontrolle wurde ein vorgefärbter Molekulargewichtsmarker in der Elektrophorese eingesetzt, der nach erfolgtem Transfer auch auf der Blotmembran sichtbar wurde. Das Polyacrylamidgel wurde im Anschluß an den Western Blot einer Silberfärbung (C.2.2.2) unterzogen, um nicht übertragene Proteine nachzuweisen. Auf die Blotmembran transferierte Proteine wurden mittels Immunoprint (C.2.3.4) visualisiert.

C.2.3.4 Immunoprint

Die bei den Spaltungen von Plasminogen entstandenen Fragmente wurden mittels Immunoprint in Anlehnung an die Methode von Ogata et al. (Ogata et al., 1983) auf MPIg untersucht.

Folgende Lösungen waren erforderlich:

A: 150 mM NaCl, 100 mM Na₂HPO₄ x H₂O, 0,05% (v/v) Tween 20, pH 7,2;

B: 1,0 M NaSCN, ε-Aminocapronsäure, 0,05% (v/v) Tween 20, pH 5,5;

C: 50 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 7,4;

D: 15 mg 4-Chlor-1-Naphthol in 5 ml Methanol, 0,5 ml 0,6% (v/v) Perhydrol ad 30 ml Lösung C.

Nach erfolgtem Transfer der elektrophoretisch getrennten Proteine (s. C.2.3.3) wurden freie Bindungsstellen auf der Blotmembran blockiert, indem die Membran zweimal 15 Minuten mit Lösung A bei Raumtemperatur auf einem Taumelgerät inkubiert wurde. Ein gegen das zu untersuchende Proteinfragment gerichteter Antikörper wurde in Lösung B in optimierter Konzentration verdünnt und die Membran darin über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal mit Lösung A gewaschen und anschließend wurde ein biotinylierter Antikörper aufgetragen, der gegen das zuvor verwendete Immunglobulin gerichtet ist. Nach 2-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde überschüssiges Reagenz

dreimal mit Lösung A von der Membran gespült und ein Komplex aus Avidin und Peroxidase in einer Verdünnung von 1:5000 in Lösung A zugesetzt. Nach einer halben Stunde wurde gründlich mit Lösung A gewaschen und durch Zugabe von Lösung D die Substratreaktion gestartet. Hatten die spezifisch angefärbten Banden eine ausreichende Intensität gegenüber dem Hintergrund erreicht, wurde die Farbentwicklung durch Spülen mit Aqua dest. beendet und die Membran zwischen 2 Filterpapieren unter Lichtausschluß getrocknet und fotografisch dokumentiert.

C.2.4 Enzymaktivitätsuntersuchungen

C.2.4.1 Aktivierung von Pro-Matrixmetalloproteinasen (pro-MMPs)

Bei den Untersuchungen zur limitierten Proteolyse von Plasminogen *in vitro* wurden auch MMPs verwendet.

Zur Aktivierung der in Proform vorliegenden MMPs wurden folgende Puffer eingesetzt:

A: 20 mM TrisHCl, 3 mM CaCl₂, pH 8,0

B: 50 mM TrisHCl, 5 mM CaCl₂, 0,5 mM, 0,5 mM ZnCl₂, 300 mM NaCl,
0,02 % (v/v) NaN₃, pH 7.5

Prof. H. Tschesche (Universität Bielefeld) stellte freundlicherweise notwendige Antigenmengen von pro-MMP-8 und pro-MMP-9 zur Verfügung.

Pro-MMP-9 wurde durch Inkubation mit 2 mM HgCl₂ in Puffer A für 1 h bei 37°C aktiviert. Pro-MMP-8 konnte durch Inkubation mit 1mM HgCl₂ in Puffer B für 2 h bei 37°C aktiviert werden. Die Ansätze zur Untersuchung der limitierten Proteolyse erfolgten in den entsprechenden Puffern ohne Zusatz von HgCl₂. Die käuflich erworbenen MMPs (C.1.2.9.) wurden entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

C.2.4.2 Aktivierung von Cathepsinen

In Anlehnung an Methods in Enzymology (Vol 80., p. 535ff) wurden zur Aktivierung der verschiedenen Cathepsine folgende Lösungen verwendet:

A: 88 mM KH_2PO_4 , 12 mM NaH_2PO_4 , 1,33 mM Na-EDTA, pH 6,0;

B: 150 mM NaCl, 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$,
0,05% (v/v) Tween 20, pH 7,4

Die Aktivierung der Cathepsine erfolgte in den oben genannten Puffern, denen jeweils 1mM DTT beigefügt worden war. Für die Aktivierung von Cathepsin B wurde Puffer A verwendet. Alle Aktivierungsansätze wurden bei 37°C für eine halbe Stunde inkubiert. Der Aktivitätsnachweis von Cathepsin G wurde in Puffer B geführt.

Die limitierten Proteolyse von Plasminogen durch Cathepsine wurde in den entsprechenden Puffern ohne Zugabe von DTT untersucht.

C.2.4.3 Nachweis der Aktivität von MMPs bzw. Cathepsinen

Der Nachweis der Enzymaktivität von MMPs und Cathepsinen erfolgte einerseits mittels Zymographie (C.2.2.1.2) und andererseits mit einem käuflichen Kit zur Bestimmung der gelatinolytischen Aktivität (C.1.2.9).

C.2.5 Inkubation von Plasminogen mit Granulozyten

C.2.5.1 Isolierung segmentkerniger Granulozyten aus EDTA-Vollblut

Die für die Vorversuche zur limitierten Proteolyse von Plasminogen notwendigen Granulozyten wurden durch Isolierung über einen Percoll-Gradienten gewonnen.

Dabei kamen folgende Reagenzien zur Verwendung:

A: 150 mM NaCl, 10 mM NaH₂PO₄ x H₂O, 10 mM Na₂HPO₄ x H₂O, pH 7,4;

B: 55% (v/v) Percoll in Puffer A.

Das mit dem Abnahmesystem von Sarstedt gewonnene EDTA-Blut wurde in 10 ml Röhrchen umgefüllt und 20 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Nachdem der trübe, thrombozytenreiche Überstand abgenommen und verworfen wurde, wurde bei 3000 rpm erneut für 20 min zentrifugiert. Der nun klare Überstand wurde für einen späteren Ausstrich zur Bestimmung der Leukozytenkonzentration nach Durchführung der Gradientenzentrifugation aufgehoben werden. Die Leukozytenschicht ("buffy coat") wurde mit einer Pipette vorsichtig von der viskösen Erythrozytenphase abpipettiert und mit Puffer A auf das 6-10-fache Volumen des entsprechenden Ausgangsvolumen gebracht. Die Erythrozyten wurden verworfen. Von der verdünnten Leukozytensuspension wurden jeweils 5 ml auf 3 ml Puffer B vorsichtig aufgebracht und die Röhrchen, die nun einen Percoll-Gradienten enthielten, für 30 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Die sich auf den abzentrifugierten Erythrozyten befindliche weißliche Schicht von Granulozyten wurde mit einer Pipette abgenommen und zweimal mit Puffer A aufgeschwemmt und für jeweils 10 min bei 1500 bzw. 1200 rpm abzentrifugiert. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde mit dem zurückgestellten Plasma aufgeschwemmt und nach Auftragen auf einen fettfreien Objektträger getrocknet und gefärbt, um die Leukozytenkonzentration durch Auszählen feststellen zu können. Danach wurden die Granulozyten in Medium resuspendiert und auf eine Zellzahl von 1×10^6 /ml eingestellt.

C.2.5.2 Granulozytenstimulation

Die Granulozyten, die für die Inkubationsversuche mit Plasminogen verwendet wurden, wurden zum Teil stimuliert, indem Zymosan in der folgenden Aufbereitung zugefügt wurde:

1 g Zymosan wurde im Wasserbad für 30 min in 50 ml 0,9% NaCl gekocht und nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur 10 min bei 2000g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet dreimal mit 0,9% NaCl gewaschen. Anschließend wurde das Pellet auf ein Volumen von 50 ml mit 0,9% NaCl aufgefüllt und in Aliquots von 1 ml bei -78°C eingefroren.

D Ergebnisse

D.1 Optimierung des Sandwich-ELISAs für Miniplasminogen

D.1.1 Aufreinigung von Hühnerantikörpern durch Affinitätschromatographie bzw. Dextransulfat-Fällung

Angesichts der großen Anzahl von zu messenden Proben war es notwendig, größere Mengen des Antikörpers gegen die neoantigene Determinante des Miniplasminogen bereitzuhalten. Aufgrund der Ergebnisse von Borst (Borst M, 1994) fiel die Wahl auf Antikörper aus Hühnereigelb. Darüber hinaus sollten weitere Erfahrungen mit der Verwendung von Hühnerantikörpern gesammelt und die Aufreinigung durch Affinitätschromatographie mit der Aufreinigung durch Dextransulfat-Fällung verglichen werden.

Bei dieser sog. Tierversuchs-Ersatzmethode wurden die Antikörper nach der Immunisierung von Hühnern aus dem Eigelb isoliert und nicht wie üblich aus dem Blut von immunisierten Säugetieren. Alle Immunisierungen waren in der spezifisch Pathogen-freien- (SPF-) Versuchshuhnhaltung in Damsdorf bei Potsdam unter Leitung von Herrn Dr. med. vet. H. Kobilke durchgeführt worden. Zur Immunisierung war ein acht Aminosäuren langes Peptid aus dem N-terminalen Bereich der neoantigenen Determinante des MPIg eingesetzt worden, das zur besseren Wasserlöslichkeit um drei polare Aminosäuren (Lysin-Arginin-Lysin) erweitert ($\text{H}_2\text{N-V-A-P-P-P-V-V-L-K-R-K-V-COOH}$) und von M. Borst als Peptid 3 bezeichnet worden war (Borst M, 1994). Das Immunisierungsprotokoll wurde ausführlich von M. Borst beschrieben, der auch die bis zur Isolierung und Aufreinigung der Hühnerantikörper (sog. IgY) bei -20°C gelagerten Eidotter zur Verfügung stellte.

Aus insgesamt 280 ml Hühnereigelb-Rohextrakt konnten nach Immunselektion und Immunabsorption 672 μg spezifische MPIg-Antikörper gewonnen werden. Unter Berücksichtigung der Ankonzentrierung durch die Eigelbaufarbeitung um den Faktor 3, betrug die Ausbeute je ml Eigelb-Rohextrakt 0,8 μg spezifisches IgY gegen MPIg. Betrachtet man die Antikörpertiter, die jeweils mit Hilfe eines

indirekten ELISAs (C.2.3.2.1) ermittelt wurden, so konnte ausgehend von einem Titer von 1:640 im Rohextrakt nach Immunselektion die Hälfte (Titer 1:320) und nach Immunabsorption ein Viertel (Titer 1:160) des spezifischen Antikörpers isoliert werden. Der Antikörper wurde mit H4/6 bezeichnet.

Eine weitere, weniger aufwendige Methode zur Isolierung von IgY aus Hühnereigelb stellt die Dextransulfat-Fällung dar. Wegen der schon erfolgten Rohextraktion der Antikörper aus dem Eigelb mußte die von Jensenius (1981) beschriebene Methode modifiziert werden (s. C.2.3.1.3).

Aus den eingesetzten 300 ml Rohextrakt wurden 12 Wochen nach Grundimmunisierung von Huhn 4 165g Antikörper isoliert. Aufgrund der Aufkonzentrierung des Rohextrakts um den Faktor 3 (s.o.) ergab sich eine Endkonzentration von 0,183 g Antikörper je ml Eigelb-Rohextrakt. Eine Abtrennung der mit Plg interagierenden Antikörper wurde nicht vorgenommen. Von dem Antikörpertiter im Rohextrakt (1:640) fand sich ein Achtel (1:80) der Antikörper im Endprodukt wieder.

D.1.2 Spezifität des Antikörpers nach Dextransulfat-Fällung

Vor dem Einsatz des Antikörpers aus der Aufreinigung durch Dextransulfat-Fällung als Primärantikörper im Sandwich-ELISA sollte seine Spezifität nachgewiesen werden. Dafür wurde eine SDS-PAGE (C.2.2.1.1) durchgeführt, in der jeweils 0,05 nmol MPLg und Plg in einer Spur aufgetragen wurden (Abb. 4a). In dem daran anschließenden Western-Blot wurde ein Streifen der Blotmembran mit dem Hühnerantikörper aus der Dextransulfat-Fällung inkubiert. Parallel dazu wurde als Positivkontrolle bei einem weiteren Streifen der Blotmembran der etablierte, polyklonale Antikörper aus Kaninchen eingesetzt.

Die Positivkontrolle zeigte ein deutliches Signal bei 38 kD (Abb. 4b), die der Bande für gereinigtes MPLg entspricht. Bei Verwendung des Hühnerantikörpers nach Dextransulfat-Fällung war keine deutlich abzugrenzende Bande in der zu erwartenden Höhe erkennbar. Es ist vielmehr aufgrund der diffusen

Anfärbung der Membran von einer unspezifischen Bindung des Antikörpers an die Membran auszugehen (Abb. 4c).

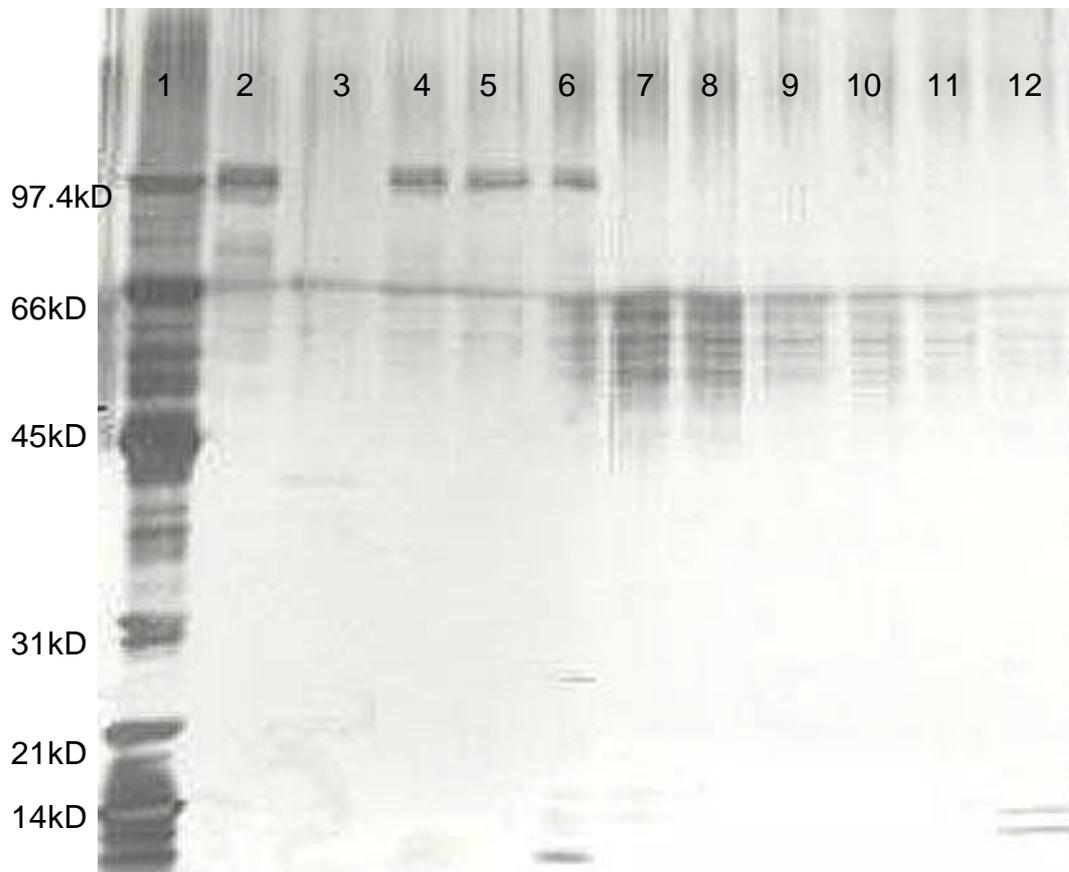


Abb. 4a Proteolytische Spaltung von Plg.
 SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen und Silberfärbung. Inkubation von Aliquots à 1000 µl des jeweiligen Aktivierungspuffers, Plg-Konz. von 0,2 µM, Enzym-Konz. von 40 nM über Nacht bei 37°C, 25 µl des Inkubationsansatzes pro Tasche.

- Spur 1: Molekulargewichtsmarker
- Spur 2: Plg (0,05 nmol)
- Spur 3: MPlg (0,05 nmol)
- Spur 4: Plg (0,05 nmol) nach Inkubation mit PIn (25 pmol)
- Spur 5: Plg (0,05 nmol) nach Inkubation mit Miniplasmin (25 pmol)
- Spur 6: Plg (0,05 nmol) nach Inkubation mit MMP-9 (25 pmol)
- Spur 7: Plg (0,05 nmol) nach Inkubation mit MMP-8 (25 pmol)
- Spur 8: Plg (0,05 nmol) nach Inkubation mit MMP-2 (25 pmol)
- Spur 9: Plg (0,05 nmol) nach Inkubation mit Cathepsin B (25 pmol)
- Spur 10: Plg (0,05 nmol) nach Inkubation mit Cathepsin G (25 pmol)
- Spur 11: Plg (0,05 nmol) nach Inkubation mit PMN-Elastase (25 pmol)
- Spur 12: Plg (0,05 nmol) nach Inkubation mit Tryptase (25 pmol)

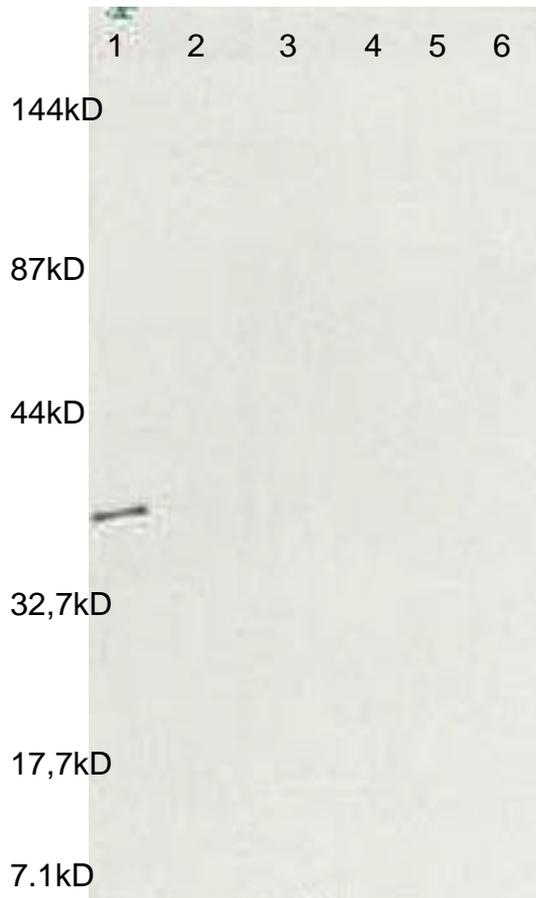


Abb. 4b Western-Blot von Abb 4a auf Immobilon-Membran mit Kaninchen Antikörper gegen MPIg.

- Spur 1: Plg und MPIg (je 0,05 nmol)
- Spur 2: Plg (0,05 nmol) nach Inkubation mit MMP-9 (25 pmol)
- Spur 3: Plg (0,05 nmol) nach Inkubation mit MMP-8 (25 pmol)
- Spur 4: Plg (0,05 nmol) nach Inkubation mit MMP-2 (25 pmol)
- Spur 5: Plg (0,05 nmol) nach Inkubation mit Cathepsin B (25 pmol)
- Spur 6: Plg (0,05 nmol) nach Inkubation mit Cathepsin G (25 pmol)

Bei der Inkubation der Blotmembran einer weiteren SDS-Elektrophorese mit IgY nach Affinitätschromatographie färbte sich neben der deutlichen, scharfen Bande des Miniplasminogens bei 38 kD eine breite, schwächere Bande in Höhe 87 kD an, die der Bande von Plasminogen entspricht (Abb. 7c).

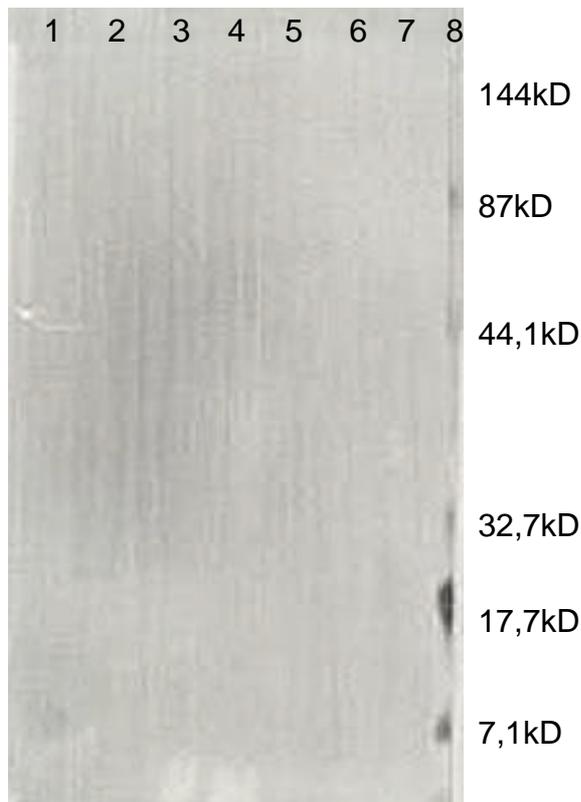


Abb. 4c Western-Blot von Abb 4a auf Immobilon-Membran mit Mplg-Antikörpern aus Huhn, Aufreinigung durch Dextransulfat-Fällung.

- Spur 1: Plg (0,05 nmol) nach Inkubation mit MMP-9 (25 pmol)
- Spur 2: Plg (0,05 nmol) nach Inkubation mit MMP-8 (25 pmol)
- Spur 3: Plg (0,05 nmol) nach Inkubation mit MMP-2 (25 pmol)
- Spur 4: Plg (0,05 nmol) nach Inkubation mit Cathepsin B (25 pmol)
- Spur 5: Plg (0,05 nmol) nach Inkubation mit Cathepsin G (25 pmol)
- Spur 6: Plg (0,05 nmol) nach Inkubation mit PMN-Elastase (25 pmol)
- Spur 7: Plg und MPlg (je 0,05 nmol)
- Spur 8: Molekulargewichtsmarker

In verschiedenen Dot-Blot-Ansätzen zeigte sich darüber hinaus eine Kreuzreaktivität des durch Dextransulfat-Fällung gewonnenen Hühnerantikörpers gegen Plg. Die Bindung an Plg war auch bei der Verwendung von Proben-Puffer, wie er im MPlg-ELISA (C.2.3.2.3) Verwendung findet, nachweisbar. Wegen dieser Unspezifität wurde der durch Dextransulfat-Fällung erhaltene Antikörper nicht weiter verwendet.

D.1.3 Einsatz eines fluoreszierenden Substrates in den ELISA

Aufgrund der wenigen positiven Messergebnisse von MPIg in humanen Serumproben (Borst M, 1994) war davon auszugehen, daß MPIg möglicherweise in Konzentrationen auftritt, die unter der Nachweisgrenze des etablierten, spezifischen ELISAs liegen. Durch Verwendung eines fluoreszierenden Substrats sollte daher eine verbesserte Sensitivität bei gleichbleibender Spezifität erreicht werden.

Als fluoreszierendes Substrat wurde Methyl-Umbelliferyl-Phosphat gewählt, das nach Dephosphatierung durch Phosphataseaktivität in die fluoreszierende Form gespalten wird. Der übrige Aufbau des Sandwich-ELISAs wurde entsprechend der Anleitung von M. Borst (Borst M, 1994) durchgeführt. Als Primärantikörper dienten der Antikörper gegen die Neodeterminante aus Kaninchen, K3I (benannt nach dem ersten mit Peptid 3 immunisierten Kaninchen), und aus Hühnereigelb, aufgereinigt durch Affinitätschromatographie, H4/6 (benannt nach Huhn 4 mit einer 6 wöchigen Immunisierung).

Bestimmt wurde nun die untere Nachweisgrenze für Miniplasminogen anhand der Fluorescent Signal Units (FSU) der Nullwerte (Normalplasma ohne Miniplasminogen). Um mindestens eine 5%ige Signifikanz für die Überschreitung der Nullwertfluoreszens zu erreichen, mußte die niedrigste MPIg-Konzentration 2 Standardabweichungen über dem Mittelwert von jeweils 4 Nullwerten liegen. Die Mittelwerte der Nullwerte bei den zwei verwendeten Primärantikörpern lagen eng beieinander, ebenso waren die Standardabweichungen ähnlich groß (Abb. 5). Daraus ergab sich eine niedrigste meßbare MPIg-Konzentration von 0,3 µg/ml bei Verwendung des IgY bzw. 10 µg/ml bei Verwendung des Kaninchen-Antikörpers in der Kavität und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors 1:5 1,5 µg/ml bzw. 50 µg/ml in der Probe (Abb 5). Da der Einsatz des fluoreszierenden Substrates nicht zu einer Erhöhung der Sensitivität führte, wurde bei weiteren Untersuchungen wieder auf das Substrat ABTS zurückgegriffen.

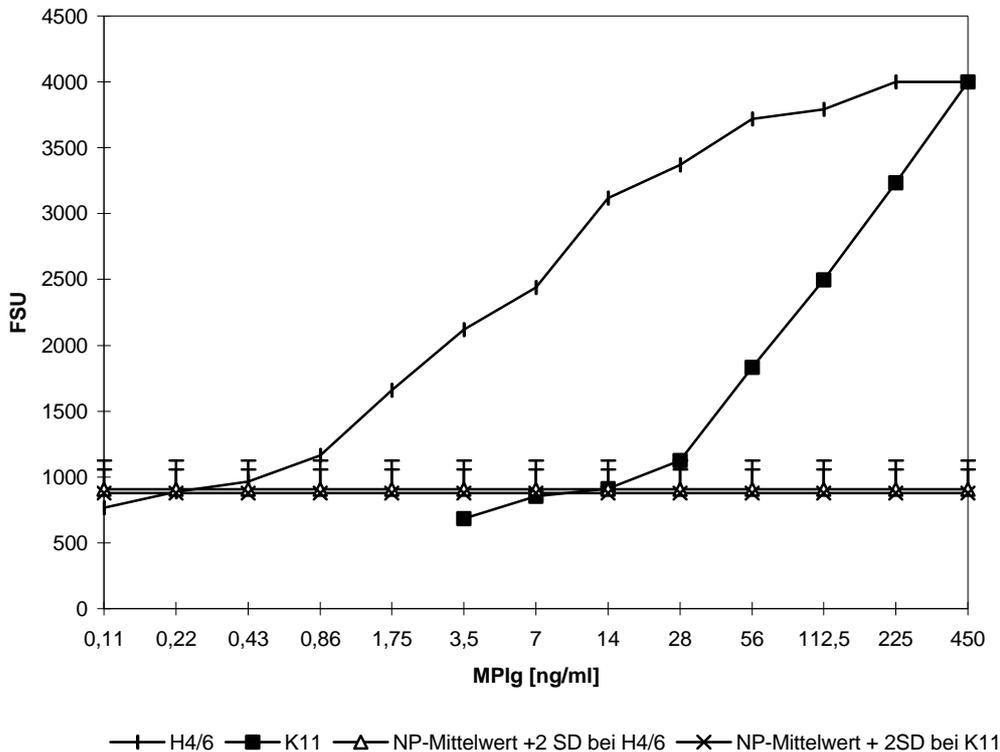


Abb. 5 Ermittlung der Nachweisgrenze des Sandwich-ELISA mit fluoreszierendem Substrat anhand der MPlg-Standardkurve in Normalplasma, Proben-Puffer (1:5 verdünnt)
 Primärantikörper: H4/6 (13,8 µg/ml) bzw. K11 (10 µg/ml)
 Antigen: Miniplasminogen (MPlg) (0,11 - 450 ng/ml)
 Sekundärantikörper: DAKO A081 biotinyliert (2,5 µg/ml)
 Mittelwert aus 6 Nullwerten bei H4/6: 908 FSU
 mit 2 Standardabweichungen: 1056 FSU
 Mittelwert aus 6 Nullwerten bei K11: 877 FSU
 mit 2 Standardabweichungen: 1129 FSU

D.1.4 Endversion des verwendeten Sandwich-ELISAs für Miniplasminogen

Aufgrund der Ergebnisse aller Optimierungsversuche wurde für die Messung der zur Verfügung stehenden Proben folgende Endversion gewählt (s. C.2.3.2.2):

Primärantikörper: polyklonaler AK aus Kaninchen (K11)
 Sekundärantikörper: biotinylierter, polyklonaler AK aus Kaninchen (DAKO A081)
 Substrat: ABTS.

D.2 Versuche zur Entstehung von Miniplasminogen

D.2.1 Limitierte Proteolyse von Plasminogen durch verschiedene Proteasen

Die enzymatische Spaltung von Plg zwischen Val₄₄₂ und Val₄₄₃, die zur Bildung von MPlg führt, ist *in vitro* vielfach für die Protease Elastase aus neutrophilen Granulozyten sowie aus Pankreas beschrieben worden (Machovich & Owen, 1989; Moroz, 1981; Sottrup-Jensen et al., 1978; Takada et al., 1988). Der Einfluß anderer Proteasen, wie etwa der Matrix-Metallo-Proteasen oder der Cathepsine B und H, inbezug auf die Bildung von Miniplasminogen ist bisher noch nicht untersucht worden.

D.2.1.1 Nachweis der Enzymaktivität

Zur Bestimmung der Enzymaktivität kam ein Test zum Einsatz, dessen Prinzip auf der gelatinolytischen Eigenschaft der zu untersuchenden Enzyme beruht (C.1.2.9). Der käufliche Kit verwendet mehrfach biotinylierte Gelatine, die an eine Festphase, wie z. B. eine Mikrotiterplatte, über einen Avidin-Komplex gebunden wird. Die nicht gesättigten Biotinylreste werden nun von einem Avidin-Peroxidase-Komplex besetzt. Ist die Gelatine vor der Bindung an die Festphase prozessiert worden, so stehen für den POD-Komplex keine freien Bindungsstellen mehr zur Verfügung. Der Farbumschlag ist somit umgekehrt proportional zur Aktivität des Enzyms.

Die Enzyme (PMN-Elastase, Cathepsin-B, Cathepsin-G, Cathepsin-H, MMP-2, MMP-8, MMP-9(Boe), MMP-9(Tsch)) wurden nach den entsprechenden Vorschriften aktiviert (s. C.1.2.9.) und in äquimolarer Konzentration von 40 nM in Aliquots von 220µl TTC-Puffer, pH 7,5, mit biotinylierter Gelatine (25ng/ml) für 60 min bei 37°C gemäß der Vorschrift des Herstellers inkubiert (s. C.1.2.9). Als Positivkontrolle wurde Trypsin in gleicher Konzentration wie die übrigen Enzyme eingesetzt, was nach vollständigem Abbau der Gelatine ein Ausbleiben der Farbreaktion bewirkte. Gelatine ohne Enzymzusatz ergab die maximal erreichbare Extinktion und bildete somit den Nullwert, von dem die Restaktivität der gebundenen Peroxidase subtrahiert wurde. Alle Enzyme, mit

denen der Abbau von Plg durchgeführt werden sollte, zeigten eine deutliche Degradation der Gelatine (Abb. 6). Dabei baute die PMN-Elastase nahezu die gesamte eingesetzte Gelatine ab (93%), die geringste gelatinolytische Aktivität zeigte MMP-8.

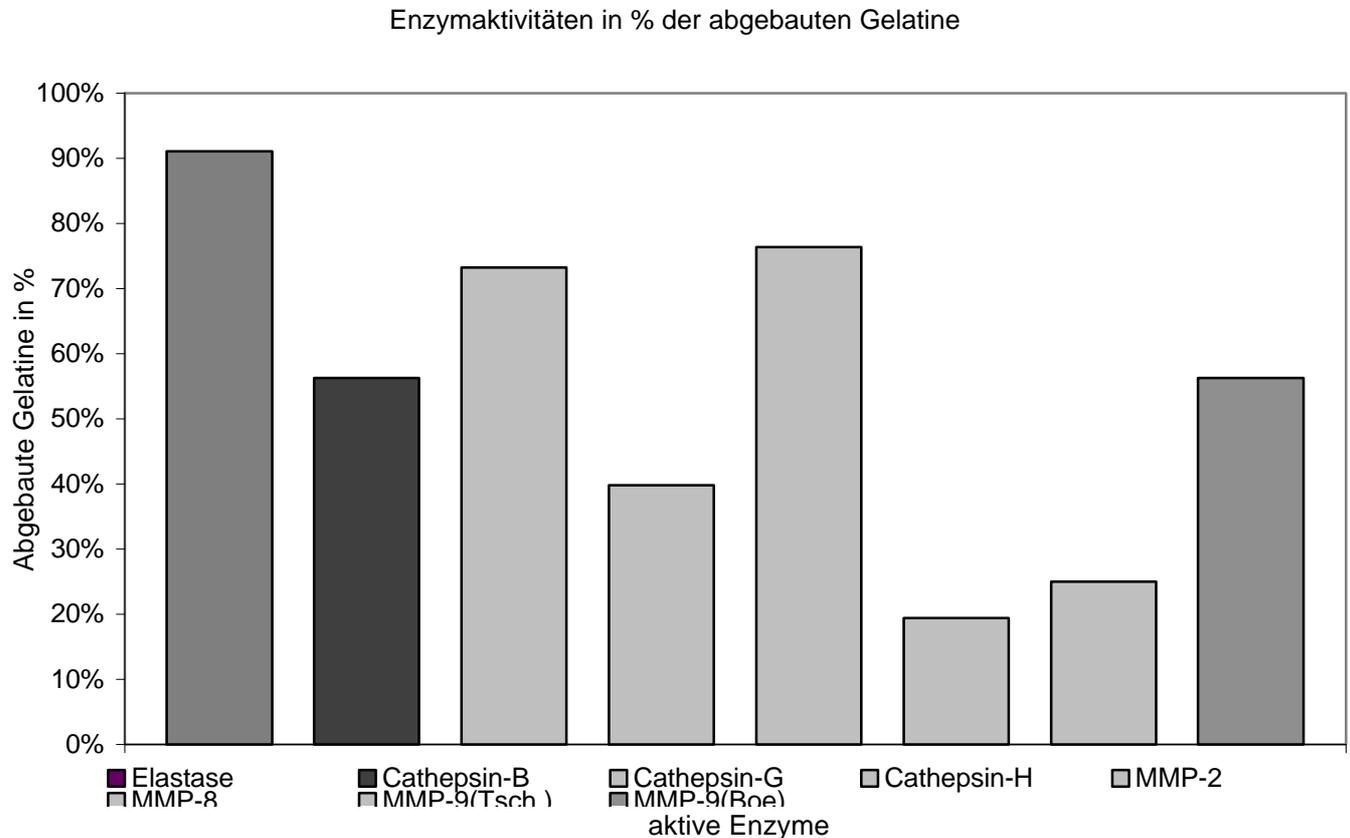


Abb. 6 Enzymaktivität

mittels Nachweis des Abbaus von Gelatine in % der eingesetzten Menge:

Elastase: 93%

Cathepsin-B: 56%

Cathepsin-G: 73%

Cathepsin-H: 40%

MMP-2: 76%

MMP-8: 19%

MMP-9(Tsch): 25%

MMP-9(Boe): 56%

Enzymmenge: 8,8 pmol auf 220 µl Inkubationsansatz

Inkubation: 60 min bei 37°C

(MMP-9 ist von Prof. Tschesche, Bielefeld, (MMP-9(Tsch)) zur Verfügung gestellt worden.

Eine weitere Charge ist von Boehringer Ingelheim (MMP-9(Boe) erworben worden)

(Aktivierung der Enzyme siehe C.1.2.9.)

Darüber hinaus wurde zum Nachweis der Enzymaktivität auch eine Zymographie (C.2.2.1.2) mit Gelatine als Proteinbestandteil im Gel durch-

geführt. Alle eingesetzten Enzyme (s.o.) zeigten in der Zymographie gelatino-lytische Aktivität. Eine quantitative Auswertung wurde nicht durchgeführt.

D.2.1.2 Plg-Spaltung durch aktive Proteasen

Um einen qualitativen Hinweis auf die Prozessierung von Plg zu erhalten, wurden die oben genannten Enzyme (Abb. 6) dem selben Aktivierungsansatz entnommen, wie bei den Aktivitätsnachweisen (s. D.2.1.1). Die Inkubation der Proteasen mit Plasminogen erfolgte jeweils in Aliquots von 220 µl PBS-Puffer (pH7,4) für 60 min bei 37°C. Zu jedem Ansatz wurde 0,26 nmol Plg zugesetzt, so daß eine der Serumkonzentration ähnliche Konzentration an Plg von 1,2 µM vorlag. Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von 8,8 pmol des jeweiligen aktiven Enzyms. Beendet wurde die Reaktion durch Denaturierung mittels Erhitzen unter reduzierenden Bedingungen.

Um äußere Einflüsse des Inkubationsansatzes ohne Enzym auszuschließen, wurden die Positivkontrollen ebenso für 60 min auf 37°C erwärmt und anschließend dem Denaturierungsprozeß unterzogen.

Das Auftreten einer proteolytischen Spaltung des Plg konnte mittels einer SDS-Gel-Elektrophorese (Abb. 7a) und parallel dazu in Western-Blots mit den entsprechenden Antikörpern gegen Plg und MPlg (Abb. 7b und c) nachgewiesen werden. Als Positivkontrollen wurden je 18 pmol MPlg und Plg in je einer Tasche aufgetragen, entsprechend einer Menge intaktem Plg, das aus den Inkubationsansätzen pro Tasche der SDS-PAGE enthalten gewesen wäre.

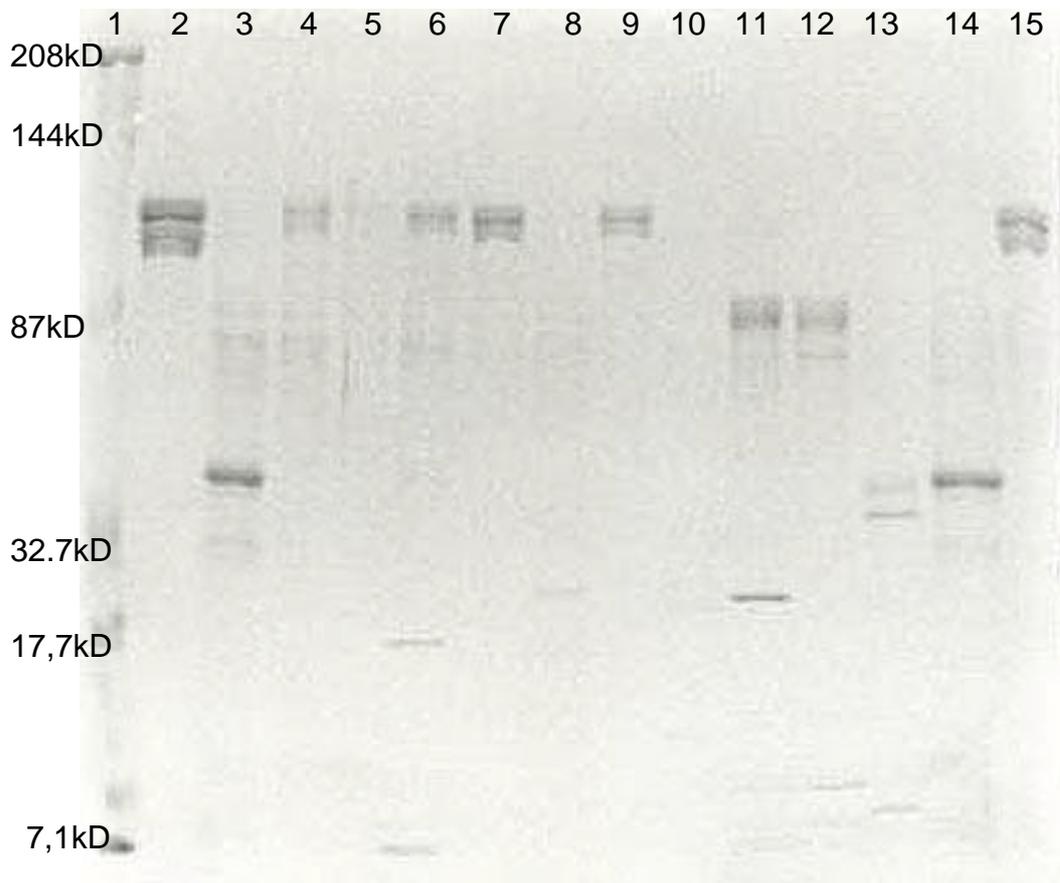


Abb. 7 a Proteolytische Spaltung von Plg
 SDS-PAGE (5%-15%) unter reduzierenden Bedingungen, Coomassie-Blue-Färbung.
 Inkubation in Aliquots von 220 µl PBS (pH 7,4), Plg-Konz. von 1,2 µM, Enzym-Konz. von
 40 nM über 1h bei 37°C, 15 µl des Inkubationsansatzes pro Tasche

- Spur 1: Molekulargewichtsmarker
- Spur 2: Plg (1,2 µM)
- Spur 3: MPlg (1,2 µM)
- Spur 4: Plg (1,2 µM) nach Inkubation mit MMP-8 (40 nM)
- Spur 5: Plg (1,2 µM) nach Inkubation mit MMP-9 (Tsch.) (40 nM)
- Spur 6: Plg (1,2 µM) nach Inkubation mit MMP-9 (Boe.) (40 nM)
- Spur 7: Plg (1,2 µM) nach Inkubation mit MMP-2 (40 nM)
- Spur 8: Plg (1,2 µM) nach Inkubation mit Cathepsin B (40 nM)
- Spur 9: Plg (1,2 µM) nach Inkubation mit Cathepsin H (40 nM)
- Spur 10: Plg (1,2 µM) nach Inkubation mit Cathepsin G (40 nM)
- Spur 11: Plg (1,2 µM) nach Inkubation mit u-PA (40 nM) mit Aprotinin
im Überschuß
- Spur 12: Plg (1,2 µM) nach Inkubation mit u-PA (40 nM) ohne Aprotinin
- Spur 13: Plg (1,2 µM) nach Inkubation mit Elastase (40 nM)
- Spur 14: MPlg (1,2 µM)
- Spur 15: Plg (1,2 µM)

Bei allen verwendeten Proteasen war eine Abschwächung der Plg-Doppelbande gegenüber der Kontrolle im SDS-Gel zu beobachten. In Gegenwart der aktiven Enzyme Cathepsin B, G und PMN-Elastase, sowie bei der

Inkubation von Plg mit u-PA ließ sich ein nahezu vollständiger Abbau des Plasminogens nachweisen.

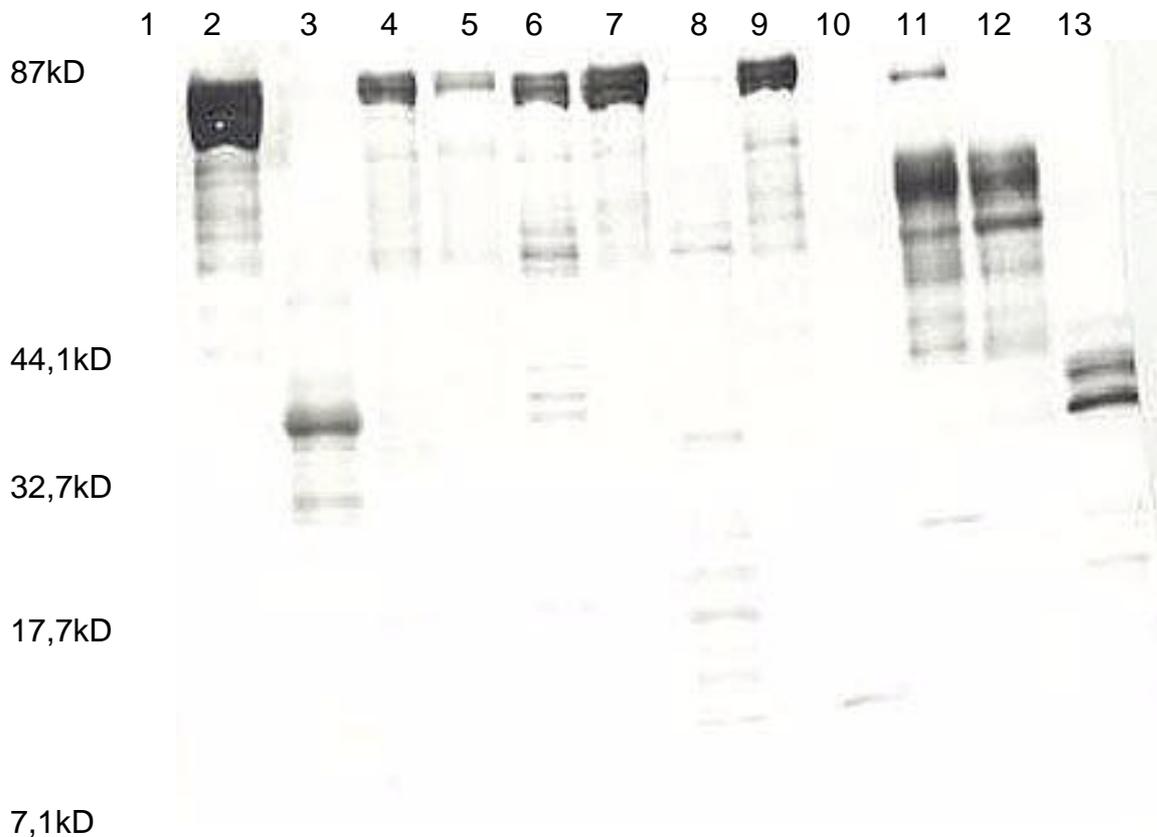


Abb. 7b Western-Blot von Abb. 7 a auf Immobilon-Membran mit polyklonalem anti-Plg IgG aus Kaninchen (DAKO A081) (1:100).

Die Spaltung von Plasminogen durch Elastase zeigte zwei starke Banden in der Größe von 35 kD und mehrere kleine Bruchstücke, die sich nur schwach anfärben ließen. Aus methodischen Gründen ist diese Spur auf dem Western-Blot mit der spezifischen Färbung von MPIg nicht abgebildet.

Die Inkubation mit u-PA führte, unabhängig vom Zusatz von Aprotinin, zu einer kräftigen Bande bei 87kD und vielen kleinen Produkten.

Cathepsin G verdaute Plg vollständig zu niedermolekularen Produkten, so daß nur schwache Banden bei etwa 17 kD und 7 kD erkennbar waren.

Cathepsin H besaß dagegen nur geringe proteolytische Potenz gegenüber Plg. Trotzdem waren einige schwache Banden vor allem im Bereich von rund 90 kD zu sehen.

Cathepsin B war mit großer Effektivität in der Lage, Plg in sehr verschieden große Bruchstücke zu spalten. Eine Bande fand sich in der Größenordnung von MPIg, die jedoch im Western-Blot nicht anfärbbar war.

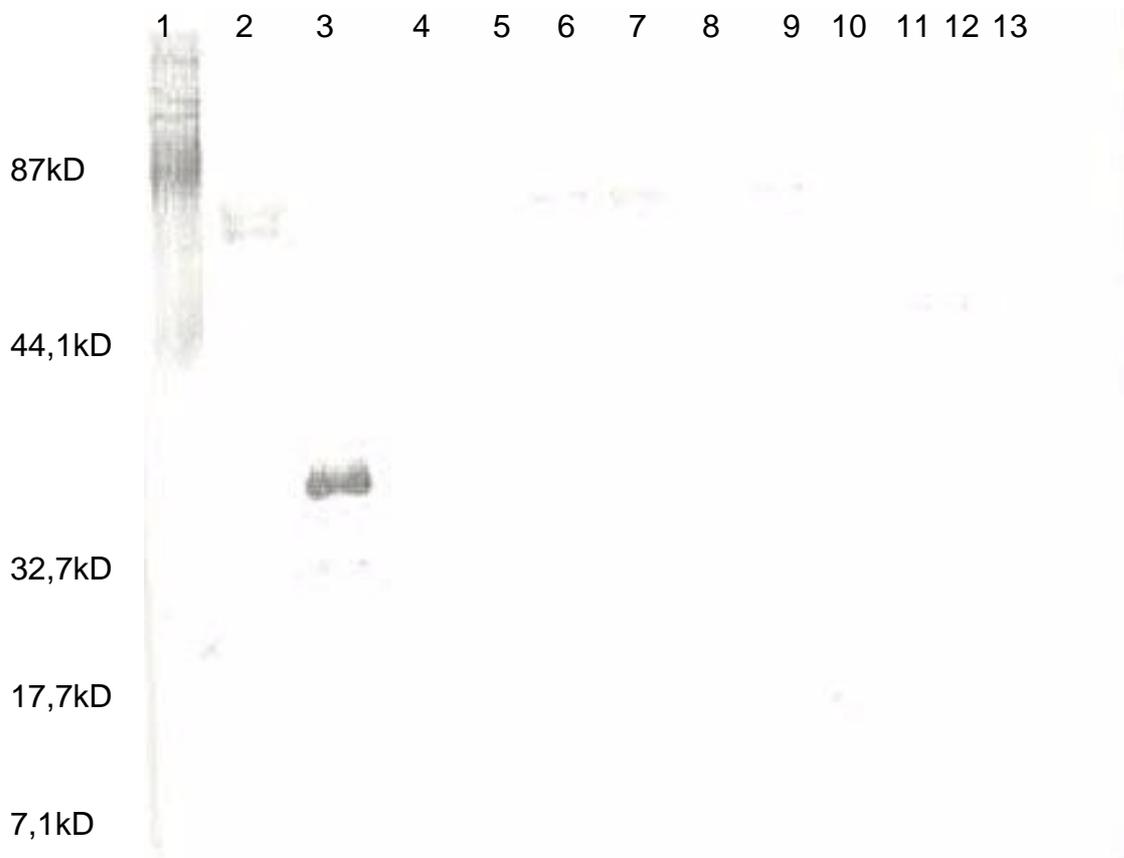


Abb. 7 c Western-Blot von Abb. 7a mit polyklonalem anti-MPIg IgY aus Hühnereigelb, aufgereinigt durch Affinitätschromatographie (1:100).

Von den eingesetzten Matrix-Metallo-Proteasen zeigten vor allem die beiden Ansätze mit MMP-9 unterschiedlicher Herkunft (Prof. Tschesche; Fa. Boehringer (C.2.4.1)) eine, wenn auch schwache Proteolyse von Plg. Bei MMP-9 von der Firma Boehringer lagen zwei Banden im Bereich von 40 kD, zu denen aber wiederum der Antikörper gegen MPIg im Western-Blot keine Affinität zeigt. MMP-9 von Prof. Tschesche zeigte eine stärkere Abnahme der Plg-Bande, ohne daß sich definierte Banden im niedermolekularen Bereich erkennen ließen.

Bei MMP-2 und MMP-8 ließen sich neben der Veränderung der Plg-Bande gegenüber der Kontrolle nur sehr schwache, weitere Banden im Western-Blot erkennen.

Aufgrund der geringen proteolytischen Aktivität der MMPs sollte in einem weiteren Ansatz untersucht werden, ob bei unterschiedlicher Inkubationsdauer die Proteasen MMP-8 und MMP-9 von Tschesche zu einer weiteren Spaltung von Plg führen. Die Inkubation erfolgte in einem Probenansatz von jeweils 500 µl PBS, pH 7,4, bei 37°C mit einer Konzentration von 1,2 µM Plg und 40 nM des entsprechenden aktivierten Enzyms. Zum Zeitpunkt 1h, 2h, 4h und 20 h nach Reaktionsbeginn wurden entsprechende Aliquots entnommen und durch Denaturierung unter reduzierenden Bedingungen die Proteasen deaktiviert (C.2.4.1).

In beiden Fällen sah man eine über den Zeitverlauf deutliche Abnahme der Intensität der Plg-Bande (Abb. 8).

Unter dem Einfluß von MMP-8 entstanden mehrere diskrete Banden, die innerhalb der ersten 4h Inkubationsdauer an Intensität zunehmen. Nach 20 h Einwirkung auf Plg zeigt sich eine Veränderung im Bandenmuster besonders im Bereich von 50 und 30 kD.

MMP-9 dagegen führte zu keinen eindeutig identifizierbaren, niedermolekularen Bruchstücken. Der Intensitätsverlustes der Plg-Bande läßt aber indirekt auf einen proteolytischen Abbau schließen.

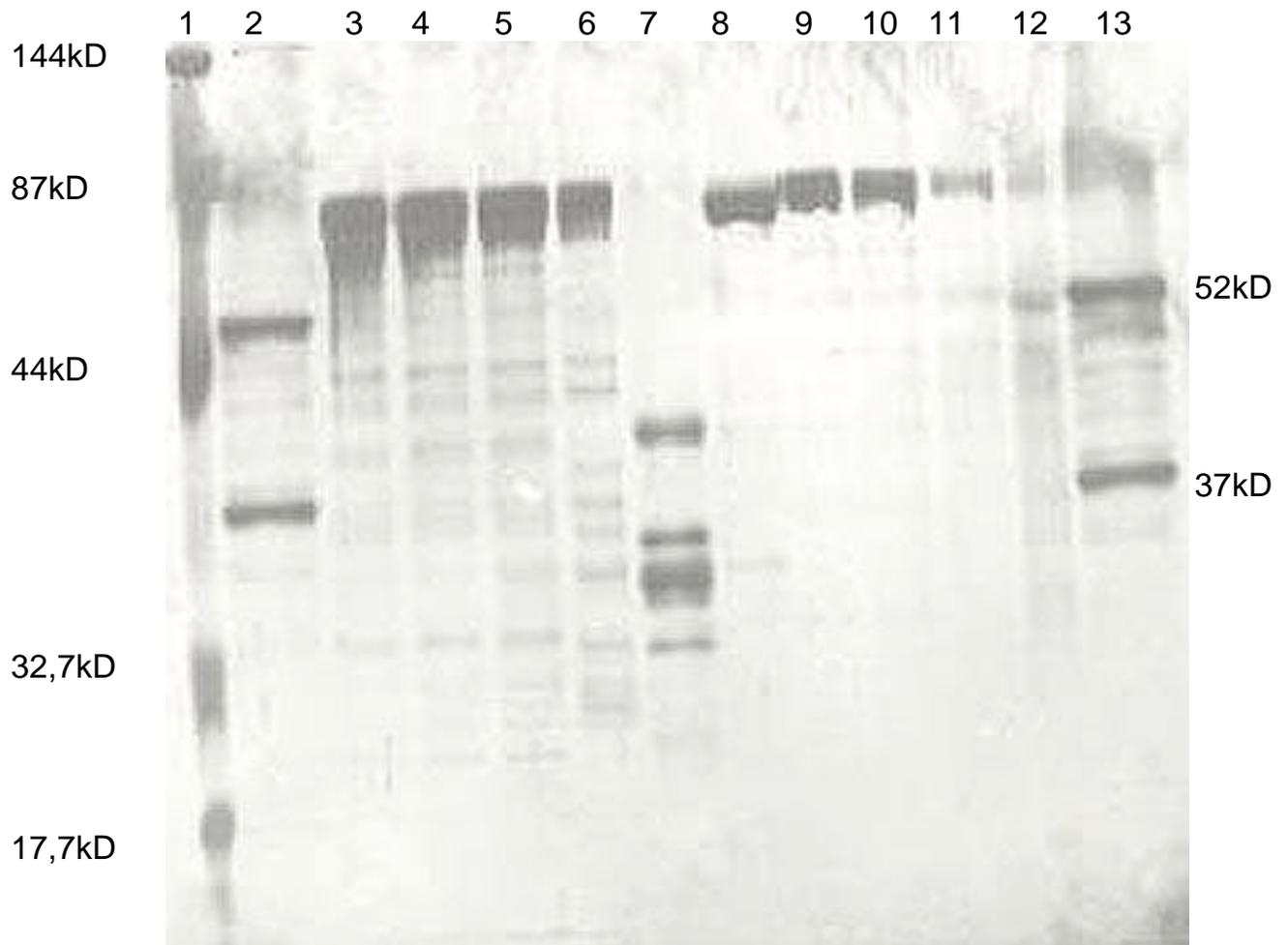


Abb. 8 Einfluß der Zeit auf die Proteolyse von Plg.
 SDS-PAGE (5%-15%), unter reduzierenden Bedingungen und Silberfärbung,
 Spur 1: Molekulargewichtsmarker
 Spur 2: Molekulargewichtsmarker
 Spur 3: Plg (1,2 µM) nach 1h Inkubation mit MMP-8 (40 nM)
 Spur 4: Plg (1,2 µM) nach 2h Inkubation mit MMP-8 (40 nM)
 Spur 5: Plg (1,2 µM) nach 4h Inkubation mit MMP-8 (40 nM)
 Spur 6: Plg (1,2 µM) nach 20h Inkubation mit MMP-8 (40 nM)
 Spur 7: Plg (1,2 µM) nach 2h Inkubation mit Elastase (40 nM)
 Spur 8: Plg (1,2 µM), MPIg (0,21 nmol)
 Spur 9: Plg (1,2 µM) nach 1h Inkubation mit MMP-9 (Tsch.)(40 nM)
 Spur 10: Plg (1,2 µM) nach 2h Inkubation mit MMP-9 (Tsch.)(40 nM)
 Spur 11: Plg (1,2 µM) nach 4h Inkubation mit MMP-9 (Tsch.)(40 nM)
 Spur 12: Plg (1,2 µM) nach 20h Inkubation mit MMP-9 (Tsch.) (40 nM)
 Spur 13: Molekulargewichtsmarker
 (Aktivierung der Enzyme siehe C.1.2.9.)

D.2.2 Limitierte Proteolyse von Plasminogen durch aktivierte neutrophile Granulozyten

Für den Nachweis der Beteiligung von neutrophilen Granulozyten an der Entstehung von MPIg wurden Plg und Normalplasma *in vitro* mit isolierten, neutrophilen Granulozyten inkubiert. Nach der Isolierung der Granulozyten mittels eines Percoll-Gradienten (C.2.5.1) wurden jeweils 50000 Zellen in die einzelnen Kavitäten gegeben, so daß eine Dichte von 1000 Granulozyten/ μ l Ansatz resultierte. Die Aktivierung der Granulozyten erfolgte durch Zymosan in einer Menge von 20 μ g pro Well. Die Inkubation wurde auf 12 Well-Zellkultur-Platten mit 5 ml Ansatz je Kavität bei 37°C durchgeführt. Zu den Zeitpunkten 1 h, 2 h und 4 h nach Granulozyten-Zugabe wurde jeweils ein Aliquot von 1 ml entnommen und sofort bei -70°C tiefgefroren. Um störende Einflüsse durch das Medium oder Zymosan ausschließen zu können, wurde als Negativkontrolle ein Ansatz ohne Zugabe von Granulozyten parallel durchgeführt. Die eingefrorenen Proben wurden am darauffolgenden Tag aufgetaut und mit Hilfe von Sandwich-ELISAs die Konzentrationen von Miniplasminogen und freier Elastase analysiert. Dabei wurden für den ELISA gegen MPIg als Primärantikörper K3I in einer Konzentration von 10 μ g/ml und als Sekundärantikörper der biotinylierte, käufliche Antikörper (DAKO A081) in einer Konzentration von 2,5 μ g/ml eingesetzt (C.2.3.2.3). Der Nachweis von Elastase erfolgte ebenfalls mittels ELISA, wobei die Elastase im Komplex mit im Überschuß zugefügtem α_1 -PI bestimmt wurde (C.2.3.2.4). Da im umgebenden Medium keine Elastase zu erwarten war, entsprach die Konzentration der komplexierten Elastase der Freisetzung durch die Granulozyten. Zur Kontrolle eines Plg-Abbaus ohne Nachweis von MPIg wurde Plg durch kompetitiven ELISA nachgewiesen.

Es zeigte sich, daß die MPIg-Konzentration bereits in Gegenwart von unstimulierten Granulozyten sowohl in unstimulierten Zustand über den gesamten Zeitraum der Inkubation deutlich anstieg (Abb. 9). Die Konzentrationen für MPIg erreichten den höchsten Wert von >1500 ng/ml nach einer Inkubationszeit von 4h ohne zusätzliche Stimulation der Granulozyten, obwohl

die Elastasekonzentration deutlich niedriger lag, als unter Stimulation der Granulozyten mit Zymosan. Dies bestätigte die Beobachtung von Borst (Borst M, 1994), daß bei dem Überschreiten eines bestimmten Elastase/Plg-Quotienten die Entstehung von MPIg abnimmt.

Unter Zugabe von Normalplasma und Stimulation der Granulozyten war ein Anstieg der MPIg-Konzentration erst nach einer Inkubationsdauer von 4h nachweisbar, obwohl Elastasekonzentrationen von >1000 ng/µl meßbar waren (Tab. 2, Abb. 9a). Die Werte der MPIg-Konzentration entsprachen bei der Inkubation mit Normalplasma allerdings nur einem Bruchteil der Konzentration der anderen Ansätze (Tab 2, Abb. 9a). Die Messung des unveränderten Plg in den Ansätzen lieferte signifikant niedrigere Werte für die Kontrollansätze ohne Granulozyten (s. Tab. 2).

Inkubation Ansatz je Kavität	MPIg [ng/ml]	MPIg [ng/ml]	Plg [µg/ml]	Elastase [ng/ml]
Messung nach 27d bei -20°C				
Med/Plg/Zym 1h	53,295	0	34,0595	0
PMN/Plg/Med 1h	351,46	620,585	45,379	525
PMN/Plg/Med/Zym 1h	188,765	230,74	42,025	1000
PMN/NP/Med/Zym 1h	2,375	0	43,139	1000
Med/Plg/Zym 2h	18,685	0	33,554	0
PMN/Plg/Med 2h	613,99	667,485	40,3275	490
PMN/Plg/Med/Zym 2h	370,125	291,63	43,579	1000
PMN/NP/Med/Zym 2h	2,37	0	44,1525	1000
Med/Plg/Zym 4h	77,535	0	33,9025	0
PMN/Plg/Med 4h	1500	1500	39,224	265
PMN/Plg/Med/Zym 4h	728,655	479,25	38,964	1000
PMN/NP/Med/Zym 4h	13,525	0	42,226	1000

Tab. 2 Proteolyse von Plg in Gegenwart von PMN

PMN: neutrophile Granulozyten

Plg: Plasminogen (eingesetzt: 200mg/Well)

NP: Normalplasma (eingesetzt: 2ml/Well)

Med: Medium (auf 5 ml/Well)

Zym: Zymosan (µg/Well)

Inkubationszeit: 1h, 2h, 4h

Angegebene Konzentrationen als Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

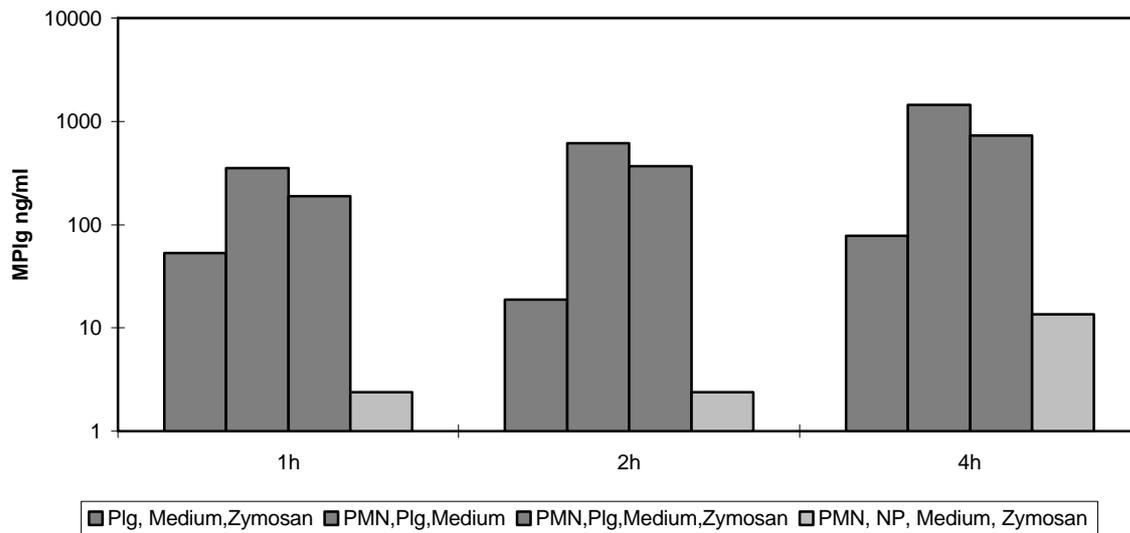


Abb. 9a Proteolyse von Plg in Gegenwart von PMN

PMN: neutrophile Granulozyten

Plg: Plasminogen (eingesetzt: 200mg/Well)

NP: Normalplasma (eingesetzt: 2ml/Well)

Med: Medium (auf 5 ml/Well)

Zym: Zymosan ($\mu\text{g}/\text{Well}$)

Inkubationszeit: 1h, 2h, 4h

Angegebene Konzentrationen sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen

In der parallel angesetzten SDS-Elektrophorese (Abb 9b) erschien in der Laufhöhe des Plg nur in den Inkubationsansätzen ohne Zusatz von Granulozyten eine Bande (s. Abb. 9b, Spuren 1,5,9). In den Ansätzen mit Normalplasma war durch Überlagerungen mit Plasmaproteinen keine Aussage zu den vorhandenen oder neu entstandenen Banden möglich. Dagegen kann in den Ansätzen mit Granulozyten durch das Fehlen der Plg-Bande auf einen proteolytischen Abbau des Plg geschlossen werden. Aus technischen Gründen konnten keine größeren Probenmengen auf das Gel aufgetragen werden, so daß für die Darstellung der MPlg-Bande in der Silberfärbung nicht genug Protein vorhanden war.

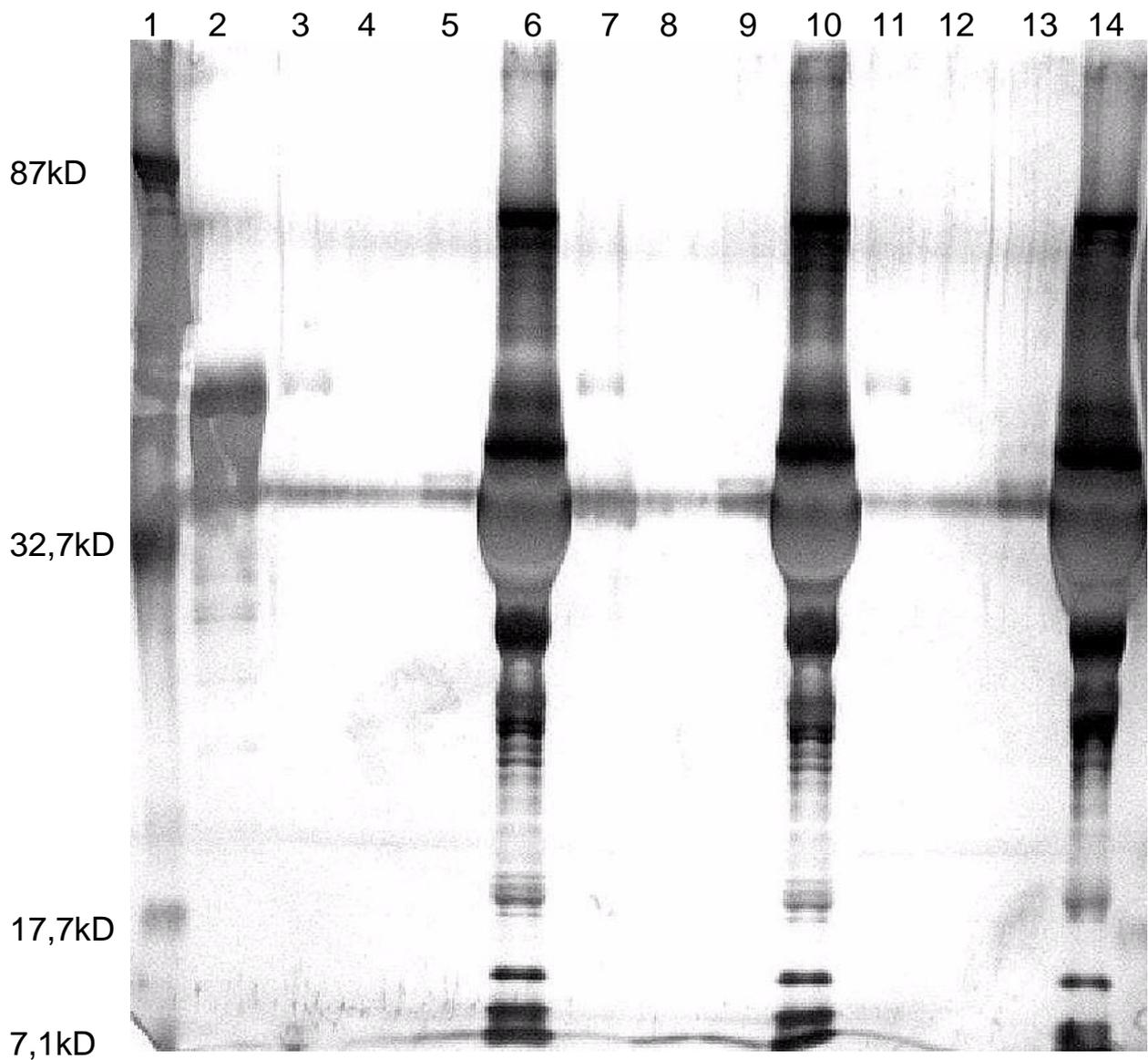


Abb. 9b Proteolyse von Plg in Gegenwart von PMN

SDS-Elektrophorese der Ansätze aus Abb 9a unter reduzierenden Bedingungen

- Spur 1: Molekulargewichtsmarker
 Spur 2: MPlg und Plg je 50 pmol
 Spur 3: Plg, Zymosan, Medium, 1h
 Spur 4: Plg, PMN, Medium, 1h
 Spur 5: Plg, PMN, Zymosan, Medium, 1h
 Spur 6: NP, PMN, Zymosan, Medium, 1h
 Spur 7: Plg, Zymosan, Medium, 2h
 Spur 8: Plg, PMN, Medium, 2h
 Spur 9: Plg, PMN, Zymosan, Medium, 2h
 Spur 10: NP, PMN, Zymosan, Medium, 2h
 Spur 11: Plg, Zymosan, Medium, 4h
 Spur 12: Plg, PMN, Medium, 4h
 Spur 13: Plg, PMN, Zymosan, Medium, 4h
 Spur 14: NP, PMN, Zymosan, Medium, 4h
 je Spur: Größenordnung: Plg 500 ng, MPlg 1 ng
 Abkürzungen wie Tab. 2

Wurden die in den Granulozytenansätzen gemessenen Konzentrationen von MPIg ins Verhältnis zu denen von Plg gesetzt, zeigte sich, daß der Quotient in den Ansätzen ohne Normalplasma und ohne Stimulation die höchsten Werte erreichte (s. Abb. 10).

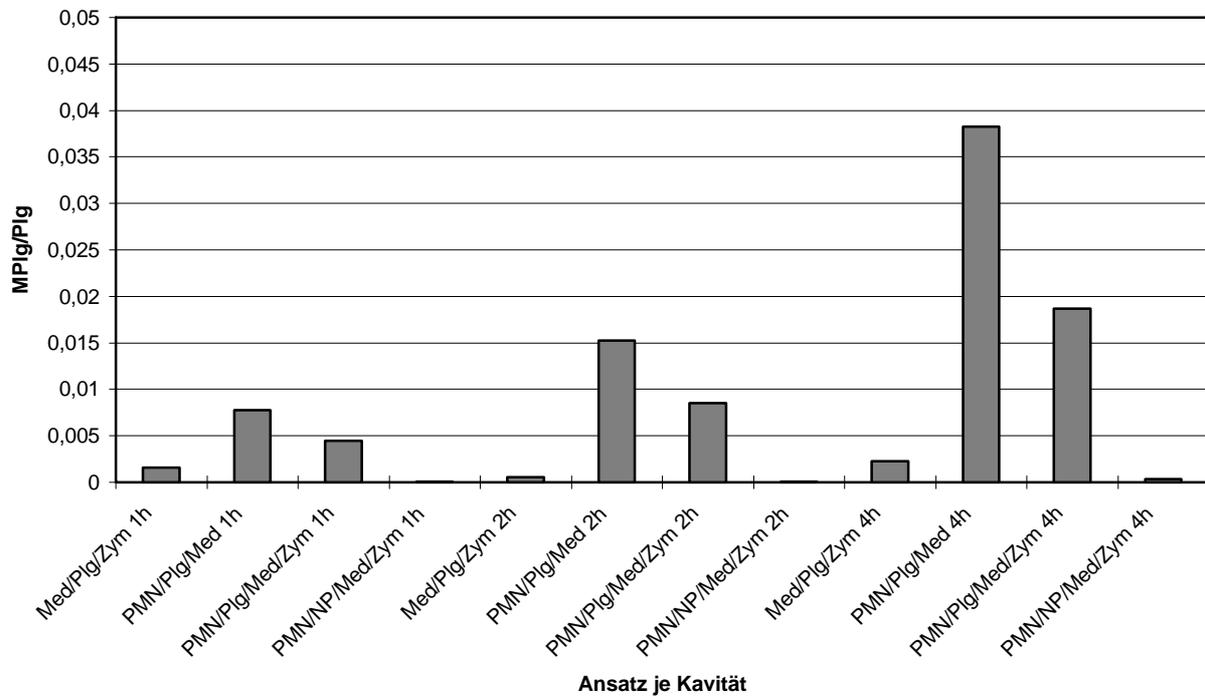


Abb. 10 Proteolyse von Plg in Gegenwart von PMN.

Ordinate: Quotient aus MPIg zu Plg

PMN: neutrophile Granulozyten

Plg: Plasminogen (eingesetzt: 200mg/Well)

NP: Normalplasma (eingesetzt: 2ml/Well)

Med: Medium (auf 5 ml/Well)

Zym: Zymosan (μg /Well)

Inkubationszeit: 1h, 2h, 4h

Angegebene Konzentrationen sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

D.3 Versuche zur Stabilität von Miniplasminogen

Für die Bestimmung von MPIg wurden Proben aus klinischen Studien gewählt, die z. T. längere Zeit tiefgefroren gelagert waren. Daher erschien es notwendig, die Stabilität von MPIg unter diesen Bedingungen zu untersuchen.

Die Bestimmung der MPIg-Konzentrationen in den verschiedenen Probenansätzen wurden mit Hilfe des Sandwich-ELISAs durchgeführt (C.2.3.2.3).

D.3.1 Stabilität in Carbonatpuffer

Das Wiederfinden von MPIg in verschiedenen Puffern wurde nach zyklischen Einfrieren und Auftauen der Proben untersucht. Dabei wurde auch Probenmaterial verwendet, das von Borst als Kontrolle bei der Etablierung des Sandwich-ELISAs eingesetzt wurde (Borst M, 1994).

In einer frisch angesetzten Probe konnte von den in einem Carbonatpuffer, pH 9,6, vorgegebenen MPIg-Konzentration von 90 ng/ml ohne Einfrieren 87,6 ng/ml bzw. 85,1 ng/ml wiedergefunden werden. Nach dem Einfrieren der restlichen Probe bei -20°C waren nach 7 Tagen 98 ng/ml bzw. 77 ng/ml nachweisbar (s. Abb 11).

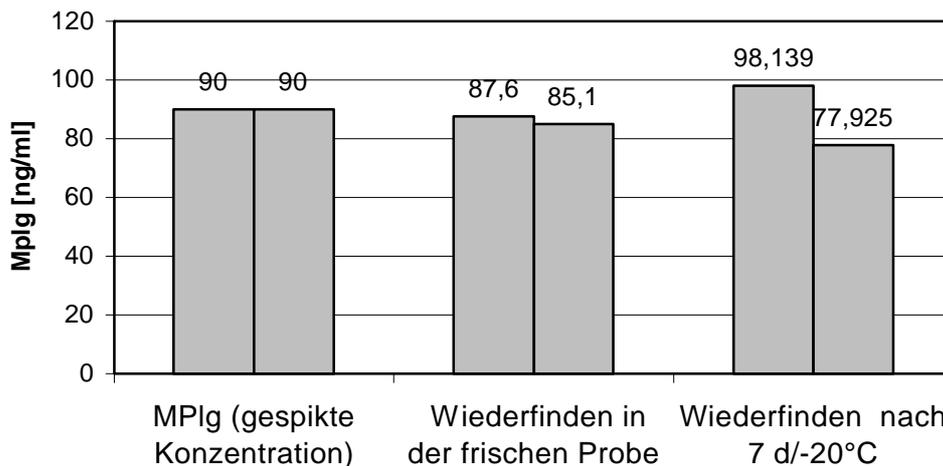


Abb. 11 Stabilität von MPIg in Carbonatpuffer.

Wiederfinden einer gespikten MPIg-Konzentration in 0,1 M Carbonatpuffer (pH 9.6) (s.C.2.3.2) in einer frischen Probe und nach Lagerung für 7 d bei -20°C.

D.3.2 Stabilität in Citrat- und EDTA-Plasma

Die Konzentration von MPIg wurde in parallel abgenommenen Plasmaproben mit unterschiedlichen Antikoagulanzen bestimmt. Dabei konnte bei einer frischen Probe eines Patienten mit Peritonitis weder im EDTA-Plasma noch im Citratplasma MPIg gemessen werden. Auffällig war jedoch, daß auch nach Zugabe von Miniplasminogen in einer Konzentration von 10 ng/ml bzw. 20 ng/ml zur EDTA-Probe kein MPIg detektiert werden konnte. Im Gegensatz dazu konnte im Citratplasma eines anderen Peritonitispatienten das direkt nach der Abnahme zur Probe zugegebene Miniplasminogen nachgewiesen werden (s. D. 3.3. und Abb. 12).

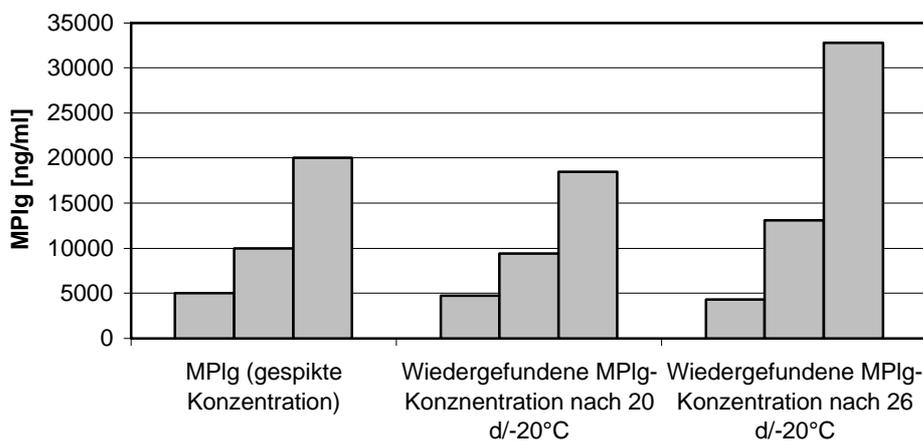


Abb. 12 Stabilität von MPIg in Citratplasma.

Wiederfinden von zu Citratplasma zugesetzten MPIg-Konzentrationen (5000 ng/ml, 10000 ng/ml bzw. 20000 ng/ml):

Messung nach 20 Tagen Lagerung bei -20°C und einmaligem Auftauen;

Messung nach 26 Tagen Lagerung bei -20°C und zweimaligem Auftauen.

Es wurde auch versucht, Miniplasminogen in Exsudatproben von Peritonitispatienten nachzuweisen. Auch hier konnte MPIg in den Citratabnahmen detektiert werden, während es in den EDTA-Proben nicht nachweisbar war.

In einem weiteren Versuch wurden 45 ng/ml MPIg in einem Probenpuffer-Normalplasma-Ansatz (NaSCN-Puffer, pH5,5, s. C.2.3.2) zugesetzt. Dieser Puffer findet beim MPIg-ELISA zum Lösen der Standards Einsatz. Dabei

konnte eine MPIg-Konzentration vor dem Einfrieren von 42,6 ng/ml und nach 8 Tagen Lagerung bei -20°C von 43,9 ng/ml gemessen werden (Abb. 13).

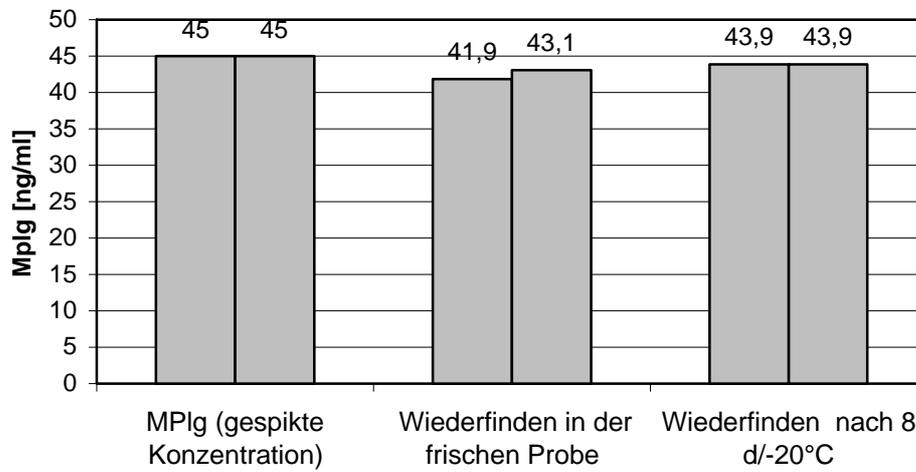


Abb. 13 Stabilität von MPIg in Probenpuffer. Wiederfinden einer gespikten MPIg-Konzentration in Probenpuffer/Normalplasma (5:1) in der frischen Probe und nach 8 d Lagerung bei -20°C.

D.3.3 Stabilität in Plasma bei Tiefkühlung

Ausgewählt wurden Citratplasma-Proben von 4 Sepsispatienten, in denen MPLg in detektierbarer Menge erwartet wurde.

Jedoch nur in einem Fall war in der frischen Plasmaprobe MPLg in einer meßbaren Konzentration von 89,07 ng/ml bestimmbar. Dieses Plasma wurde nachfolgend à 1 ml portioniert, bei -20°C tiefgefroren und nach einer Lagerung von 20 Tagen wurde erneut MPLg in dieser Probe bestimmt. In dieser Messreihe konnte nur noch eine MPLg-Konzentration von 2 ng/ml (untere Nachweisgrenze des ELISA) detektiert werden. Nach erneutem Einfrieren der Proben und einer Lagerung bei -20°C für weitere 6 Tage war kein MPLg mehr nachweisbar (Abb.15).

Zu drei Aliquots dieser Citratplasma-Probe wurde zudem vor dem ersten Einfrieren zusätzlich MPLg in 3 unterschiedlichen Konzentrationen (5 µg, 10 µg und 20 µg) zugegeben. Diese Ansätze wurden parallel mit der Originalprobe zu den oben genannten Zeitpunkten gemessen. Nach dem ersten Auftauen nach 20 Tagen Lagerung bei -20°C waren die gemessenen MPLg-Konzentrationen in allen Proben niedriger. In absoluten Werten wurde nach dem ersten Auftauen zwischen 300 ng/ml und 1700 ng/ml MPLg weniger gemessen als der ursprünglichen Probe beigemischt (Abb. D 12). Beim zweiten Auftauen der Proben konnte in den Proben, die mit 10 µg bzw. 20 µg MPLg gespikt wurden, eine höhere Konzentration als ursprünglich eingesetzt gemessen werden. Somit konnte bei diesen hohen Konzentrationen nach dem ersten Auftauen ca. 90% und nach dem zweiten Auftauen ca. 86% des eingesetzten MPLg wiedergefunden werden. Warum in einer weiteren Messung ein Wert von 130% über der eingesetzten Konzentration gemessen wurde, bleibt unklar und ist am wahrscheinlichsten auf einen Messfehler zurückzuführen.

Aliquots einer EDTA-Probe, die im Rahmen der Routineblutabnahmen einem anderen Sepsispatienten abgenommen wurde, wurde ebenfalls MPLg (10 ng/ml bzw. 20 ng/ml) zugefügt. Von diesen eingesetzten MPLg-Mengen wurde mittels ELISA jedoch keine nachweisbaren Konzentrationen in den Proben wiedergefunden.

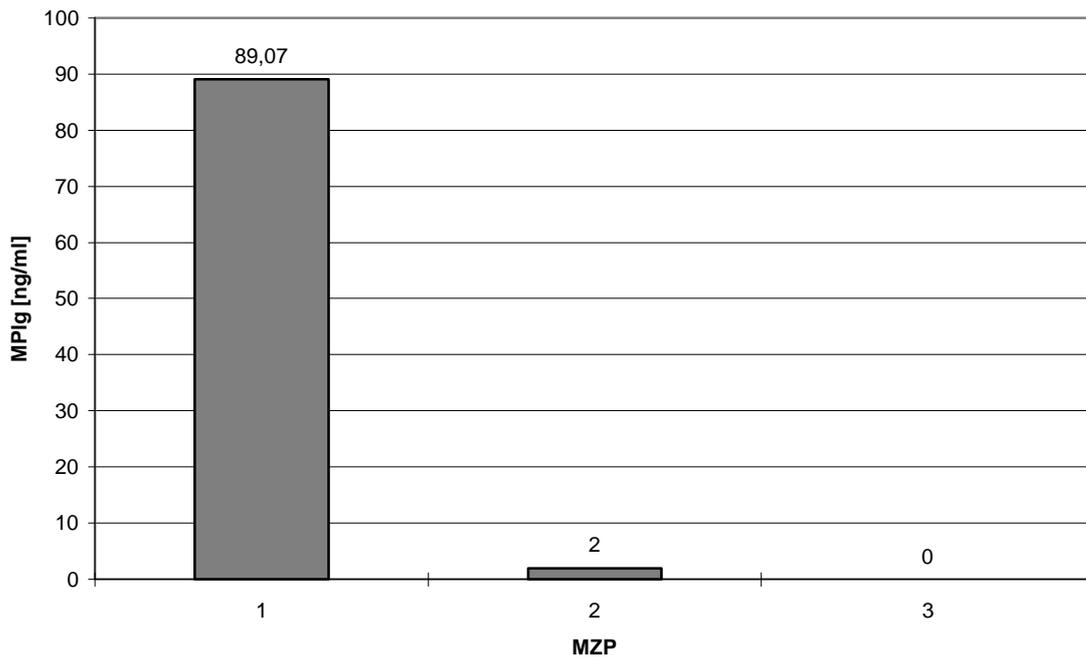


Abb. 15 Stabilität von MPIg in Citratplasma.

MPIg-Konzentration im Citratplasma eines Sepsispatienten nach unterschiedlicher Lagerung der Probe:

MZP 1: Messung direkt nach Abnahme der Probe;

MZP 2: Messung nach 20 d Tiefkühlung bei -20°C und einmaligem Auftauen;

MZP 3: Messung nach 26 d Tiefkühlung bei -20°C und zweimaligem Auftauen.

D.4 Nachweis von Miniplasminogen (MPlg) in systemischen und lokalen Körperflüssigkeiten

Die quantitative Detektion von MPlg erfolgte mit dem etablierten Sandwich-ELISA (C.2.3.2.3). Bei der Bestimmung der Plg-Konzentrationen kam ein kompetitiver ELISA zur Anwendung (C.2.3.2.5).

D.4.1 MPlg bei gesunden Probanden

Damit die Bildung von MPlg unter physiologischen Bedingungen auszuschließen war, wurden Plasmaproben von gesunden Probanden in einzelnen Tests mitgeführt. Als untere Nachweisgrenze für MPlg wurde dessen Konzentration in einem Normalplasmapool mit einem Konfidenzintervall von zwei Standardabweichungen definiert (Borst M, 1994). Dabei ergab sich bei einer Messwellenlänge von 405 nm eine mittlere Extinktion von 0,364 bei einer zweifachen und von 0,118 von bei einer einfachen Standardabweichung. Dies bedeutet für die untere Nachweisgrenze der MPlg-Konzentration bei diesem Testsystem mit zweifacher Standardabweichung einen Wert von 2,6 ng/ml. Bei den gemessenen Proben von 10 gesunden Probanden wurde dieser Wert nicht überschritten.

D.4.2 MPlg bei Peritonitispatienten

Aufgrund der Tatsache, daß vereinzelt proteolytische Spaltprodukte parallel zur proteolytische Aktivität der PMN-Elastase in Exsudaten gefunden werden konnten (Jochum et al., 1999), erschien es am erfolgreichsten, MPlg in lokalen, sowie auch systemischen Körperflüssigkeiten von Peritonitispatienten in größerem Umfang zu analysieren.

Bestimmt wurde MPlg in seriell gewonnenen Proben aus einer prospektiven, randomisierten Studie zur Applikation von Antithrombin III an Patienten, die aus unterschiedlicher Ursache an einer Peritonitis erkrankt waren. In der Therapiegruppe wurde Fresh-Frozen-Serum (FFS) intraperitoneal nach der ersten Lavage und 6h postoperativ über die Drainagen verabreicht. Der sys-

temische AT-III-Spiegel wurde postoperativ auf 140% der Norm angehoben (Schorr et al., 2000). Aus dem gesamten Patienten-Kollektiv wurden Proben ausgewählt, die eine hohe Konzentration an PMN-Elastase aufwiesen und vor der Bestimmung des MPIg nicht aufgetaut waren.

D.4.2.1 MPIg in Blutproben

Es wurden EDTA-Plasma, Citratplasma und Serumproben präoperativ sowie 2h, 6h, 8, 12h, 18h, 24h, 30h, 42h, 48h und im folgenden bis Tag 5 zweimal täglich gewonnen.

Obwohl für die MPIg-Bestimmung nur Proben ausgewählt wurden, die in den Exsudaten Elastasekonzentrationen über 10000 ng/ml aufwiesen, konnte weder in Serumproben, noch in Citrat- oder EDTA-Plasmaproben MPIg in Konzentrationen über der Nachweisgrenze des Sandwich-ELISAs gefunden werden.

D.4.2.2 MPIg in Exsudatproben

Die Exsudate wurden intraoperativ vor und nach der Peritoneallavage gewonnen und danach zu den gleichen Zeitpunkten wie die Blutproben entnommen, wobei ab Stunde 6 das Exsudat über je 6 bzw. 12 Stunden gepoolt wurde. Die abgenommenen Proben wurden in EDTA-, Citrat- bzw. Serumröhrchen überführt, zentrifugiert und der Überstand bei -70°C eingefroren.

Auch hier wurde MPIg nur in den Patientenproben gemessen, die hohe Elastasekonzentrationen von über 10000 ng/ml aufwiesen. MPIg wurde in allen jeweils sequentiell gewonnenen Exsudatproben erfaßt, um Zeitverläufe darstellen zu können. Es wurden nur die Citratexsudate eingesetzt, die vorher noch nicht aufgetaut waren.

Von je 6 Patienten aus der Therapie- und aus der Kontrollgruppe war bei 2 Patienten die Ursache der Peritonitis ein Tumor. 3 Patienten verstarben an der

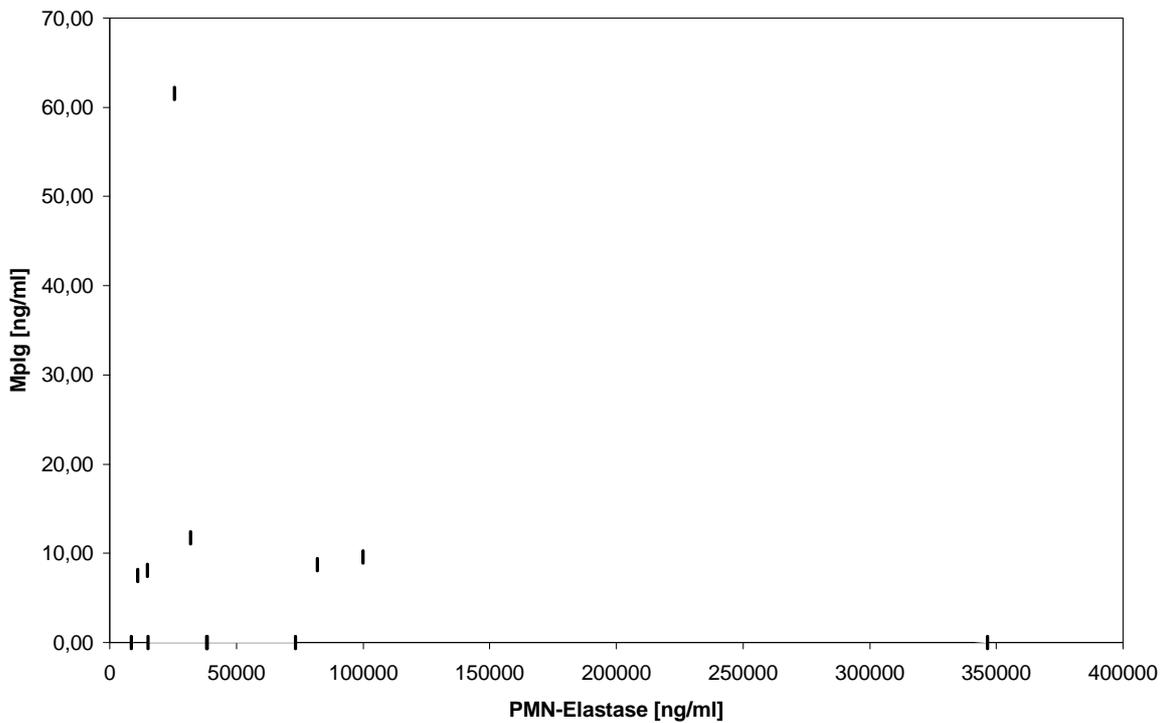


Abb. 16 b Scatterplot für MPIg und PMN-Elastase in Exsudatproben von Peritonitispatienten, die vor der ersten Lavage entnommen wurden (Probenanzahl n=12).

Um ausschließen zu können, daß in der intraperitonealen Flüssigkeit nicht genug Plg zur Prozessierung zu MPIg zur Verfügung stehen könnte, wurden die Konzentrationen von Plg und MPIg in den Exsudaten verglichen. Bei Plg-Werten unter 30 µg/ml war bis auf zwei Ausnahmen keine Entstehung von Miniplasminogen mehr nachweisbar (Abb. 17a). Ein Zusammenhang zwischen Plg-Konzentration und MPIg-Bildung konnte jedoch auch unter ausschließlicher Berücksichtigung der Proben vor der ersten Lavage nicht nachgewiesen werden (Abb. 17b).

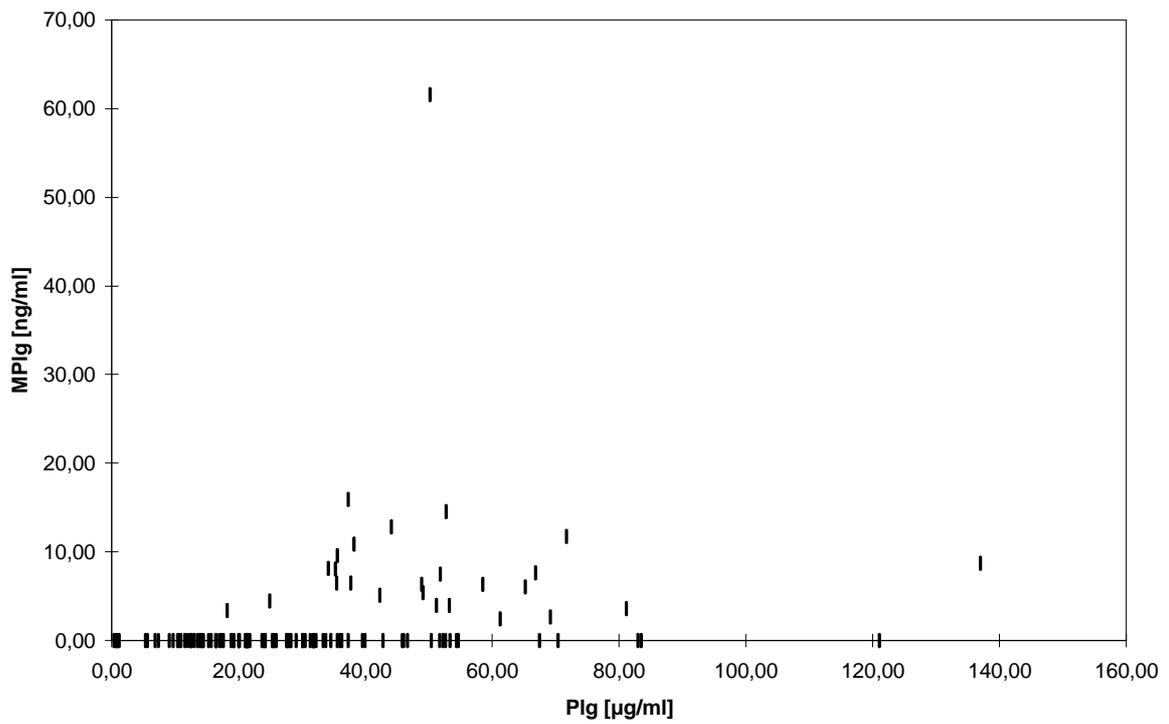


Abb.17a Scatterplot für MPIg und Plg in Exsudatproben von Peritonitispatienten (Probenanzahl n=155).

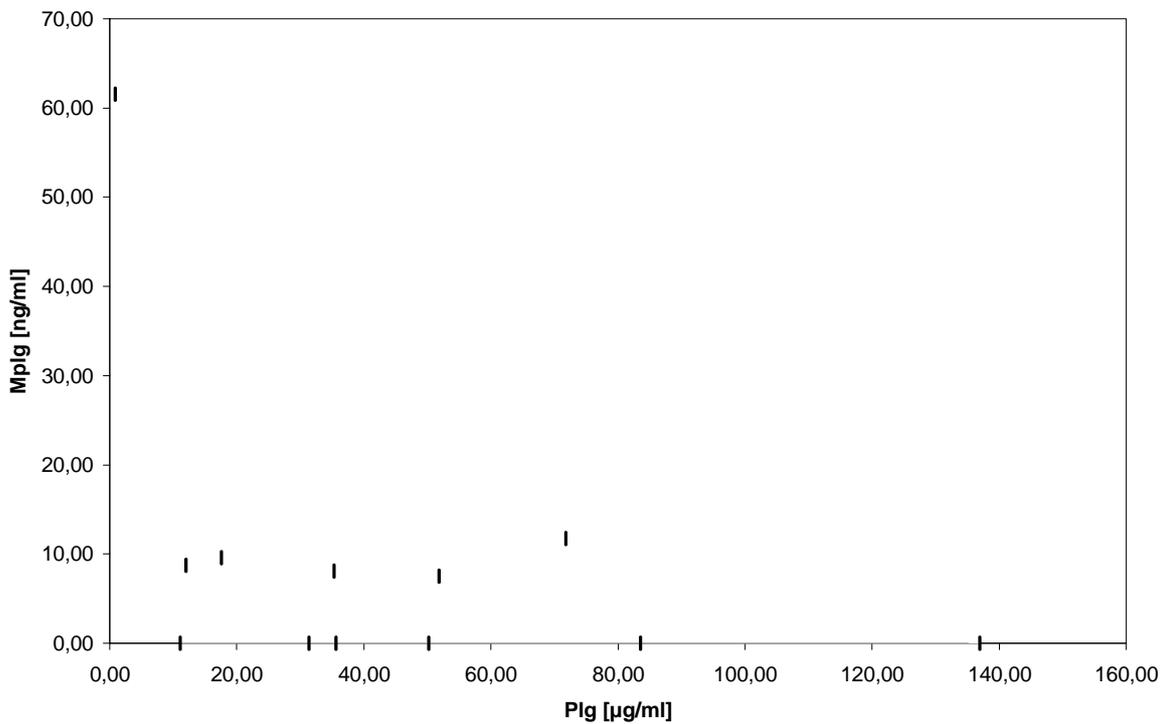


Abb.17b Scatterplot für MPIg und Plg in Exsudatproben von Peritonitispatienten, die vor der ersten Lavage entnommen wurden (Probenanzahl n=12).

Unter der Annahme, daß bei einem bestimmten Wert des Quotienten von Plg/PMN-Elastase die Spaltung von Plg begünstigt wird, wurde versucht, das Verhältnis Plg/Elastase in Beziehung zur MPIg-Entstehung zu setzen. Aber auch hier ließ sich keine korrelative Tendenz erkennen (Abb. 18).

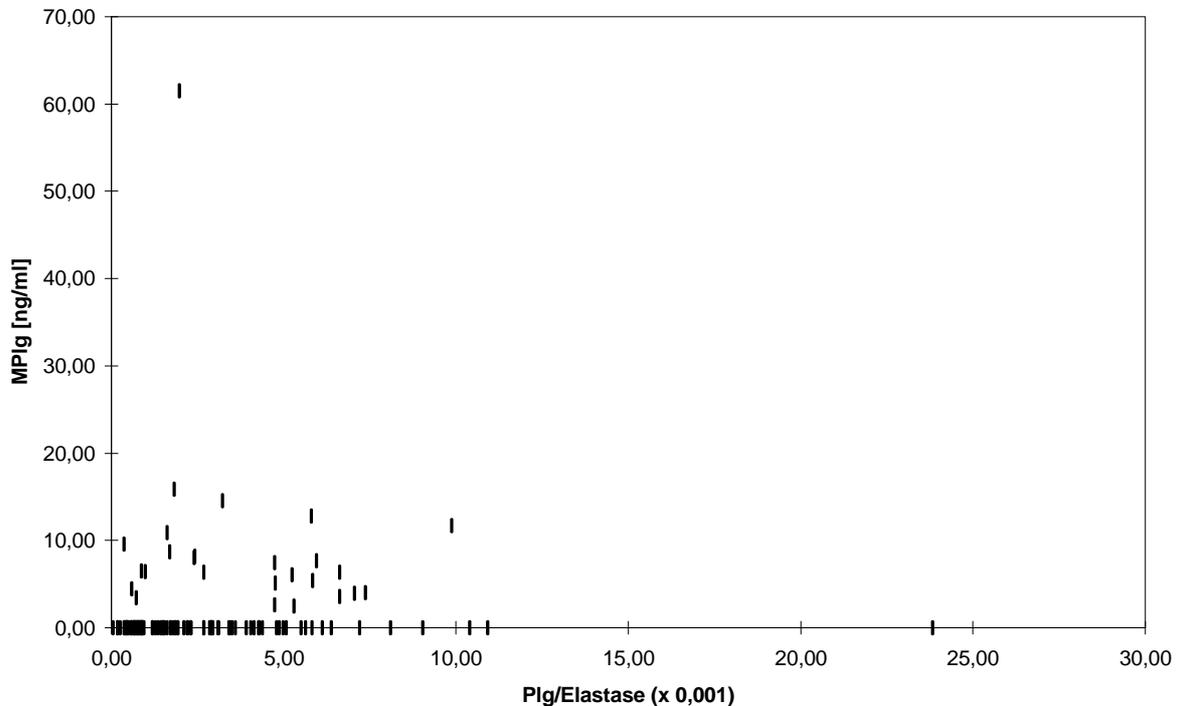


Abb. 18 Scatterplot für MPIg und dem Quotient aus Plg zu Elastase in Exsudatproben von Peritonitispatienten (Probenanzahl n=155).

Beim Versuch, die MPIg-Konzentrationen unabhängig vom Messzeitpunkt auf das Outcome der Patienten zu beziehen, zeigte sich bei den während des Beobachtungszeitraumes verstorbenen Patienten (Patienten n=3, Proben n=33), daß der Mittelwert der MPIg-Konzentrationen mit 3,2 ng/ml höher lag, als bei den Überlebenden (Patienten n=9, Proben n=123) mit 2,4 ng/ml. Der Median war in der Gruppe der Verstorbenen mit 1,1 ng/ml ebenfalls höher als mit 0,53 ng/ml in der Gruppe der Überlebenden. Der Boxplot dieser Gruppen zeigte daneben auch den großen Unterschied in der Spannweite der Quartilen (Abb. 19). Der Unterschied zwischen überlebenden und verstorbenen Patienten war jedoch nicht signifikant bei Anwendung eines Mann-Whitney U-Tests mit einem Z-Wert von -1,1 und einem Signifikanzniveau von $p = 0,05$.

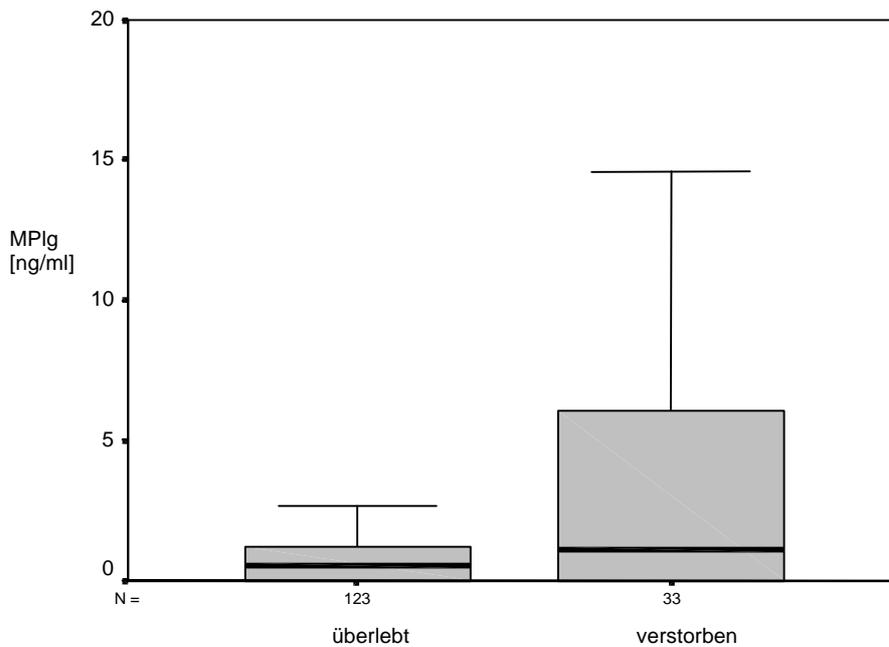


Abb. 19 Boxplots der MPIg-Konzentrationen in Exsudatproben von Peritonitispatienten unterschieden nach Überlebenden (Patienten n=9, Proben n=123) und Verstorbenen (Patienten n=3, Proben n=33).

Bei einem Datenvergleich von Patienten mit Tumor (Patienten n=2; Proben n=22) und denen ohne Tumor (Patienten n=10; Proben n=134) zeigt sich ebenfalls ein Unterschied sowohl in den Mittelwerten der MPIg-Konzentrationen (2,9 ng/ml ohne Tumor zu 0,78 ng/ml mit Tumor) als auch bei den Medianen (0,88 ng/ml ohne Tumor zu 0,12 ng/ml mit Tumor). Der Boxplot zeigte für die Patientengruppe mit Tumor eine geringere Spannweite der Quartilen (Abb. 20). Diese Unterschiede waren auf einem Signifikanzniveau von $p = 0,05$ signifikant im Mann-Whitney U-Test (bei einem Z-Wert von -2,9).

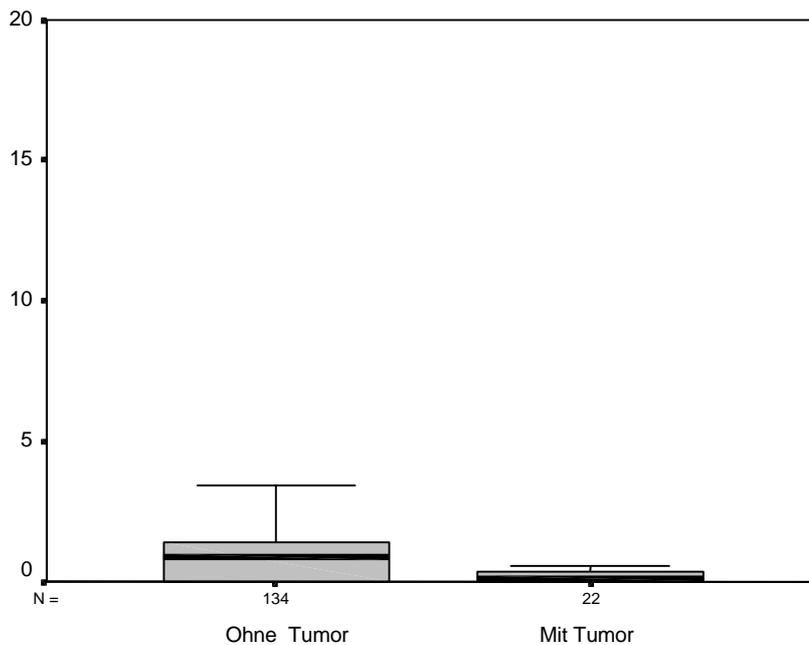


Abb. 20 Boxplots der MPLg-Konzentrationen in Exsudatproben von Peritonitispatienten ohne (Patienten n=10, Proben n=134) und mit Tumor (Patienten n=2, Proben n=33).

Der Vergleich der Patienten aus der Therapiegruppe (Patienten n=9, Proben n=82), die Antithrombin III und Fresh-Frozen-Serum erhalten hatten, mit der Kontrollgruppe (Patienten n=3, Proben n=72), brachte ambivalente Daten. Der Mittelwert war in der Kontrollgruppe mit 3,05 ng/ml höher als in der Therapiegruppe mit 2,20 ng/ml, der Median verhielt sich mit 0,31 ng/ml in der Kontrollgruppe und 0,84 ng/ml in der Therapiegruppe gerade umgekehrt (Abb. 21). Der Unterschied bei den Mittelwerten war ebenfalls signifikant bei $p = 0,05$ und einem Z-Wert von -2,3.

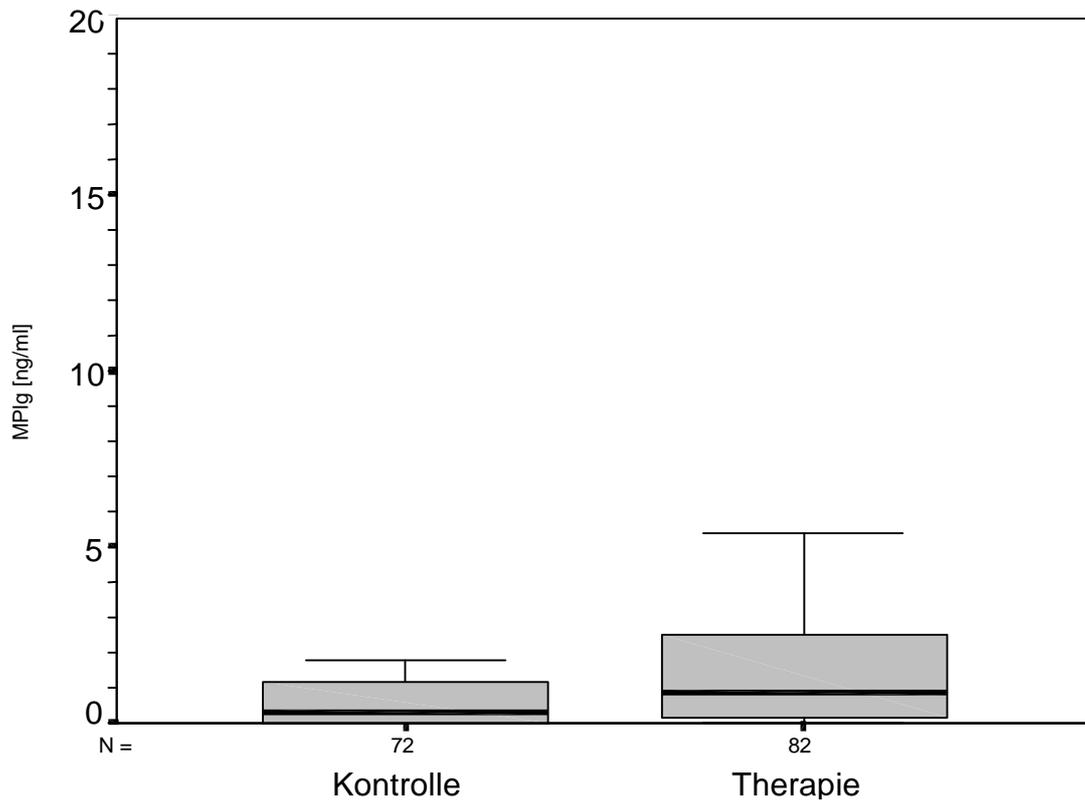


Abb. 21 Boxplots der MPIg-Konzentrationen in Exsudatproben von Peritonitispatienten der Therapiegruppe (Patienten n=9, Proben n=82) und der Kontrollgruppe (Patienten n=3, Proben n=72).

Verlaufsbeobachtungen

Betrachtet man den Verlauf der MPIg-Konzentrationen von allen Patienten über den gesamten Beobachtungszeitraum, fällt eine deutliche Abnahme, sowohl des Mittelwertes, als auch des medianen Wertes nach der ersten Laparotomie und Peritoneallavage von 9,1 ng/ml bzw. 4,6 ng/ml auf 0,2 ng/ml bzw. 0,05 ng/ml auf. Während die medianen Werte im Verlauf zwischen 0,2 und 1,2 ng/ml schwanken, steigen die Mittelwerte ab dem Meßzeitpunkt (MZP) 2 bis zum MZP 7 bis auf einen Wert von 10,2 ng/ml stetig an (Abb. 22a).

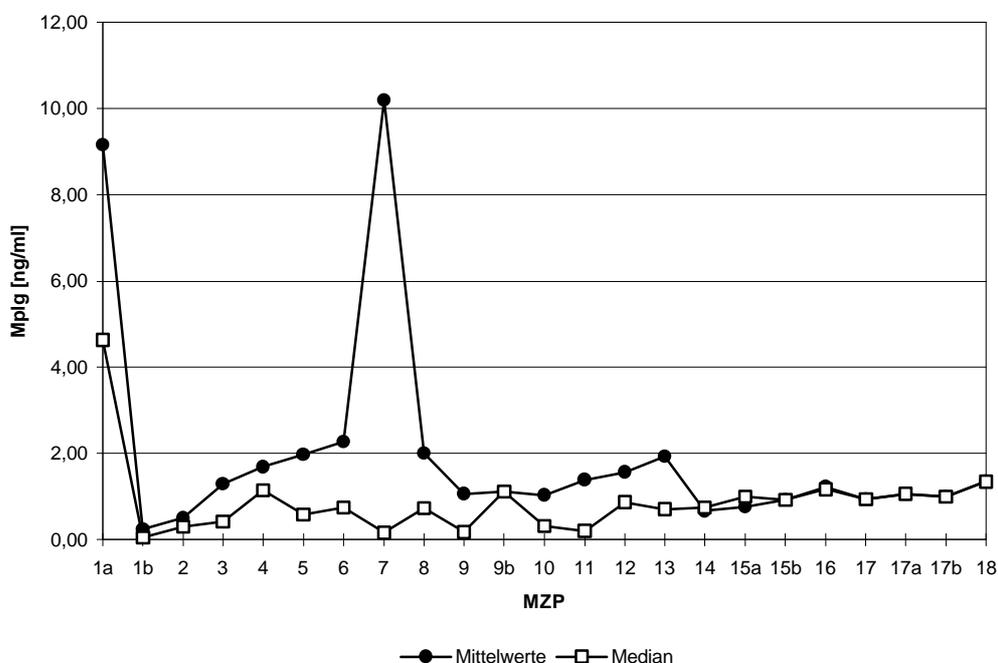


Abb. 22 a Mittelwerte und Mediane der MPIg-Konzentration im Verlauf in Exsudatproben aller Peritonitispatienten über den gesamten Beobachtungszeitraum; Anzahl der Proben je MZP siehe Abb. 22b, Beschriftung der Ordinate MZP a entspricht Probenentnahme vor Laparotomie und Lavage; MZP b entspricht Probenentnahme nach Laparotomie und Lavage.

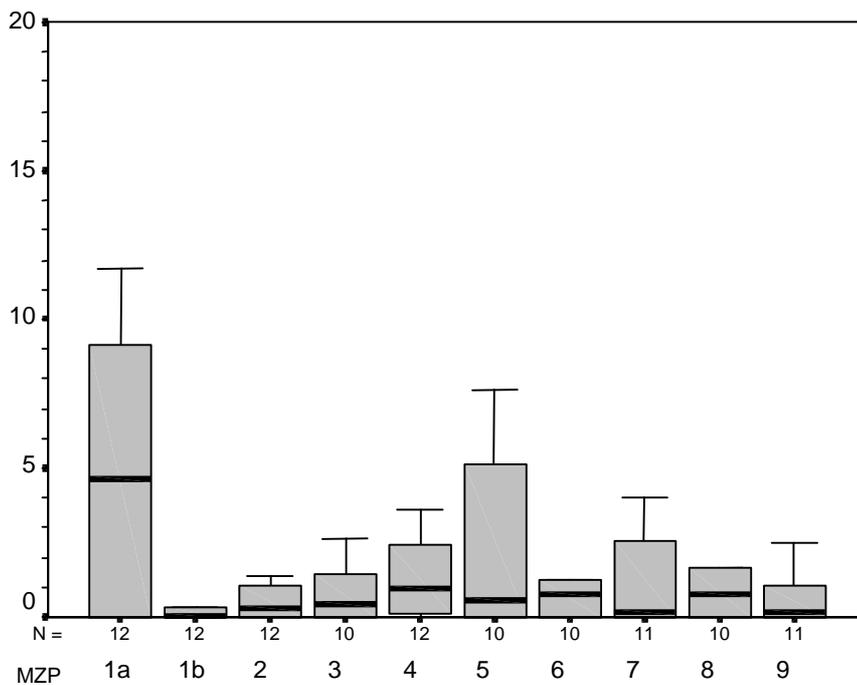


Abb. 22 b Boxplots der MPIg-Konzentrationen im Verlauf in Exsudatproben von Peritonitispatienten im Beobachtungszeitraum bis MZP 9.

Nach dem MZP 9 schwankt die Anzahl der pro Messzeitpunkt gemessenen Proben erheblich durch das Ausscheiden einzelner Patienten aus der Studie oder durch Einfügen zusätzlicher MZP bei Relaparotomien (MZP 9b, 15b, 17b), so daß zu vielen MZP nur eine Probe vorlag. In diesen Fällen entspricht der Median dem Mittelwert. Darüber hinaus fehlten nach dem MZP 9 bei vielen Patienten im Verlauf einzelne Proben, was eine Interpretation der MPIg-Konzentrationen über den Beobachtungszeitraum erschwert. Deshalb wird sich im folgenden (außer in Einzelfalldarstellungen) nur auf die Messzeitpunkte 1 mit 9 bezogen.

Unter Berücksichtigung der Boxplotauswertung (Abb. 22b) sieht man, daß der Anstieg zum MZP 7 in den Mittelwerten (Abb. 22a) auf einen Ausreißer zurückzuführen ist.

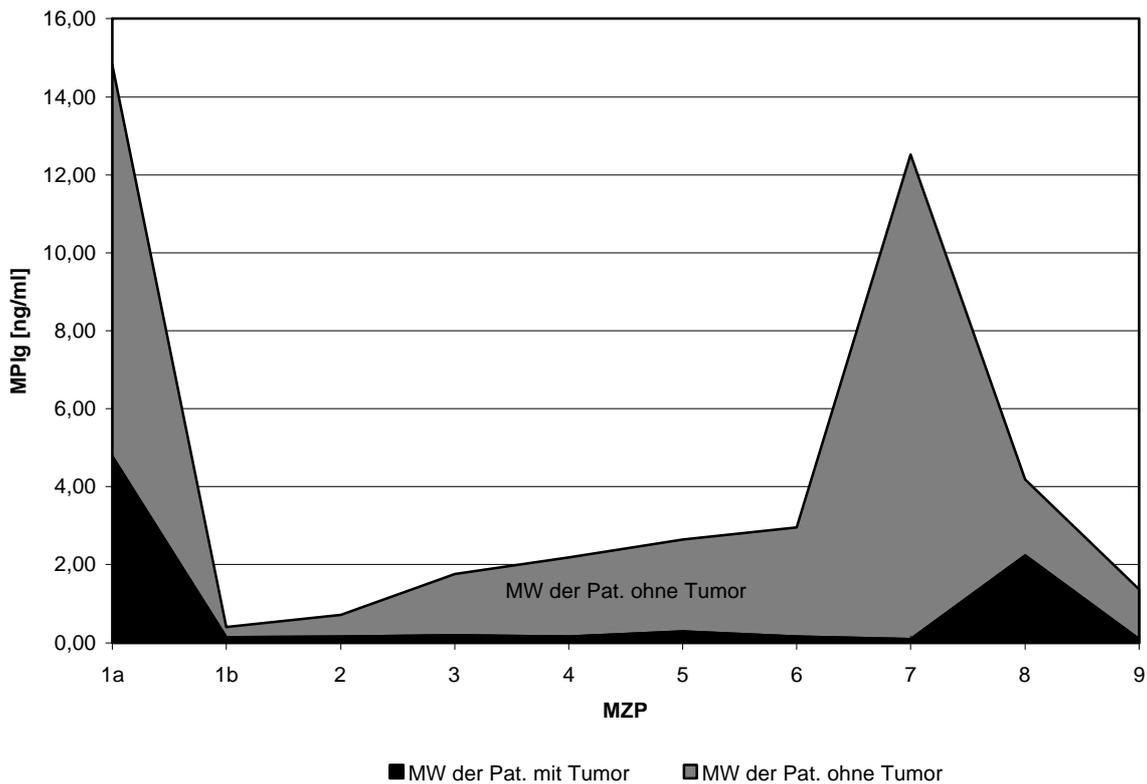


Abb. 23 Mittelwerte (MW) der MPIg-Konzentrationen im Verlauf in Exsudatproben von Peritonitispatienten ohne (n=10) und mit (n=2) Tumor im Beobachtungszeitraum bis MZP 9.

Der Anstieg der MPIg-Konzentrationen im Mittelwert bis zum MZP 7 ist besonders ausgeprägt in der Gruppe der tumorfreien Patienten (n=10) im Vergleich zu den Patienten, die an einem Tumor erkrankt waren (n=2) (Abb. 23). Angesichts der geringen Patientenzahl in beiden Gruppen ist allerdings kein signifikanter Unterschied nachweisbar.

Wie bereits bei der Einzelwertbetrachtung dargestellt, war ein signifikanter Unterschied der MPIg-Konzentrationen zwischen den Therapie- und Kontrollpatienten bzw. den verstorbenen und überlebenden Patienten innerhalb des Beobachtungszeitraums nicht nachweisbar.

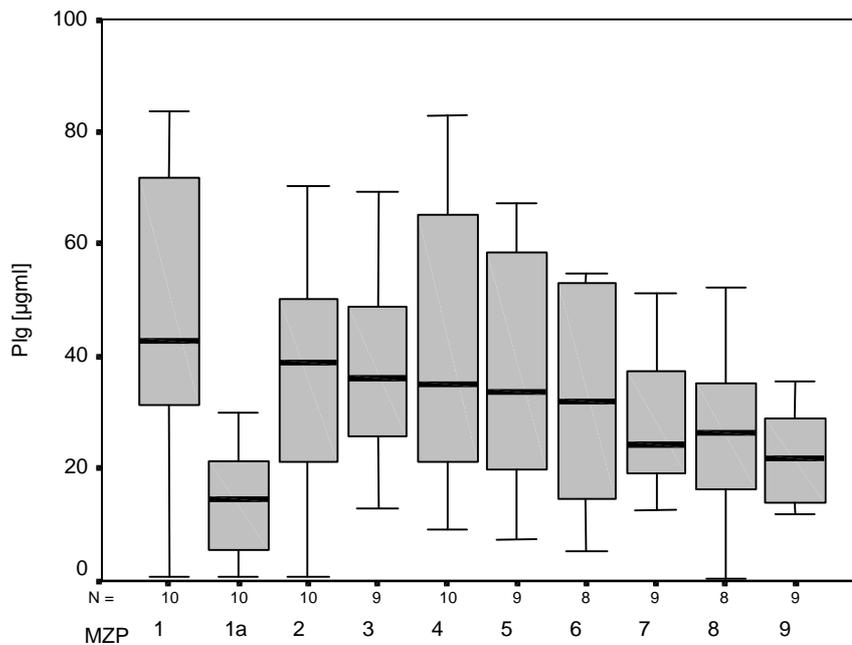


Abb. 24 Boxplots der Plg-Konzentrationen im Verlauf in Exsudatproben (n=92) des gesamten Peritonitispatientenkollektivs (n=10) im Beobachtungszeitraum bis MZP 9.

Bei Betrachtung der korrespondierenden Plg-Konzentrationen des gesamten Kollektivs im Verlauf erkennt man nach der Lavage einen Konzentrationsabfall in den Exsudatproben. Ein Wiederanstieg während der folgenden 6h (Abb 24) war auf die intraperitoneale Serumgabe in der Therapiegruppe zurückzuführen (Abb 25a). Eine ähnliche Tendenz lässt sich auch bei den MPlg-Werten erkennen (Abb. 25b).

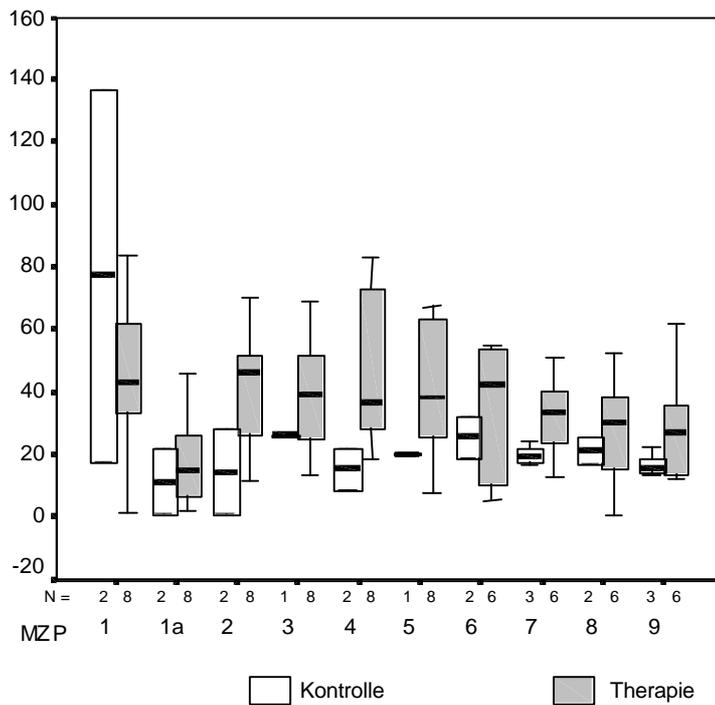


Abb. 25a Boxplots der Plg-Konzentrationen in Exsudatproben (n=92) des gesamten Peritonitispatientenkollektivs im Beobachtungszeitraum bis MZP 9 unterschieden nach Therapie (Patienten n=2) und Kontrolle (Patienten n=8).

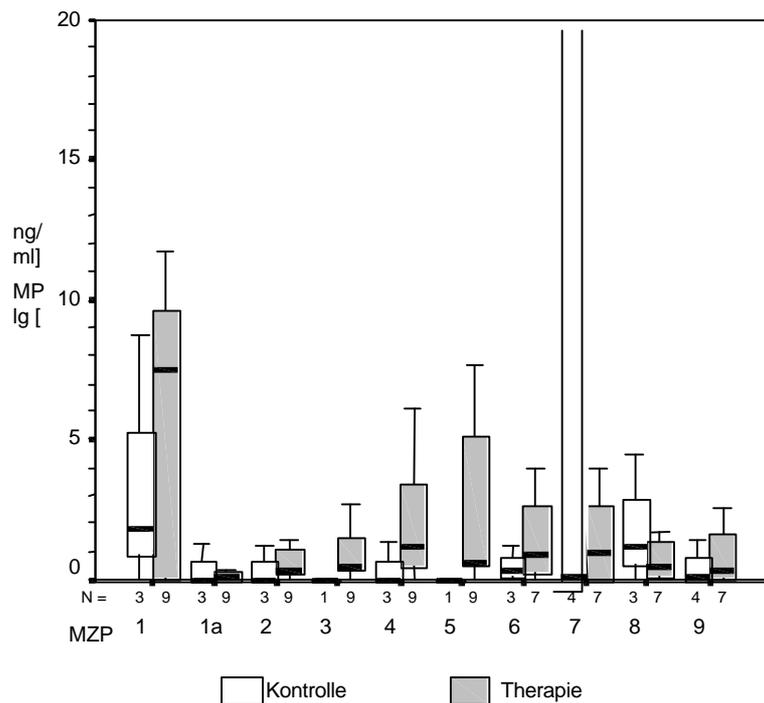


Abb. 25b Boxplots der MPIg-Konzentrationen in Exsudatproben des gesamten Peritonitispatientenkollektivs im Beobachtungszeitraum bis MZP 9 unterschieden nach Therapie (Patienten n=9, Proben n=82) und Kontrolle (Patienten n=3, Proben n=72).

D.4.2.3 MPIg in Urinproben

Um einen Hinweis auf ein mögliches Ausscheiden von MPIg über die Niere zu erhalten, wurde bei einem katheterisierten Patienten mit Peritonitis und zusätzlich vorhandenen Sepsiszeichen der Urin auf MPIg hin untersucht. Zum Zeitpunkt der Probenentnahme lagen keinerlei Hinweise auf eine Nierenfunktionsstörung vor.

Die gesammelte Menge des Morgenurins (400 ml) wurde vor der Bestimmung durch Gefriertrocknung um den Faktor 50 auf 8 ml eingeengt. In dieser Probe konnte kein MPIg gemessen werden, obwohl in der parallel abgenommenen Citrat-Plasmaprobe eine MPIg-Konzentration von 89 ng/ml bestimmt wurde.

D.4.3 MPIg bei Patienten mit Mammakarzinom

Neben der Bestimmung von MPIg und Plg in Körperflüssigkeiten von Peritonitispatienten wurde versucht, MPIg auch in Proben von Tumorpatienten nachzuweisen. Dies ist insbesondere von Interesse in Hinblick auf einen möglichen, indirekten Nachweis der Bildung des Angiogeneseinhibitors Angiostatin. Ausgewählt wurden Proben von Patienten, die an einem bösartigen Tumor des Drüsenepithels der Milchdrüse erkrankt waren. Für diese Epithelneoplasien wurde eine Korrelation zwischen der Aggressivität des Tumors - unter Berücksichtigung der Wachstumsgeschwindigkeit und Tendenz zur Metastasierung - zu Komponenten des Plg/Plasminogen-Aktivatoren-System beschrieben (Burtin et al., 1985b; Burtin et al., 1987a; Clavel et al., 1986). Vor diesem Hintergrund sind die u-PA- und PAI-1-Konzentrationen aus den Tumorzellen des Primärtumors in Bezug auf die Gesamtproteinmenge der Tumorzellsuspension im Labor von Dr. Untsch, Frauenpoliklinik des Klinikums Großhadern, gemessen worden. Zusätzlich wurden in der selben Operation, die der Entfernung des Primärtumors diente, Knochenmarksbiopsien beidseitig aus den Beckenkämmen entnommen und mit monoklonalen Antikörper gegen Zytokeratin-18 gefärbt, um eine Infiltration mit Zellen epithelialen Ursprungs nachzuweisen.

D.4.3.1 MPIg in Serumproben

Aufgrund der retrospektiven Untersuchung lagen nur 40 Serumproben vor, die intraoperativ bei der Entfernung von Primärtumoren unterschiedlicher Ätiologie gewonnen wurden. Dabei handelte es sich um die folgende Tumortypen : 1 gutartiger Tumor im Sinne einer Mastopathie, je 1 Angio-sarkom, Cystosarkoma phylloides und ein nicht näher bezeichneter invasiver Tumor, 4 lobuläre Karzinome und 27 invasiv duktales Karzinome (Abb. 30).

Nach der Entnahme und dem Zentrifugieren der Blutprobe wurde der Überstand in Eppendorfreaktionsgefäßen zu je 1 ml portioniert und bei -20°C tiefgefroren. In perioperativ abgenommenen Blutproben wurden Kreatinin,

sowie die Tumormarker CEA und CA 15-3 mittels kommerziell erhältlicher ELISAs der Firmen Boehringer (Mannheim) und Abbott (USA) am Institut für Klinische Chemie der LMU bestimmt.

Die MPlg-Konzentrationen in den Serumproben wurden mit unserem laborintern etablierten Sandwich-ELISA erfaßt. Bei der Quantifizierung der Plg-Konzentrationen kam der kompetitive ELISA zur Anwendung (C.2.3.2.5).

In 12 der 40 Proben war eine MPlg-Konzentration über der Nachweisgrenze von 2,2 ng/ml meßbar. Dabei lag der Mittelwert aller Proben bei 5,2 ng/ml mit einer mittleren Abweichung von 7,6ng/ml (Abb. 26).

Die gemessenen Plg-Konzentrationen ergaben einen Mittelwert von 42 µg/ml mit einer mittleren Abweichung von 12 µg/ml (Abb. 27)

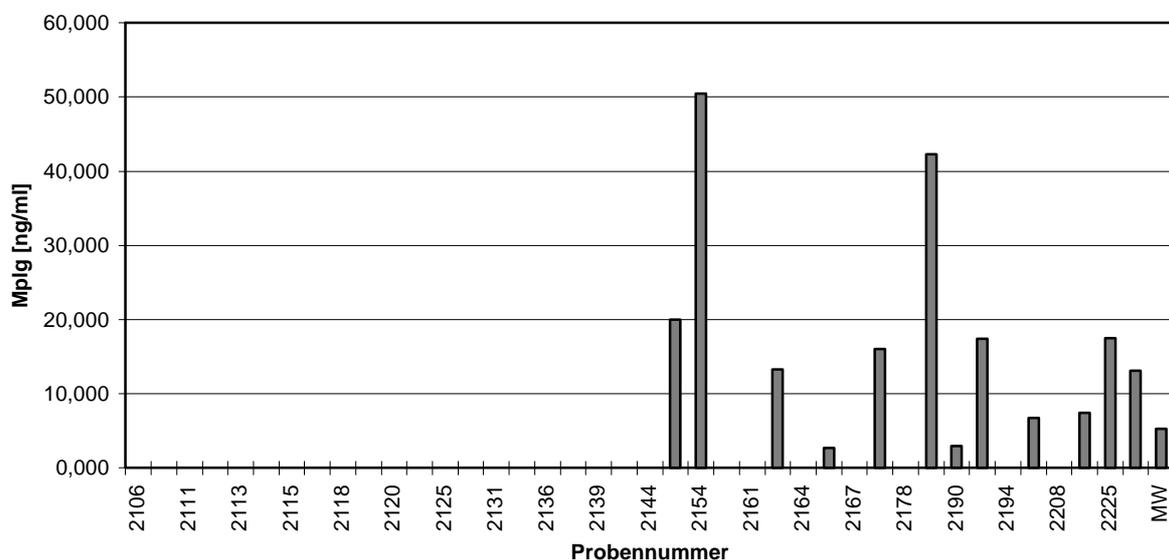


Abb. 26 MPlg-Konzentrationen in Serumproben von Mamma-Ca-Patientinnen. Probennummern 2106 bis 2225 (nicht fortlaufend); Mittelwert aller Proben (MW).

Eine Korrelation zwischen MPlg- und Plg-Konzentration konnte allerdings nicht gefunden werden (Abb. 28).

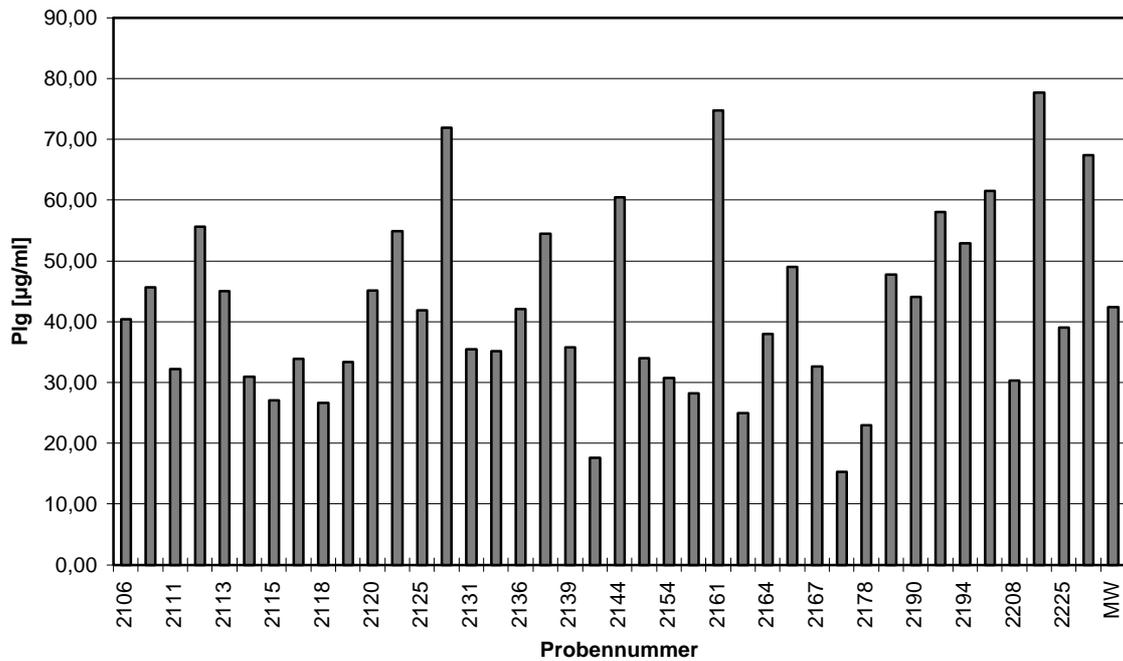


Abb. 27 Plg-Konzentrationen in Serumproben von Mamma-Ca-Patientinnen. Probennummern 2106 bis 2225 (nicht fortlaufend); Mittelwert aller Proben (MW).

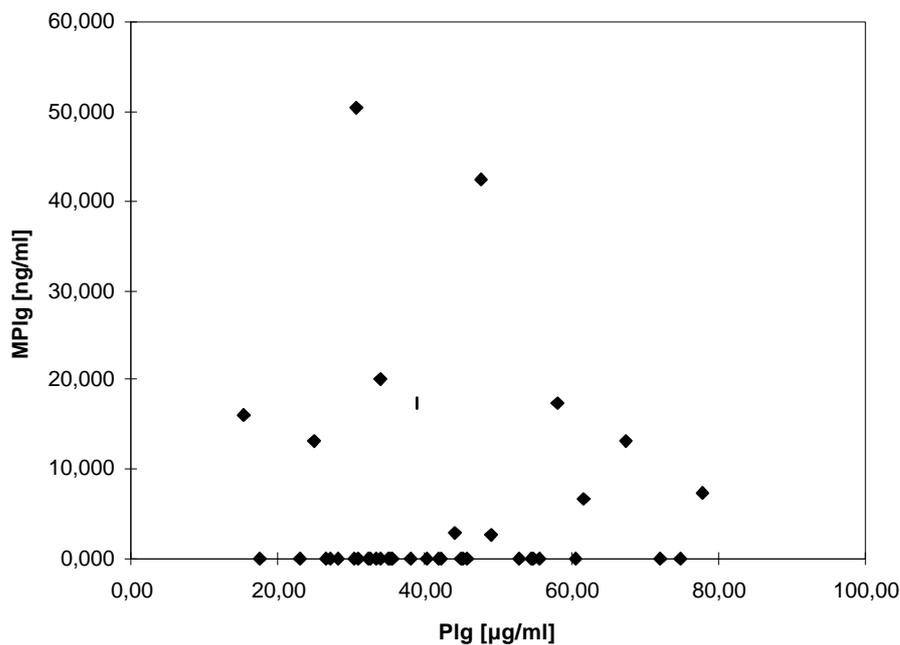


Abb. 28 Scatterplot für Plg-Konzentrationen und MPIg-Konzentrationen in Serumproben von Mamma-Ca-Patientinnen (n=40)

Ebenso war zwischen MPIg und den Konzentrationen von PAI-1 (Abb. 29a) und von u-PA (Abb. 29b) im Serum von 23 Patientinnen keine Korrelation

festzustellen und damit kein Hinweis auf einen Zusammenhang mit dem invasiven Verhalten des Tumors zu erkennen.

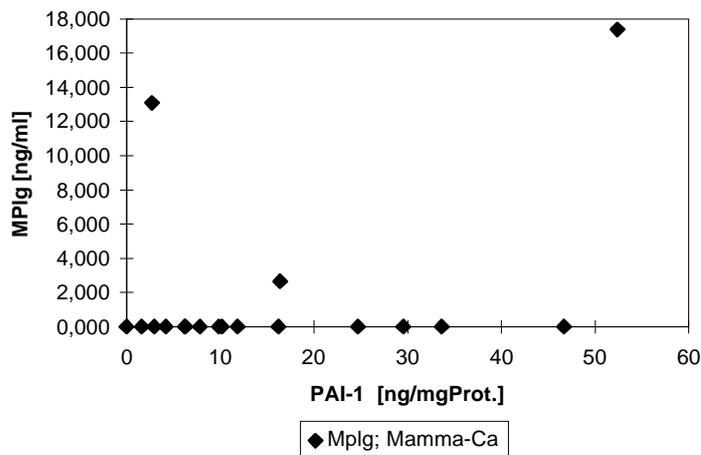


Abb. 29a Scatterplot für der MPIg-Konzentration und PAI-1 in Serumproben von Mamma-Ca-Patientinnen (n=23)

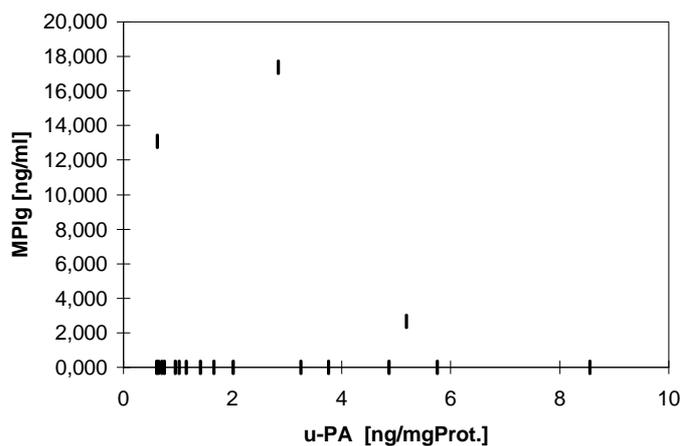


Abb. 29b Scatterplot für der MPIg-Konzentration und u-PA in Serumproben von Mamma-Ca-Patientinnen (n=23)

Bei der Analyse der MPIg-Konzentrationen in Bezug auf den histologischen Typ des Tumors konnte aufgrund der stark variierenden Anzahl von Proben kein signifikanter Unterschied dargestellt werden. Die großen Unterschiede in der Anzahl führten auch zu großen Schwankungen in den Quartilenabständen (25%/50%/75%) zwischen den einzelnen Entitäten (Abb. 30).

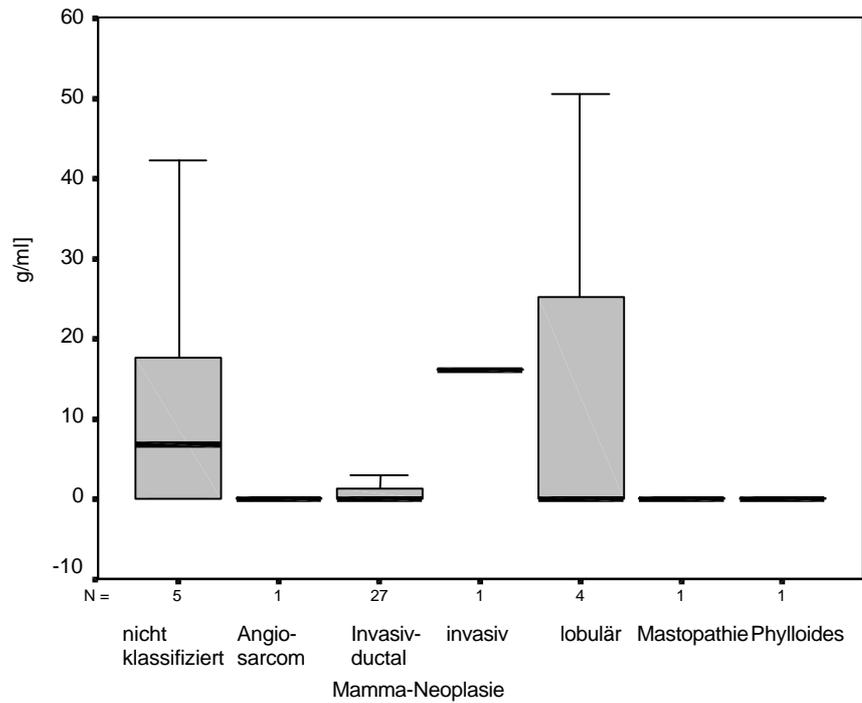


Abb. 30 Boxplots der MPIg-Konzentrationen in Serumproben von Mamma-Ca-Patientinnen bei histologisch unterschiedlichen Entitäten.

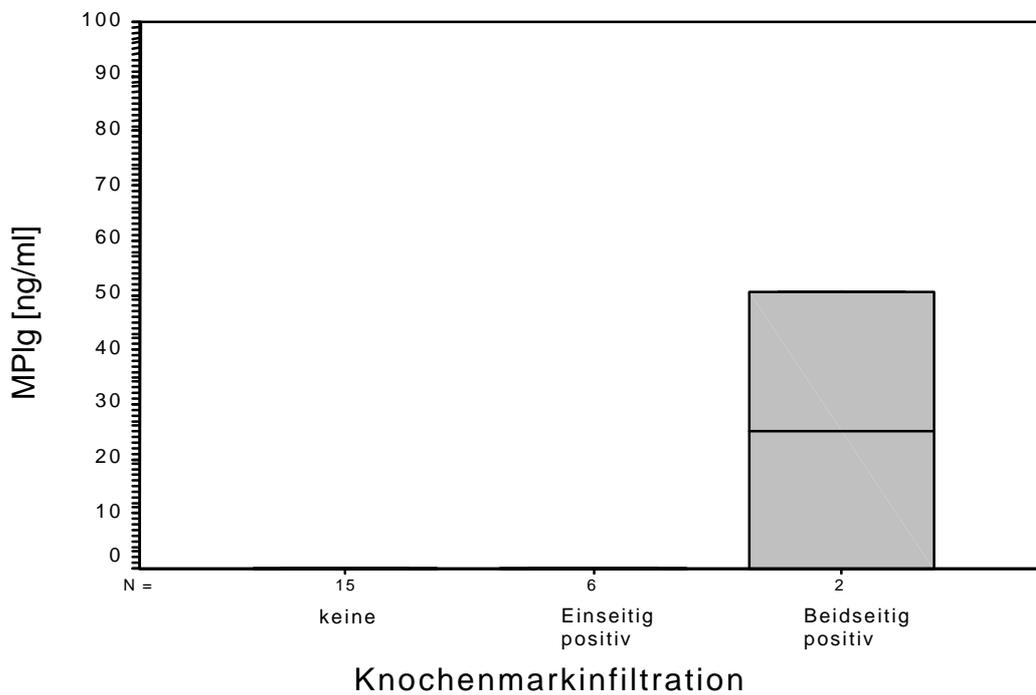


Abb. 31 Boxplot der MPIg-Konzentrationen in Serumproben von Mamma-Ca-Patientinnen (n=23) bei unterschiedlichen Stadien der Knochenmarksinfiltration, nachgewiesen an Beckenkammpunktionen mittels monoklonalem Anti-Cytokeratin-18-Antikörper.

Zwischen den verschiedenen Tumorstadien (nach der TNM-Klassifikation) konnten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die lokale Tumorausbreitung, Anzahl der Lymphknotenmetasen oder Fernmetastasierung beobachtet werden. In der Auswertung der Korrelation mit den Knochenmarksbiopsien fiel eine Erhöhung der MPIg-Konzentration bei einem beidseitigen Nachweis Zytokeratin-18-positiven Zellen im Knochenmark auf (Abb. 31).

Um Aufschluß über eine mögliche Retention von MPIg bei Nierenfunktionseinschränkung zu erhalten, wurden die MPIg-Konzentrationen mit den Kreatininwerten verglichen. Dabei ließ sich kein Zusammenhang feststellen (Abb. 32).

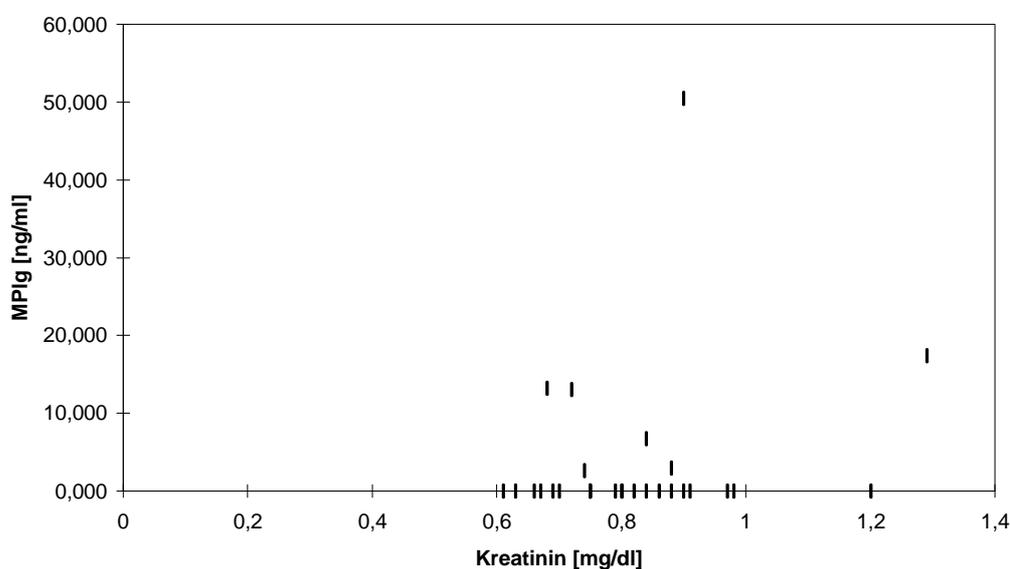


Abb. 32 Scatterplot zwischen den MPIg- und Kreatinin-Konzentrationen in Serumproben von Mamma-Ca-Patientinnen (n=27).

D.4.3.2 MPIg in Gewebe-Zytosol

Bestimmt wurde darüber hinaus MPIg in Mammakarzinom-Proben, die einer laborinternen Kooperation mit J. Foekens (Dr. Daniel den Hoed Cancer Center, Rotterdam) entstammten. Aus Tumorgewebe wurden Zytosolextrakte gewonnen und in diesen Proben sowohl mit α_1 PI komplexierte Elastase als auch MPIg gemessen. Hierdurch sollte es möglich sein, die lokale Entstehung von MPIg als direkten Aktivitätsnachweis der Elastase im Tumor selbst zu belegen. Allerdings konnte in keiner der gemessenen Zytosolproben (n=15) mittels unseres ELISAs MPIg über der Nachweisgrenze von 2 ng/ml nachgewiesen werden.

E. Diskussion

E.1 Optimierung des Miniplasminogen-ELISA

Isolierung spezifischer Antikörper aus Hühnereigelb

MPIg wurde erstmals in Citratplasma von 7 Sepsispatienten mittels Auftrennung über Lysinsepharose und nachfolgende Bestimmung der Plasminaktivität (Kordich et al., 1987), bzw. in EDTA-Proben entzündlicher Synovialflüssigkeit mittels ELISA (Moroz et al., 1986) nachgewiesen. Diese Untersuchungen fanden an kleinen Probenkollektiven statt. Um MPIg in einer größeren Anzahl von Proben spezifisch bestimmen zu können, wurde von Borst (1994) ein ELISA auf der Basis von Antikörpern aus Kaninchenserum entwickelt. Darüber hinaus gelang es ihm auch, als Primärantikörper Antikörper aus Hühnereigelb, sogenanntes IgY, herzustellen und diese in Pilotuntersuchungen einzusetzen. Für eine weitere Verbesserung des Testsystems erschien die Verwendung aviärer Antikörper insbesondere deshalb erfolgversprechend, weil sich in den Untersuchungen von Borst (1994) zeigte, daß Antikörper aus Hühnereigelb weniger unspezifische Bindung mit PIg eingehen als Kaninchen-Antikörper. Somit wurden für eine Reaktivierung des MPIg-ELISAs auch Antikörper aus Eigelb isoliert und aufgereinigt.

Die Menge an Antikörpern aus 1 ml Eigelb-Rohextrakt nach Immunabsorption und Immunselektion lag jedoch um den Faktor 4 - 5 unter dem von Borst (1994) bestimmten Bereich und betrug nur 0,8 µg (3 - 5 µg bei Borst). Aufgrund dieses unerwartet schlechten Resultats sollte versucht werden, ob mit Eiweißpräzipitation durch Dextransulfat-Fällung die Ausbeute verbessert werden kann. In der Literatur sind für Fällungsmethoden zur Aufreinigung von Antikörpern aus Hühnereigelb wesentlich bessere Ausbeuten beschrieben (Ntakarutimana et al., 1992). Für die Methode von Jesenius (1981) lagen im Labor von Prof. Jochum bereits Erfahrungen vor, weshalb diese Dextransulfat-Fällung gewählt wurde. Die lipophilen Bestandteile wurden in der Vorreinigung des Eigelbs durch Einfrieren abgetrennt. In dem darauf folgenden Schritt wur-

den die Antikörper durch Bindung an eine Mischbettionenaustauscher-Matrix aufkonzentriert. Damit stand ein bereits um den Faktor 3 eingeeengtes Eigelb-Rohextrakt zur Verfügung. Dieses wurde wie natives Eigelb in der Methode nach Jensenius (1981) eingesetzt (C.2.3.1.3).

Nach der Aufreinigung des IgY aus dem Eigelb-Rohextrakt konnte unter Berücksichtigung der bereits bestehenden Konzentrierung um den Faktor 3 mit 0,186 g Antikörper je 1 ml Eigelb eine 23250-fach höhere Ausbeute als bei der Affinitätschromatographie erreicht werden. Bei der Prüfung der Spezifität des Antikörpers erwies sich allerdings, daß nach dieser Art der Aufreinigung der Antikörper eine ungewöhnlich intensive, unspezifische Bindung auch an Strukturen der Blotmembran und an die ELISA-Platten, selbst nach Absättigung mit Proteinlösung aufwies (D.1.2, Abb. 4c).

Somit war im Gegensatz zu den Erfahrungen, die in der Arbeitsgruppe von Prof. Jochum mit Elastase-Antikörpern aus Hühnereigelb gewonnen werden konnten, der Antikörper gegen MPIg, der nach der Dextransulfat-Fällung isoliert wurde, nicht für den Einsatz im ELISA geeignet.

Als Folgerung aus diesen Ergebnissen wurde für die Messung der Patientenproben wie auch der Proben aus *in vitro*-Inkubationen ausschließlich der Antikörper aus Kaninchenserum in den etablierten Puffersystemen verwendet (Borst, 1994).

Fluoreszierendes Substrat

Ausgehend von der Überlegung, daß der limitierende Faktor für die untere Nachweisgrenze des ELISA die geringe Differenz in den Extinktionen im Bereich niedriger Konzentrationen gebundener Antikörper wäre, wurde nach Methoden gesucht, auch bei geringer Anzahl gebundener Antikörper einen Unterschied in der Umsetzung des Substrats zu finden. In der Literatur ist durch fluorogenes Substrat eine Steigerung der Sensitivität bis zu einer unteren Nachweisgrenze von 1 ng/ml beschrieben (Molz et al., 1997; Schaap et al., 1989). Dabei wurde als Sekundärantikörper ein Anti-Plasminogen-Antikörper

im Konjugat mit alkalischer Phosphatase verwendet, die 4-Methyl-Umbel-lyferyl-Phosphat umsetzt.

Durch Verwendung des fluorogenen Substrats ließ sich jedoch keine Erniedrigung der Nachweisgrenze erreichen. Die Nachweisgrenze lag im Gegenteil um über den Faktor 100 höher. Bei der Verwendung von IgY als Primärantikörper war die untere Nachweisgrenze bei 0,3 µg/ml bzw. bei der Verwendung von Kaninchen-IgG bei 10 µg/ml. Im Vergleich dazu ist der untere Cut-Off unter den von Borst (1994) etablierten Bedingungen (C.2.3.2.3) mit 2,4 ng/ml festgesetzt. Der limitierende Faktor für die untere Nachweisgrenze ist in der unspezifischen Bindung des Primärantikörpers zu suchen. Darüber hinaus ist die erheblich schlechtere Sensitivität auch mit einer unspezifischen Anlagerung des Biotin-Phosphatase-Komplexes erklärbar, die als einzige Komponente des ursprünglichen ELISAs verändert wurde.

Somit haben wir uns für den weiteren Nachweis von MPIg zur Verwendung von polyklonalem Kaninchenantikörper als Primärantikörper und ABTS für die Substratreaktion entschlossen.

E.2 Entstehung von Miniplasminogen

In einer Reihe von Literaturzitationen wird die Entstehung von MPIg ausschließlich auf die proteolytische Aktivität der Elastase zurückgeführt (Duboscq et al., 1997; Kordich et al., 1987; Moroz et al., 1986; Sottrup-Jensen et al., 1978). Seit der Beschreibung von Angiostatin als einem Spaltprodukt des PIg mit angiostatischer Wirkung durch O'Reilly (O'Reilly et al., 1994) wird die Spaltung von PIg auch durch andere Proteasen als die Serinprotease Elastase aus Granulozyten in Betracht gezogen. Unter anderem wurde die Entstehung von Angiostatin auf die Wirkung von Metallo-Elastase, MMP-13, aus in den Tumor eingewanderten Makrophagen zurückgeführt (Dong et al., 1997). *In vitro* Untersuchungen konnten eine Entstehung von Angiostatin auch durch MMP-3 (Lijnen et al., 1998) und durch Autokatalyse von PIn (Stathakis et al., 1997) nachweisen. Vor diesem Hintergrund erschien es wichtig zu zeigen, ob neben den genannten Enzymen noch andere Proteasen in der Lage sind, PIg in der

Weise zu prozessieren, daß MPIg bzw. sein Gegenstück, das Angiostatin, entstehen. Für derartige Inkubationsversuche wurden Enzyme ausgesucht, von denen bekannt ist, daß sie eine Rolle bei der Metastasierung von Tumorzellen spielen oder als Proteasen bei der Akti-vierung oder Zerstörung von Granulozyten freigesetzt werden.

Über den Gelatinase-Assay konnte die Aktivität der eingesetzten Enzyme nachgewiesen werden. Somit konnte ein Ausbleiben der Entstehung von MPIg aufgrund ungenügender Enzymaktivität ausgeschlossen werden.

Die *in vitro*-Inkubationen von Plg mit aktivierten Enzymen ließen ausschließlich bei Elastase aus Granulozyten das Auftreten von MPIg erkennen. Auch bei längerer Inkubation von Plg mit den verwendeten MMPs (MMP-2, MMP-8, MMP-9) konnte kein MPIg nachgewiesen werden.

Für die Messung von Miniplasminogen in Patientenproben bedeutet diese Beobachtung, daß die Entstehung von MPIg am ehesten wohl auf den Einfluß der PMN-Elastase zurückzuführen ist.

Wurde Plg mit Granulozyten inkubiert, entstand MPIg ohne zusätzliche Aktivierung der Granulozyten in größeren Mengen als unter zusätzlicher Aktivierung mit Zymosan. Bei der Inkubation mit Normalplasma anstelle von Plg konnte MPIg nicht gemessen werden, da die freigesetzte Elastase durch α_1 -PI inhibiert wird. Während der Isolierung unterliegen die Granulozyten durch die verschiedenen Zentrifugationsschritte und auch schon bei der Blutabnahme durch Kontakt mit körperfremden Material einer Voraktivierung. Diese Grundaktivierung erklärt die hohen Elastasekonzentrationen von 295 ng/ml bis 525 ng/ml. Bei zusätzlicher Aktivierung lagen die Elastasekonzentrationen über dem Messbereich von 1000 ng/ml (s. D.3.3., Tab D1, Abb.8). Die Messung von MPIg in den Ansätzen ohne Granulozyten ist am ehesten auf eine Restkreuzreaktivität der Primärantikörper gegenüber Plg zurückzuführen, die nicht durch die Zugabe von Normalplasma, wie dies im Falle des Standards vorgenommen wird, unterdrückt wurde (Borst M, 1994). Für diese These spricht ebenfalls die an der unteren Nachweisgrenze sich bewegenden Konzentrationen für MPIg in den Ansätzen mit Normalplasma. In allen Ansätzen mit Granulozyten ist in Abhängigkeit von der Zeit eine deutliche

Zunahme an MPIg zu sehen, im Gegensatz zu denen ohne Granulozyten. Eine zu hohe Elastasekonzentration wirkt sich allerdings auf das Ausmaß der Entstehung von MPIg negativ aus. Diese Beobachtung machte auch Borst (Borst M, 1994) bei *in vitro*-Spaltversuchen mit Elastase. Trotz der Zunahme der MPIg-Konzentration über einen Zeitraum von 4 h scheint eine hohe Elastasekonzentration zu einer weiteren Prozessierung des entstandenen MPIg zu niedermolekularen Produkten zu führen. Das sehr viel niedrigere Ausmaß, in dem MPIg unter Zugabe von Normalplasma anstelle von Plg entsteht, ist mit dem Überschuß von Elastaseinhibitoren im Normalplasma zu erklären, die die freie Elastase-aktivität trotz hoher immunologisch nachweisbarer Konzentrationen reduzieren. So ist erst nach einer Inkubationsdauer von 4 h bei Raumtemperatur ein Anstieg der MPIg-Konzentration deutlich erkennbar. Aus diesen Beobachtungen kann man schließen, daß für die Entstehung von MPIg unter physiologischen Bedingungen nicht nur die absolute Elastasekonzentration eine Rolle spielt, sondern daß auch eine Umgebung ohne funktionstüchtige Elastaseinhibitoren oder die Inkubationsdauer von entscheidendem Einfluß sind. *Ex vivo*-Untersuchungen in Exsudatproben von Peritonitispatienten ergeben ähnliche Resultate. So wurde die Destruktion von diversen funktionellen Proteinen (Billing et al., 1997; Jochum et al., 1999) in Gegenwart von hohen Konzentrationen von Elastase bei gleichzeitigem Vorliegen von inaktivem α_1 -PI beschrieben. Eine Wiederherstellung der Inhibitionskapazität durch die Gabe von Serum, um Opsonine und andere Abwehrproteine vor der Proteolyse zu schützen, konnte mit der Verbesserung der Infektabwehr bei Peritonitis in Zusammenhang gebracht werden (Billing et al., 1994).

E.3 Messung von Miniplasminogen in verschiedenen Proben

Sämtliche Proben wurden mit dem für den Primärantikörper aus Kaninchenserum optimierten ELISA (Borst M, 1994) gemessen.

Vor der Messung von Proben aus verschiedenen Patientenkollektiven sollte geklärt werden, welches Blutabnahmesystem am besten geeignet war und wie sich MPIg bei Einfrieren der Proben verhält.

Untersucht wurden verschiedene, in der Routine verwendete Methoden zur Blutabnahme. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf die Proben gelegt, zu denen EDTA oder Citrat als Antikoagulanzen zugesetzt wird. Die Messung in Serumproben wurde als problematisch angesehen, da aufgrund der bei der Serumgewinnung stattfindenden Koagulation sowohl eine Plg-Aktivierung als auch eine Aktivierung von Granulozyten mit Freisetzung u. a. von Elastase induziert wird. Als Antikoagulant bei der Blutabnahme oder Verarbeitung von anderen Körperflüssigkeiten wurde primär Citrat gewählt, da sich in den Parallelmessungen von EDTA- und Citratplasma-Proben herausstellte, daß zu den Proben zugesetztes MPIg in Citratplasma wiedergefunden werden konnte, im EDTA-Plasma jedoch nicht (s.D.4.1). Dieser negative Einfluß von EDTA auf das Testsystem konnte bisher nicht geklärt werden. Folglich wurde MPIg in den Proben, wenn möglich, in Citratplasma bestimmt.

Um den Effekt des Einfrierens der Proben auf die Reproduzierbarkeit von MPIg-Werten bewerten zu können, wurden sowohl Proben aus *in vitro*-Versuchen als auch Patientenproben, in denen Miniplasminogen nachweisbar war, nach mehrmaligen Auftauen und Einfrieren gemessen. Die Werte in Proben, in denen MPIg in Puffersystemen ohne Plasma bestimmt wurde, zeigten eine Abweichung von der eingesetzten Konzentration von etwa 14% (s. D.4.2). Die Schwankungen bewegten sich dabei im Bereich der Abweichungen, wie sie Borst (Borst M, 1994) beschrieben hatte.

Wurden Proben mit Granulozyten im Ansatz gemessen, konnten nach Lagerung bei -20°C über mehrere Tage bei hohen Elastasewerten nur noch Werte gefunden werden, die 30 % unter dem Ausgangswert lagen (s. D.4.2., Abb.12).

Unter Normalplasmazugabe konnte bei erneuter Messung kein MPIg mehr nachgewiesen werden.

Ebenfalls sank z. B. die ursprüngliche MPIg-Konzentration in Patientenproben (Citratplasma) von 89 ng/ml nach zweimaligem Auftauen unter die Nachweisgrenze von 2,4 ng/ml. Auch nach Zugabe von größeren Mengen (im µg-Bereich) von gereinigtem MPIg ließ sich zwar nach dem ersten Auftauen nach 20 d die eingesetzte Menge bis auf einen Verlust von 6 % wiederfinden. Nach dem zweiten Auftauen 6 d später lag dagegen die Konzentration in 2 der gemessenen 3 Proben über der 26 d vorher eingesetzten Menge (s. D.4.3.). Das Wiederfinden von MPIg scheint eher von der Anzahl der Auftauvorgänge, als von der Dauer des Einfrierens abhängig zu sein.

Dies wäre damit vereinbar, daß durch den Vorgang des Einfrierens und Auftauens die Proteolyse des Plg und des MPIg fortschreitet, wie dies auch im zeitlichen Verlauf bei der *in vitro*-Inkubation von Plasminogen mit MMP-8 bzw. MMP-9 gezeigt werden konnte.

Vor dem Messen der pathologischen Proben sollte geklärt werden, ob MPIg nicht auch in Proben von gesunden Probanden zu finden ist. Aber in keiner der 10 gemessenen Proben konnte MPIg nachgewiesen werden, so daß das Auftreten von MPIg wohl nur auf pathologische Prozesse zurückgeführt werden kann.

Um einen Anhalt für den Einfluß von Granulozyten-Elastase im Tumorgeschehen zu bekommen, wurde MPIg in systemischen Proben eines Tumorkollektivs bestimmt. Dafür wurden Proben verwendet, die einer Studie mit Mamma-Ca-Patienten entstammten. Diese standen aus einer Kooperation mit Dr. Funke/Dr. Untsch (Chirurgische Klinik Großhadern) zur Verfügung. Ausgewählt wurden diese Proben, weil in einer umfangreichen Untersuchung zahlreiche Parameter in diesen Proben bereits bestimmt worden waren und somit möglicherweise Korrelationen zwischen dem Nachweis von Miniplasminogen und Faktoren mit prognostischen Wert für disseminiertes Tumorstadium herzustellen sind. Für Tumoren des Drüsen- und Drüsen- gangepithels der Mamma ist darüber hinaus der Einfluß des Plg-, PA-Systems

bekannt. So besteht ein Zusammenhang zwischen der Tumormetastasierung und dem immun-histologischen Nachweis von Plg in Tumorgewebe (Burtin et al., 1987a).

Aus logistischen Gründen lagen aus der Kooperation mit Dr. Funke/Dr. Untsch nur Serumproben vor. In einem Drittel der gemessenen 40 Proben konnte MPIg nachgewiesen werden. In den übrigen Proben lag die Konzentration unter der Nachweisgrenze des ELISAs von 2,4 ng/ml. Aufgrund der vielen Nullwerte war eine statistische Auswertung schwer möglich. Deshalb war es auch nicht sinnvoll die Mittelwerte der einzelnen Gruppen miteinander zu vergleichen, sondern es wurden Unterschiede zwischen den Medianen graphisch gegeneinander aufgetragen, um auch Ausreißer besser darstellen zu können. Es lag in keinem Fall eine Normalverteilung der Werte vor, so daß die meisten statistischen Tests nicht verwendet werden konnten. Daher wurde versucht, mit einem Test für unabhängige, nicht normalverteilte Stichproben einen signifikanten Unterschied in den unterschiedlichen Gruppen zu erkennen.

Bei einer Unterteilung nach histologisch unterschiedlichen Tumorentitäten war ein Unterschied zwischen den Gruppen am auffälligsten. Allerdings zeigte sich nicht bei den Medianen sondern lediglich in dem Abstand der Quartilen ein Unterschied, der jedoch wegen der geringen Anzahl an Proben eine sinnvolle statistische Auswertung nicht erlaubte (s. D.5.3, Abb. 27). Zu den anderen Parameter wie Plasminogen PAI-1, u-PA oder Tumormarkern (CEA, CA19-9) konnte keine Korrelation mit der MPIg-Konzentration hergestellt werden.

Bei den Proben, in denen MPIg gemessen wurde, handelte es sich wie bereits erwähnt um Serumproben. Aufgrund der in den Vorversuchen erhaltenen Ergebnisse, ist diese Art der Probenaufbereitung nicht vorteilhaft für die Stabilität von MPIg. Nicht nur könnte entstandenes MPIg durch die in der Aufbereitung freigesetzte Elastase weiter gespalten werden, sondern vor allem auch während der Aufbereitung der Probe könnte natives Plg gespalten werden. Gegen die erste Hypothese spricht, daß vorher unaufgetaute Proben verwendet wurden und bei Vorhandensein von MPIg in der Zirkulation der Patienten vor der Proben-abnahme geringe MPIg-Mengen in einer größeren Anzahl von Proben gefunden werden müßten. Die Unterschiede zwischen den

gemessenen MPIg-Konzentrationen sind allerdings sehr groß, besonders ein herausragender Wert von 50 ng/ml kann mit dieser These nicht erklärt werden. Führt man die gemessenen MPIg-Werte auf eine *in vitro*-Proteolyse während der Blutabnahme oder während des Auftauens zurück, sind die Werte besser verständlich. Man muß also davon ausgehen, daß in der Zirkulation meßbare MPIg-Mengen entstehen.

Deshalb wurde MPIg auch in Proben, die aus homogenisierten Tumorzellen gewonnen wurden, bestimmt. Hier wurden Proben verwendet, die in immunhistologischen Untersuchungen eine besonders hohe Elastasekonzentration erkennen ließen. Nach den Vorversuchen, in denen die proteolytische Aktivität gegenüber MPIg von Granulozyten untersucht wurde (s. D3.3.), sollte in diesen Proben MPIg detektierbar sein, da angenommen werden konnte, daß eine Proteolyse des PIg durch Elastase in der räumlichen Nähe vonstatten gehen könnte. Jedoch konnte in keiner der Proben MPIg nachgewiesen werden. Da trotz der gemessenen hohen Elastasekonzentrationen keine mittels ELISA nachweisbare MPIg-Konzentration entsteht, ist davon auszugehen, daß die Elastase entweder nicht aktiv ist oder andere Substrate als PIg der Elastase im Überfluß zur Verfügung stehen. Sollte allerdings MPIg entstanden sein, könnte dies durch die Aktivität der Elastase sofort weitergespalten werden. Ein direkter Einfluß der PMN-Elastase auf die Entstehung von Angiostatin war daher weder zu beweisen noch auszuschließen.

Bei den Proben, die im Rahmen der Peritonitisstudie gemessen wurden, zeigte sich in der statistischen Analyse in Bezug auf Unterschiede zwischen der Gruppe mit und der Gruppe ohne Tumor, daß ohne Tumor die Werte für Miniplasminogen höher (2,9 ng/ml) lagen als in der Gruppe mit Tumor (0,78 ng/ml). Dieser Unterschied der Mittelwerte war bei Anwendung des Mann-Whitney-Tests signifikant ($p=0,05$) (s. D.5.2.2., Abb. 19).

Für die Entstehung von Angiostatin in Tumoren wurde neuerdings Metallo-Elastase aus eingewanderten Monozyten/Makrophagen identifiziert (Dong et al., 1997). Allerdings gibt es auch Hinweise für die Proteolyse von PIg zu Angiostatin durch u-PA in Gegenwart von freien Sulfhydrylgruppen und somit

für die Produktion von Angiostatin durch den Tumor selbst (Gately et al., 1997). Die im Mittel höheren MPIg-Konzentrationen, bei den Patienten, bei denen kein Tumor bekannt war, widersprechen der These, daß evtl. Metallo-Elastase an der Entstehung von Angiostatin im Tumorgeschehen beteiligt ist. Allerdings könnte die beschriebene Bildung von Angiostatin bei Entzündung (Falcone et al., 1998) auf den Einfluß von Elastase aus Granulozyten zurückzuführen sein.

Die proteolytische Aktivität von Proteasen aus Granulozyten in Exsudatproben bei Peritonitispatienten ist sehr gut beschrieben (Billing et al., 1997; Jochum et al., 1999). Auch konnte der Nachweis eines Elastase-spezifischen Spaltprodukten der A α -Kette des Fibrinogens, das sogenannte Fibrino-Elastase-Peptid (kurz: FEP; A α 1-21), mit Hilfe eines spezifischen ELISAs erbracht werden (Gippner-Steppert, 1991). Der Nachweis von MPIg in Peritonitisexsudaten erschien daher erfolgversprechend. Hierbei wurden Proben aus einer Peritonitis-Studie verwendet, bei der die therapeutische, intraperitoneale Applikation von Antithrombin III und Fresh-Frozen-Serum zur Wiederherstellung der lokalen Abwehrmechanismen untersucht wurde (Billing et al., 1994). Aus dem gesamten Kollektiv wurden wiederum diejenigen Proben ausgewählt, die besonders hohe Elastasekonzentrationen aufwiesen. Bei den ersten Messungen zeigte sich, daß in den parallel zu den Exsudatproben abgenommenen Blutproben kein MPIg nachweisbar war. Es war primär nicht auszuschließen, daß aufgrund der erhöhten Permeabilität MPIg aus dem lokalen, intraperitonealen Geschehen, sollte es dort entstehen, in der Zirkulation meßbar wäre. Wegen der Größe des MPIg von 38 kD war zudem nicht auszuschließen, daß MPIg über die Niere ausgeschieden wird, da die Schwelle für die unselektive, glomeruläre Ausscheidung bei 60 kD liegt. Um diese Möglichkeit des Verlustes von MPIg aus der Zirkulation nachzuweisen, wurde bei einem Sepsispatienten MPIg sowohl im Plasma, als auch im Urin bestimmt. Im zuvor durch Gefriertrocknung eingeeengte Urin (1:50) konnte MPIg nicht gemessen werden, trotz eines MPIg-Wertes von 89 ng/ml im Citratplasma. Auch eine unspezifische Proteinurie hatte in der Routinediagnostik weder zum Zeitpunkt vor noch nach der Probenabnahme bestanden. Als weiteres Indiz

dafür, daß die Ausscheidung von MPIg über die Niere keinen Einfluß auf dessen Plasmakonzentration hat, zeigte sich keine Korrelation zwischen erhöhten Kreatininwerten und MPIg bei den gemessenen Mamma-Ca-Proben. Bei einem Einfluß der Nierenfunktion auf die MPIg-Plasmakonzentrationen hätten erhöhte Kreatininwerte als Zeichen der eingeschränkten, glomerulären Filtrationsleistung zu höheren MPIg-Plasmawerten führen müssen.

Obwohl Proben von Patienten ausgewählt wurden, die während des Beobachtungszeitraums Elastasekonzentrationen von über 10000 ng/ml aufwiesen, konnte ein Zusammenhang zwischen Elastasekonzentration und MPIg-Menge nicht bestätigt werden. Eine mögliche Korrelation könnte bei Einbeziehung aller gemessenen Proben verdeckt werden, da in der Patientengruppe ohne Therapie nach der ersten Laparotomie und Lavage bei weiterhin erhöhten Elastasewerten das Plg ausgewaschen sein könnte und somit das Substrat fehlen würde. Diese Fehlerquelle kann ausgeschlossen werden, wenn man nur die Werte betrachtet, die bei der Abnahme vor der ersten Lavage gemessen wurden. Aber auch hier konnte kein Zusammenhang beobachtet werden. So konnte in 4 dieser Proben trotz hoher Elastasekonzentrationen kein MPIg gemessen werden. Es ist ebenso keine Untergrenze der Elastasekonzentration erkennbar, unter der kein MPIg entsteht, wie dies für Fibrinogenspaltprodukt FEP ($A\alpha 1-21$) beschrieben wurde (Gippner-Steppert, 1991). Eine Erklärung hierfür ist die 4-fach höhere Fibrinogenkonzentration (8800 nmol/l) im Vergleich zu der Plasminogenkonzentration (2170 nmol/l) im Plasma. Die gleichen Konzentrationsverhältnisse können im Exsudat erwartet werden. Fibrinogen kann somit mit weit größerer Wahrscheinlichkeit als Plg durch Elastase gespalten werden.

Unter dieser Prämisse wäre zu erwarten, daß bei hohen Plg-Konzentrationen MPIg entsteht. Es zeigte sich aber auch hier weder im Bezug auf das gesamte Kollektiv, noch bei Betrachtung ausschließlich der Proben von der ersten Lavage ein Zusammenhang zwischen der Plg-Konzentration und dem Auftreten von MPIg.

Daß bei fehlendem Substrat kein Spaltprodukt entsteht, war einfach zu beweisen. Die Patientengruppe ohne Therapie, d. h. ohne Serum- und AT-III-Gabe 6 Stunden nach der ersten Lavage, sollten signifikant niedrigere MPIg-Werte und Plg-Werte aufweisen, als die Therapiegruppe nach der Serumgabe. In der graphischen Darstellung ist eine höhere Plg-Konzentration in der Therapiegruppe erkennbar, die allerdings wegen der geringen Probenanzahl für den einzelnen Meßzeitpunkt nicht signifikant ist. Genauso verhält es sich auch mit den MPIg-Konzentrationen. Dennoch ist in der Therapiegruppe die MPIg-Konzentration bei Anwendung des Mann-Whitney-Tests für unabhängige, nicht normalverteilte Stichproben mit 3,05 ng/ml signifikant höher als in der Kontrollgruppe (2,2 ng/ml) ($p=0,05$). Die Bildung von MPIg steht also in engem Zusammenhang mit der Applikation von Serum in die Bauchhöhle.

Einzelverläufe, in denen Anstiege der Elastase-Konzentration einem Anstieg der MPIg-Konzentration vorausgingen, wie sie Borst fand (Borst M, 1994), konnten wir nicht zeigen.

Entgegen der Ergebnisse aus den Vorversuchen, die die Entstehung von MPIg nach Inkubation von Plasma mit Granulozyten bestätigen, ließ sich *in vivo* ein Zusammenhang zwischen der proteolytischen Kapazität in den Exsudaten und der MPIg-Entstehung nicht zweifelsfrei beweisen. MPIg ist daher – im Gegensatz zu dem Elastase-spezifischen Spaltprodukt des Fibrinogens (FEP) (Gippner-Steppert, 1991) - als ein spezifisches Spaltprodukt des Plg nicht für den indirekten Nachweis der proteolytischen Aktivität der PMN-Elastase geeignet.

E.4 Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluß von PMN-Elastase auf die Proteolyse von Plg *in vivo* zu untersuchen. Auf Grund der widersprüchlichen Ergebnisse aus den Messungen von MPIg in Plasma- und Exsudatproben wäre eine Untersuchung an histologischen Präparaten interessant, da die Beteiligung von Plg an der Metastasierung gut belegt ist (Burtin et al., 1987a; Ruppert et al., 1997). Nach der Fixierung des Gewebes wäre auch eine *in vitro*-Prozessierung von Plg bzw. MPIg wie bei der Probenaufbereitung nicht zu erwarten, so daß hiermit eine bessere Möglichkeit bestünde, die lokale Bildung von MPIg und damit den Einfluß von PMN-Elastase an der Entstehung von Angiostatin *in vivo* nachzuweisen.

F Literaturverzeichnis

- Angles-Cano, E. (1994) *Chem Phys Lipids* 67-68, 353.
- Barendsz-Janson, A.F., Griffioen, A.W., Muller, A.D., van Dam-Mieras, M.C., & Hillen, H.F. (1998) *J Vasc Res* 35, 109.
- Bieth, J., Metais, P., & Warter, J. (1968) *Clin Chim Acta* 20, 69.
- Bikfalvi, A. (1995) *Eur J Cancer* 31A, 1101.
- Billing, A., Frohlich, D., Assfalg-Machleidt, I., Machleidt, W., & Jochum, M. (1991) *Biomed Biochim Acta* 50, 399.
- Billing, A.G., Frohlich, D., Konecny, G., Schildberg, F.W., Machleidt, W., Fritz, H., & Jochum, M. (1994) *Eur J Clin Invest* 24, 28.
- Billing, A.G., Jochum, M., Frohlich, D., Cheronis, J.C., & Fritz, H. (1997) *Eur J Clin Invest* 27, 1030.
- Borst M. (1994), Institut für Klinische Chemie und Biochemie des Klinikums Innenstadt, Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktor der Pharmazie an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
- Borza, D.B. & Morgan, W.T. (1997) *J Biol Chem* 272, 5718.
- Bradford (1976), *Anal Biochem* 72, 248.
- Brantly, M., Lee, J.H., Hildeshiem, J., Uhm, C.S., Prakash, U.B., Staats, B.A., & Crystal, R.G. (1997) *Am J Respir Cell Mol Biol* 16, 225.
- Burke, S.E., Davidson, D.J., Lubbers, N.L., Reininger, I.M., & Henkin, J. (1996) *Thromb Res* 83, 421.
- Burtin, P., Chavanel, G., Andre-Bougaran, J., & Gentile, A. (1987a) *Int J Cancer* 39, 170.
- Burtin, P., Chavanel, G., & Andre, J. (1985b) *Int J Cancer* 35, 307.
- Bussolino, F., Mantovani, A., & Persico, G. (1997) *Trends Biochem Sci* 22, 251.
- Cao, Y., Ji, R.W., Davidson, D., Schaller, J., Marti, D., Sohndel, S., McCance, S.G., O'Reilly, M.S., Llinas, M., & Folkman, J. (1996) *J Biol Chem* 271, 29461.
- Castellino, F.J. & McCance, S.G. (1997) *Ciba Found Symp* 212, 46.
- Chang, Y., Mochalkin, I., McCance, S.G., Cheng, B., Tulinsky, A., & Castellino, F.J. (1998) *Biochemistry* 37, 3258.
- Christiansen, V.J., Sims, P.J., & Hamilton, K.K. (1997) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 164.

- Church, W.R. & Messier, T.L. (1991) *Hybridoma* 10, 659.
- Claesson-Welsh, L., Welsh, M., Ito, N., Anand-Apte, B., Soker, S., Zetter, B., O'Reilly, M., & Folkman, J. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5579.
- Clark, L.D., Clark, R.K., & Heber-Katz, E. (1998) *Clin Immunol Immunopathol* 88, 35.
- Clavel, C., Chavanel, G., & Birembaut, P. (1986) *Cancer Res* 46, 5743.
- Dong, Z., Kumar, R., Yang, X., & Fidler, I.J. (1997) *Cell* 88, 801.
- Duboscq, C., Genoud, V., Parborell, M.F., & Kordich, L.C. (1997) *Thromb Res* 86, 505.
- Dunn, F.W., Deguchi, K., Soria, J., Soria, C., Lijnen, H.R., Tobelem, G., & Caen, J. (1984) *Thromb Res* 36, 345.
- Edelberg, J.M. & Pizzo, S.V. (1991) *Blood Coagul.Fibrinolysis* 2, 759.
- Falcone, D.J., Khan, K.M., Layne, T., & Fernandes, L. (1998) *J Biol Chem* 273, 31480.
- Gaffney, P.J. (1971) *Nat New Biol* 234, 281.
- Gately, S., Twardowski, P., Stack, M.S., Cundiff, D.L., Grella, D., Castellino, F.J., Enghild, J., Kwaan, H.C., Lee, F., Kramer, R.A., Volpert, O., Bouck, N., & Soff, G.A. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10868.
- Gately, S., Twardowski, P., Stack, M.S., Patrick, M., Boggio, L., Cundiff, D.L., Schnaper, H.W., Madison, L., Volpert, O., Bouck, N., Enghild, J., Kwaan, H.C., & Soff, G.A. (1996) *Cancer Res* 56, 4887.
- Gippner-Steppert, C., Entwicklung eines spezifischen Testsystems für den Nachweis der Bildung eines proteolytischen Spaltprodukts des Fibrinogens durch lysosomale PMN-Elastase sowie Untersuchungen am Miniplasminogen, einem Elastase-spezifischen Spaltprodukt des Plasminogens. 1991, Dissertation zur Erlangung des Grades des Doktors der Chemie an der Ludwigs-Maximilians-Universität, München
- Hautamaki, R.D., Kobayashi, D.K., Senior, R.M., & Shapiro, S.D. (1997) *Science* 277, 2002.
- Henkin, J., Marcotte, P., & Yang, H.C. (1991) *Prog Cardiovasc Dis* 34, 135.
- Heukeshoven, J. & Fasman, G.D. (1985) *Elektrophoresis* 6, 103.
- Holvoet, P., Lijnen, H.R., & Collen, D. (1986) *Eur J Biochem* 157, 65.
- Jensenius, J. C.(1981) *J Immunol Methods* 46(1), 63
- Ji, W.R., Barrientos, L.G., Llinas, M., Gray, H., Villarreal, X., Deford, M.E., Castellino, F.J., Kramer, R.A., & Trail, P.A. (1998) *Biochem Biophys Res Commun* 247, 414.

- Jochum, M., Billing, A.G., Frohlich, D., Schildberg, F.W., MacHleidt, W., Cheronis, J.C., Gippner-Steppert, C., & Fritz, H. (1999) *Eur J Clin Invest* 29, 246.
- Jochum, M., Gippner-Steppert, C., MacHleidt, W., & Fritz, H. (1994) *Am J Respir Crit Care Med* 150, S123.
- Kirschenbaum, D.M. (1976) in *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology* (Fasman, G.D., Ed.) pp 383-545, crc Press, Cleveland, Ohio.
- Kleiner, D.E. & Stetler-Stevenson, W.G. (1999) *Cancer Chemother Pharmacol* 43 Suppl, S42.
- Kordich, L.C., Porterie, V.P., Lago, O., Bergonzelli, G.E., Sasseti, B., & Sanchez, A.J. (1987) *Thromb Res* 47, 553.
- Kraus, M. (1998) in *Labor und Diagnose* (Thomas, L., Ed.) pp 640-642, TH-Books-Verl.-Ges., Frankfurt.
- Kwaan, H.C. & Astrup, T. (1969) *Exp Mol Pathol* 11, 82.
- Kyhse-Anderson, J. (1984) *J.Biochem.Biophys.Methods* 10, 203.
- Lämmli, U.K. (1970) *nature* 227, 680.
- Lijnen, H.R., Ugwu, F., Bini, A., & Collen, D. (1998) *Biochemistry* 37, 4699.
- Lijnen, H.R., Zamarron, C., & Collen, D. (1985) *Eur J Biochem* 150, 141.
- Llinas, M. Human Plasminogen. *Eur J Biochem* . 1997. Ref Type: Electronic Citation
- Lucas, R., Holmgren, L., Garcia, I., Jimenez, B., Mandriota, S.J., Borlat, F., Sim, B.K., Wu, Z., Grau, G.E., Shing, Y., Soff, G.A., Bouck, N., & Pepper, M.S. (1998) *Blood* 92, 4730.
- Machovich, R. & Owen, W.G. (1989) *Biochemistry* 28, 4517.
- McRae, B., Nakajima, K., Travis, J., & Powers, J.C. (1980) *Biochemistry* 19, 3973.
- Mihalyi, E., Weinberg, R.M., Towne, D.W., & Friedman, M.E. (1976) *Biochemistry* 15, 5372.
- Molgaard, L., Ponting, C.P., & Christensen, U. (1997) *FEBS Lett* 405, 363.
- Molz, P., Teuter, C., Schelp, C., & Amann, E. (1997) *Anticancer Res* 17, 3051.
- Montesano, R., Pepper, M.S., Mohle-Steinlein, U., Risau, W., Wagner, E.F., & Orci, L. (1990) *Cell* 62, 435.
- Moroz, L.A. (1981) *Blood* 58, 97.
- Moroz, L.A., Wing, S., & Liote, F. (1986) *Thromb Res* 43, 417.
- Müller-Berghaus, G. (1998) in *Labor und Diagnose* (Thomas, L., Ed.) pp 561-580, TH-Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt.

- Müller-Esterl, W. (1986) in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U., Ed.) pp 304-316, Verlag Chemie GmbH, Weinheim/ Bergstraße.
- Nast-Kolb, D., Waydhas, C., Gippner-Steppert, C., Schneider, I., Trupka, A., Ruchholtz, S., Zettl, R., Schweiberer, L., & Jochum, M. (1997) *J Trauma* 42, 446.
- Ntakarutimana, V., Demedts, P., van Sande, M., & Scharpe, S. (1992) *J Immunol Methods* 153, 133.
- O'Reilly, M.S., Holmgren, L., Chen, C., & Folkman, J. (1996) *Nat Med* 2, 689.
- O'Reilly, M.S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R.A., Moses, M., Lane, W.S., Cao, Y., Sage, E.H., & Folkman, J. (1994) *Cell* 79, 315.
- Ogata, K., Arakawa, M., Kasahara, T., & et al. (1983) *J.Immunol.Meth.* 65, 75.
- Owen, M.C., Brennan, S.O., Lewis, J.H., & Carrell, R.W. (1983) *N Engl J Med* 309, 694.
- Patterson, B.C. & Sang, Q.A. (1997) *J Biol Chem* 272, 28823.
- Pepper, M.S., Montesano, R., Mandriota, S.J., Orci, L., & Vassalli, J.D. (1996) *Enzyme Protein* 49, 138.
- Perlmutter, D.H. (1998) *Semin Liver Dis* 18, 217.
- Plow, E.F., Herren, T., Redlitz, A., Miles, L.A., & Hoover-Plow, J.L. (1995) *FASEB J* 9, 939.
- Ravanti, L. & Kahari, V.M. *Int.J.Mol.Med.2000.Oct.;6(4):391.-407.* 6, 391.
- Ray, J.M. & Stetler-Stevenson, W.G. (1994) *Eur Respir J* 7, 2062.
- Redl, H., Schlag, G., Bahrami, S., Davies, J., Jochum, M., & Bengtsson, A. (1994) *Prog Clin Biol Res* 388, 221.
- Reinartz, J., Hansch, G.M., & Kramer, M.D. (1995) *J Immunol* 154, 844.
- Rejante, M.R., Byeon, I.J., & Llinas, M. (1991) *Biochemistry* 30, 11081.
- Ruppert, C., Ehrenforth, S., Scharrer, I., & Halberstadt, E. (1997) *Cancer Detect Prev* 21, 452.
- Saksela, O. & Rifkin, D.B. (1988) *Annu Rev Cell Biol* 4, 93.
- Schaap, A.P., Akhavan, H., & Romano, L.J. (1989) *Clin Chem* 35, 1863.
- Schorr, M., Siebeck, M., Zugel, N., Welcker, K., Gippner-Steppert, C., Czwienczek, E., Groschler, M., & Jochum, M. (2000) *Eur J Clin Invest* 30, 359.
- Sottrup-Jensen, L., Claeys, H., Zajdel, M., Petersen, T.E., & Magnusson, S. (1978) in *Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis* (Davidson, J.F., Rowan, R.M., Samama, M.M., & Desnoyers, P.C., Eds.) pp 191-209, Rav Press, New York.

- Stack, M.S., Moser, T.L., & Pizzo, S.V. (1992) *Biochem J* 284, 103.
- Stathakis, P., Fitzgerald, M., Matthias, L.J., Chesterman, C.N., & Hogg, P.J. (1997) *J Biol Chem* 272, 20641.
- Stathakis, P., Lay, A.J., Fitzgerald, M., Schlieker, C., Matthias, L.J., & Hogg, P.J. (1999) *J Biol Chem* 274, 8910.
- Takada, A., Sugawara, Y., & Takada, Y. (1988) *Thromb Res* 50, 285.
- Takada, A. & Takada, Y. (1989) *Thromb Res* 55, 717.
- Takada, A., Takada, Y., & Sugawara, Y. (1988) *Thromb Res* 49, 253.
- Ullberg, M., Karlsson, I., Wiman, B., & Kronvall, G. (1992) *APMIS* 100, 21.
- Ullberg, M., Kronvall, G., & Wiman, B. (1989) *APMIS* 97, 996.
- Westermarck, J. & Kahari, V.M. (1999) *FASEB J* 13, 781.
- Wu, H.L., Chang, B.I., Wu, D.H., Chang, L.C., Gong, C.C., Lou, K.L., & Shi, G.Y. (1990) *J Biol Chem* 265, 19658.
- Wu, H.L., Wu, I.S., Fang, R.Y., Hau, J.S., Wu, D.H., Chang, B.I., Lin, T.M., & Shi, G.Y. (1992) *Biochem Biophys Res Commun* 188, 703.
- Zucker, S., Hymowitz, M., Conner, C., Zarrabi, H.M., Hurewitz, A.N., Matrisian, L., Boyd, D., Nicolson, G., & Montana, S. (1999) *Ann N Y Acad Sci* 878, 212.

G Abkürzungsverzeichnis

α_1 PI	α_1 -Proteinase-Inhibitor
α_2 AP	α_2 -Antiplasmin
α_2 M	α_2 -Makroglobulin
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FSU	Fluorescent Signal Unit
HMK	Hochmolekulares Kininogen
H4/6	anti MP1g-Antikörper von Huhn 4 nach 6-wöchiger Immunisierung
LBS	Lysin-Bindungs-Stellen
K3I	anti MP1g-Antikörper von Kaninchen 1 mit Peptid 3 immunisiert
MMP	Matrix-Metallo-Proteinasen
MP1g	Miniplasminogen
MZP	Meßzeitpunkt
NP	Normalplasma
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PMN	polymorph-nukleäre Neutrophile
Pln	Plasmin
Plg	Plasminogen
PlgR	Plasminogen-Rezeptor
sct-PA	pro-Gewebs-Typ Plasminogen-Aktivator (single chain tissue typ Plasminogen-Aktivator)
scu-PA	Pro-Urokinase (single chain Urokinase)
Serpin	Serin-Proteinase-Inhibitor
TIMP	Tissue Inhibitor of MMP
t-PA	Gewebe-Typ Plasminogen-Aktivator
u-PA	Urokinase
u-PAR	Urokinase-Rezeptor
vWF	von Willebrand Faktor

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname: Weimann, Dirk
Anschrift: Erlachhofstr. 1.2
71640 Ludwigsburg
Geburtstag: 17. Mai 1970
Geburtsort: Friedrichshafen
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:
1976 bis 1980 Grundsule Neukeferloh
1980 bis 1981 Ernst-Mach-Gymnasium, Haar
1981 bis 1990 Pestalozzi-Gymnasium, München

Wehrersatzdienst:
Okt. 1990 bis Dez.1991 Zivildienstleistender bei "Die Johanniter",
Ottobrunn bei München

Studium:
Mai 1992 bis Aug. 1992 Geschichte und Latein, Freiburg im Breisgau
Sept. 1992 bis Feb. 1993 Chemie, Freiburg im Breisgau

Mai 1993 bis Okt. 1999 Humanmedizin, LMU, München
01.Juli 2001 Approbation zum Arzt

Famulaturen:
April 1997 Pathologisches Institut der LMU,
Vorstand: Prof. Dr. med. U. Löhrs
Aug./Sept. 1997 Innere Abteilung, KKH Pfaffenhofen/Ilm,
Chefarzt: Dr. med. Halbritter
Okt. 1997 Dr. v. Haunersches Kinderspital der LMU,
Direktor: Prof. Dr. med. Hadorn
März/April 1998 Chirurgische Klinik und Poliklinik des
Klinikums Innenstadt der LMU,
Direktor: Prof. Dr. med. L. Schweiberer

Praktisches Jahr Okt. 1998 bis Jan. 1999	Chirurgische Klinik und Poliklinik des Klinikums Innenstadt der LMU, Direktor: Prof. Dr. med. L. Schweiberer
Feb. bis Mai 1999	Medizinische Poliklinik des Klinikums Innenstadt der LMU, Direktor: Prof. Dr. med. D. Schlöndorff
Juni bis Sept. 1999	Pathologisches Institut der LMU, Direktor: Prof. Dr. med U. Löhrs
Jan. 2000 bis Juli 2001	Arzt im Praktikum in der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie des Klinikums Ludwigsburg, Chefarzt: Prof. Dr. med G. Helbing
Seit Aug. 2001	Assistenzarzt in der Klinik für Allgemein- und Visceralchirurgie des Klinikums Lubwigsburg Chefarzt: Prof. Dr. med. K. Junghanns
April 1995 bis Okt. 1998	Durchführung der Laborarbeiten unter der Anleitung von Frau Prof. M. Jochum am Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie in der Chirurgischen Klinik des Klinikums Innenstadt der LMU, München