

**Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen
Deutsches Herzzentrum München
an der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. Schunkert)**

***In vitro* Untersuchungen zur Regulation von Matrix
Metalloproteinasen bei kardiovaskulären Zellen durch den
Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN)**

Bayram Özgür Bülbül

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny
Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. R. Schmidt
2. Univ.-Prof. Dr. K.-L. Laugwitz

Die Dissertation wurde am 02.05.2013 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 29.01.2014 angenommen.

Teile dieser Arbeit wurden publiziert:

Schmidt, R., Bültmann, A., Ungerer, M., Joghetaei, N., Bülbül, Ö., Thieme, S., Chavakis, T., Toole, B.P., Gawaz, M., Schömig, A., May, A.E. Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer Regulates Matrix Metalloproteinase Activity in Cardiovascular Cells: Implications in Acute Myocardial Infarction. *Circulation* 113 (2006) 834-841

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|---|
| Inhaltsverzeichnis | Fehler! Textmarke nicht definiert. |
| 1. Einleitung..... | 9 |
| 1.1 Epidemiologie und Pathogenese der Arteriosklerose | 9 |
| 1.2 Matrix Metalloproteinasen (MMPs) | 10 |
| 1.2.1 Struktur und Funktion der MMPs | 10 |
| 1.2.2 Einteilung der MMPs..... | 12 |
| 1.2.3 Regulation der MMP-Synthese und Aktivität | 14 |
| 1.2.4 Regulation von Transkription und Translation | 14 |
| 1.2.5 Aktivierung von pro-MMPs..... | 15 |
| 1.2.6 Inhibition der MMP-Aktivität | 16 |
| 1.3 Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN) | 17 |
| 2. Problemstellung | 20 |
| 3. Material und Methoden | 21 |
| 3.1 Material..... | 21 |
| 3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial..... | 21 |
| 3.1.2 Medien, Lösungen und Puffer..... | 23 |
| 3.1.3 Primer | 27 |
| 3.1.4 rekombinante Proteine..... | 28 |
| 3.1.5 Zelllinien | 29 |
| 3.1.6 Antikörper | 30 |
| 3.2 Zellbiologische Methoden | 31 |
| 3.2.1 Isolierung peripherer mononukläerer Zellen aus Vollblut..... | 31 |
| 3.2.2 Kultivierung von MonoMac6-Zellen..... | 32 |
| 3.2.3 Smooth muscle cells (SMC) | 32 |
| 3.2.4 Proteinnachweis | 33 |
| 3.2.4.1 Solubilisierung von Proteinen aus Zellen..... | 33 |
| 3.2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophores (SDS-PAGE)..... | 33 |
| 3.2.4.3 Western Blot | 34 |
| 3.2.4.4 Zymographie..... | 35 |
| 3.3 Molekularbiologische Methoden | 36 |
| 3.3.1 Isolierung der Gesamt-RNA..... | 36 |

| | |
|---|----|
| 3.3.2 Reverse Transkription (RT-PCR, cDNA Synthese)..... | 37 |
| 3.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)..... | 38 |
| 3.3.3.1 Konventionelle Polymerase-Kettenreaktion | 38 |
| 3.3.3.2 Quantitative Real-time Polymerase-Kettenreaktion (QRT-PCR) | 40 |
| 3.3.4 Agarose-Gelelektrophorese | 41 |
| 3.3.5 Zell-Zell Adhäsion | 42 |
| 3.3.6 Zelladhäsion an das rekombinante EMMPRIN-Fc-Fusionsprotein | 42 |
| 3.4 Weitere Methoden | 43 |
| 3.4.2 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) | 44 |
| 3.4.3 Short interfering (si) RNA-Technologie | 46 |
| 3.4.4 Enzymatischer DNA-Verdau mit Restriktionendonukleasen | 47 |
| 3.4.5 Ligation | 48 |
| 3.4.6 Klonieren von EMMPRIN | 48 |
| 3.4.7 Herstellen von Adenoviren..... | 48 |
| 3.4.8 Herstellung von chimeren Fc-EMMPRIN Fusionsprotein..... | 50 |
| 4. Ergebnisse..... | 51 |
| 4.1 Zellmembran gebundenes EMMPRIN induziert die MMP-9-Aktivität in Monozyten..... | 51 |
| 4.2 Immobilisiertes rekombinantes Fc-EMMPRIN induziert die MMP-9 Expression in Monozyten | 53 |
| 4.3 MT1-MMP hat keinen wesentlichen Einfluss auf die EMMPRIN vermittelte MMP-9 Aktivität der Monozyten | 54 |
| 4.4 Auf Monozyten exprimiertes EMMPRIN induziert nach Zell/Zellkontakt die | 55 |
| MMP-2 Sekretion in glatten Muskelzelle | 55 |
| 4.5 Der substantielle Effekt von MT1-MMP auf MMP-2 Sekretion glatter Muskelzellen | 56 |
| 4.6 EMMPRIN wird zur Regulation von MMP-9 bei Monozyten benötigt..... | 57 |
| 5. Diskussion | 59 |
| 6. Zusammenfassung | 63 |
| 7. Literaturverzeichnis..... | 65 |
| 8. Lebenslauf | 78 |
| 9. Selbständigkeitserklärung..... | 80 |
| 10. Danksagung | 81 |

Verzeichnis der Abkürzungen

| | |
|------------------|---|
| A | Adenin |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| bFGF | <i>basic fibroblast growth factor</i> |
| bp | Basenpaare |
| C | Cytosin |
| CD | <i>cluster of differentiation</i> , Zelloberflächenmarker |
| cDNA | <i>copy</i> Desoxyribonukleinsäure |
| CHO | <i>chinese hamster ovary</i> |
| CRP | C-reaktives Protein |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxynukleotidtriphosphat |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGF | <i>epidermal growth factor</i> |
| ELISA | <i>enzyme linked immune sorbent assay</i> |
| EMMPRIN | <i>extracellular matrix metalloproteinase inducer</i> |
| FACS | <i>fluorescence activated cell sorting system</i> , Durchflusszytometrie |
| Fc | konstanter Abschnitt eines Antikörpers |
| FCS | <i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum |
| FITC | Fluorescein Isothiocyanate |
| FSC | <i>forward scatter</i> , Forwärtstreulicht |
| G | Guanin |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase |
| GTC | Guanidiniumisothiocyanat |
| h | Stunde |
| HCl | Salzsäure |
| HEPES | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure |
| H ₂ O | Wasser |
| HMG-CoA | 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A |
| HRP | <i>horse radish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase |

| | |
|-------------------|--|
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| kDa | Kilodalton |
| LDL | <i>low density lipoprotein</i> , Lipoprotein niedriger Dichte |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| M-CSF | <i>macrophage colony stimulating factor</i> , Makrophagenkolonien-stimulierender Faktor |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| MHC | <i>major histocompatibility complex</i> , <i>Haupthistokompatibilitätskomplex</i> |
| min | Minute |
| MMP | Matrix-Metalloproteinasen |
| MOI | <i>multiplicity of infection</i> |
| MonoMac6 | immortalisierte humane monozytäre Zelllinie |
| mRNA | <i>messenger RNA</i> , Boten-RNA |
| MT-MMP | <i>membrane type-MMPs</i> , membranständige MMPs |
| NaCl | Natriumchlorid |
| nm | Nanometer |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| OD | Optische Dichte |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzsäure |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion |
| PDGF | <i>platelet derived growth factor</i> , Wachstumsfaktor von Thrombozyten abstammend |
| PE | Phycoerythrin |
| pH | <i>potentia Hydrogenii</i> , Kraft des Wasserstoffes |
| PFA | Paraformaldehyd |
| pro-MMP | Vorstufe einer MMP, enzymatisch inaktiv |
| QRT | Quantitative Real-time |
| RIPA | Lysepuffer für Thrombozyten |
| RISC | <i>RNA-induced silencing complex</i> , RNA-induzierter |

| | |
|-------|---|
| RISC | <i>RNA-induced silencing complex</i> , RNA-induzierter hemmender Komplex |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNAi | <i>RNA interference</i> |
| RNP | Ribonukleoprotein |
| rpm | <i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute (Zellmedium) |
| RT | Reverse Transkription |
| SDS | <i>sodium dodecyl sulfat</i> , Natrium- Dodecylsulfat |
| sec | Sekunde |
| siRNA | <i>small interfering RNA</i> |
| SMC | <i>smooth muscle cell</i> , glatte Muskelzelle |
| SSC | <i>side scatter</i> , Seitwärtsstreulicht |
| T | Thymin |
| Taq | <i>Thermus aquaticus</i> |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA Puffer |
| TBE | Tris-Borat-EDTA Puffer |
| TBS | <i>Tris buffered saline</i> , Tris-gepufferte Salzsäure |
| TGF | <i>transforming growth factor</i> , transformierender Wachstumsfaktor |
| TIMP | <i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i> , Inhibitoren der MMPs des Gewebes |
| Tm | <i>melting temperature</i> , Schmelztemperatur |
| TNF | <i>tumor necrosis factor</i> |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| U | <i>units</i> , Einheiten |
| UV | ultraviolett |
| V | Volt |
| VEGF | <i>vascular epidermal growth factor</i> |
| VLE | <i>very low endotoxin</i> , sehr geringer Gehalt an Endotoxin |

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie und Pathogenese der Arteriosklerose

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen in den westlichen Industrienationen die häufigste Todesursache dar (Lusis, A.J. et al. 2000). Zu den wichtigsten Risikofaktoren, die zur Arteriosklerose führen, werden Hypertonie, Diabetes mellitus, Nikotinabusus, Hypercholesterinämien bzw. Hypertriglyceridämien, Adipositas, männliches Geschlecht, Stress und erhöhtes Lebensalter gezählt.

In der Pathogenese der Arteriosklerose unterscheidet man verschiedene Stadien (Stary, H.C. et al. 1995). Die initial auftretende Endothelläsion (Typ I) zieht eine vermehrte Durchlässigkeit für Plasmabestandteile und die Einwanderung von mononukleären Zellen und Ablagerung von Lipiden in die Intima nach sich. Die Monozyten differenzieren zu Makrophagen und bilden mit Endothelzellen aggressive Sauerstoffradikale, welche sich an der Oxidation von Low Density Lipoprotein (LDL) beteiligen. Aufgrund dieser Oxidation ist eine Bindung an die LDL-Rezeptoren nicht mehr möglich. Jedoch wird oxidiertes LDL über Scavenger-Rezeptoren von Makrophagen aufgenommen. Dies hat zur Folge, dass Makrophagen sich in lipidgefüllte Schaumzellen umwandeln. Die Endothelzellen exprimieren vermehrt Adhäsionsmoleküle, wodurch vermehrt Monozyten einwandern. Stickstoffmonoxid (NO) wird durch oxidiertes LDL abgefangen. Die Freisetzung von Zytokinen durch Leukozyten initiiert die Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen in die subendotheliale Schicht. Somit entstehen die makroskopisch sichtbaren „fatty streaks“ (Typ II). Extrazelluläre Lipidablagerungen und Monozyten werden als Präatherom bezeichnet (Typ III). Im Atheromstadium (Typ IV) liegt ein nekrotischer Herd aus Lipiden und Zellresten vor, der auch Lipidkern bezeichnet wird und von einer faser- und zellreichen Deckplatte umgeben wird. Sowohl die Dicke der Deckplatte, als auch die Größe des Lipidkerns sind für die Stabilität der Plaques ausschlaggebend (Stary, H.C. et al. 1995). Durch Degradierung der Schulterbereiche der instabilen Plaques besteht die Gefahr der Ruptur der fibrösen Schutzkappe. Die anschließende Aktivierung der Gerinnung führt zum akuten Gefäßverschluss (Typ V-VI).

1.2 Matrix Metalloproteinasen

Matrix Metalloproteinasen (MMPs) gehören zur Familie zinkabhängiger Endopeptidasen, die durch ihre proteolytische Eigenschaft in der Lage sind, Proteine der extrazellulären Matrix abzubauen. MMPs nehmen somit sowohl bei physiologischen Gewebsumbauvorgängen, wie der Embryonalentwicklung, Wachstum und Wundheilung, als auch bei pathologischen Prozessen, wie Tumorinvasion, Inflammation und Neoangiogenese eine bedeutende Rolle ein (Galis, S.Z. et al. 2002, Nagase, H. et al. 1999, May, A.E. et al. 2005).

1.2.1 Struktur und Funktion der MMPs

Alle MMPs weisen in ihrer Grundstruktur drei konstante Domänen auf. Die katalytische Domäne besteht aus ca. 170 Aminosäuren und enthält eine Zink-Bindungsregion im Bereich des katalytisch aktiven Zentrums (Nagase, H. et al. 1999). Das Zinkion wird komplexiert, indem drei Histidine des langen Proteinanteils mit drei Bindungsstellen des Zinkions interagieren (Lovejoy, B. et al. 1994). Weiterhin sind zur strukturellen Stabilität und Enzymaktivität Calciumionen vorhanden. Ihr Funktionsoptimum liegt im physiologischen pH-Bereich (Nagase, H. 1999, Reynolds, J.J. 1996).

Am aminoterminalen Ende der katalytischen Domäne befindet sich die Pro-Domäne, die zur Aktivierung des Pro-Enzyms (Zymogens) abgespalten wird. Das aus 80 Aminosäuren bestehende Propeptid enthält Cystein, welches die vierte Bindungsstelle am Zinkion besetzt (Becker, J.W. et al. 1995). Die Cystein-Zink Bindung führt zur Verdrängung des zur katalytischen Aktivität notwendigen Wasser (H₂O)-Moleküls. Zusätzlich bewirkt es eine Rückfaltung des Propeptids über die katalytische Domäne, wodurch der Zugang des Substrats in das aktive Zentrum verhindert wird (Springmann, E.B. et al. 1990, van Wart, H.E. et al. 1990).

Allen MMPs ist zusätzlich ein ca. 20 Aminosäuren langes hydrophobes Signalpeptid am aminoterminalen Ende der Pro-Domäne gemeinsam. Das Signalpeptid wird während der Sezernierung in die extrazelluläre Matrix abgespalten. Die sezernierten MMPs sind noch als Pro-Enzyme inaktiv. Außer die zellulär durch Furin aktivierten MMPs (membranständige MMPs, MMP-11, MMP-23, MMP28), werden alle MMPs als Pro-Enzyme in die extrazelluläre Matrix sezerniert (Sato, H. et al. 1996, Kang, T.

et al. 2002). Aus diesen drei Grundbausteinen bestehen die kleinsten MMPs, MMP-7 (Matrilysin) und MMP-26 (Sternlicht, M.D. et al. 2001, Nagase, H. et al. 2006). Alle anderen MMPs besitzen eine weitere Domäne, die dem Protein Hämapexin ähnlich ist. Über eine prolinreiche „Hinge“-Region ist die Hämapexin-Domäne am carboxyterminalen Ende mit der katalytischen Domäne verbunden (Clark, I.M. et al. 1989). Diese Domäne vermittelt die Substratbindung und die spezifische Interaktion mit Gewebsinhibitoren (Murphy, G. et al. 1997). Membranständige MMPs (MT-MMP) weisen carboxyterminal eine hydrophobe Aminosäureabfolge auf, die als Transmembran-Domäne zur Verankerung an der Zellmembran fungiert (Creemers, E.E. et al. 2001, Lijnen, H.R. 2002). Die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 besitzen zusätzlich an der katalytischen Domäne drei kollagenbindende Typ 2 Inserts, die zur Bindung an Gelatin benötigt werden (Abbildung 1).

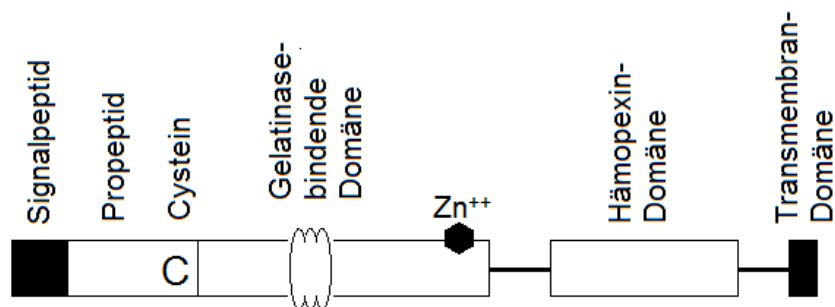


Abbildung 1: Darstellung der Proteinstruktur von MMPs. Nach proteolytischer Abtrennung der Propeptid-Domäne kommt es zu einer Konformationsänderung und somit zur Aktivierung der MMPs. In der katalytischen Domäne befindet sich die Bindungsregion, die dem jeweiligen Substrat spezifisch ist. Die Hämapexin-Domäne vermittelt die Substratbindung und ist an der Inaktivierung des Enzyms beteiligt. (Abbildung nach Creemers, E. et al. 2001)

1.2.2 Einteilung der MMPs

Die derzeit über 20 bekannten MMPs werden entsprechend ihrer Substratspezifität und Struktur in Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, MT-MMPs und andere MMPs unterteilt (Nagase, H. et al. 1999, Visse, R. et al. 2003, Westermarck, J. et al. 1999).

Die Gruppe der Kollagenasen wird aus drei verschiedenen MMPs gebildet (Tabelle 1). Hierbei handelt es sich um MMP-1 (interstielle Kollagenase), MMP-8 (neutrophile Kollagenase) und MMP-13 (Kollagenase-3). Zu ihren gemeinsamen Substraten zählen Kollagen Typ I, II und III (Creemers, E.E. et al. 2001). Sie sind in der Lage die Tripelhelix von nativem Kollagen in zwei Fragmente zu spalten (Krane, S.M. et al. 1996). Anschließend denaturiert das Kollagen bei Körpertemperatur zu Gelatine.

Die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9, auch Gelatinase A und Gelatinase B genannt, können Gelatine weiter abbauen. Durch ihre Bindung an die nicht-tripel-helikalen Bereiche der Kollagene werden sie proteolytisch aktiv (Birkedal-Hansen H et al. 1993, Kähäri VM et al. 1999). So wird Kollagentyp IV, welches einen wichtigen Bestandteil der Basalmembran darstellt, durch MMP-2 und MMP-9 gespalten. Die Migration von Endothelzellen und die Angiogenese werden dadurch gefördert (Creemers, E.E. et al. 2001).

Die Gruppe der Stromelysine wird aus MMP-3, MMP-10 und MMP-11 gebildet. Sie haben ein breites Wirkspektrum gegenüber den Kollagentypen II, IV, IX und X und Strukturproteinen wie Laminin, Fibronectin, Vitronectin und Proteoglykanen (Creemers, E.E. et al. 2001, Westmarck, J. et al. 1999).

Zu den MT-MMPs werden sechs verschiedene MMPs gezählt, MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-24 und MMP-25. Außer dem Abbau von Kollagen, Laminin, Fibronectin und Proteoglykanen sind sie in der Lage die inaktiven Pro-Enzyme proMMP-2 und proMMP-9 zu aktivieren (Pei, D. 1999, Creemers, E.E. et al. 2001).

Weiterhin existieren MMPs, die nicht in die oben aufgeführten Klassen eingruppiert werden können. Hierzu zählen MMP-12 (Metalloelastase) und MMP-7 (Matrilysin).

Tabelle 1: Einteilung der MMPs und ihre Substratspezifität (nach Creemers, E.E. et al. 2001 und Westermarck J. et al. 1999)

| Gruppe | Bezeichnung, Molekülmasse | Substrate |
|-------------------------|----------------------------------|--|
| Kollagenasen | Kollagenase-1 (MMP-1), 55 kDa | Kollagene Typ I, II, VII und X, Gelatin, Enaktin, Aggrekan |
| | Kollagenase-2 (MMP-8), 75 kDa | Kollagene Typ I, II und III, Aggrekan |
| | Kollagenase-3 (MMP-13), 65 kDa | Kollagene Typ I, II und III, Gelatin, Fibronektin, Laminine, Tenascin |
| Gelatinasen | Gelatinase A (MMP-2), 72 kDa | Kollagene Typ I, IV, V, VII und X, Gelatin, Fibronektin, Laminine, Aggrekan, Tenascin C, Vitronektin |
| | Gelatinase B (MMP-9), 92 kDa | Kollagene Typ IV, V und XIV, Gelatin, Aggrekan, Elastin, Entaktin, Vitronektin |
| Stromelysine | Stromelysin-1 (MMP-3), 57 kDa | Kollagene Typ III, IV, IX und X, Gelatin, Tenascin C, Fibronektin, Laminine, Vitronektin |
| | Stromelysin-2 (MMP-10), 57 kDa | Kollagen Typ IV, Fibronektin, Aggrekan |
| | Stromelysin-3 (MMP-11), 55 kDa | Kollagen Typ IV, Fibronektin, Gelatin, Laminine, Aggrekan |
| Membran-assozierte MMPs | MT1-MMP (MMP-14), 66 kDa | Kollagene Typ I, II und III, Fibronektin, Laminine, Proteoglykane, Vitronektin, Aktivierung von pro-MMP-2 und Pro-MMP-13 |
| | MT2-MMP (MMP-15) | Aktivierung von pro-MMP-2 |
| | MT3-MMP (MMP-16) | Aktivierung von pro-MMP-2 |
| Andere MMPs | Matrilysin (MMP-7), 28 kDa | Kollagen Typ IV, Fibronektin, Gelatin, Laminine, Vitronektin, Tenascin C, Elastin, Aggrekan |
| | Metalloelastase (MMP-12), 53 kDa | Elastin |

1.2.3 Regulation der MMP-Synthese und Aktivität

Bei MMPs handelt es sich um potente Enzyme mit einem breiten proteolytischen Wirkspektrum. Der Auf- und Abbau von extrazellulärer Matrix muss streng reguliert werden, um einen geordneten Gewebeumbau zu gewährleisten. Die Fehlregulation von MMPs führt zur unkontrollierten Proteolyse von extrazellulärer Matrix, welche mit vielen Erkrankungen in Verbindung gebracht wird (Chakraborti, S. et al. 2003).

Die Regulation von MMP-Aktivität erfolgt hauptsächlich auf drei unterschiedlichen Ebenen. Zum einen durch die *de novo* Synthese einzelner MMPs mittels Transkription und Translation, zum anderen durch Aktivierung von Pro-Enzymen. Die Inhibition der MMP-Aktivität erfolgt durch spezifische Gewebsinhibitoren (*tissue inhibitors of matrix metalloproteinases*, TIMPs).

1.2.4 Regulation von Transkription und Translation

Die Regulation der MMP-Expression erfolgt zum überwiegenden Teil auf RNA-Ebene. Verschiedene Faktoren lösen die Aktivierung der Transkription aus. So führt die Sezernierung von Zytokinen, Hormonen und Wachstumsfaktoren zu vermehrter MMP-Bildung. Diese Eigenschaft wurde für *epidermal growth factor* (EGF), *vascular epidermal growth factor* (VEGF), *basic fibroblast growth factor* (bFGF), *platelet-derived growth factor* (PDGF), *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), CD 40, Homocystein, Insulin, Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8) beschrieben (Creemers, E.E. et al. 2001, Miyake, H. et al. 1997, Kanno, N. et al. 1998, Lamoreaux, W.J. et al. 1998, Holven, K.B. et al. 2003). Zusätzlich können Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Vitronectin, Elastin und Kollagen die Expression von MMP positiv beeinflussen (Bafetti, L.M. et al. 1998, Haas, T.L. et al. 1998).

In arteriosklerotisch veränderten Gefäßen werden MMPs vermehrt exprimiert. Dies ist auf mechanische Faktoren wie Scherkräfte, hämodynamische Veränderungen und erhöhten transmuralen Druck zurückzuführen (Sho, E. et al. 2002, Li, Y. et al. 2000). Weiterhin wird die MMP-Synthese durch die Freisetzung von NO bei oxidativem Stress und reaktiver Moleküle wie Wasserstoffperoxid (H₂O₂) aus Schaumzellen der arteriosklerotischen Plaques stimuliert (Inoue, N. et al. 2001, Galis, Z.S. et al. 2002).

Auch Mutationen im Promotorbereich können zu veränderter Transkription von MMPs führen (Zhang, B. et al. 1999). Die Hemmung der MMP-Transkription wurde für Kortikosteroide, Heparin, Retinolsäure, Interleukin-4 (IL-4) und Indometazin beschrieben.

In der Neusynthese verschiedener MMPs spielt ebenfalls das zellgebundene Glykoprotein *extracellular matrix metalloproteinase inducer* (EMMPRIN) eine entscheidende Rolle.

1.2.5 Aktivierung von pro-MMPs

Die Aktivierung von pro-MMPs erfolgt auf drei verschiedene Ebenen. Hierzu zählt die Aktivierung im Extrazellulärraum, im Intrazellulärraum und auf der Zelloberfläche durch MT-MMPs.

Mit Ausnahme der MT-MMPs und Stromelysin-3 (MMP-11) werden alle MMPs als inaktive Enzyme in die extrazelluläre Matrix sezerniert. Die enzymatische Aktivität der MMPs wird durch die Bindung von Cystein in der Pro-Domäne mit dem Zinkion im aktiven Zentrum inhibiert. Nach einer Trennung dieser Bindung besetzt ein H₂O-Molekül die Stelle des Cysteins, die vierte Koordinationstelle des Zinkions. Bei diesem Vorgang („Cystein-switch“) wird das Pro-Enzym in eine biologisch wirksame Form überführt. Dieser Schritt wird durch extrazelluläre Proteasen wie Trypsin, Plasmin, Kallikrein, Chymase und Elastatse initiiert (Creemers, E.E. et al. 2001). Anschließend tritt die vollständige Aktivierung durch Abspaltung der Pro-Domäne ein. Dies kann autokatalytisch oder durch andere MMPs erfolgen (Creemers, E.E. et al. 2001). Einzelne MMPs sind in der Lage, sich gegenseitig zu aktivieren. So können MMP-3 und MMP-7 die beiden Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 aktivieren. Die Gelatinasen können sich gegenseitig stimulieren (Sang, Q.X. et al. 1995, Crabbe, T. et al. 1994).

Intrazellulär werden die bereits erwähnten MT-MMPs und MMP-11 aktiviert. Im Gegensatz zu anderen MMPs besitzen sie am Übergang von der Pro-Domäne zur katalytischen Domäne eine Furin-Erkennungssequenz (Pei, D. et al. 2000, Seiki, M. 1999). Diese Aminosäurenabfolge stellt das Substrat für die Protease Furin im Trans-Golgi-Netzwerk dar (Pei, D., Weiss, S.J. 1995, Sato, H. et al. 1996).

Die MMP-Aktivierung an der Zelloberfläche erfolgt durch die MT-MMP. Sie spielen in der Zellmigration eine wichtige Rolle. So aktiviert zum Beispiel MT1-MMP zusammen mit TIMP die pro-MMP-2 und pro-MMP-13 (Jones, C.B. et al. 2003).

1.2.6 Inhibition der MMP-Aktivität

Eine weitere Regulationsebene der MMP-Aktivität stellt die spezifische Hemmung der Proteinase durch endogene Inhibitoren (*tissue inhibitor of metalloproteinase*, TIMP) dar. Es lassen sich vier verschiedene TIMP (TIMP-1, -2, -3, -4) unterscheiden. Aufgebaut sind sie aus zwei Proteindomänen und unterscheiden sich je nach Glykosylierung in ihrer Molekülmasse (zwischen 20-30 kDa) und MMP-Spezifität (Brew, K. et al. 2000, Creemers, E.E. et al. 2001). Sie werden grundsätzlich von Zellen gebildet, die auch MMPs sezernieren (Overall, C.M. 1994).

Die Inhibierung erfolgt analog dem „Cystein-switch“-Mechanismus. Das Zinkion im aktiven Zentrum der katalytischen Domäne wird mit der N-terminalen Aminosäure der TIMPs komplexiert. Somit ist die Bindung eines H₂O-Moleküls an das Zinkion und eine Überführung des Pro-Enzyms in eine biologisch wirksame Form nicht möglich (Tschesche, H. 1998). Gleichzeitig geht der C-terminale Bereich der TIMPs mit der Hämopexin-Domäne der MMPs eine Bindung ein (Kleiner, D.E. Jr et al. 1993). Die TIMPs unterscheiden sich in ihrer Bindungsaffinität zu verschiedenen MMPs (Henriet, P. et al. 1999). Die Regulation der TIMP-Expression erfolgt durch ähnliche Faktoren, die auch die MMP-Synthese stimulieren. Somit beeinflusst die gleichgerichtete Expression eine Minderung der MMP-Aktivität (Creemers, E.E. et al. 2001).

TIMP-1, ein 28 kDa großes, glykosyliertes Protein, wird von Makrophagen und Bindegewebszellen synthetisiert und inhibiert verschiedene MMPs mit Ausnahme von MT1-MMP und MMP-2 (Creemers, E.E. et al. 2001).

TIMP-2 ist ein 21 kDa großes, nicht-glykosyliertes Protein, welches ausgenommen von MMP-9 zahlreiche MMPs inhibiert. Zusätzlich spielen TIMP bei der Aktivierung von MMPs an der Zelloberfläche eine bedeutende Rolle. So bindet es an pro-MMP-2 und rekrutiert es an die Plasmamembran. Anschließend erfolgt die Aktivierung durch MT1-MMP (Strongin, A.Y. et al. 1995). Auf ähnlicher Weise kann TIMP-1 mit pro-MMP-9 einen Komplex bilden und es aktivieren (Brew, K. et al. 2000). TIMP-3 liegt

ausschließlich an die extrazelluläre Matrix gebunden vor, somit wirkt sie lokal inhibierend am Ort der Synthese. Eine Hemmung von MMP-1, -2, -3, -9, -13 und MT1-MMP wurde nachgewiesen. TIMP-4 inhibiert MMP-1, -3, -7 und -9 (Creemers, E.E. et al. 2001). Unabhängig von der MMP-Inhibierung werden weitere Funktionen der TIMP wie die Beteiligung an der Steroidsynthese, Wachstumsfaktoren ähnlichen Wirkung und Hemmung der Angiogenese beschrieben (Hayakawa, T. et al. 1992, Hayakawa, T. et al. 1994, Thorgeirsson, U.P. et al. 1996).

1.3 Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN)

EMMPRIN ist ein hydrophobes transmembranöses Glykoprotein und besteht aus 269 Aminosäuren (Miyachi, T. et al. 1991). Abhängig vom Grad der Glykosylierung besitzt es eine Molekülmasse zwischen 31 und 64 kDa und ist zur Neusynthese bestimmter MMPs, wie MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 und MT1-MMP fähig (Tang, W. et al. 2004, Tang, W., Hemler, M.E. 2004). EMMPRIN wird zur Superfamilie der Immunglobuline gezählt (Biswas, C. et al. 1995). Proteine der Immunglobulin-superfamilie weisen gemeinsame Strukturmerkmale auf, wodurch sie zur Zelloberflächeninteraktion und immunologischen Erkennung befähigt sind. Zu ihnen gehören T-Zellrezeptoren, *major histocompatibility complex* (MHC)-Antigene, Immunglobuline, CD4, CD8 und Zelladhäsionsmoleküle (Guo, H. et al. 1998, Miyachi, T. et al. 1991). EMMPRIN besteht aus zwei extrazellulären Immunglobulindomänen des C2-Typs (Phospholipid-bindend), die 185 Aminosäuren umfasst. Die kurze transmembranäre Domäne und die zytoplasmatische Domäne sind stark konserviert (Abbildung 2). Die glutamin- und leucinreiche Aminosäuresequenz der transmembranären Domäne lässt auf die Wichtigkeit dieser Region schließen (Miyachi, T. et al. 1991, Muramatsu, T., Miyachi, T. 2003, Nabeshima, K.H. et al. 2006). Dies deutet auf die Möglichkeit einer Protein-Protein-Interaktion an der Zellmembran hin (Seulberger, H. et al. 1992, Schuster, V.L. et al. 1996). Die Domänen ähneln den variablen Regionen von Immunglobulinen oder auch der β -Kette des MHC-II-Moleküls (Miyachi, T. et al. 1990, Miyachi, T. et al. 1991, Seulberger, H. et al. 1990, Fossum, S. et al. 1991).

Für die N-terminale Immunglobulindomäne konnten MMP-stimulierende Eigenschaften nachgewiesen werden (Sun, J., Hemler, M.E. 2001). Weiterhin

können EMMPRIN-Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen der N-terminalen Immunglobulin-domäne *cis*-konfigurierte Homo-Oligomere bilden, das sogenannte „EMMPRIN-Clustering“ (Yoshida, S. et al. 2000, Toole, B.P. 2003).

Auf Tumorzellen sind homophile EMMPRIN-EMMPRIN-Wechselwirkungen beschrieben, wodurch die Stimulation von EMMPRIN erfolgt. Somit kann EMMPRIN sowohl als Effektor, als auch Rezeptor fungieren. Die Blockierung dieser homophilen Interaktion führt zur Inhibierung der MMP-Stimulierung und der Reduktion der Tumordinvasion (Sun, J. et al. 2001). Die proteolytische Abspaltung („*shedding*“) des EMMPRIN von der Zelloberfläche durch MMPs oder die Abschnürung von EMMPRIN tragenden Mikrovesikeln und die anschließende Freisetzung von EMMPRIN in die extrazelluläre Matrix, gelten als weitere Aktivierungsmechanismen (Caudroy, S. et al. 1999, Sidhu, S.S. et al. 2004, Haug, C. et al. 2004). Der C-terminale Bereich der extrazellulären Immunglobulin-domäne kann mit Caveolae assoziieren (Tang, W. et al. 2004). Caveolae sind omega-förmige Einstülpungen der Zellmembran. In dessen *lipid rafts*, cholesterinreiche Mikrodomänen in Zellmembranen, ist das essentielle Strukturprotein Caveolin-1 vorhanden, welches mit der zweiten Immunglobulin-domäne von EMMPRIN interagiert. Bei Überexpression von Caveolin-1 kommt es zu einem geringeren EMMPRIN-Clustering und dadurch zur geringeren MMP-1 Expression. Zusätzlich vermindert Caveolin die Glykosylierung der extrazellulären Domäne von EMMPRIN (Tang, W. et al. 2004). Ohne Glykosylierung ist das Protein nicht funktionsfähig (DeCastro, R. et al. 1996). Zudem wurde nachgewiesen, dass das deglykosylierte EMMPRIN die Aktivität des glykosylierten EMMPRIN antagonisiert (Guo, H. et al. 1997, Kanekura, T. et al. 2002). Als weitere Bindungspartner für EMMPRIN wurden das Calcium-bindende Protein Annexin II und Cyclophilin, welches die Vermehrung der T-Zellen hemmt, beschrieben (Toole, B.P. 2003, Yurchenko, V. et al. 2002). Das EMMPRIN-Gen befindet sich auf dem Chromosom 19p3.3. Das Gen enthält sieben Exons und sechs Introns, mit einem Promotor 470 bp 5' *upstream* (-142 bis -112 bp). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass EMMPRIN die Expression seines eigenen Genes induzieren kann. (Liang, L. et al. 2002, Miyauchi, T. et al. 1995, Toole, B.P. 2003, Tang, W. et al. 2004).

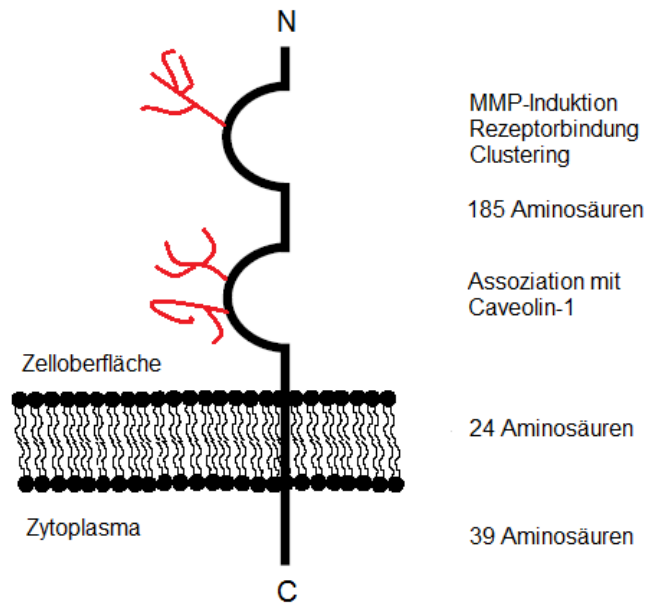


Abbildung 2: Schematische Darstellung des EMMPRIN-Proteins. Das transmembranöse Glykoprotein EMMPRIN besteht aus zwei extrazellulären Immunglobulin-domänen und drei N-gekoppelten Oligosacchariden, sowie einer kurzen transmembranären Domäne und einer zytoplasmatischen Domäne.

(Abbildung nach Muramatus, T., Miyauchi, T. 2003)

2. Problemstellung

Die regulatorische Wirkung von EMMPRIN auf MMPs konnte in der Tumorbio­logie erstmals beschrieben werden und wurde durch die daraus resultierende Degradation extrazellulärer Matrix mit Metastasierungsprozessen in Verbindung gebracht. Bei inflammatorischen Prozessen wie der Pathogenese atherosklerotischer Plaques werden auf mononukleären Zellen vermehrt EMMPRIN nachgewiesen.

Die pathophysiologische Bedeutung von EMMPRIN und der Einfluss von EMMPRIN auf die Aktivierung der MMPs und somit auf die mögliche Entwicklung der Plaqueinstabilität und das Fortschreiten zur Plaqueruptur wiederum durch den Abbau extrazellulärer Bausteine ist bis heute nicht beschrieben.

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte nach *Chlamydia pneumoniae* Infektion von Monozyten eine vermehrte Oberflächenexpression von EMMPRIN und MT1-MMP auf Monozyten mit gesteigerter MMP-9 Sekretion nachgewiesen werden. Weiterhin wurde nach Inkubation der infizierten Monozyten mit glatten Muskelzellen eine vermehrte MMP-2 Sekretion der glatten Muskelzellen beobachtet. Diese Versuchsergebnisse führen zu der Annahme, dass eine EMMPRIN vermittelte MMP-Aktivierung vorliegt.

Ziel dieser Arbeit ist es, erstmals die regulatorische Wirkung von EMMPRIN auf die Aktivierungskaskade von MMPs durch *in vitro* Versuche mit Zellen, die zur Pathogenese der Atherosklerose beitragen, zu untersuchen.

Hierbei sollen folgende wissenschaftlichen Fragestellungen beantwortet werden:

- (1) Welche Bedeutung hat EMMPRIN auf die Aktivierung von MMPs in Monozyten?
- (2) Welche Bedeutung hat EMMPRIN auf die Aktivierung von MMPs in glatten Muskelzellen?
- (3) Lassen sich durch Zellmembran gebundenes EMMPRIN dieselben Wirkungen wie durch azellulär gebundenes EMMPRIN erzielen?

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

| | |
|---|--|
| Begasungsbrutschrank (Hera cell) | Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau |
| BIORAD Gene Pulser | Bio-Rad, München |
| Butterfly Multifly Set | Sarstedt, Nümbrecht |
| CPDA-Monovette-8,5-ml | Sarstedt, Nümbrecht |
| Cellophane, large | Gibco Invitrogen, Karlsruhe |
| ELISA-Lesegerät (Biotrak II) | Amersham Bioscience, Freiburg |
| Heizplatte MR 3001 | Heidolph Instruments, Schwabach |
| FACS-Gerät | FACSCalibur, Beckton-Dickinson, Heidelberg |
| FACS-Röhrchen 5 ml, 12 x 75 mm (Falcon) | Becton-Dickinson, Heidelberg |
| Falcon-Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml) | Becton Dickinson, Heidelberg |
| ImageJ | Public-Domain-Software zur Quantifizierung der optischen Dichte der Zymographie-Gels |
| Lichtmikroskop invers (Axiovert) | Carl Zeiss, Jena |
| Tischzentrifuge (Megafuge) | Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau |
| Neubauer Zählkammer | Brand, Wertheim |
| Novex Mini Cell | Gibco Invitrogen, Karlsruhe |

| | |
|--|--|
| pH-Meter (pH 525) | WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim |
| Pipettierhilfen (1µl, 100µl, 1000µl) | Eppendorf, Hamburg |
| Pipettenspitzen | Eppendorf, Hamburg |
| Protein-A-Säule | Medigenomix, Martinsried |
| Quarzküvette | Hellma, Mühlheim/Baden |
| Real-Time PCR-Gerät (ABI Prism 7700) | PerkinElmer-Applied Biosystems, Foster City (USA) |
| Röntgenfolien Super R/X | FujiFilm Europe, Düsseldorf |
| Spektrometer, GeneQuant pro | Amersham Bioscience, Freiburg |
| RNA/DNA Calculator, Classic | |
| Sysmex KX-21N (Zellenzählgerät) | Sysmex Deutschland, Norderstedt |
| Vakuumpumpe Helmut Saur | Laborbedarf, Reutlingen |
| Vortex-Gerät (Vortex Genie 1) | Scientific Industries, Bohemia (USA) |
| Wellplatten (6-Well, 12-Well, 96-Well) | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Whatman-Filterpapier | Whatman, Maidstone (Vereinigtes Königreich) |
| Zentrifuge für 2ml Gefäße | Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau |
| Zentrifugenröhrchen (12ml, 200ml) | Beckman Coulter, München |

3.1.2 Medien, Lösungen und Puffer

| | |
|--|--|
| Agarose | Carl Roth, Karlsruhe |
| Bovines Serumalbumin (BSA) | Roth, Karlsruhe |
| Cellstar Zellkulturflaschen 50 ml (T25), 250 ml (T75) | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Coomassie Blue | Serva Electrophoresis, Heidelberg |
| DEPC-Wasser | Sigma-Aldrich Chemie, München |
| DNA Leiter | Gibco Invitrogen, Karlsruhe |
| dNTP-Mix | Qiagen, Köln |
| DNA-Polymerase-Mix (Pol-Mix) | F. Hoffmann-La Roche, Basel (Schweiz) |
| <i>Effectene Transfection Reagen Kit</i> | Qiagen, Hilden |
| Ethanol | Roth, Karlsruhe |
| Ethidiumbromid | Carl Roth, Karlsruhe |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA) | Serva Electrophoresis, Heidelberg |
| FACS-Puffer/-Spüllösung | Becton-Dickinson, Heidelberg |
| FCS (fetal calf serum) | Gibco Invitrogen, Karlsruhe |
| Ficoll-Lösung | Amersham Biosciences Europe, Freiburg |
| Gel-Dry Drying Solution | Gibco Invitrogen, Karlsruhe |
| Geneticin | Sigma-Aldrich, München |
| Ham's F12 Medium | Firma Biochrom, Berlin |

| | |
|--|---------------------------------------|
| Kanamycin | Sigma-Aldrich, München |
| Ligationspuffer | Fermentas, St. Leon-Rot |
| Lipofektamin | Life Technologies, Inc., Gaithersburg |
| Lipopolysaccharid (LPS) | Sigma-Aldrich, München |
| Loading Dye Solution (6x) | Fermentas, St. Leon-Rot |
| β-Mercaptoethanol | Carl Roth, Karlsruhe |
| Novex Tris-Glycin SDS Sample Buffer (2x) | Gibco Invitrogen, Karlsruhe |
| Novex Zymogram Developing Buffer | Gibco Invitrogen, Karlsruhe |
| Novex Zymogram (Gelatin) Gel, 10 % | Gibco Invitrogen, Karlsruhe |
| Novex Zymogram Renaturing Buffer | Gibco Invitrogen, Karlsruhe |
| Omniscript Reverse Transkriptase Kit | Quiagen, Köln |
| Omniscript RT | Quiagen, Köln |
| Oligo-dT-Primer | Quiagen, Köln |
| Paraformaldehyd 4 % | Sigma-Aldrich, München |
| PCR Buffer (10x) | Quiagen, Köln |
| PCR-Cycler Mastercycler, | Eppendorf, Hamburg |
| PCR-Reaktionsgefäße | Eppendorf, Hamburg |
| PCR-Öl | Sigma-Aldrich, München |
| Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) | Sigma-Aldrich, München |
| Ponceau S | Sigma-Aldrich, München |
| Protein Assay Reagent A+B | Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA) |

| | |
|----------------------------------|---------------------------------------|
| QIAshredder Säule | Qiagen, Köln |
| Q-Solution (5x) | Qiagen, Köln |
| Random-Hexamer | Gibco Invitrogen, Karlsruhe |
| RLT- Lyse- Puffer | Qiagen, Köln |
| RNAiFect-Transfektionsreagenz | Qiagen, Köln |
| RNAi Starter Kit | Qiagen, Köln |
| RNase freies Wasser | Qiagen, Köln |
| Rnase-Inhibitor | Qiagen, Köln |
| RNeasy Mini-Kit | Qiagen, Köln |
| RNeasy Spin Säule | Qiagen, Köln |
| RPE-Puffer | Qiagen, Köln |
| RT Reaktionspuffer (10x) | Qiagen, Köln |
| RW1-Puffer | Qiagen, Köln |
| SeeBlueR Protein-Standard | Invitrogen, Karlsruhe |
| SDS Page Gelatin Zymography-Kit | Gibco Invitrogen, Karlsruhe |
| SYBR Green PCR Core Reagents Kit | Applied Biosystems, Foster City (USA) |
| Taq PCR Core Kit | Qiagen, Köln |
| TBE-Gel, 6 % | Gibco Invitrogen, Karlsruhe |
| TBE-Puffer (10x) | Gibco Invitrogen, Karlsruhe |
| Tris-Glycin Gel | Gibco Invitrogen, Karlsruhe |
| Tris-Glycin SDS Sample Buffer | Gibco Invitrogen, Karlsruhe |

| | |
|----------------------------------|--------------------------------------|
| Trypanblau-Lösung (0,4 %) | Sigma, Deisenhofen |
| Trypsin/EDTA | Gibco Invitrogen, Karlsruhe |
| T4 DNA-Ligase | Gibco BRL, Karlsruhe |
| VLE-RPMI-1640 | Gibco Invitrogen, Karlsruhe |
| Western Blotting Luminol Reagent | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |

Fixierlösung für gefärbte Zellen (FACS): 0,5 g Paraformaldehyd in 45 ml PBS, bei 65°C lösen und pH auf 7,4 einstellen, steril filtrieren (0,20 µm)

Erythrozytenlysepuffer: 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 500 mM LiCl, 10 mM EDTA (pH 8,0), 1 % LiDS, 5 mM DTT

Ripa-Gebrauchslösung: Ripa-Lyse-Puffer (2,5 ml), destilliertes Wasser (2,5 ml), Aprotinin 1 mg/ml (15µl), PMSF 100 mM (25 µl), Leupeptin 1 mg/ml (1,5 µl)

Ripa-Lyse-Puffer (2x): 1 M Tris pH 7,2 (10 ml), NaCl (9,2 g), EGTA (0,38 g), 20 % Triton-X-100 (50 ml), Na-desoxycholat (10 g), 10 % SDS (10 ml), destilliertes Wasser ad 500 ml

SDS-Lauf-Puffer (Running-Buffer) (10x): Glycin (144 g), Tris Base (30 g), 20 % SDS (50 ml), destilliertes Wasser ad 1 l

TAE-Puffer: 40mM Tris-Acetat, 1mM EDTA, pH 7,5

TBS (10x): Tris HCl (13,2 g), Tris Base (2 g), NaCl (82 g), destilliertes Wasser ad 1 l

| | |
|--|--|
| <u>TBS-T:</u> | TBS 10x (200 ml), Tween 20 (1 ml), destilliertes Wasser ad 2 l |
| <u>LB Medium für E.Coli Bakterien:</u> | 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl, pH7,2 |
| <u>Lämmli-Probenpuffer (3x):</u> | 1 M Tris pH 6,8 (1,25 ml), 20 % SDS (2 ml), Glycerin (2 ml), 2-Mercapto- Ethanol (1 ml), Bromphenolblau (2 Körner), destilliertes Wasser ad 10 ml |
| <u>Restriktionsenzyme:</u> | Promega, Mannheim |
| XhoI/KpnI | |
| PmeI | |
| PacI | |
| KpnI/EcoRV | |
| KpnI/NotI | |
| anti-flag-M2-Antikörper | Sigma-Aldrich, München |

3.1.3 Primer

EMMPRIN-siRNA (Qiagen, Hilden)

Sense: 5'-(CGG CCA UGC UGG UCU GCA A)dTdT- 3'

Antisense: 5'-(UUG CAG ACC AGC AUG GCC G)dTdTTC- 3'

Kontroll-siRNA (Qiagen, Hilden)

Sense: 5'-(UUC UCC GAA CGU GUC ACG U)dTdT-3'

Antisense: 5'-(ACG UGA CAC GUU CGG AGA A)dTdT-3'

EMMPRIN-cDNA (Qiagen, Hilden)

Sense: 5'-GCG GGG GGT ACC ACC ATG GCG GCT GCG CTG TTC GTG-3'

Antisense: 5'-GCG GGG CTC GAG TCA CTT GTC GTC GTC GTC CTT ATA GTC
GGA AGA GTT CCT CTG GCG G-3'

Fc-Fragment (ProCorde/Trigen, Martinsried)

Sense: 5'-GCGGGGGGTACCACCATGGTTCGTCTGCCTCTGC-3'

Antisense: 5'-GCGGGGGCGGCCGCCGGGTGGTTCTGGATGGAC-3'

Extrazelluläre Domäne von EMMPRIN (ProCorde/Trigen, Martinsried)

Sense: 5'- GCGGGGGGTACCACCATGGCGGCTGCGCTGTTTCGTG-3'

Antisense: 5'-GCGGGGGCGGCCGCCGTGGCTGCGCACGCGGAG-3'

EMMPRIN (ProCorde/Trigen, Martinsried)

Sense: 5'-GCTGGTCACCATCATCTTCATCT-3'

Antisense: 5'-CGCTCGTTCATCATCCAGGA-3'

MT1-MMP (MWG Biotech, Ebersberg)

Sense: 5'- GAGGAAGGATGGCAAATTCGT-3'

Antisense: 5'- AGGGACGCCTCATCAAACAC-3'

GAPDH (MWG Biotech, Ebersberg)

Sense: 5'- GAAGGTGAAGGTCGGAGTC- 3'

Antisense: 5'- GAAGATGGTGATGGATTTC- 3'

3.1.4 rekombinante Proteine

EMMPRIN-Fc ProCorde/Trigen, Martinsried

Fc-Fragments ProCorde/Trigen, Martinsried

3.1.5 Zelllinien

| | |
|---|--|
| CHO-Zellen | American Type Culture Collection (ATCC), Bethesda (USA) |
| E.coli Stamm DH5 α | Gibco Invitrogen, Karlsruhe |
| E.coli Stamm (rec.A ⁺) BJ5183 | Stratagene, Amsterdam (Holland) |
| Humane, glatte Gefäßmuskelzellen, SMCs | Clonetics, Cambrex Bio Science, Verviers (Belgien) |
| Humane Nierenzellen QBI-293A | Qbiogene, Heidelberg |
| SMC basal medium Clonetics | Cambrex Bio Science, Verviers (Belgien) |
| Humane Monozyten | gesunde humane Spender |
| MonoMac 6-Zellen | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig |
| Vektor pADeasy-1 (33414 bp) | Stratagene, Amsterdam (Holland) |
| Vektor pADTrack CMV | Qbiogene, Heidelberg |
| Vector pcDNA/Neo | Invitrogen, San Diego (USA) |
| Vector pcDNA5-FRT | Gibco Invitrogen, Karlsruhe |

3.1.6 Antikörper

Primärantikörper

| | |
|---|---|
| Maus Anti-Human EMMPRIN, Klon 1 G6.2 | Chemicon International, Temecula (USA) |
| Maus Anti-Human MT1-MMP, Klon 114-IF2 | Calbiochem, San Diego (USA) |
| Human-Anti EMMPRIN (CD 147), Klon HIM6 | BD Pharmingen, Heidelberg |
| Human-Anti β -Aktin | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| Kaninchen anti Human MMP9, AB 805 | Chemicon, Temecula (USA) |
| Maus-Anti MMP2, IM33L | Calbiochem, Bad Soden |

Sekundärantikörper

| | |
|---|--------------------------------------|
| RPE-konjugiertes Fab2-Fragment vom Kaninchen anti-Maus-Immunglobulin | DAKO, Glostrup (Dänemark) |
| Ziege-Anti Maus IgG HPR konj. 1:2000 | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| Ziege-Anti Kaninchen IgG HPR 1:2000 | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Isolierung peripherer mononuklärer Zellen aus Vollblut

Um in den folgenden Experimenten mononukläre Zellen verwenden zu können, wurden Blutproben von 6 subjektiv gesunden Probanden ohne laufende medikamentöse Therapie verwendet, von diesen waren 2 weiblich und 4 männlich. Der Altersmittelwert betrug 31 Jahre bei einer Standardabweichung von 4 Jahren. Mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation wurden aus dem peripheren Blut mononukläre Zellen von Erythrozyten und Granulozyten getrennt. Nach dem Zentrifugieren befanden sich in der Interphase die mononuklären Zellen, wogegen die Erythrozyten und die Granulozyten pelletierten. Die zellreiche Interphase wurde vorsichtig abgesaugt und nach Vitalfärbung mit Trypanblau die Anzahl der lebenden Zellen ermittelt.

Durchführung:

In ein 50 ml Zentrifugenröhrchen wurden 15 ml Ficoll vorgelegt und anschließend mit 30 ml antikoaguliertem Blut (2,5 g Dextrose, 2,2 g Natriumcitrat, 73 g Zitronensäure pro 100 ml Vollblut), langsam überschichtet. Nach 20 min Zentrifugieren bei 1500 rpm wurde die Interphase entnommen und in einem neuen Zentrifugenröhrchen auf 50 ml mit PBS (pH 7,4) aufgefüllt. Anschließend wurde für 10 min mit 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Falls eine Verunreinigung mit Erythrozyten bestand, wurden 2–10 ml Erythrozytenlysepuffer für ca. 3 min hinzugegeben. Nach erneutem Waschen wurde der Überstand gewonnen, das Sediment resuspendiert und mit PBS auf ca. 2 ml aufgefüllt. Die Lebend-Zellzahl wurde mittels Trypanblau in einer Neubauer Zählkammer ermittelt. Dazu wurden 10 µl Testansatz in einem Well einer 96-Well Rundbodenplatte mit 10 µl Trypanblau gemischt und in die Zählkammer gefüllt. Die nicht angefärbten Zellen wurden gezählt.

Gesamtzahl = Zellzahl in Kammer x Volumen (ml) im Tube x 2×10^4

Die Eigenschaft der Monozyten, durch Pseudopodienbildung an Plastikoberfläche zu adhären, wurde bei der Selektion aus den gewonnenen Zellen genutzt. Die mononuklären Zellen ($0,5 \times 10^6$ Zellen/ml) wurden mit VLE-RPMI-1640, welches zu 10 % low-tox Kälberserum enthält, in Kulturflaschen überführt und für 24 std. bei

37°C inkubiert. Danach wurden die nicht adhärenen Zellen (Lymphozyten) durch vorsichtiges waschen entfernt. Die übrig gebliebenen adhärenen Zellen wurden mit 5 %igem EDTA vom Flaschenboden gelöst und nach erneutem Waschen in Monozytenmedium VLE-RPMI-1640 aufgenommen. Durchflußzytometrisch konnte für diese Methode ein >90 %iger Gehalt an CD-14- positiven Monozyten nachgewiesen werden.

3.2.2 Kultivierung von MonoMac6-Zellen

Zusätzlich wurden humane MonoMac6-Zellen verwendet. Diese immortalisierte humane Monozyten Zelllinie besitzt sowohl phänotypisch als auch funktionell die Eigenschaften reifer Monozyten (Löms Ziegler-Heitbrock, H.W. et al. 1988). Humane MonoMac6-Zellen wurden in VLE-RPMI-1640, das 10 %iges low-tox FCS enthält, kultiviert. Die MonoMac6 Zellen wurden zum Nachweis der MMP-9 Aktivität nach Zellkontakt mit EMMPRIN genutzt.

Für einen weiteren Versuch wurden MonoMac6 Zellen mit EMMPRIN-Adenovirus transfiziert. Die erfolgreiche Transfektion wurde mittels Western-Blot nachgewiesen. Zur Nachweis von EMMPRIN assoziierten MMP-2 Sekretion aus den glatten Muskelzellen wurden die erfolgreich transfizierten EMMPRIN überexprimierenden MonoMac6 Zellen mit 4 %igem Paraformaldehyd fixiert. Nach mehrmaligem Waschen der Zellen ($2,5 \times 10^6$ /Well) mit PBS wurden diese mit kultivierten glatten Muskelzellen für 12 h koinkubiert. Als Positivkontrolle wurden die glatten Muskelzellen nur mit Lipopolysaccharid (LPS, 100 ng/ml) stimuliert. Anschließend erfolgte die Untersuchung der gewonnenen Zellüberstände mittels Gelatin-Zymographie.

3.2.3 Smooth muscle cells (SMC)

Glatte Muskelzellen aus menschlichen Koronararterien wurden im SMC-Basalmedium kultiviert und nach 2 bis 5 Passagen für die Versuche benutzt.

3.2.4 Proteinnachweis

3.2.4.1 Solubilisierung von Proteinen aus Zellen

Bei der Isolierung von Proteinen, die sich sowohl im Zytosol als auch auf der Membran der Zelle befinden, wurde wie folgt vorgegangen.

Durchführung:

Sämtliche Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt, um die Proteasenaktivität gering zu halten. Die zu lysierenden Zellen wurden in 200 µl RIPA-Gebrauchslösung aufgenommen und für 30 min inkubiert. Durch die RIPA-Gebrauchslösung erfolgt auch die Solubilisierung von Membranproteinen. Anschließend wurde das Gemisch bei 4°C für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Im Überstand befinden sich die gesuchten Proteine. Die Konzentrationsbestimmung wurde mit dem Proteinassay-Farbreakanz von Bio-Rad durchgeführt. Zur Doppelbestimmung wurden jeweils 5 µl der Proben in eine 96-Loch-Platte gegeben. Als Standardlösung wurde Bovines Serumalbumin (BSA) mit unterschiedlicher Konzentration verwendet. Die Proben werden nach Zugabe von Bio-Rad Probenreagenz A (25µl) und B (200µ) für 15 min im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wird die Extinktion der Proben bei 595 nm bestimmt und mit den BSA-Standardreihen verglichen.

3.2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophores (SDS-PAGE)

Die SDS-Gelelektrophorese ist eine Methode, um Proteine in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe zu sortieren. Hierzu wird als Trennmedium ein Polyacrylamidgel verwendet, das zusätzlich mit dem amphiphilen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) zum Einsatz kommt. Zuerst müssen die Proteine in eine lineare Form gebracht werden, damit Faltungen und Strukturen nicht das Wanderungsverhalten der Proteine beeinflussen. Dies wird durch Hitze und dem Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol erreicht. Anschließend binden SDS-Moleküle proportional zur Proteingröße an das Protein und bilden eine negative Hülle. Diese wandern in der Elektrophorese zur Anode hin und werden ihrer Größe nach getrennt. Anschließend erfolgt die Visualisierung durch Färben mit Ponceau S oder Coomassie Blue.

Durchführung:

Die SDS-PAGE wurde mit Novex Mini-Cell Kammer durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden die Proben 1:3 mit 3x SDS-Probenpuffer verdünnt und für 7 min bei 95°C im Heizblock denaturiert. Im Anschluss wurden die Proben (25 µl) und der Größenmarker See-Blue R in die Taschen des 10 %igen Tris-Glycin-Gels gegeben. Nach Auffüllen der Gelkammer mit dem SDS-Running-Buffer wurde die elektrophoretische Auftrennung mit einer Spannung von 120 V für 120 min bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.2.4.3 Western Blot

Der Western Blot ist eine sensitive Methode zur Detektion und Quantifizierung von spezifischen Proteinen in einem Proteingemisch. Zunächst wird durch die SDS-Page-Gelelektrophorese eine Trennung der Proteine entsprechend ihrer Molekülmasse durchgeführt. Anschließend werden diese auf eine Membran aus Nitrozellulose transferiert. Dazu wird ein senkrecht zum Polyacrylamidgel gerichtetes elektronisches Feld angelegt. Die Proteine wandern aus dem Gel an die Membran und bleiben aufgrund hydrophober Wechselwirkungen auf der Oberfläche haften. Nach auswaschen von SDS renaturieren die Proteine und nehmen wieder ihre Sekundär- und Tertiärstruktur ein. Der erfolgreiche Transfer der Proteine lässt sich durch Färben mit unspezifischen Farbstoffen wie mit dem Ponceau S darstellen. Um die spezifischen Proteine über eine Immunodetektion nachweisen zu können, müssen alle freien Bindungsstellen auf der Membran blockiert werden. Dazu wird ein für den Antikörper nicht erkennbares Protein wie Milchpulver oder BSA verwendet. Anschließend wird die Membran mit einem antigenspezifischen Primärantikörper behandelt. Nach mehreren Waschschrritten werden schwache oder ungebundene Antikörper entfernt. Dem folgt eine Inkubation mit einem Sekundärantikörper, der spezifisch gegen den Primärantikörper ist. An das Ende des zweiten Antikörpers ist das Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt, welches die Umsetzung von Luminol katalysiert. Die dabei frei werdende Lumineszenz wird auf einem Röntgenfilm festgehalten.

Die Western Blot Methode wurde zur Kontrolle der erfolgreichen Transfektion von CHO-Zellen mit EMMPRIN und der MonoMac6 Zellen mit EMMPRIN-Adenovirus angewendet. Weiterhin wurde quantitativ die Sekretion von MMPs bestimmt.

Durchführung:

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die Gelkassette vorsichtig geöffnet. Während der Vorbereitung des Transfers äquilibrierte das Gel in einer Schale mit Transferpuffer. Zwei Whatman-Filterpapiere wurden entsprechend der Gelgröße zurechtgeschnitten und zusammen mit der Nitrozellulosemembran in den Transferpuffer gelegt.

Das Gel wurde für 120 min bei 30 V geblottet. Zum Nachweis des erfolgreichen Transfers wurde die Membran mit Ponceau S gefärbt. Nach Abwaschen des Farbstoffs mit PBS erfolgte die Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran. Dazu wurde die Membran für 30 min in TBS-T mit 1 % BSA geschwenkt. Die Inkubation mit dem ersten Antiserum (1:2500 Verdünnung in TBS-T) erfolgte über Nacht bei 4°C.

Nach dreimaligem Waschen in TBS-T für je 10 min wird der ungebundene Antikörper entfernt. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (1:5000 Verdünnung in TBS-T) für 1 h bei Raumtemperatur. Nach den 3 Waschschritten mit TBS-T je für 10 min und zwei kurzen Waschvorgängen mit TBS wird die Membran mit dem Luminolreagenz für 2 min inkubiert. Nach Entfernen der Lösung wird die Nitrozellulose mit zwei Röntgenfilmen bedeckt und in die Röntgenkassette gelegt. Die Entwicklungszeit richtet sich nach der Intensität des Antikörpers. Dieser kann zwischen 10 min bis mehrere Stunden betragen.

3.2.4.4 Zymographie

Inaktive Enzymvorstufen werden als Zymogen bezeichnet. Erst durch chemische Verbindungen oder durch das Enzym selbst werden sie in die aktive Form umgewandelt. Die SDS-Page Zymographie ermöglicht die elektrophoretische Trennung von Proteinen. Bei der Zymographie wird dem Gel zur Bestimmung von MMPs als Substrat Gelatine zugesetzt. Nach Auftrennung der Proteine erfolgt die

Renaturierung und Inkubation bei 37°C. Hierbei wird das Gelatin im Gel durch die Gelatinasen MMP-2 (~72 kDa) und MMP-9 (~92 kDa) abgebaut. Aus dem Umfang des abgebauten Gelatins lässt sich eine quantitative Aussage über die Proteaseaktivität machen. Anschließend wird das Gel mit Coomassie Blue gefärbt. Dadurch erfolgt eine Negativ-Darstellung, da sich das Gelatin und nicht die enzymatisch abgebauten Areale färben lassen.

Die Zymographie wurde zur Messung der sezernierten MMP-9 Aktivität aus den Monozyten und sezernierten MMP-2 Aktivität aus den glatten Muskelzellen durchgeführt.

Durchführung

Für die SDS-Page Zymographie wurde ein Kit der Firma Invitrogen verwendet. In gleichen Anteilen werden 10 µl Zellkulturüberstände mit 10 µl SDS-Probenpuffer verdünnt. Nach einer 10 min Inkubation bei Raumtemperatur sind die Proteasen reversibel denaturiert. Anschließend wird die mit einem 10 %igen Gelatingel bestückte Novex-Mini-Cell mit gekühltem SDS-Laufpuffer gefüllt. Die Geltaschen werden mit 10 µl Probengemisch gefüllt und als Leiter wird SeeBlue Plus 2 verwendet. Die Elektrophorese wird im Kühlschrank (4°C) bei 125 V für 2 h durchgeführt. Danach wird das Gel in eine Schale mit Renaturierungspuffer überführt und für 30 min unter permanentem Schwenken inkubiert. Die Proteasen kehren in ihre ursprüngliche aktive Form zurück. In einer Schale mit dem Entwicklungspuffer wird das Gel für weitere 24 h bei 37°C unter permanentem Schwenken inkubiert. Am folgenden Tag wird das Gel für 30 min in verdünnter Coomassie Blue Lösung gefärbt und mit destilliertem Wasser gewaschen. Unter Zugabe von Drying Solution wird das Gel zwischen zwei Cellophan Folien verpackt und getrocknet.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Isolierung der Gesamt-RNA

Bei der Isolierung von RNA muss mit größter Sorgfalt gearbeitet werden, um eine Kontamination mit RNAsen oder DNAsen zu vermeiden. Diese werden nach Degradierung von Zellen aus natürlichen Quellen wie Haut und Bakterien freigesetzt.

Durch ihre hohe Hitzestabilität und Unempfindlichkeit gegenüber pH-Wertveränderungen sind RNAsen fast an allen Oberflächen vorhanden. Die RNA-Isolierung aus der Zelle erfolgte mit RNAeasy Mini Kit. Hierbei wird die Guanidiniumisothiocyanat (GTC) Methode (Chomczynski, P., Sacchi, N. 1987) angewendet, bei der die RNase der Zelle effektiv mit der proteindenaturierenden Wirkung von GTC inhibiert wird.

Durchführung:

Bis zu 5×10^6 Zellen werden in 350 μ l RLT-Lyse-Puffer mit 1 %igem β -Mercaptoethanol aufgenommen und lysiert. Das Lysat wird auf eine QIAshredder Säule gegeben und für 2 min bei Raumtemperatur mit 13000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wird mit 350 μ l 70 %igem Ethanol vermischt und in der RNeasy Spin Säule für 15 sec bei 10000 rpm zentrifugiert. Dadurch wird die Gesamt-RNA an die Membran der Säule gebunden. 700 μ l RW1 Puffer wird auf die Säule gegeben und für weitere 15 sec bei 10000 rpm zentrifugiert. Nach Setzen der Säule auf ein neues Eppendorf-Gefäß wird mit 500 μ l RPE für 15 sec bei 10000 rpm gewaschen. Dieser Waschvorgang wird nochmal wiederholt, jedoch wird für 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Frei von Begleitsubstanzen wird die RNA von der Membran mit 35 μ l RNase freiem Wasser in ein frisches Eppendorf-Gefäß durch einminütiges Zentrifugieren bei 14000 rpm eluiert.

Die Konzentrations- und die Reinheitsbestimmung der RNA erfolgt mit einem UV-Spektralphotometer. In einer Quarzküvette wird die optische Dichte (OD) bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Der OD_{260} -Wert ermöglicht die Berechnung der Konzentration. Ein Absorbationswert von 1,0 entspricht einer Konzentration von 40 μ g/ml RNA. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} gibt Auskunft über den Reinheitsgrad und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

3.3.2 Reverse Transkription (RT-PCR, cDNA Synthese)

Bei der Reversen Transkription erfolgt die Umschreibung einer RNA-Sequenz mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RNA abhängige DNA-Polymerase) in eine complementary DNA (cDNA). Dieser dient als Ausgangsmaterial für die PCR. Bei der Synthese der cDNA wird neben dem Enzym ein Primer benötigt, der an die RNA

hybridisiert und somit den Startpunkt darstellt. Es können sowohl Oligo-dT-Primer, die aus 16-20 Thymidinen bestehen und an den Poly-A-Schwanz von RNA binden, verwendet werden, als auch zufällige Hexamerprimer aus 6 Basenpaare (Random Hexamers). Nach Transkription durch Anlagerung der komplementären Basen und Abspaltung entstehen einzelsträngige cDNA.

Durchführung:

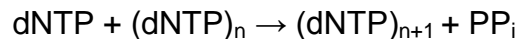
Nach Bestimmung der RNA Konzentration werden zur cDNA Herstellung Omniscript™ RT Kit, Random-Hexamer (0,1 mM) und Rnase-Inhibitor (10 units/µl) benötigt. Die isolierte RNA wird für 5 min bei 65°C denaturiert. Anschließend wird mit RNase freiem Wasser 1 µg RNA auf ein Volumen von 14 µl ergänzt. Dieser wird mit 6 µl Mastermix, welches aus 2 µl 10x RT-Puffer, 2 µl dNTP-Mix, 1 µl Oligo-dT-Primer, 1 µl Random-Hexamer, 1 µl Rnase-Inhibitor, 1 µl Omniscript RT besteht, vermischt und für 60 min bei 37°C inkubiert. Die gewonnene cDNA kann bei -20°C gelagert werden.

3.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.3.3.1 Konventionelle Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR ist eine *in vitro* Technik zur gezielten Amplifikation einer bestimmten DNA-Region. Hierbei wird die in der Zelle erfolgende DNA-Replikation simuliert (Mullis, K.B. et al. 1987). Für die Reaktion wird das Template-DNA bzw. die cDNA als Vorlage für die komplementär einzubauenden Nukleotide benötigt. Der Einbau von Nukleotiden erfolgt durch die Taq Polymerase, welche von dem hitzestabilen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert wurde. Die thermostabile DNA abhängige DNA-Polymerase spaltet den Nukleotidtriphosphaten Pyrophosphat ab, wodurch Energie freigesetzt wird. Diese wird für die Veresterung von frei stehenden 3'Hydroxylenden mit den einzubauenden Desoxynukleotidmonophosphaten gebraucht. Da keine *de novo* Synthese erfolgen kann, müssen zwei Oligonukleotidprimer hinzugegeben werden. Nach Binden an den komplementären Bereich der Template-DNA erfolgt die Polymerisation von Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTPs) im dazwischen liegenden Bereich. Das

Einbauen der dNTPs erfolgt wie bereits oben erwähnt durch die Taq Polymerase nach der folgenden Reaktionsgleichung:



Im Hinblick auf die Enzymaktivität wird ein geeignetes Puffersystem gewählt um den pH-Wert im Reaktionssatz optimal einzustellen (pH-Optimum: 8,8).

Ein zyklischer Ablauf der Reaktionen, der zu einer exponentiellen Amplifikation der Ausgangs-DNA führt, erfolgt in drei Schritten:

1. Denaturierung: Die DNA wird durch Erhitzen (90°C-94°C) denaturiert. Dabei werden die Doppelstränge entwunden und gespalten.
2. Annealing: In diesem Schritt wird durch Senken der Temperatur (50°C-65°C) die Bindung der Oligonukleotidprimer an den zu vervielfältigenden komplementären DNA-Bereich erreicht. Die genaue Annealingtemperatur (Schmelztemperatur, T_m) wird aus der Länge und dem Verhältnis (G+C) : (A+T) der Primersequenz ermittelt.

$$T_m = [(\text{Anzahl von A+T}) \times 2^\circ\text{C} + (\text{Anzahl von G+C}) \times 4^\circ\text{C}]$$

3. Extension: Beim Temperaturoptimum der Taq Polymerase (72°C) erfolgt die Polymerisation zwischen den Primern, wobei ein komplementärer Strang zum Original-DNA gebildet wird.

Bei der konventionellen PCR handelt es sich um eine Methode zur exponentiellen Vermehrung von DNA. So lassen sich rein rechnerisch nach 30 Zyklen 10^9 Kopien erstellen. Jedoch sind zu Beginn der Amplifikation Primer und DNA-Polymerasen in Überfluss vorhanden. Aufgrund der kleinen eingesetzten Templatmenge (Ausgangs-DNA) ist die Wahrscheinlichkeit für ein Zusammentreffen mit Primer und Polymerase suboptimal. Somit ist in der primären Phase die Amplifikation des Templates begrenzt. In der zweiten Phase kommt es zu einem exponentiellen Anstieg des PCR-Produktes bis zu einer Produktmenge von 10^{-8}M und geht in eine lineare Phase mit bis 10^{-7}M über. Sowohl die Renaturierung der PCR-Produkte mit zusätzlichem Primer-Verbrauch als auch die Bildung von Nebenprodukten wie Pyrophosphat und Monophosphatnukleotide führen dazu, dass die DNA-Menge in der dritten Phase gegen ein Plateau konvergiert.

3.3.3.2 Quantitative Real-time Polymerase-Kettenreaktion (QRT-PCR)

Die QRT-PCR ist ein modernes Verfahren zur Quantifizierung der Genexpression. Die DNA-Menge wird über den gesamten Verlauf der Amplifikation nach jedem einzelnen Zyklus bestimmt. Zur Visualisierung des entstehenden Amplifikons wird der Farbstoff SYBR Green verwendet, der in den kleinen Windungen (*minor grooves*) der doppelsträngigen DNA interkaliert. Hierbei handelt es sich um ein nichtspezifisches Detektionssystem, das eine Anregungswellenlänge von 497 nm und eine Emissionswellenlänge von 520 nm besitzt. Der Anstieg des Fluoreszenzsignals ist proportional zum Anstieg der Konzentration der entstandenen Amplifikate. Mit zunehmender Akkumulation des PCR Produktes nimmt die Fluoreszenz des Farbstoffes zu. Die Kombination zweier Geräte in einem System (Systeme Abi Prism 7700) ermöglicht zum einen die Durchführung der eigentlichen PCR im Thermocycler und zum anderen erfolgt die Registrierung der Fluoreszenz mit einer CCD-Kamera. Die exponentielle Zunahme der Kopien wird in einer graphischen Auswertung dargestellt, woraus sich der *cycle threshold* (C_T)-Wert ermitteln lässt. Dieser gibt eine Zyklenzahl an und stellt den niedrigsten messbaren positiven Wert einer quantitativen Real-time PCR dar. Sie steht in direkter Beziehung mit der eingesetzten Ausgangsmenge an DNA und wird zur Quantifizierung einer Reaktion benutzt.

Durchführung:

Die QRT-PCR wird mit einem SYBR Green Core Reagents Kit der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Um das Auftreten unspezifischer Amplifikationen zu verringern, wird die Polymerase AmpliTaq-Gold („*hot start*“) verwendet. EMMPRIN, MT1-MMP und das „*housekeeping gene*“ Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) werden zur endogenen Kontrolle jeweils zweifach bestimmt. Der Reaktionsansatz wird aus 5 µl 10x PCR-Puffer, welches bereits den fluoreszierenden Farbstoff erhält, 6 µl $MgCl_2$ (25 mM), 4 µl dNTP Mix (25 mM) 0,25 µl AmpliTaq-Gold (5 U/µl), 0,5 µl AmpErase (1 U/µl), 1,5 µl Forward Primer, 1,5 µl Reverse Primer, 1,5 µl cDNA und 32,25 µl DEPC- H_2O hergestellt. Der PCR-Zyklus besteht aus 10-minütiger Initialdenaturierung bei 95°C, gefolgt von 40 Zyklen 15 sec Denaturierung „*melting*“ bei 95°C, einem 30 sec „*annealing*“ bei 62°C und 30 sec Extension bei 72°C. Anschließend werden die PCR-Produkte bei 4°C aufbewahrt.

Tabelle 2: Verwendete Primer

| Produkt | Forward primers (5'-3') | Reverse primers (5'-3'9 |
|---------|-------------------------|-------------------------|
| EMMPRIN | GCTGGTCACCATCATCTTCATCT | CGCTCGTTCATCATCCAGGA |
| MT1-MMP | GAGGAAGGATGGCAAATTCGT | AGGGACGCCTCATCAAACAC |
| GAPDH | GAAGGTGAAGGTCGGAGTC | GAAGATGGTGATGGGATTTC |

3.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die horizontale Gelelektrophorese ist eine Standardmethode zur Auftrennung der Nukleinsäuremoleküle nach ihrem Molekulargewicht. Durch die negative Ladung der Phosphatgruppen wandern diese im elektrischen Feld zur Anode. Die Agarosekonzentration des Gels bestimmt die Größe der Moleküle, die sich dadurch auftrennen lassen. So lassen sich in hochprozentigen Agarose-Gelen kleinere Fragmente besser trennen und umgekehrt in niederprozentigen Agarose-Gelen große Fragmente. Erst nach Zugabe von Ethidiumbromidlösung bei der Aufbereitung des Gels können die DNA-Banden sichtbar gemacht werden. Ethidiumbromid interkaliert in die Doppelstränge der DNA und fluoresziert auf dem UV-Transluminator. Mit einer Polaroid-Kamera werden die Ergebnisse dokumentiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Gelelektrophorese sowohl als präparatives, als auch als analytisches Werkzeug eingesetzt.

Durchführung:

Die Analysen erfolgen in 0,8 %igen bis 1,5 %igen Agarose-Gelen. Für die gewünschte Agarosekonzentration wird die nötige Menge des Agarosepulvers in einem Erlenmeyerkolben gewogen und das entsprechende Volumen an 1x TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 7,5) hinzugegeben. In der Mikrowelle wird dieser aufgekocht bis sich die Agarose in Lösung gebracht hat. Anschließend wird die Agaroselösung auf 60°C abgekühlt und mit 2 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml)/50 ml versetzt. Anschließend wird es auf einen Gelträger mit einem Kamm gegossen. Nach Erstarren des Gels wird der Kamm vorsichtig entfernt. Das Gel wird

in die Elektrophorese-Kammer überführt und mit 1x TAE-Puffer bis zum Überschichten des Gels aufgefüllt. Die DNA-Proben werden mit 2 µl Gelbeladungspuffer (0,25 % Bromphenolblau, 15 % Ficoll 400) vermischt und in die Taschen des Gels aufgetragen. Zur Bestimmung der Länge der Fragmente wird ein DNA-Längenstandard pipettiert. Die Elektrophorese wird je nach gewünschter Auftrennung bei 80-100 mV für 1,5 bis 3 h durchgeführt. Auf dem UV-Transluminator ($\lambda=302$ nm) werden die DNA-Banden sichtbar gemacht und dokumentiert.

Die unter 3.3.1 bis 3.3.4 aufgeführten Methoden wurden bei unterschiedlichen Versuchen mit verschiedenen Fragestellungen durchgeführt.

3.3.5 Zell-Zell Adhäsion

Zur Untersuchung der EMMPRIN vermittelten MMP-9 Aktivität aus den Monozyten werden EMMPRIN transfizierte- und nicht transfizierte CHO-Zellen auf 6-Well Platten kultiviert. Anschließend mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und dreimal mit Phosphat gepufferter salzhaltiger Lösung gewaschen. Die isolierten humanen Monozyten (1×10^6 pro Well) können sich mit den fixierten CHO-Zellen adhären. Nach 12 h hat man die Überschüsse geerntet und in der Gelzymografie die MMP-9 Aktivität ermittelt.

Um in einem weiteren Experiment die EMMPRIN vermittelte MMP-2 Aktivität der SMCs zu ermitteln, werden MonoMac6 Zellen mit einer steigenden Menge an EMMPRIN-Vektoren aus Adenoviren infiziert (in aufsteigender Konzentration MOI 0, 10, 50). Die erfolgreiche Überexpression von EMMPRIN wird durch Western Blot und RT-PCR bestätigt. Die EMMPRIN überproduzierenden monozytären Zellen werden mit 4 % Paraformaldehyd fixiert gewaschen. Anschließend erfolgt eine Koinkubation mit kultivierten SMCs. Nach 12 h werden die Zellüberschüsse geerntet um in der Gelzymographie MMP-2 Aktivität auf zu zeigen.

3.3.6 Zelladhäsion an das rekombinante EMMPRIN-Fc-Fusionsprotein

Die funktionelle Relevanz von EMMPRIN wird in einem isolierten azellulären System untersucht. Aus dem Vollblut isolierten Monozyten adhären an die immobilen, azellulären EMMPRIN-Fc-Fusionsproteinen (5 µg/ml) und an die Negativkontrolle

den Fc-Fragmenten der humanen Immunglobuline G (2 µg/ml) für 12 h. Die MMP-9 Aktivität wird im Überstand mittels Gelzymographie nachgewiesen.

Zum Ausschluss einer MT1-MMP vermittelten MMP-9 Aktivierung werden humane MonoMac6 Zellen mit dem EMMPRIN-Fc-Fusionsproteinen (5 µg/ml) mit und ohne blockierenden monoklonalen MT1-MMP für 24 h koinkubiert. Als Negativkontrolle erfolgt die Inkubation mit dem Fc-Fragment des humanen Immunglobulins G (2 µg/ml). Die Proteinmenge von MMP-9 im Zellüberstand wird in der Western Blot Methode untersucht.

Zum Nachweis einer vermehrten MMP2 Sekretion aus den glatten Muskelzellen durch MT1-MMP wird der folgende Versuch durchgeführt. Die SMCs adhären an die EMMPRIN-Fc-Fusionsproteine (5 µg/ml) oder an Fc-Fragmente der humanen Immunglobuline G (2 µg/ml) mit und ohne einem blockierenden monoklonalen Antikörper Anti-MT1-MMP (5 µg/ml). Nach 24 h wird durch Western Blot der Zellüberstand auf die Proteinmenge von MMP-2 hin untersucht.

3.4 Weitere Methoden

Folgende Methoden wurden durch Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe und durch externe Labore durchgeführt. Die Produkte dieser Untersuchungen wurden in den oben beschriebenen Versuchsdurchführungen angewendet. Zur Transparenz der vorliegenden Arbeit werden diese, nicht selbst durchgeführten Methoden im Folgenden aufgeführt. Die Herstellung der EMMPRIN überexprimierenden Monozyten und die Herstellung des rekombinanten EMMPRIN-Fc sowie die Herstellung der EMMPRIN exprimierenden CHO Zellen erfolgte in Kooperation mit der Fa. Procorde/Trigen, Martinsried.

3.4.1 EMMPRIN transfizierte CHO-Zellen

CHO-Zellen wurden stabil mit EMMPRIN transfiziert, um Zellmembran gebundenes EMMPRIN zu erhalten.

Durchführung:

EMMPRIN cDNA wurde in den Expressionsvektor pcDNA/Neo subkloniert. Die Aufreinigung erfolgte durch CsCl₂ Gradientenzentrifugation und Phenol/Chloroform Extraktion. Die CHO-Zellen wurden in Kulturflaschen aufgenommen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Erreichen einer 50-70 %igen Konfluenz der Zellen in der Kulturflasche, erfolgte die Transfektion in 5 ml serumfreiem Ham F12 Medium mit Lipofektamin-DNA Komplex. Dieser besteht aus 10 µl Lipofektamin und 10 µg DNA mit oder ohne EMMPRIN Sequenz. Nach 6 h Inkubation bei 37°C wurde 5 ml 20 % FCS haltiges Medium hinzugegeben und für weitere 72 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA abgelöst und in 400 mg/l Geneticin enthaltendem Medium für die nächsten 2-3 Wochen weiterkultiviert. Die erfolgreiche Transfektion wurde durch Real-Time PCR und Western Blot bestätigt. Zum Nachweis, dass zellmembrangebundenes EMMPRIN die MMP-Aktivität in Monozyten induziert, wurden die transfizierten und nichttransfizierten (Negativkontrolle) CHO-Zellen in einer 6-Well Platte ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit 4 %igem Paraformaldehyd fixiert und PBS gewaschen.

Die isolierten humanen Monozyten (10⁶ Zellen/Well) wurden mit den fixierten EMMPRIN tragenden und nicht EMMPRIN tragenden CHO-Zellen für 12 h koinkubiert. Die Zellüberstände wurden mittels SDS-Page-Gelatin-Zymografie auf Gelatinasen untersucht.

3.4.2 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Die Durchflusszytometrie ermöglicht eine schnelle, objektive Analyse und Auftrennung von Zellpopulationen. Das Messprinzip beruht auf der simultanen Analyse der unterschiedlichen Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner Zellen. Ursprünglich wurde diese Methode in der Immunologie-Forschung angewendet.

Im Fluorescence-Activated Cell Sorter (FACS) Gerät liegt ein ständiger Fluss einer Trägerflüssigkeit („*sheath fluid*“) vor. Die zu messende Zellsuspension wird aus dem FACS-Röhrchen in Überdruck angesaugt und gelangt in eine Messküvette. Von der Trägersubstanz umgeben und beschleunigt, gelangen die Zellen in der Suspension

zur Messkammer des Gerätes (hydrodynamische Fokussierung). Alle Zellen erreichen in Perlenkettenanordnung einzeln die Messkammer, dessen Durchmesser 120 µm misst und werden mit monochromatischem Laserlicht (Argonlaser) angeleuchtet. Abhängig von der Größe, der Oberflächenbeschaffenheit und Kompartimentierung der Zelle wird das auftreffende Licht gestreut. Anhand des im spitzen Winkel (3-10°) gestreuten Lichtes, welches als Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FCS) bezeichnet wird erhält man Informationen über die Größe der Zellen. Die Granularität der Zellen wird durch die im 90° reflektierten Seitwärtssträulicht (*side scatter*, SCC) gemessen. Weiterhin können die Oberflächenmoleküle mit Hilfe von gebundener Antikörper-Fluorochrom-Konjugate spezifisch nachgewiesen und quantifiziert werden. Dabei handelt es sich um monoklonale Antikörper, die mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert sind. Die Energie des Lichtes wird im charakteristischen Wellenlängenbereich für das Fluoreszenzmolekül absorbiert. Somit werden Elektronen in ein höheres Energieniveau angehoben. Beim Rückgang ins ursprüngliche Energieniveau geben diese Photonen ab und es kommt zur Emission von Fluoreszenzen. Zu den gebräuchlichsten Fluorochromen gehören Fluorescein-Isothiocyanat (FITC; grünes Emissionslicht, 515-545 nm) und Phycoerythrin (PE; orange/rotes Emissionslicht, 564-606 nm).

In unseren Versuchen wurde die Durchflusszytometrie in der Bestimmung der Zelloberflächenexpression von EMMPRIN und MT1-MMP auf Monozyten angewendet.

Durchführung:

Bei den Versuchen wurden die monoklonalen Primärantikörper CD147 (EMMPRIN), anti-Human und MT1-MMP anti-Human verwendet.

10⁶ Zellen oder Zellüberstände wurden für 30 min auf Eis mit adäquat verdünntem Antikörper (10 µl/ml) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit kaltem PBS wurden die Primärantikörper mit einem fluoreszierendem Zweitantikörper detektiert. Die Inkubation der Zellen erfolgte für weitere 30 min auf Eis und im Dunkeln. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in 200 µl PBS/1 % PFA fixiert. Die Analyse der gefärbten Zellen erfolgte am FACScan und zur Auswertung wurde das Software Cellquest Version 3.1f verwendet.

3.4.3 Short interfering (si) RNA-Technologie

Die siRNA-Technologie ist eine Methode, bei der gezielt einzelne Gene auf posttranskriptioneller Ebene inhibiert werden. Da keine kommerziell erhältlichen, EMMPRIN blockierende Antikörper vorhanden waren, haben wir uns der siRNA-Methode bedient. SiRNAs sind 21-25 bp lang und weitgehend doppelsträngig. Die gentechnisch hergestellten siRNAs werden liposomal in die Zellen transfiziert. Im Zytosol inkorporiert die siRNA mit einem Multi-Enzykomplex, der als *RNA induced silencing complex* (RISC) bezeichnet wird. Anschließend erfolgt eine Adenosintriphosphat (ATP) abhängige Entwindung des siRNAs, wobei ein Strang (*guide-RNA*) mit dem RISC assoziiert bleibt. Der *guide*-Strang des Ribonukleoproteinkomplexes (RNP-Komplex) erkennt das Ziel mRNA und hybridisiert. Folglich wird innerhalb des Hybrids die mRNA durch die Endonuklease Slicer hydrolysiert. Die in kleine Teilstücke gespaltene mRNA wird im Zytosol durch unspezifische Nukleasen abgebaut. Der RNP-Komplex bleibt unbeeinträchtigt und geht weitere mRNA Degradierungen ein. Die Transfektionseffizienz beträgt ca. 80-90 %, wodurch eine Inhibierung des Zielgens um ca. 50-60 % erreicht wurde.

Im Rahmen der Dissertation ist die siRNA-Technologie angewendet worden, da keine kommerziell erhältlichen EMMPRIN blockierenden Antikörper vorhanden waren.

Durchführung:

Das Gene Silencing in Monozyten wurde mit dem RNAi Starter Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Die isolierten Monozyten werden gewaschen und in das Kulturmedium VLE RPMI 1640 + 10 % FCS aufgenommen. Auf eine Konzentration von 10^6 Zellen/ml gebracht werden sie über Nacht in T25 Falschen bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag werden die Monozyten mit 1 µg EMMPRIN-siRNA (20µmol/l) und 6 µl RNAiFect Puffer für 24 h inkubiert. Folgende EMMPRIN-RNA-Duplexe werden verwendet: Sense; 5'-(CGG CCA UGC UGG UCU GCA A)dTdT- 3', Antisense: 5'-(UUG CAG ACC AGC AUG GCC G)dTdT- 3'. Als Kontrolle werden unspezifische siRNAs benutzt. Die erfolgreiche Suppression von EMMPRIN auf der Zelloberfläche wird kontinuierlich durch FACS Analysen bestätigt.

Zum Nachweis der EMMPRIN assoziierten Regulation von MT1-MMP wurden unbehandelte isolierte humane Monozyten und EMMPRIN-siRNA behandelt. Nach 48 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 12 h mit Lipopolysaccharid (LPS, 100ng/ml) stimuliert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zelloberflächenexpression von EMMPRIN und MT1-MMP mittels der Durchflußzytometrie. Auf die Stimulierung der unbehandelten Monozyten mit Lipopolysaccharid reagierten diese mit vermehrter EMMPRIN Oberflächenexpression. Nach Behandeln mit EMMPRIN-siRNA verringerte sich die EMMPRIN Expression auf der Zelloberfläche der Monozyten um ca. 50 % im Vergleich zu Zellen die mit Kontroll-siRNA behandelt wurden. Weiterhin wurde aus der FACS-Analyse ersichtlich

3.4.4 Enzymatischer DNA-Verdau mit Restriktionendonukleasen

Bei Restriktionendonukleasen Typ-II handelt es sich um bakterielle Enzyme, die Phosphoesterasebindungen in der DNA spalten können. Für jedes dieser Enzyme gibt es einen bestimmten pallindromischen Sequenzabschnitt (ca. 4 bis 6 bp), an der die DNA gespalten/geschnitten wird. Dabei können glatte (*blunt ends*) oder klebrige (*sticky ends*) überstehende Enden entstehen. In dieser Arbeit wurden Restriktionendonukleasen eingesetzt um den für die Klonierungsschritte nötigen Verdau von Plasmid-DNA und cDNA durchzuführen.

Durchführung:

Die DNA-Lösung wird mit 2 µl 10 x Reaktionspuffer in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert. Dadurch erfolgt eine pH-Werteinstellung, welches für eine optimale Enzymaktivität benötigt wird.

Entsprechende *Units* an Restriktionsenzymen (mindestens 1 U pro 1 µg DNA) werden hinzugegeben und mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt. Anschließend wird die Mischung für 2 h bei 37°C inkubiert.

3.4.5 Ligation

Die Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit Vektormolekülen bei der Klonierung erfolgt durch Verwenden von T4 DNA-Ligase. Dieser katalysiert unter ATP Abspaltung die Veresterung zwischen den 3' Hydrox- und 5' Phosphatenden zweier DNA-Fragmente.

Durchführung:

Zur Ligation wurde ein Protokoll von Sambrook verwendet (Sambrook, J. et al. 1989). In einem Volumen von 10 µl werden 1 µl des DNA-Fragments (50 µg/µl) und 1 µl des Vektors (250 ng/µl) mit 1 µl Ligationspuffer und 0,5 µl (200 U) Ligase 24 h bei Raumtemperatur inkubiert.

3.4.6 Klonieren von EMMPRIN

Durchführung:

Die cDNA von EMMPRIN wurde aus einer humanen „*heart cDNA Library*“ mittels PCR amplifiziert. Hierzu wurden als Vorwärtsprimer 5'-gcggggggtaccacatggcggctgctgctgtcgtg-3' und Rückwärtsprimer 5'-gcggggctcgagtcactgtcgtcgtcgtccttatagtcggaagagttcctctggcgg-3' verwendet. Nach 24 Zyklen, bei einer Annealing Temperatur von 56°C werden die PCR-Produkte und die als Transfervektor eingesetzten Plasmid-DNA pADTrack CMV einem enzymatischem Verdau mit den Restriktionsendonukleasen XhoI/KpnI ausgesetzt. Nach der Ligation mit der T4-Ligase wurde die Integrität von EMMPRIN cDNA im geklonten Plasmid pADTrack CMV EMMPRIN durch Sequenzierung nachgewiesen. Die Expression von EMMPRIN wurde durch Western Blot mittels peroxidasekonjugiertem anti-flag-M2-Antikörper kontrolliert.

3.4.7 Herstellen von Adenoviren

Für weitere Untersuchungen wurden EMMPRIN überexprimierende Monozyten durch adenoviralen Gentransfer hergestellt. Die Adenoviren sind in der Lage,

eukaryontische Zellen zu infizieren, wobei die epichromosomal gelegene DNA der Viren zur Produktion eigener Proteine genutzt wird.

Durchführung:

Für Generierung wird der zuvor hergestellte Transvektor pADTrack CMV EMMPRIN verwendet. Der Vektor vermittelt Kanamycinresistenz. Nach enzymatischer Spaltung und Linearisierung des Vektors mit PmeI wird 1 µg pADTrack CMV EMMPRIN zusammen mit 1 µg pADeasy-1 Vektor in das elektrokompetente E.coli BJ5183 Bakterium bei 2500 V, 200 Ohm und 25 µl FD kotransformiert. Bis auf die deletierten *Early 1* (E1) und *Early 3* (E3) Sequenzen weist das Adenovirusplasmid pADeasy-1 alle nötigen adenoviralen Sequenzen auf. Nach homologer Rekombination entsteht der pADeasy1-EMMPRIN-Vektor. Die Bakterien werden mit 500 µl LB Medium für 30 min bei 37°C und 600 rpm inkubiert. Anschließend werden 100 µl hiervon auf Agarplatten mit 50 µg/ml Kanamycin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Generierung funktionsfähiger Adenoviren wird der hergestellte pADeasy1-EMMPRIN-Vektor mit dem Enzym PacI linearisiert und in QBI-293A Zellen mit „*Effectene Transfection Reagent*“ der Firma Qiagen transfiziert. Durch QBI 293A Zellen werden die E1 und E3 Gene des Adenovirus ergänzt, wodurch ein infektiöses EMMPRIN-Adenovirus entstehen kann. Für die Plaqueselektion der rekombinanten mit Virus infizierten QBI 293A Zellen wurden diese mit dem Nährmedium bedeckt, welches 0,5 % Agarose enthält (1:1 Mix des modifizierten Eagles Medium 2x; Gibco Lifetechnologies, zusätzlich mit 20 % Serum, 2x Penicillin/Streptomycin, 2x L-Glutamin und 1 % Agarose in 1 % Wasser). 7 Tage nach der Transfektion werden die QBI 293A Zellen von der Zellkulturschale abgenommen und in PBS aufgenommen in ein 50 ml Falconröhrchen überführt. Durch dreimaliges Schockgefrieren in Flüssigstickstoff und erneutem Auftauen bei 37°C werden die Zellen lysiert. Nach der Zentrifugation des Lysats bei 3400 rpm werden die im Überstand vorhandenen rekombinanten Viren für die Infektion von DH5α-Zellen verwendet. Die DH5α-Zellen enthalten den recA/endA-strain, wodurch sich die Amplifikation der EMMPRIN-Adenoviren in großen Mengen erreichen lässt.

3.4.8 Herstellung von chimeren Fc-EMMPRIN Fusionsprotein

Um im Rahmen dieser Arbeit die Auswirkungen von EMMPRIN in einem isolierten azellulären System untersuchen zu können wurde ein rekombinantes FC-EMMPRIN Fusionsprotein hergestellt. Als Negativkontrolle diente ein FC-Fragment.

Durchführung:

In einer PCR erfolgt zunächst die Herstellung extrazellulärer Domänen von EMMPRIN. Hierzu werden die Vorwärtsprimer 5'-gcgggggtaccaccatggcggctgcgctgttcgtg-3' und Rückwärtsprimer 5'-gcgggggcggcccgctggctgcgcacgcggag-3' verwendet. Der zuvor hergestellte pADTrack CMV EMMPRIN Vektor dient dabei als Template. Die Durchführung der PCR erfolgt in 24 Zyklen bei einer Annealing Temperatur von 56°C. Nach der Amplifikation wird die EMMPRIN-Sequenz herausgeschnitten. Als nächstes erfolgt die Klonierung des optimierten CHO-FC-Fragments in das Plasmid pcDNA5-FRT mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen KpnI/EcoRV. In das entstandene pcDNA-FRT FC opt-Vektor wird im Anschluss mit den Enzymen KpnI/NotI die EMMPRIN-Sequenz subkloniert. Der hergestellte Vektor „pcDNA-FRT EMMPRIN Fc opt“ wird durch Sequenzierung kontrolliert und die Expression im Western blot nachgewiesen. Eingeschleust in die CHO-Zellen wird das Fusionprotein EMMPRIN-Fc, von diesen exprimiert, welches über die Protein-A-Säule aufgereinigt wird. Als Negativkontrolle zu den durchgeführten Versuchen wird ein FC-Fragment verwendet. Die Sequenz für die Herstellung wird aus einer humanen „*heart cDNA Library*“ der Firma Clontech bezogen. Folgende Vorwärtsprimer 5'-gcgggggtaccaccatggctcgtctgcctctgc-3' und Rückwärtsprimer 5'-gcgggggcggcccggtgttctggatggac-3' werden verwendet. Anschließend werden die Amplifikate mittels der Enzyme KpnI und NotI in das pcDNA-FRT Fc Vektor ligiert. Die erfolgreiche Durchführung wird durch Sequenzierung und Western Blot überprüft.

4. Ergebnisse

In früheren Experimenten unserer Arbeitsgruppe konnte *in vivo* nach einem akuten Herzinfarkt eine vermehrte Oberflächenexpression von EMMPRIN und MT1-MMP auf Monozyten nachgewiesen werden. Weiterhin wurde festgestellt, dass die verstärkte EMMPRIN Bildung mit vermehrter MT1-MMP-Expression auf der Zelloberfläche und vermehrter MMP-9-Aktivität im Plasma einhergeht. So führte dies zu der Annahme, dass die erhöhte zelluläre Expression von EMMPRIN möglicherweise die MMP-Sekretion und Aktivität der Monozyten reguliert.

4.1 Zellmembran gebundenes EMMPRIN induziert die MMP-9-Aktivität in Monozyten

Um die These, dass Zellmembran gebundenes EMMPRIN die MMP-9-Aktivität in Monozyten induziert, untersuchen zu können, wurden die aus dem Vollblut isolierten Monozyten mit EMMPRIN transfizierten CHO-Zellen koinkubiert.

Zunächst wurden CHO-Zellen mit EMMPRIN transfiziert. Die infizierten CHO-Zellen zeigten in der quantitativen Real-time PCR eine gesteigerte mRNA-Expression für EMMPRIN (Abbildung 3A). Weiterhin wurde die erfolgreiche Transfektion auf Proteinebene durch Western Blot bestätigt. Als Standard wurde die Expression von β -Aktin gemessen (Abbildung 3B). Nach Zellkontakt zwischen EMMPRIN tragenden CHO-Zellen und Monozyten wurde in den Zellüberständen durch die SDS-Page-Gelatin-Zymographie eine gesteigerte monozytäre Aktivität der Gelatinase MMP-9 nachgewiesen (Abbildung 3C).

Diese Beobachtung weist darauf hin, dass an Zellmembran gebundenes EMMPRIN im Rahmen zellulärer Wechselwirkungen mit Monozyten, eine vermehrte MMP-9 Sekretion induzieren kann.

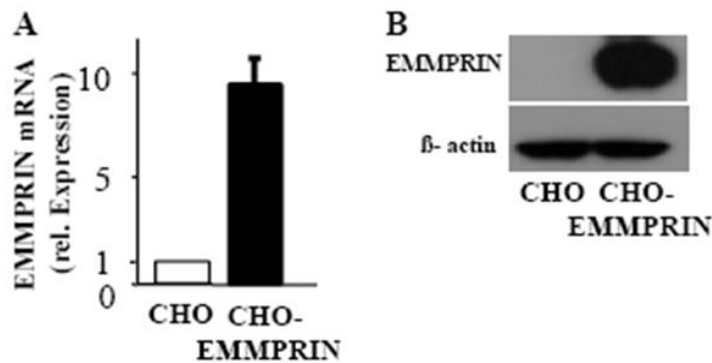


Abbildung 3 A: mRNA Expression von EMMPRIN infizierten Monozyten im Vergleich zu nicht-infizierten Monozyten gemessen mit der real-time PCR. **B:** Nachweis von EMMPRIN-Protein (58 kDa) mittels Western-Analyse bei infizierten Monozyten. Das Strukturprotein β -Aktin (45 kDa) dient zur Kontrolle der erfolgreich durchgeführten Western-Analyse. In Abbildung A wurde der Durchschnittswert aus drei unabhängigen Einzelversuchen zusammengefasst (\pm Standardabweichung). (Abbildung aus Schmidt, R. et al. Circulation 2006)

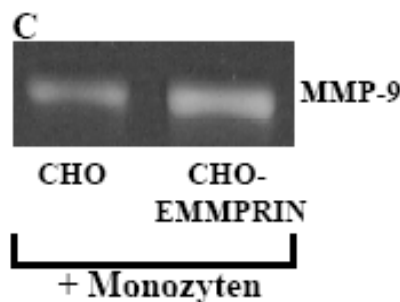


Abbildung 3 C: MMP-9 Sekretion der Monozyten nach Zellkontakt mit CHO- und CHO-EMMPRIN-Zellen. Die Zellüberstände wurden nach 12 h Inkubation in der SDS-Page-Gelatin-Zymographie untersucht. Durch die Adhäsion der Monozyten an das Membrangebundene EMMPRIN kommt es zu einer gesteigerten MMP-9 Aktivität. Abgebildet ist ein repräsentativer Versuch aus drei unabhängigen Versuchen. (Abbildung aus Schmidt, R. et al. Circulation 2006)

4.2 Immobilisiertes rekombinantes Fc-EMMPRIN induziert die MMP-9 Expression in Monozyten

Um die funktionelle Relevanz von EMMPRIN in einem isolierten azellulären System untersuchen zu können wurde das rekombinante Fc-EMMPRIN-Fusionsprotein hergestellt. Dieser wurden für 12 h mit isolierten humanen Monozyten inkubiert. Anschließend erfolgte die Untersuchung der Überstände mittels Gelatin-Zymographie. Die Inkubation der Monozyten mit Fc-EMMPRIN zeigte, im Gegensatz zur Negativkontrolle dem Fc-Fragment, eine deutlich gesteigerte MMP-9 Aktivität auf. Dies lässt darauf schließen, dass EMMPRIN zu einer vermehrten MMP-9 Sekretion der Monozyten führt (Abbildung 3 D).

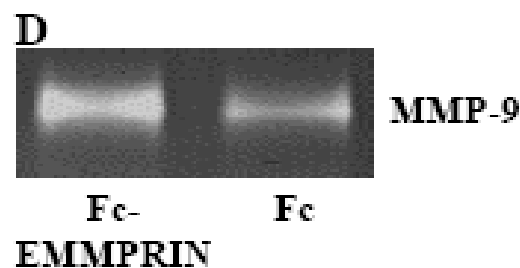


Abbildung 3 D: Die Adhäsion isolierter Monozyten an das rekombinante Fc-EMMPRIN führt zu einer vermehrten MMP-9 Stimulation der Zellen durch EMMPRIN. In der Negativkontrolle, wird durch das Fehlen von EMMPRIN eine geringe MMP-9 Aktivität verzeichnet. Die Abgebildete Gelatin-Zymographie ist ein repräsentativer Versuch aus drei unabhängigen Versuchen. (Abbildung aus Schmidt, R. et al. Circulation 2006)

4.3 MT1-MMP hat keinen wesentlichen Einfluss auf die EMMPRIN vermittelte MMP-9 Aktivität der Monozyten

In früheren *in vivo* Experimenten unserer Arbeitsgruppe konnte nach akutem Myokardinfarkt EMMPRIN assoziierte MMP-9 Aktivierung und vermehrte MT1-MMP Expression auf der Zelloberfläche von Monozyten verzeichnet werden. Um eine zusätzliche Wirkung des MT1-MMPs bei der vermehrten MMP-9 Ausschüttung auszuschließen, adhärten in einem weiteren Versuch humane MonoMac6 Zellen an das Fc-Fragment oder an das rekombinante Fc-EMMPRIN, mit und ohne einem blockierenden monoklonalem MT1-MMP-Antikörper. Die nach 24 h gewonnenen Zellüberstände wurden nach der Western-Analyse untersucht. In der quantitativen Proteinanalyse von MMP-9 durch Western Blot konnte wie aus den vorherigen Versuchen eine vermehrte MMP-9 Sekretion durch EMMPRIN nachgewiesen werden. Eine Blockierung von MT1-MMP mit antihumanem MT1-MMP-Antikörper wies keine wesentliche Veränderung in der Ausschüttung von MMP-9 auf (Abbildung 3 E). Zusammengefasst stellt dieses Experiment die vorherrschende Wirkung von EMMPRIN auf die Ausschüttung von MMP-9 aus den Monozyten dar.

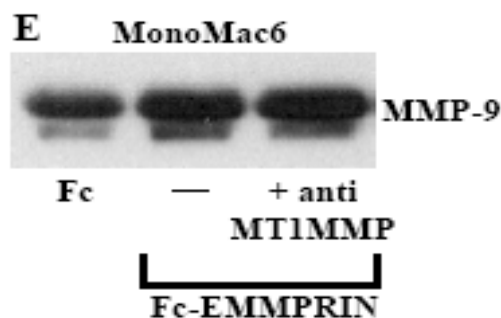


Abbildung 3 E: Das Fc-Fragment des humanen IgG (2µg/ml) oder Fc-EMMPRIN (5µg/ml) mit und ohne einem blockierenden monoklonalen MT1-MMP Antikörper (5µg/ml) wurde für 24 h mit humanen MonoMac6 Zellen koinkubiert. Im Western Blot wurde die Proteinmenge von MMP-9 bestimmt. Die Blockierung des Membranproteins MT1-MMP hat keinen wesentlichen Einfluss auf die Aktivität von MMP-9. Abgebildet ist ein repräsentativer Western Blot von drei unabhängigen Versuchen. (Abbildung aus Schmidt, R. et al. Circulation 2006)

4.4 Auf Monozyten exprimiertes EMMPRIN induziert nach Zell/Zellkontakt die MMP-2 Sekretion in glatten Muskelzellen

Die fibröse Schutzkappe der arteriosklerotischen Plaques wird durch verschiedene Proteasen degradiert. Hierzu gehören vorwiegend die von Monozyten sezernierten MMPs. Zusätzlich werden innerhalb der atherosklerotischen Plaques MMP-2 vorgefunden, die von glatten Muskelzellen sezerniert werden. Aufgrund dessen untersuchten wir die MMP-2 Sekretion glatter Muskelzellen nach zellulärem Kontakt mit EMMPRIN exprimierenden Monozyten.

Zunächst wurden humane MonoMac6 Zellen mit EMMPRIN-Adenovirus in steigenden Mengen transfiziert. Die unterschiedlich starke EMMPRIN-Expression wurde durch Western Blot bestätigt (Abbildung 4 A).

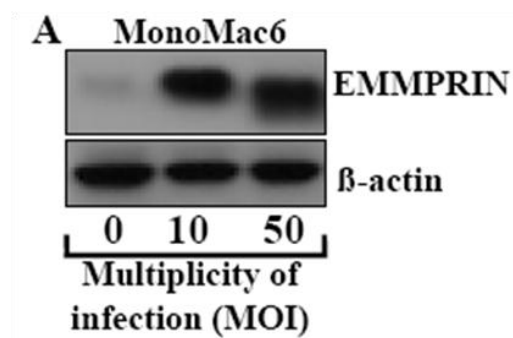


Abbildung 4 A: Western-Analyse der humanen MonoMac6 Zellen nach Infektion mit ansteigenden Dosen (*multiplicity of infection*, MOI) eines EMMPRIN-Adenovirus. Mit steigender Infektionsdosis erhöht sich die Expressionsrate von EMMPRIN auf der Oberfläche von MonoMac6 Zellen. Zur Kontrolle des erfolgreich durchgeführten Western Blots wird das Strukturprotein β -Aktin (45 kDa) mitbestimmt. (Abbildung aus Schmidt, R. et al. Circulation 2006)

Anschließend erfolgte die Untersuchung der gewonnenen Zellüberstände mittels Gelatin-Zymographie. Eine vermehrte MT1-MMP Expression auf der Zelloberfläche der glatten Muskelzellen konnte nach Zellkontakt mit EMMPRIN überexprimierenden MonoMac6 Zellen festgestellt werden. Weiterhin ist eine Korrelation zwischen EMMPRIN Expression auf MonoMac6 Zellen und MMP-2 Sekretion der glatten

Muskelzellen zu verzeichnen. Die MMP-2 Sekretion der SMCs nach zellulärem Kontakt mit EMMPRIN-Überexprimierenden MonoMac6 Zellen waren vergleichbar mit dem Verhalten der Lipopolysaccharid stimulierten SMCs, die als Positivkontrolle dienten (Abbildung 4 B).

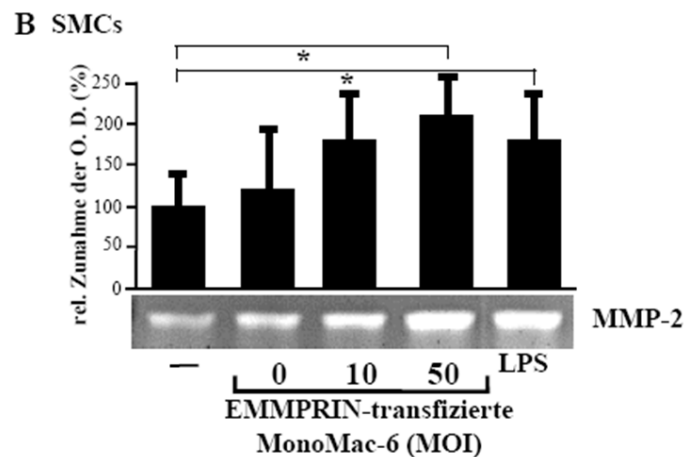


Abbildung 4 B: In aufsteigenden Mengen (MOI 0, 10, 50) mit EMMPRIN infizierte MonoMac6 Zellen ($2,5 \times 10^6$ /Well) wurden mit humanen glatten Muskelzellen (SMC) für 24 h koinkubiert. Als Positivkontrolle wurden die SMCs mit Lipopolysaccharid (LPS, 100 ng/ml) stimuliert. Nach Zellkontakt der EMMPRIN überexprimierenden MonoMac6 Zellen mit SMCs führte zur einer vermehrten MMP-2 Sekretion aus den glatten Muskelzellen. Abgebildet ist eine repräsentative Gelatin-Zymographie aus fünf unabhängigen Versuchen. (Abbildung aus Schmidt, R. et al. Circulation 2006)

4.5 Der substantielle Effekt von MT1-MMP auf MMP-2 Sekretion glatter Muskelzellen

Die aus dem vorausgehenden Experiment gewonnene Erkenntnis, dass nach Stimulierung von glatten Muskelzellen mit EMMPRIN vermehrt MMP-2 sekretiert und MT1-MMP auf der Zelloberfläche exprimiert wird, veranlasste uns zu weiteren Nachforschungen. Um einen Effekt der MT1-MMP bei der vermehrten Ausschüttung von MMP-2 zu untersuchen, wurde diese mit einem monoklonalen MT1-MMP-Antikörper blockiert. Die glatten Muskelzellen adhärten an das Fc-Fragment oder

an das rekombinante Fc-EMMPRIN mit und ohne einem blockierenden monoklonalen MT1-MMP-Antikörper. Die nach 24 h gewonnenen Zellüberstände wurden nach der Western-Methode untersucht. Wie bei den vorherigen Versuchen konnte eine vermehrte MMP-2 Sekretion der SMCs durch EMMPRIN nachgewiesen werden. Die Blockierung von MT1-MMP mit monoklonalen Antikörper führte zur verminderten MMP-2 Sekretion der SMCs (Abbildung 4C).

Zusammengefasst stellen diese Daten, die Fähigkeit von EMMPRIN dar, sowohl auf Monozyten als auch auf glatten Muskelzellen MMPs zu aktivieren.

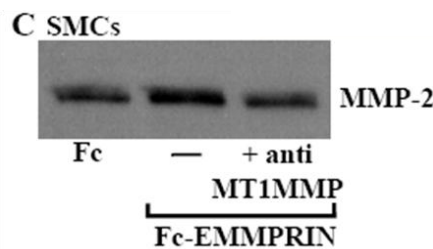


Abbildung 4 C: Verminderte MMP-2 Aktivität nach Blockieren von MT1-MMP durch humane monoklonale Antikörper. Glatte Muskelzellen wurden mit Fc-Fragment (2 µg/ml), Fc-EMMPRIN (5 µg/ml) mit und ohne einen blockierenden monoklonalen MT1-MMP-Antikörper (5 µg/ml) für 24 h kokubiert. Die Zellüberstände wurden im Western Blot untersucht. (Abbildung aus Schmidt, R. et al. Circulation 2006)

4.6 EMMPRIN wird zur Regulation von MMP-9 bei Monozyten benötigt

Die gewonnenen Erkenntnisse aus den vorausgegangenen Versuchen veranlasste uns zu weiteren Experimenten, um die potentielle Relevanz von EMMPRIN bei der Aktivierung von MMPs bei Monozyten näher untersuchen zu können. Da keine kommerziell erhältlichen EMMPRIN blockierenden Antikörper vorhanden waren, haben wir uns der siRNA-Methode „*gene silencing*“ bedient. Hierbei wurde auf posttranskriptionaler Ebene die EMMPRIN Expression auf Monozyten inhibiert. Zunächst wurde ein Teil der isolierten humanen Monozyten unbehandelt und der andere Teil mit Kontroll-siRNA bzw. EMMPRIN-siRNA vorbehandelt (Abbildung 5A). Auf die Stimulierung der unbehandelten Monozyten mit Lipopolysaccharid reagierten diese mit vermehrter EMMPRIN Oberflächenexpression. Nach Behandeln mit

EMMPRIN-siRNA verringerte sich die EMMPRIN Expression auf der Zelloberfläche der Monozyten um ca. 50 % im Vergleich zu Zellen die mit Kontroll-siRNA behandelt wurden. Dies wurde durchflusszytometrisch bestätigt.

Die Zellüberstände aus dem vorhergehenden Versuch wurden zusätzlich auf MMP-9 Aktivitäten der Monozyten untersucht. Dies erfolgte mittels der Gelatin-Zymographie und des Western Blots. Mit EMMPRIN siRNA vorbehandelten Monozyten zeigten trotz der LPS-Stimulierung eine verminderte MMP-9 Sekretion. Wogegen auf den LPS-Stimulus die unbehandelten und mit Kontroll siRNA vorbehandelten Monozyten mit vermehrten MMP-9 Aktivitäten reagierten (Abbildung 5 B,C).

Zusammenfassend lassen diese Daten auf die funktionelle Rolle von EMMPRIN in der Regulation von MMP-9 bei Monozyten schließen.

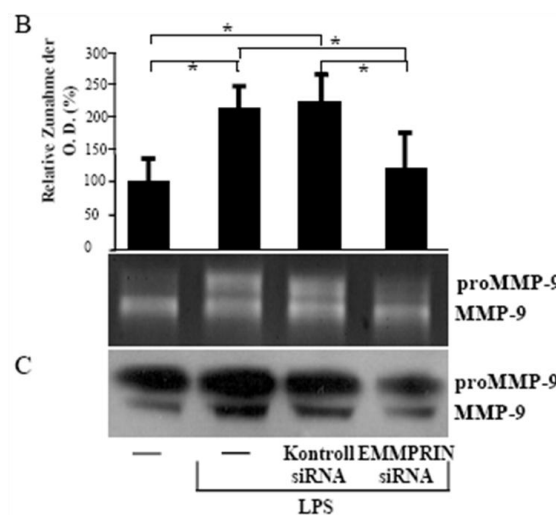


Abbildung 5 B,C: Isolierte humane Monozyten wurden unbehandelt oder mit Kontroll siRNA und EMMPRIN siRNA (1µg SiRNA / 6µl RNAifect) behandelt. In beiden Methoden ließen sich nach der LPS-Stimulierung der unbehandelten und mit Kontroll siRNA behandelten Monozyten eine vermehrte MMP-9 Aktivität nachweisen. Durch Inhibierung von EMMPRIN mit spezifischer EMMPRIN siRNA verringerte sich die MMP-9 Aktivität in den Monozyten. Abgebildet ist eine repräsentative Gelatin-Zymographie von fünf und ein repräsentativer Western Blot von vier unabhängigen Versuchen. (Abbildung aus Schmidt, R. et al. Circulation 2006)

5. Diskussion

Kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Hypertonie, Diabetes mellitus Typ 2 und Hypercholesterinämien tragen maßgeblich zur steigenden Inzidenz von Herz-Kreislauf-Erkrankungen bei, die mit einem Anteil von 50 % an der Gesamtmortalität die häufigste Todesursache in der westlichen Welt darstellen (Libby, P. 1998, Ross. R. 1999).

Bei den atherosklerotischen Veränderungen der Koronararterien handelt es sich um eine chronisch inflammatorische Erkrankung der Gefäßwand, die im Krankheitsverlauf durch stetige Lumeneinengung einerseits zu insuffizienter myokardialer Blutversorgung und folglich zur Herzinsuffizienz führt. Andererseits wird durch eine Ruptur der arteriosklerotischen Plaques ein oftmals tödlicher Myokardinfarkt ausgelöst (Dalager-Pedersen, S. et al. 1998, Libby, P. 2003, Zhou, J. et al. 1999). In der Pathogenese der atherosklerotischen Plaques spielen inflammatorische Prozesse wie die Einwanderung mononukleärer Zellen und die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine eine wesentliche Rolle. Entscheidend für die Instabilität und Vulnerabilität der atherosklerotischen Plaques ist hierbei ein verminderter Gehalt an extrazellulärer Matrix. In der makrophagenreichen Schulterregion der atherosklerotischen Plaque besteht ein Ungleichgewicht zwischen der Matrixbildung und der Degradation von Kollagenen durch Matrixmetalloproteinasen, die von eingewanderten Monozyten exprimiert werden. Diese kontinuierlichen Umbauvorgänge führen zur Ausdünnung und Instabilität der fibrösen Schutzkappe der atherosklerotischen Plaques und gehen mit einem erhöhten Risiko einer Plaqueruptur einher.

Die proteolytischen Prozesse, die während der Plaqueeinstellung ablaufen, werden zum größten Teil durch verschiedene Klassen der MMPs induziert, die durch Monozyten bzw. Makrophagen und glatten Muskelzellen exprimiert werden. In den instabilen Plaques treten dabei insbesondere MT1-MMP, MMP-2 und MMP-9 in Erscheinung (Libby, P. et al. 1997, Galis, Z.S. et al. 1994). Eine *in vitro* durchgeführte Stimulation der glatten Muskelzellen mit den Zytokinen IL-1 und TNF- α führte insbesondere zu einer vermehrten Expression von MT1-MMP (Rajavashisth, T.B. et al. 1999). Zusätzlich zur Spaltung der extrazellulären Matrix vermittelt MT1-MMP die Aktivierung von MMP-2 und des proteolytischen Wachstumsfaktors (*transforming*

growth factor-β, TGF-β) (Seiki, M. et al. 2003). Die Bindung von Monozyten an Kollagen geht mit vermehrter MMP-9-Sekretion einher, die durch einen zusätzlichen zellulären Kontakt mit Thrombozyten weiter verstärkt wird (Galt, S.W. et al. 2001). In humanen vulnerablen Plaques wurde bereits durch die Arbeitsgruppe um Galis in der *in situ* Zymografie eine vermehrte Sekretion von MMP-2, MMP-3 und MMP-9 aus den glatten Muskelzellen nach Stimulierung durch makrozytär sezernierte Zytokine beschrieben.

In entzündlichen Prozessen wie in der Atherosklerose wird vermehrt EMMPRIN nachgewiesen, (Tomita, T. et al. 2002, Eui, Y.C. et al. 2002, Haug, C. et al. 2004) die am ehesten den Makrophagen zuzuordnen ist (Major, T.C. et al. 2002). Zusätzlich zur bekannten EMMPRIN-Expression auf glatten Muskelzellen, Monozyten/Makrophagen und Endothelzelle wurde die Expression auf Thrombozyten nachgewiesen (Haug, C. et al. 2004, Schmidt, R. et al. Thromb. Haemost. 2006).

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte eine vermehrte EMMPRIN Expression auf Monozyten nach Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* nachgewiesen werden. Das Vorhandensein von *Chlamydia pneumoniae* in atherosklerotischen Plaques wurde bereits in verschiedenen Arbeiten beschrieben. (Muhlenstein, J.B. et al., 1996, Maas, M. et al. 1998). Durch die Infektion wird eine Aktivierung der proinflammatorischen Kaskade im Plaque vermutet (Netea, M.G. et al. 2000). Unsere Arbeitsgruppe konnte nach einer *Chlamydia pneumoniae* Infektion vermehrte Oberflächenexpression von EMMPRIN und MT1-MMP auf Monozyten nachweisen, die mit einer Steigerung der MMP-9 Sekretion einherging. Mittels der EMMPRIN-siRNA Technologie wurde Oberflächenexpression von EMMPRIN blockiert, welches mit verminderter MMP-9 Aktivierung einherging. Dies deutet auf eine regulatorische Wirkung von EMMPRIN bei der Aktivierung von proteolytischen Faktoren hin (Schmidt, R. et al. Circulation 2006).

Bereits in *in vivo* Untersuchungen konnte unsere Arbeitsgruppe eine quantitative Hochregulierung von EMMPRIN auf Monozyten bei koronarer Herzerkrankung nachweisen. Die Oberflächenexpression von EMMPRIN auf Monozyten wurde mit den von Patienten mit chronisch stabiler Angina pectoris und gesunden Probanden verglichen. Hierbei zeigte sich, dass beim akuten Myokardinfarkt vermehrt EMMPRIN auf Monozyten exprimiert wird. Zusätzlich wurde eine Hochregulation der MT1-MMPs

auf Monozyten festgestellt, die bekanntlich verstärkt durch EMMPRIN exprimiert werden. In einer weiteren Untersuchung konnte im Akutereignis in Korrelation zur Oberflächenexpression von EMMPRIN und MT1-MMP eine erhöhte Plasmaaktivität der Gelatinase MMP-9 festgestellt werden. Ein deutlicher Rückgang von EMMPRIN, MT1-MMP und MMP-9 Bildung zeigte sich bei denselben Patienten 6 Monate nach dem akuten Myokardinfarkt (Schmidt, R. et al. Circulation 2006). Diese Daten lassen auf eine Aktivierungskaskade von MMPs schließen, die möglicherweise nach Aufregulierung von EMMPRIN beim akuten Myokardinfarkt auftritt.

Zum Nachweis einer kausalen Verbindung zwischen der vermehrten EMMPRIN Expression und dem vermehrten Auftreten von MT1-MMP und MMP-9 wurden in der vorliegenden Arbeit *in vitro* die Regulierung von MMPs durch EMMPRIN untersucht.

Es konnte aufgezeigt werden, dass nach Zellkontakt von Monozyten mit EMMPRIN transfizierten CHO (*chinese hamster ovary*)-Zellen eine vermehrte MMP-9 Sekretion stattfindet. Dieselben Ergebnisse wurden nach Adhäsion von Monozyten an das rekombinante azelluläre Fc-EMMPRIN gewonnen. Eine Inhibierung der EMMPRIN-Expression auf Monozyten durch die siRNA-Technologie führte trotz der Stimulierung mit Lipopolysaccharid (LPS) zu einer verminderten MMP-9 Sekretion. Zusammenfassend lassen diese Daten auf die funktionelle Rolle von EMMPRIN in der monozytären Proteolyse durch Regulation von MMP-9 Sekretion schließen. Durch verschiedene Proteasen wird die fibröse Schutzkappe der arteriosklerotischen Plaques degradiert. Hierzu gehören vorwiegend die von Monozyten sezernierten MMPs. Innerhalb der vulnerablen Plaques wird vermehrt MMP-2 vorgefunden, die aus den glatten Muskelzellen sezerniert werden (Galis, Z.S. et al. 1994).

In unseren Untersuchungen konnte nach zellulärem Kontakt der glatten Muskelzellen mit EMMPRIN exprimierenden Monozyten eine vermehrte MMP-2 Sekretion aus den glatten Muskelzellen verzeichnet werden. Zusätzlich wurde eine erhöhte Expressierung von MT1-MMP auf der Zelloberfläche von glatten Muskelzellen festgestellt.

In einer bereits veröffentlichten Arbeit von Matias-Roman und seinen Mitarbeitern wurde MT1-MMP auf Monozyten beschrieben, die zur Migration von Monozyten durch die Endothelzellen in die Subintima von Bedeutung ist (Matias-Roman, S. et al. 2005). Die Inhibierung der EMMPRIN Expression auf Monozyten durch die siRNA Technologie ging mit einer verminderten Oberflächenexpression von MT1-MMP

einher. Wogegen der zelluläre Kontakt von EMMPRIN Überexprimierenden Monozyten mit sowohl Monozyten, als auch glatten Muskelzellen zu einer vermehrten Oberflächenexpression von MT1MMP führt. Daraus wird die zentrale Rolle von EMMPRIN in der Oberflächenexpression von MT1-MMP ersichtlich.

In unseren weiteren Untersuchungen wurde eine zusätzliche regulatorische Wirkung von MT1-MMP bei der EMMPRIN vermittelten MMP-2 Sekretion aus den glatten Muskelzellen nachgewiesen. Die Blockierung von MT1-MMP durch Antikörper ging mit einer verminderten MMP-2 Sekretion einher. Wogegen die Blockierung von MT1-MMP zu keiner Veränderung in der MMP-9 Ausschüttung aus den Monozyten aufwies.

Zusammengefasst wird erstmals aus den *in vitro* erhobenen Daten die pathophysiologische Relevanz der verstärkten EMMPRIN Expression auf Monozyten und glatte Muskelzellen ersichtlich. EMMPRIN trägt durch die verstärkte MT1-MMP, MMP-9 und MMP-2 Expression möglicherweise eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der atherosklerotischen Plaqueprogression und zur dessen Ruptur bei. Allerdings müsste diese Hypothese noch in weiteren tierexperimentellen Knockout-Modellen belegt werden.

Bislang bestehen klinisch keine sicheren Verfahren, instabile, rupturgefährdete atherosklerotische Plaques zu diagnostizieren. Weiterhin sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine therapeutischen Möglichkeiten vorhanden, die eine proteolytische Veränderung der extrazellulären Matrix und die darauf folgende Plaqueruptur mit akutem Myokardinfarkt verhindern kann. EMMPRIN, als auch MT1-MMP könnten in der weiteren Forschung eventuell ein möglicher Angriffspunkt zur Herstellung von kardioprotektiven Medikamente werden.

6. Zusammenfassung

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) stellen eine heterogene Gruppe zinkabhängiger Endopeptidasen dar, die durch Proteolyse der extrazellulären Matrix bei verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen mitwirken. Der *Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer* (EMMPRIN), ein hydrophobes transmembranöses Glykoprotein, wird vermehrt bei inflammatorischen Prozessen wie der Pathogenese atherosklerotischer Plaques auf mononukleären Zellen exprimiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die regulatorische Wirkung von EMMPRIN auf die Aktivierungskaskade von Matrix-Metalloproteinasen durch *in vitro* Versuche mit kardiovaskulären Zellen untersucht. Unsere Beobachtungen weisen darauf hin, dass an Zellmembran gebundenes EMMPRIN im Rahmen zellulärer Wechselwirkungen mit Monozyten eine vermehrte MMP-9 Sekretion induzieren kann. Zudem wurde gezeigt, dass MT1-MMP keinen wesentlichen Einfluss auf die EMMPRIN vermittelte MMP-9 Aktivität der Monozyten hat. Es konnte überdies nachgewiesen werden, dass auf Monozyten exprimiertes EMMPRIN nach Zell-Zellkontakt die MMP-2 und MT1-MMP Sekretion in glatten Muskelzellen induziert. Da nach Blockierung von MT1-MMP durch monoklonale Antikörper eine signifikant verminderte MMP-2 Sekretion der glatten Muskelzellen beobachtet werden konnte, kann MT1-MMP eine bedeutende Rolle bei der EMMPRIN vermittelten MMP-2 Sekretion auf glatte Muskelzellen zugeschrieben werden. Um die funktionelle Relevanz von EMMPRIN in einem isolierten azellulären System zu untersuchen, wurde das rekombinante Fc-EMMPRIN-Fusionsprotein hergestellt. Durch immobilisiertes rekombinantes Fc-EMMPRIN konnte wie durch auf Zellmembran gebundenes EMMPRIN die MMP-9 Expression in Monozyten induziert werden. Zudem war das rekombinante Fc-EMMPRIN für die Regulation von MT1-MMP bei Monozyten notwendig.

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals durch *in vitro* erhobene Daten die pathophysiologische Relevanz der verstärkten EMMPRIN Exprimierung auf Monozyten und glatten Muskelzellen. EMMPRIN hat durch verstärkte MT1-MMP, MMP-9 und MMP-2 Expression möglicherweise eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der atherosklerotischen Plaque.

Da bisher keine Verfahren zum Nachweis rupturgefährdeter atherosklerotischer Plaques bestehen und zudem keine therapeutischen Möglichkeiten vorhanden sind

um das Fortschreiten zur Plaqueruptur zu verhindern, sollte die Funktion von EMMRPIN und MT1-MMP in geeigneten in vivo Studien weiter untersucht werden.

7. Literaturverzeichnis

Abe, N., Osanai, T., Fujiwara, T., Kameda, K., Matsunaga, T., Okumura, K. C-reactive protein-induced upregulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer in macrophages: inhibitory effect of fluvastatin. *Life Sci.* 78 (2006) 1021-1028

Bafetti, L.M., Young, T.N., Itoh, Y. Intact vitronectin induces matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 expression and enhanced cellular invasion by melanoma cells. *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 143-149

Becker, J.W., Marcy, A.I., Rokosz, L.L., Axel, M.G., Burbaum, J.J., Fitzgerald, P.M., Cameron, P.M., Esser, C.K., Hagmann, W.K., Hermes, J.D., Springer, J.P. Stromelysin-1: threedimensional structure of the inhibited catalytic domain and of the C-truncated proenzyme. *Protein Sci.* 4 (1995) 1966-1976

Birkedal-Hansen, H., Moore, W.G., Bodden, M.K., Windsor, L.J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A., Engler, J.A. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 4 (1993) 197-250

Biswas, C., Zhang, Y., DeCastro, R., Guo, H., Nakamura, T., Kataoka, H., Nabeshima, K. The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res.* 55 (1995) 434-439

Brew, K., Dinakarpandian, D., Nagase, H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim. Biophys. Acta.* 1477 (2000) 267-283

Caudroy, S., Polette, M., Nawrocki-Raby, B., Cao, J., Toole, B.P., Zucker, S., Birembaut, P. EMMPRIN-mediated MMP regulation in tumor and endothelial cells. *Clin. Exp. Metastasis* 19 (2002) 697-702

Caudroy, S., Polette, M., Tournier, J.M., Burlet, H., Toole, B., Zucker, S., Birembaut, P. Expression of the extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and the matrix metalloproteinase-2 in bronchopulmonary and breast lesions. *J. Histochem. Cytochem.* 47 (1999) 1575-1580

Chakraborti, S., Mandal, M., Mandal, A., Chakraborti, T. Regulation of matrix metalloproteinases: An overview. *Mol. Cell Biochem.* 253 (2003) 269-285

Chomczynski, P., Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162 (1987) 156-159

Clark, I.M., Cawston, T.E. Fragments of human fibroblast collagenase. Purification and characterization. *Biochem. J.* 263 (1989) 201-206

Crabbe, T., Smith, B., O'Connell, J.P., Docherty A Human progelatinase A can be activated by matrilysin. *FEBS Lett.* 345 (1994) 14-16

Creemers, E.E., Cleutjens, J.P., Smits, J.F., Daemen, M.J. Matrix Metalloproteinase Inhibition After Myocardial Infarction: A New Approach to Prevent Heart Failure? *Circ. Res.* 89 (2001) 201-210

Dalager-Pedersen, S., Ravn, H.B., Falk, E. Atherosclerosis and acute coronary events. *Am. J. Cardiol.* 82 (1998) 37T-40T

Davidson, B., Goldberg, I., Berner, A., Kristensen, G.B., Reich, R. EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) is a novel marker of poor outcome in serous ovarian carcinoma. *Clin. Exp. Metastasis* 20 (2003) 161-169

DeCastro, R., Zhang, Y., Guo, H., Kataoka, H., Gordon, M.K., Toole, B., Biswas, G. Human keratinocytes express EMMPRIN, an extracellular matrix metalloproteinase inducer. *J. Invest. Dermatol.* 106 (1996) 1260-1265

Eui, Y.C., Dongsoo, K., Bum, K.H., Hyuck, M.K., Young, G.S., Ki, H.B., Hyun-Young, P., Ki, C.W., Hyun-Seung, K. Upregulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and gelatinases in human atherosclerosis infected with *Chlamydia pneumoniae*: The potential role of *Chlamydia pneumoniae* infection in the progression of atherosclerosis. *Exp. Mol. Med.* 34 (2002) 391-400

Fossum, S., Mallett, S., Barclay, A.N. The MRC OX-47 antigen is a member of the immunoglobulin superfamily with an unusual transmembrane sequence. *Eur. J. Immunol.* 21 (1991) 671-679

Galis, Z.S., Khatri, J.J. Matrix Metalloproteinases in Vascular Remodeling and Atherogenesis: The Good, the Bad, and the Ugly. *Circ. Res.* 90 (2002) 251-262

Galis, Z.S., Muszynski, M., Sukhova, G.K., Simon-Morrissey, E., Unemori, E.N., Lark, M.W., Amento, E., Libby, P. Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circ. Res.* 75 (1994) 181-189

Galt, S.W., Lindemann, S., Medd, D., Allen, L.L., Kraiss, L.W., Harris, E.S., Prescott, S.M., McIntyre, T.M., Weyrich, A.S., Zimmerman, G.A. Differential regulation of matrix metalloproteinase-9 by monocytes adherent to collagen and platelets. *Circ. Res.* 89 (2001) 509-516

Guo, H., Zucker, S., Gordon, M.K., Toole, B.P., Biswas, C. Stimulation of matrix metalloproteinase production by recombinant extracellular matrix metalloproteinase inducer from transfected Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 24-27

Guo, H., Majmudar, G., Jensen, T.C., Biswas, C., Toole, B.P., Gordon, M.K. Characterization of the gene for human EMMPRIN, a tumor cell surface inducer of matrix metalloproteinases. *Gene* 220 (1998) 99-108

Haas, T.L., Davis, S.J., Madri, J.A. Three-dimensional type I collagen lattices induces coordinate expression of matrix metalloproteinases MT-MMP and MMP-2 in microvascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 3604-3610

Haug, C., Lenz, C., Diaz, F., Bachem, M.G. Oxidized low-density lipoproteins stimulate extracellular matrix metalloproteinase Inducer (EMMPRIN) release by coronary smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24 (2004) 1823-1829

Hayakawa, T., Yamashita, K., Tanzawa, K., Uchijima, E., Iwata, K. Growth promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP1) for a wide range of cells: a possible new growth factor in serum. *FEBS Lett.* 298 (1992) 29-32

Hayakawa, T., Yamashita, K., Ohuchi, E., Shinagawa, A. Cell growth promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *J. Cell. Sci.* 107 (1994) 2373-2379

Henriet, P., Blavier, L., Declerck, Y.A. Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) in invasion and proliferation. *Apmis.* 107 (1999) 111-119

Holven, K.B., Halvorsen, B., Schulz, H., Aukrust, P., Ose, L., Nenseter, M.S. Expression of matrix metalloproteinase-9 in mononuclear cells of hyperhomocysteinaemic subjects. *Eur. J. Clin. Invest.* 33 (2003) 555-560

Inoue, N., Takeshita, S., Gao, D., Ishida, T., Kawashima, S., Akita, H., Tawa, R., Sakurai, H., Yokoyama, M. Lysophosphatidylcholin increases the secretion of matrix metalloproteinase 2 through the activation of NADH/NADPH oxidase in cultured endothelial cells. *Atherosclerosis* 155 (2001) 45-52

Jones, C.B., Sane, D.C., Herrington, D.M. Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in acute coronary syndrome. *Cardiovasc. Res.* 59 (2003) 812-823

Kähäri, V.M., Saarialho-Kere, U. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion. *Ann. Med.* 31 (1999) 34-45

Kanekura, T., Chen, X., Kanzaki, T. Basigin (CD147) is expressed on melanoma cells and induces tumor cell invasion by stimulating production of matrix metalloproteinases by fibroblasts. *Int. J. Cancer.* 99 (2002) 520-528

Kang, T., Nagase, H., Pei, D. Activation of membrane-type matrix metalloproteinase 3 zymogen by the proprotein convertase furin in the trans-Golgi network. *Cancer Res.* 62 (2002) 675-81

Kanno, N., Nonomura, N., Miki, T., Kojima, Y., Takahara, S., Nozaki, M., Okuyama, A. Effects of epidermal growth factor on the invasion activity of the bladder cancer cell line. *J. Urol.* 159 (1998) 586-590

Kleiner, D.E. Jr., Tuuttila, A., Tryggvason, K., Stetler-Stevenson, W.G. Stability analysis of latent and active 72-kDa type IV collagenase: the role of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *Biochemistry.* 32 (1993) 1583-1592

Krane, S.M., Byrne, M.H., Lemaitre, V., Henriot, P., Jeffrey, J.J., Witter, J.P., Liu, X., Wu, H., Jaenisch, R., Eeckhout, Y. Different collagenase gene products have different roles in degradation of type I collagen. *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 28509-28515

Lamoreaux, W.J., Fitzgerald, M.E.C., Reiner, A., Reiner, A., Hasty, K.A., Charles, S.T. Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro. *Microvascular Res.* 55 (1998) 29-42

Libby, P., Geng, Y.J., Sukhova, G.K., Simon, D.I., Lee, R.T. Molecular determinants of atherosclerotic plaque vulnerability. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 811 (1997) 134-142

Libby, P. The interface of atherosclerosis and thrombosis: basic mechanisms. *Vasc. Med.* 3 (1998) 225-229

Libby, P. Vascular biology of atherosclerosis: overview and state of the art. *Am. J. Cardiol.* 91 (2003) 3A-6A

Li, Y., McTiernan, C.F., Feldman, A.M. Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of matrix metalloproteinase and their regulators in cardiac matrix remodeling. *Cardiovasc. Res.* 46 (2000) 214-224

Liang, L., Major, T., Bocan, T. Characterization of the promoter of human extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN). *Gene* 282 (2002) 75-86

Lijnen, H.R. Extracellular proteolysis in the development and progression of atherosclerosis. *Biochem. Soc. Trans.* 30 (2002) 163-7

Löms Ziegler-Heitbrock, H.W., Thiel, E., Futterer, A., Herzog, V., Wirtz, A., Riethmuller, G. Establishment of a human cell line (MonoMac6) with characteristics of mature monocytes. *Int. J. Cancer* 41 (1988) 456-461

Lovejoy, B., Cleasby, A., Hassell, A.M., Longley, K., Luther, M.A., Weigl, D., McGeehan, G., McElroy, A.B., Drewry, D., Lambert, M.H., Jordan, J.R. Structure of the catalytic domain of fibroblast collagenase complexed with an inhibitor. *Science* 263 (1994) 375-377

Lusis, A.J. Atherosclerosis. *Nature* 407 (2000) 233-241

Maass, M., Bartels, C., Kruger, S., Krause, E., Engel, P.M., Dahlhoff, K. Endovascular presence of *Chlamydia pneumoniae* DNA is a generalized phenomenon in atherosclerotic vascular disease. *Atherosclerosis* 140 (1998) 25-30

Major, T.C., Liang, L., Lu, X., Rosebury, W., Bocan, T.M.A. Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN) Is Induced Upon Monocyte Differentiation and Is Expressed in Human Atheroma. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22 (2002) 1200-1207

Matias-Roman, S., Galvez, B.G., Genis, L., Yanez-Mo, M., de la Rosa, G., Sanchez-Mateos, P., Sanchez-Madrid, F., Arroyo, A.G. Membrane type 1-matrix metalloproteinase is involved in migration of human monocytes and is regulated through their interaction with fibronectin or endothelium. *Blood* 105 (2005) 3956-3964

May, A.E., Schmidt, R., Bülbül, B.Ö., Hölderle, M., Walther, F., Schomig, A., Gawaz, M., Klouche, M. Plasminogen and matrix metalloproteinase activation by enzymatically modified low density lipoproteins in monocytes and smooth muscle cells. *Thromb. Haemost.* 93 (2005) 710-715

Miyake, H., Yoshimura, K., Hara, I., Eto, H., Arakawa, S., Kamidono, S. Basic fibroblast growth factor regulates matrix metalloproteinases production and in vitro invasiveness in human bladder cancer cell lines. *J. Urol.* 157 (1997) 2351-2355

Miyauchi, T., Kanekura, T., Yamaoka, A., Ozawa, M., Miyazawa, S., Muramatsu, T. Basigin, a new, broadly distributed member of the immunoglobulin superfamily, has strong homology with both the immunoglobulin V domain and the beta-chain of major histocompatibility complex class II antigen. *J. Biochem.* 107 (1990) 316-323

Miyauchi, T., Masuzawa, Y., Muramatsu, T. The basigin group of the immunoglobulin superfamily: complete conservation of a segment in and around transmembrane domains of human and mouse basigin and chicken HT7 antigen. *J. Biochem.* 110 (1991) 770-774

Miyauchi, T., Jimma, F., Igakura, T., Yu, S., Ozawa, M., Muramatsu, T. Structure of the mouse basigin gene, a unique member of the immunoglobulin superfamily. *J. Biochem.* 118 (1995) 717-724

Muhlestein, J.B., Hammond, E.H., Carlquist, J.F., Radicke, E., Thomson, M.J., Karagounis, L.A., Woods, M.L., Anderson, J.L. Increased incidence of *Chlamydia* species within the coronary artery of patients with symptomatic atherosclerotic versus other form of cardiovascular disease. *Am. Coll. Cardiol.* 27 (1996) 1555-1561

Muramatsu, T., Miyauchi, T. Basigin (CD147): a multifunctional transmembrane protein involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion. *Histo. Histopathol.* 18 (2003) 981-987

Murphy, G., Knauper, V. Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain? *Matrix Biol.* 15 (1997) 511-518

Nabeshima, K.H., Iwasaki, H., Koga, K., Hojo, H., Suzumiya, J., Kikuchi, M. Emmprin (basigin/CD147): Matrix metalloproteinase modulator and multifunctional cell recognition molecule that plays a critical role in cancer progression. *Pathol. Int.* 56 (2006) 359-367

Nagase, H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol. Chem.* 378 (1997) 151-160

Nagase, H., Woessner, J.F. Jr. Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 21491-21494

Nagase, H., Visse, R., Murphy, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.* 69 (2006) 562-573

Netea, M.G., Selzman, C.H., Kullberg, B.J., Galama, J.M., Weinberg, A., Stalenhoef, A.F., Van der Merr, J.W., Dinarello, C.A. Acellular components of *Chlamydia pneumoniae* stimulate cytokine production in human blood mononuclear cells. *Eur. J. Immunol.* 30 (2000) 541-549

Overall, C.M. Regulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase expression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 732 (1994) 51-64

Pei, D., Weiss, S.J. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature* 375 (1995) 244-247

Pei, D. Identification and characterization of the fifth membrane- type matrix metalloproteinase MT5- MMP. *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 8925-8932

Pei, D., Kang, T., Qi, H. Cysteine array matrix metalloproteinase (CAMMP)/MMP-23 is a type II transmembrane matrix metalloproteinase regulated by a single cleavage for both secretion and activation. *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 33988-33997

Rajavashisth, T.B., Xu, X.P., Jovinge, S., Meisel, S., Xu, X.O., Chai, N.N., Fishbein, M.C., Kaul, S., Cercek, B., Sharifi, B., Shah, P.K. Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase Expression in Human Atherosclerotic Plaques: Evidence for Activation by Proinflammatory Mediators. *Circulation* 99 (1999) 3103-3109

Reynolds, J.J. Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases: a functional balance in tissue degradation. *Oral Dis.* 2 (1996) 70-76.

Ross, R. Atherosclerosis - An Inflammatory Disease. *N. Engl. J. Med.* 340 (1999) 115-126

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989 Second Edition

Sang, Q.X., Birkedal-Hansen, H., Van Wart, H.E. Proteolytic and non-proteolytic activation of human neutrophil progelatinase B. *Biochim. Biophys. Acta.* 1251 (1995) 99-108

Sato, H., Kinoshita, T., Takino, T., Nakayama, K., Seiki, M. Activation of a recombinant membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2. *FEBS Lett.* 393 (1996) 101-104

Schmidt, R., Bültmann, A., Ungerer, M., Joghetaei, N., Bülbül, Ö., Thieme, S., Chavakis, T., Toole, B.P., Gawaz, M., Schömig, A., May, A.E. Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer Regulates Matrix Metalloproteinase Activity in

Cardiovascular Cells: Implications in Acute Myocardial Infarction. *Circulation* 113 (2006) 834-841

Schmidt, R., Redecke, V., Breitfeld, Y., Wantia, N., Miethke, T., Massberg, S., Fischel, S., Neumann, F.J., Schomig, A., May, A.E. EMMPRIN (CD 147) is a central activator of extracellular matrix degradation by *Chlamydia pneumoniae*-infected monocytes. Implications for plaque rupture. *Thromb. Haemost.* 95 (2006) 151-158

Schuster, V.L., Lu, R., Kanai, N., Bao, Y., Rosenberg, S., Prie, D., Ronco, P., Jennings, M.L. Cloning of the rabbit homologue of mouse 'basigin' and rat 'OX-47': kidney cell type-specific expression, and regulation in collecting duct cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1311 (1996) 13-19

Seiki, M., Yana, I. Roles of pericellular proteolysis by membrane type-1 matrix metalloproteinase in cancer invasion and angiogenesis. *Cancer Sci.* 94 (2003) 569-574

Seiki, M. Membrane-type matrix metalloproteinases. *Apmis.* 107 (1999) 137-143.

Seulberger, H., Unger, C.M., Risau, W. HT7, Neurothelin, Basigin, gp42 and OX-47-- many names for one developmentally regulated immuno-globulin-like surface glycoprotein on blood-brain barrier endothelium, epithelial tissue barriers and neurons. *Neurosci. Lett.* 140 (1992) 93-97

Seulberger, H., Lottspeich, F., Risau, W. The inducible blood--brain barrier specific molecule HT7 is a novel immunoglobulin-like cell surface glycoprotein. *Embo. J.* 9 (1990) 2151-2158

Sho, E., Sho, M., Singh, T.M., Nanjo, H., Komatsu, M., Xu, C., Masuda, H., Zarins, C.K. Arterial enlargement in response to high flow requires early expression of matrix metalloproteinases to degrade extracellular matrix. *Exp. Mol. Pathol.* 73 (2002) 142-153

Sidhu, S.S., Mengistab, A.T., Tauscher, A.N., LaVail, J., Basbaum, C. The microvesicle as a vehicle for EMMPRIN in tumor-stromal interactions. *Oncogene*. 23 (2004) 956-963

Springman, E.B., Angleton, E.L., Birkedal-Hansen, H., Van Wart, H.E. Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (1990) 364-368.

Stry, H.C. Composition and classification of human atherosclerotic lesions. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.* 421 (1992) 277-290

Stry, H.C., Chandler, A.B., Glagov, S., Guyton, J.R., Insull, W. Jr., Rosenfeld, M.E., Schaffer, S.A., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., Wissler, R.W. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler. Thromb.* 14 (1995) 840-856.

Sternlicht, M.D., Werb, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17 (2001) 463-516

Strongin, A.Y., Collier, I., Bannikov, G., Marmer, B.L., Grant, G.A., Goldberg, G.I. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 5331-5338

Sukhova, G.K., Schönbeck, U., Rabkin, E., Schoe, F.J., Poole, A.R., Billingham, R.C., Libby, P. Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques. *Circulation* 99 (1999) 2503-2509

Sun, J., Hemler, M.E. Regulation of MMP-1 and MMP -2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions. *Cancer Res.* 61 (2001) 2276-2281

Tang, W., Chang, S.B., Hemler, M.E. Links between CD147 function, glycosylation, and caveolin-1. *Mol. Biol. Cell* 15 (2004) 4043-4050

Tang, W., Hemler, M.E. Caveolin-1 regulates matrix metalloproteinases-1 induction and CD147/EMMPRIN cell surface clustering. *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 11112-11118

Thorgeirsson, U.P., Yoshiji, H., Sinha, C.C., Gomez, D.E. Breast cancer, tumor neovasculature and the effect of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) on angiogenesis. *In Vivo* 10 (1996) 137-144

Tomita, T., Nakase, T., Kaneko, M., Shi, K., Takahi, K., Ochi, T., Yoshikawa, H. Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer and enhancement of the production of matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 46 (2002) 373-378

Toole, B.P. Emmpirin (CD147), a cell surface regulator of matrix metalloproteinase production and function. *Curr. Top. Dev. Biol.* 54 (2003) 371-389

Tschesche, H. Bimolecular interaction of matrix metalloproteinases and their inhibitors TIMPs. *J. Protein Chem.* 17 (1998) 549-551

Van Wart, H.E., Birkedal-Hansen, H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (1990) 5578-5582

Visse, R., Nagase, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ. Res.* 92 (2003) 827-839

Westermarck, J., Kähäri, V.M. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J.* 13 (1999) 781-792

Yan, L., Zucker, S., Toole, B.P. Roles of the multifunctional glycoprotein, emmprin (basigin; CD147), in tumour progression. *Thromb. Haemost.* 93 (2005) 199-204

Yoshida, S., Shibata, M., Yamamoto, S., Hagihara, M., Asai, N., Takahashi, M., Mizutani, S., Muramatsu, T., Kadomatsu, K. Homo-oligomer formation by basigin, an immunoglobulin superfamily member, via its N-terminal immunoglobulin domain. *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 4372-4380

Yurchenko, V., Zybarth, G., O'Connor, M., Dai, W.W., Franchin, G., Hao, T., Guo, H., Hung, H.C., Toole, B., Gallay, P., Sherry, B., Bukrinsky, M. Active site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activity via CD147. *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 22959-22965

Zhang, B., Ye, S., Herrmann, S.M., Eriksson, P., de Maat, M., Evans, A., Arveiler, D., Luc, G., Cambien, F., Hamsten, A., Watkins, H., Henney, A.M. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation* 99 (1999) 1788-1794

Zhou, J., Chew, M., Ravn, H.B., Falk, E. Plaque pathology and coronary thrombosis in the pathogenesis of acute coronary syndromes. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 230 (1999) 3-11

8. Lebenslauf

Der Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version nicht mitveröffentlicht.

9. Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

In vitro Untersuchungen zur Regulation von Matrix Metalloproteinasen (MMPs) bei kardiovaskulären Zellen durch den

Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN)

in der Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen der Technischen Universität München am Deutschen Herzzentrum München unter der Anleitung und Betreuung durch

Herrn PD Dr. med. Roland Schmidt

ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 5 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe die Dissertation in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.

Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

Die Promotionsordnung der Technischen Universität München ist mir bekannt.

Berlin, den 31. Januar 2013

.....

Bayram Özgür Bülbül

10. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Albert Schömig für die Möglichkeit an der Klinik für Herz-und Kreislauferkrankungen der Technischen Universität München promovieren zu dürfen.

Herrn PD. Dr. Andreas May danke ich sehr herzlich für die Zuweisung des Themas, der Diskussionsbereitschaft und Unterstützung während der Bearbeitung.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD. Dr. med. Roland Schmidt für seine intensive, motivierende Betreuung sowie Unterstützung in allen wissenschaftlichen Fragen.

Weiterhin möchte ich mich bei Monika Hölderle für die Einführung in die Labortätigkeit, ihre ständige Ansprechbarkeit, nette Arbeitsatmosphäre und freundliche Unterstützung bedanken.

Ein großer Dank gebührt Herrn Dr. Thomas Schachtner für seine erhabene Unterstützung und Ismail Türkmeneli für seine Motivation, die zum Entstehen dieser Arbeit wesentlich beigetragen haben.

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Schwester bedanken, die mich stets unterstützt haben.