

**Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie  
der Technischen Universität München**

**Untersuchungen zur Regulation der TNF- $\alpha$ -stimulierten  
Matrix-Metalloproteinase-9-Expression durch die MAPK**

**Michael Heidinger**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Univ.-Prof. Dr. F. P. Schmidtchen
Prüfer der Dissertation:	1. apl. Prof. Dr. H. Kolb, 2. Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher

Die Dissertation wurde am 29. 11. 2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 18. 01. 2006 angenommen.

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	5
1 Einleitung .....	7
1.1 Die Bedeutung der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs).....	7
1.2 Allgemeine Struktur und Biochemie der MMPs .....	7
1.3 Die Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) .....	9
1.4 Aktivierung und Inhibition von MMP-9.....	11
1.5 Substrate und Funktionen der MMP-9 .....	12
1.6 Regulation der MMP-9-Genexpression.....	14
1.7 TNF- $\alpha$ und die Rezeptoren TNF-R1 und TNF-R2.....	16
1.8 Die Regulation von NF $\kappa$ B.....	18
1.9 Die MAPK-Signaltransduktionen.....	18
1.9.1 ERK.....	19
1.9.2 p38 .....	20
1.9.3 JNK .....	21
1.10 Vorkommen und Bedeutung von MMP-9 für Physiologie und Pathophysiologie.....	21
1.10.1 Vorkommen von MMP-9.....	21
1.10.2 Bedeutung von MMP-9 in der Tumorbilogie .....	22
1.10.3 Therapiestrategien durch Inhibition der MMPs .....	23
1.11 Zielsetzung dieser Arbeit.....	25
2 Material und Methoden.....	26
2.1 Geräte .....	26
2.2 Zelllinien.....	27
2.3 Stimulantien .....	28
2.4 Antikörper.....	28
2.4.1 Einsatz in der Zellkultur .....	28
2.4.2 Einsatz im Western Blot .....	29
2.5 Inhibitoren .....	29
2.5.1 Protease-Inhibitor .....	29

2.5.2	Inhibitoren der intrazellulären Signaltransduktionswege .....	29
2.6	Puffer und Färbelösungen.....	31
2.7	Gebrauchsfertige Kits, Gele und Zymografien .....	31
2.8	Plastikwaren.....	32
2.9	Filme .....	32
2.10	Zellkultur .....	33
2.10.1	Kultivierung und Aufbewahrung der Zellen.....	33
2.10.2	Zellzahlbestimmung .....	34
2.10.3	Isolierung von CD14 <sup>+</sup> Monozyten.....	34
2.10.4	Serumfreie Zellkultur, Stimulation der Zellen und Gewinnung von konditionierten Medien .....	35
2.10.5	Invasionsassay.....	36
2.11	Molekularbiologische Methoden.....	37
2.11.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen .....	37
2.11.2	Reverse Transkription .....	37
2.11.3	Quantitative PCR.....	38
2.11.4	Electrophoretic Mobility Gel Shift Assay (EMSA) .....	38
2.12	Proteinchemische Methoden.....	43
2.12.1	Herstellung der Zelllysate zur Analyse phosphorylierter Proteine .....	43
2.12.2	Herstellung der Triton X-100 Zellextrakte.....	43
2.12.3	Reinigung der Gelatinasen.....	44
2.12.4	Quantitative Proteinbestimmung .....	44
2.12.5	Gelatine-Zymografie.....	45
2.12.6	Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE).....	46
2.12.7	Western Blot.....	47
3	Ergebnisse .....	48
3.1	Die basale MMP-9-Expression in THP-1 Zellen.....	48

3.2	Charakterisierung der autokrinen TNF- $\alpha$ -Stimulation.....	49
3.3	Untersuchungen zur Signaltransduktion der autokrin TNF- $\alpha$ - stimulierten MMP-9-Expression .....	52
3.3.1	Inhibition der ERK1/2-Signaltransduktion.....	52
3.3.2	Inhibition von p38 .....	53
3.3.3	Analyse der Interaktion von p38 und ERK1/2.....	54
3.3.4	Inhibition von JNK .....	56
3.3.5	Analyse der Interaktion von JNK und ERK1/2.....	57
3.3.6	Gleichzeitige Inhibition von p38 und JNK.....	58
3.3.7	Hemmung von Protein-Phosphatasen.....	59
3.3.8	Bedeutung von NF $\kappa$ B.....	60
3.3.9	Untersuchung aktiver Transkriptionsfaktoren .....	61
3.3.10	Einfluss der ERK1/2- und p38-Inhibitoren auf die THP-1 Zellen im Invasionsassay .....	61
3.4	Untersuchung der exogen TNF- $\alpha$ -stimulierten MMP-9- Expression und der beteiligten Signaltransduktionen.....	64
3.4.1	Charakterisierung der exogen TNF- $\alpha$ -stimulierten MMP-9- Expression .....	64
3.4.2	Einfluss von exogenem TNF- $\alpha$ auf ERK1/2 und p38.....	65
3.4.3	Inhibition von ERK1/2.....	66
3.4.4	Einfluss von exogenem TNF- $\alpha$ auf die Aktivierung von NF $\kappa$ B.....	67
3.4.5	Inhibition von NF $\kappa$ B.....	68
3.5	Untersuchung der Signaltransduktion der autokrin TNF- $\alpha$ - stimulierten MMP-9-Expression in den Leukämiezelllinien HL-60 und NB4.....	69
3.5.1	Inhibition von ERK1/2.....	69
3.5.2	Inhibition von p38 .....	71
3.6	Inhibition von ERK1/2 in Monozyten .....	73

3.7	Inhibition von p38 in HaCaT Keratinozyten .....	74
4	Diskussion .....	76
4.1	Charakterisierung der autokrin TNF- $\alpha$ -stimulierten MMP-9- Expression	76
4.2	Regulation der basalen MMP-9-Expression durch die Signaltransduktion 78	
4.3	Einfluss von Transkriptionsfaktoren auf die basale MMP-9- Expression	81
4.4	Einfluss der Gelatinasen auf die Invasion der THP-1 Zellen .....	82
4.5	Exogen TNF- $\alpha$ -induzierte Signaltransduktion und MMP-9- Expression .	82
4.6	Die Rolle von TNF- $\alpha$ in der MMP-9-Expression und Tumorprogression	85
4.7	Bedeutung der MAPK-Inhibition für die Therapie .....	86
5	Zusammenfassung.....	88
6	Literaturverzeichnis .....	90
7	Danksagung	101
8	Lebenslauf	102

## Abkürzungsverzeichnis

AP-1	Activating Protein 1
ATF-2	Activating Transcription Factor 2
BM	Basalmembran
CPB	Cyclophilin B
CTAP-III	Connective Tissue Activating Peptide-III
DMSO	Dimethylsulfoxid
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
ETS	Erythroblastosis Twenty Six
EZM	Extrazelluläre Matrix
FKS	Foetales Kälberserum
Fra	Fos-related antigen
G6PDH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
GAPDH	Glycerinadelhyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gro- $\alpha$	Growth-related $\alpha$
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IFN	Interferon
IKK	I $\kappa$ B Kinase
IL-1 $\beta$	Interleukin 1 $\beta$
IL-2R $\alpha$	Interleukin-Rezeptor 2 $\alpha$
IL-8	Interleukin 8
JNK	c-Jun N-Terminal Kinase
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinasen
MAPKAP-2	MAPK activated Protein 2
MEK	MAPK/ERK Kinase
MEKK	MEK Kinase Kinase
MKK	MAPK Kinase
MMP	Matrix-Metalloproteinase
NF $\kappa$ B	Nuclear Factor $\kappa$ B
NIK	NF $\kappa$ B Inducing Kinase

PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PEA-3	Polyoma Enhancer A Binding Protein-3
PF-4	Platelet Factor 4
PMA	Phorbolmyristataacetat
PP	Protein-Phosphatase
TACE	TNF- $\alpha$ Converting Enzyme
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
TIMP	Tissue Inhibitor of Matrix-Metalloproteinase
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrosefaktor $\alpha$
TNF-R1	TNF- $\alpha$ Rezeptor 1
TNF-R2	TNF- $\alpha$ Rezeptor 2
TRADD	TNF-R Associated Death Domain
TRAF	TNF-R Associated Factor
SAP-1	Stress Activated Protein 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

# 1 Einleitung

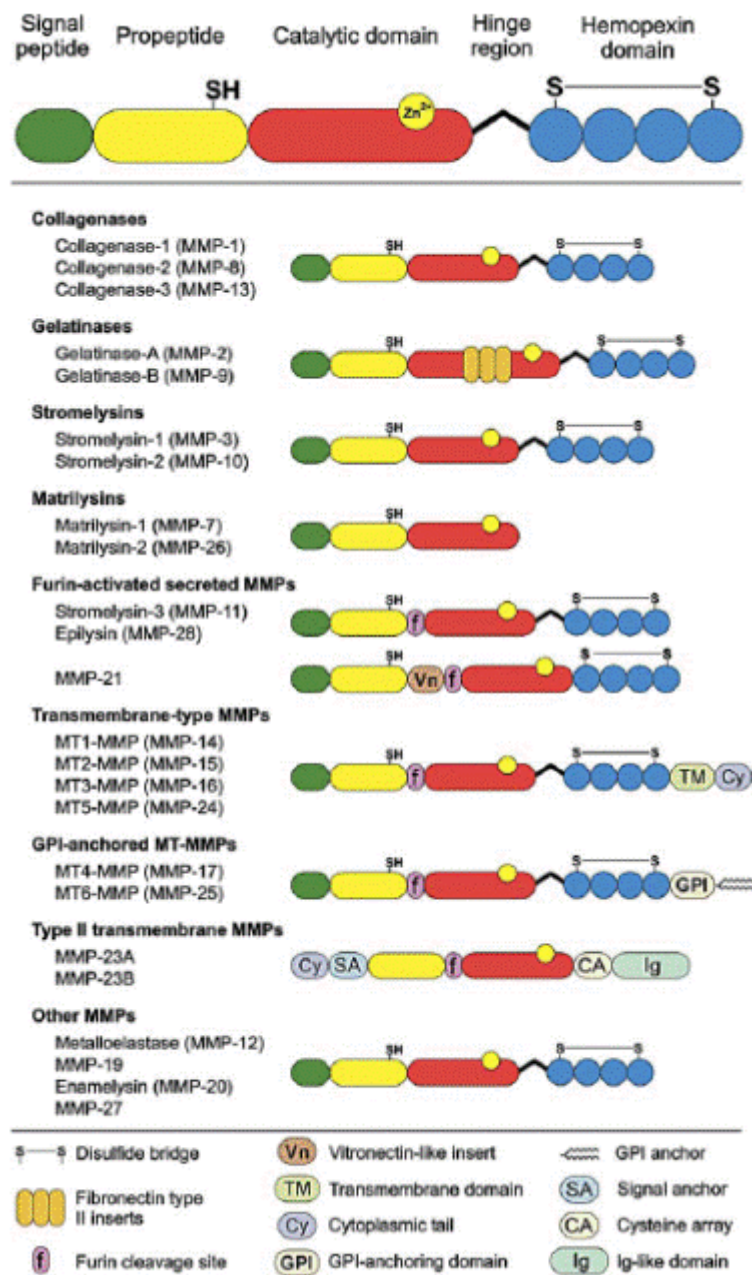
## 1.1 Die Bedeutung der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)

Die extrazelluläre Matrix (EZM) setzt sich aus zahlreichen sezernierten Proteinen und anderen Makromolekülen zusammen. Durch sie werden die Eigenschaften des Gewebes wie Stabilität und die Zelladhäsion bestimmt. Für viele physiologische Prozesse wie Embryonalentwicklung, Knochenumbau, Wundheilung, Immunantwort und Angiogenese ist der Umbau der EZM notwendig. Die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind daran durch kontrollierte Proteolyse beteiligt (Stamenkovic, 2003). Da sie fast alle Komponenten der EZM spalten können, steht eine Deregulierung der MMPs aber auch im Zusammenhang mit einer unkontrollierten, pathologischen Degradation des Gewebes. Dies ist der Fall bei einigen Erkrankungen des Herzens (Jones et al., 2003), der Lunge (Chakrabarti and Patel, 2005), des zentralen Nervensystems (Opdenakker et al., 2003), sowie bei Arthritis (Milner and Cawston, 2005) und malignen Tumoren (Vihinen and Kahari, 2002).

## 1.2 Allgemeine Struktur und Biochemie der MMPs

Die MMPs sind eine Familie sezernierter zink-abhängiger Metalloendopeptidasen, die mit den ADAMs (*a disintegrin and metalloproteinase*) und ADAM-TS (*ADAMs with thrombospondin motives*) verwandt sind. Bisher wurden 24 Gene der MMP-Familie charakterisiert, wovon die meisten in einem Cluster auf Chromosom 11 (11q22.2-22.3) lokalisiert sind. Die Gene der MMPs zeigen einen hochkonservierten modularen Aufbau, der sich auch in der Domänenstruktur der Proteine widerspiegelt. Die MMPs werden deshalb sowohl aufgrund ihrer Struktur, wie auch ihrer Substratspezifität klassifiziert. Bis auf wenige Ausnahmen besteht die Grundstruktur aller MMPs aus einem Signalpeptid, dem Propeptid, der katalytischen Domäne und der Hemopexindomäne (Visse and Nagase, 2003). Das Signalpeptid am Aminoterminus ermöglicht den Transport der MMPs an die Plasmamembran, wo sie zumeist als inaktives Proenzym sezerniert werden. Das Propeptid am Aminoterminus enthält eine hochkonservierte Sequenz mit einem





**Abb 1: Die Domänenstrukturen der humanen MMPs.**

Die MMPs werden aufgrund ihrer Struktur und Substratspezifität eingeteilt und unterscheiden sich durch zusätzliche Domänen von der Grundstruktur. Als Besonderheiten weisen die Matrilysine und Typ II-Transmembran-MMPs keine Hemopexindomänen auf. Die Furin-aktivierten sekretierten MMPs besitzen wie alle membranassoziierten MMP eine spezifische Furin-Schnittstelle. Die membranassoziierten MMPs werden nach den Domänen, die sie in der Membran verankern unterteilt (Ala-Aho and Kahari, 2005).

ungepaarten Cysteinrest (PRCGVPD), der an das Zink-Atom im katalytischen Zentrum bindet. Durch Proteolyse, Oxidation, denaturierende Verbindungen und

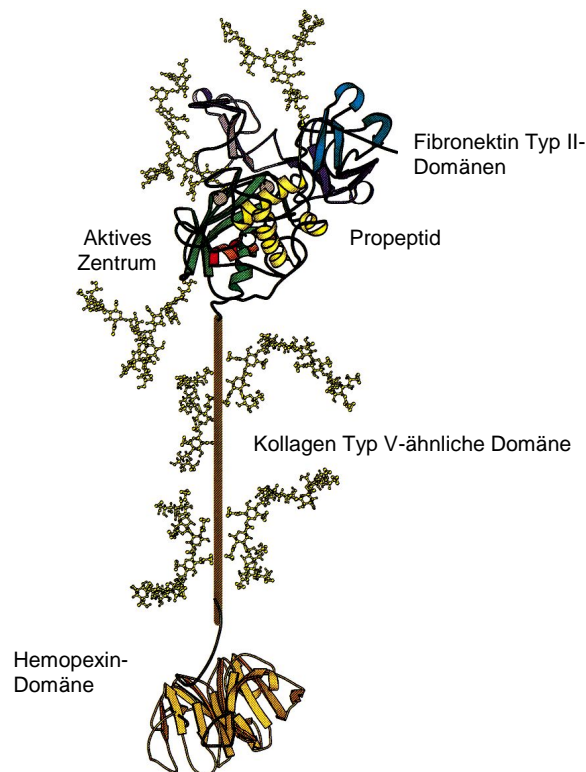
andere Einflüsse kann eine Konformationsänderung der 3-D-Struktur des Propeptids erreicht werden, was die Bindung des Cysteins an das Zink-Atom auflöst (*cystein switch*). Dies führt durch Autokatalyse zur Abspaltung des Propeptids und damit zur Freigabe des katalytischen Zentrums, in dem das Zink-Atom in einem konserviertem Motiv über 3 Histidinreste (HEXXHXXGXXH; X=variable Aminosäure) koordiniert ist. Die Aktivierung der meisten MMPs wird *in vivo* vermutlich durch eine Kaskade proteolytischer Reaktionen unter Beteiligung von MMPs und Serinproteasen bewerkstelligt. Schon vor der Sekretion können MMPs, die eine Furin-Schnittstelle aufweisen, durch Furin und ähnliche Proteasen intrazellulär im Golgi-Apparat aktiviert werden (Nagase, 1997). An die katalytische Domäne ist über einen flexiblen Linker (*hinge region*) die carboxyterminale Hemopexindomäne gebunden deren Funktion hauptsächlich in der Substratbindung besteht.

Die MMPs werden allgemein durch 3 Hauptmechanismen reguliert: Transkription, Aktivierung des Proenzym und Hemmung der Aktivität durch endogene Inhibitoren (Chakraborti et al., 2003).

### **1.3 Die Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9)**

Die Gelatinasen, MMP-2 und MMP-9, nehmen innerhalb der MMP-Familie eine besondere Stellung ein, bezeichnenderweise befinden sich die Gene beider Enzyme nicht im Cluster der anderen MMP-Gene. Das Gen von MMP-9 ist auf dem Chromosom 20 lokalisiert (20q12-13), hat eine Länge von 7,7 kb und ist in 13 Exons angeordnet. Die davon transkribierte 2,3 kb lange mRNA codiert ein Protein von 704 Aminosäuren (Huhtala et al., 1991). Ein Vergleich der Primärstrukturen von Gelatinasen mit denen anderer MMPs zeigt die Besonderheit dieser Enzyme. MMP-2 und MMP-9 tragen innerhalb der katalytischen Domäne eine Insertion von drei Fibronectin Typ II-Modulen. Zusätzlich besitzt MMP-9 zwischen dem katalytischem Zentrum und der Hemopexindomäne eine offenbar flexible, prolinreiche Kollagen Typ V ähnliche Sequenz (Wilhelm et al., 1989). Dieser Teil trägt O-glykosidisch gebundene Zuckerreste, die das Enzym vermutlich stabilisieren und vor Degradation schützen. Drei weitere Oligosaccharide sind über eine N-glykosidische Bindung mit der Prodomäne und dem aktiven Zentrum von

MMP-9 verknüpft (Rudd et al., 1999). Durch die posttranslational gebundenen Zuckerreste beträgt das Molekulargewicht des Proenzymes ungefähr 94 kDa, während ein Molekül ohne Glykosylierung einer Größe von 78 kDa entspricht. Neben der monomeren Form kann MMP-9 in verschiedenen Komplexen vorliegen. Über eine Disulfidbrücke können zwei MMP-9-Moleküle ein Dimer mit einer Größe von ca. 200 kDa bilden. Häufig aber bildet die Proform von MMP-9 einen nicht-kovalenten Komplex mit dem endogenen Inhibitor TIMP-1, der hierbei an die Hemopexindomäne bindet (Goldberg et al., 1992). Vor allem in den Vesikeln der neutrophilen Granulozyten geht MMP-9 eine kovalente Bindung mit dem Protein NGAL ein (neutrophil gelatinase B-associated lipocalin) (Yan et al., 2001b).



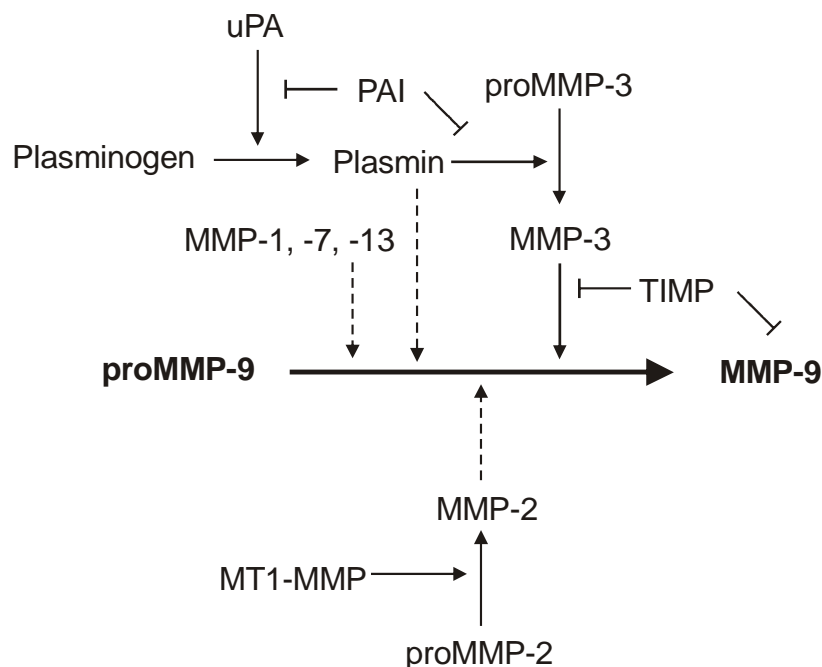
**Abb. 2: Struktur von MMP-9.**

Die vorhergesagte Struktur von MMP-9 wurde abgeleitet aus der Struktur von MMP-2 (Morgunova et al., 1999). Die Kollagen Typ V-ähnliche Domäne, drei N-glykosidische und 4 von 14 möglichen O-glykosidisch gebundenen Zuckerresten wurden eingefügt (Opdenakker et al., 2001).

## 1.4 Aktivierung und Inhibition von MMP-9

Die MMP-9 wird als latentes Proenzym sekretiert und *in vivo* durch spezifische Spaltung des Propeptids aktiviert. Von MMP-1, -2, -3, -7 und -13, sowie von Plasmin kann die 94 kDa-Proform von MMP-9 zu einer aktiven Form von 83 kDa umgesetzt werden. Diese Reaktion kann von MMP-3 alleine oder schrittweise von 2 verschiedenen der oben genannten Proteasen durchgeführt werden. Auch andere Endopeptidasen wie Trypsin, Chymotrypsin oder Kathepsin G können MMP-9 prozessieren, was zu aktiven Formen mit unterschiedlichen Molekulargewichten zwischen 80 kDa bis 65 kDa führt (Nagase, 1997). An der Aktivierung von MMP-9 *in vivo* sind vermutlich mehrere Proteasen beteiligt, die sich in einer Kaskade gegenseitig aktivieren (siehe Abb. 3) (Ramos-DeSimone et al., 1999). Da beobachtet wurde, dass MMP-9 *in vitro* sogar durch Bindung eines Substrats aktiviert werden kann, könnten noch weitere physiologische Mechanismen der MMP-9 Aktivierung existieren (Bannikov et al., 2002).

Die Aktivität der MMP-9 kann durch Bindung eines der 4 TIMPs, den natürlichen MMP-Inhibitoren, an das katalytische Zentrum blockiert werden. Durch den



**Abb. 3: Aktivierung der MMP-9.**

Die Übersicht zeigt proteolytische Kaskaden, die an der Aktivierung von MMP-9 *in vivo* beteiligt sein können. Plasmin könnte beispielsweise auch MMP-1, -7 und -13 prozessieren und somit zur Aktivierung von MMP-9 beitragen (uPA = Urokinase Plasminogen Aktivator; PAI = Plasminogen Aktivator Inhibitor). Durchbrochene Linien zeigen an, dass diese Proteasen MMP-9 vermutlich nicht alleine aktivieren können.

spezifischen Komplex, den TIMP-1 mit der Hemopexindomäne von MMP-9 eingeht, wird jedoch die Bindung von TIMP-1 an das katalytische Zentrum beschleunigt (O'Connell et al., 1994). Die MMP-9-Aktivität kann auch von dem multivalentem Proteaseinhibitor  $\alpha$ 2-Makroglobulin, dem  $\beta$ -Amyloid-precursor-Protein und dem Membranprotein RECK inhibiert werden (Van den Steen et al., 2002).

## 1.5 Substrate und Funktionen der MMP-9

MMP	Substrate	
	Proteine der EZM	Andere Proteine
MMP-1/Kollagenase-1	Kollagen I/II/III/VII/X/XI, Gelatin, Entactin, Aggrecan, Fibronectin, Laminin, Tenascin, Vitronectin	Perlecan, IGFBP-2/3, ProTNF- $\alpha$ , $\alpha$ 1-AC, $\alpha$ 2-MG, $\alpha$ 1-PI
MMP-2/Gelatinase A	Kollagen I/III/IV/V/VII/X/XI, Gelatin, Elastin, Fibronectin, Laminin, Aggrecan, Tenascin, Decorin, Vitronectin	TGF- $\beta$ , TGF- $\beta$ 2, IL-1 $\beta$ , MCP-3, SDF-1, IGFBP-3/5, TNF- $\alpha$ , FGF-R1, $\alpha$ 1-AC, $\alpha$ 1-PI
MMP-3/Stromelysin-1	Kollagen III/IV/V/VII/IX/X/XI, Elastin, Laminin, Fibronectin, Gelatin, Aggrecan, Entactin, Decorin, Tenascin, Vitronectin	Perlecan, HB-EGF, IL-1 $\beta$ , Plasminogen, E-cadherin, IGFBP-3, TNF- $\alpha$ , $\alpha$ 1-AC, $\alpha$ 2-MG, $\alpha$ 1-PI
MMP-7/Matrilysin	Kollagen I/IV, Aggrecan, Laminin, Fibronectin, Gelatin, Entactin, Decorin, Elastin, Tenascin, Vitronectin	FASL, $\beta$ 4 integ rin, E-cadherin, HB-EGF, Plasminogen, TNF- $\alpha$ , $\alpha$ 1-PI,
MMP-8/Kollagenase-2	Kollagen I/II/III, Aggrecan	$\alpha$ 2-MG, $\alpha$ 1-PI
MMP-9/Gelatinase B	Kollagen IV/V/XI/XIV/XVIII, Decorin, Gelatin, Elastin, Laminin, Aggrecan, Vitronectin, Fibrinogen, Fibrin	TGF- $\beta$ 2, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-2R $\alpha$ , IFN- $\beta$ , ICAM-1, IGFBP, IL-8, GRO- $\alpha$ , PF-4, CTAP-III, SDF-1, CXCL5, 6, 9, 10, KiSS-1, Kit-ligand, $\alpha$ 1-AC, $\alpha$ 2-MG, $\alpha$ 1-PI, MMP-2, -13, plasminogen
MMP-10/Stromelysin-2	Kollagen III/IV/V, Aggrecan, Elastin, Laminin, Fibronectin, Gelatin	nicht bekannt
MMP-11/Stromelysin-3	nicht bekannt	IGFBP-1, $\alpha$ 2-MG, $\alpha$ 1-PI
MMP-12/Metalloelastase	Kollagen I/IV, Aggrecan, Decorin, Gelatin, Elastin, Fibronectin, Laminin, Vitronectin, Entactin	Plasminogen, $\alpha$ 2-MG, $\alpha$ 1-PI
MMP-13/Kollagenase-3	Kollagen I/II/III/VI/IX/X/XIV, Gelatin, Fibronectin, Aggrecan	$\alpha$ 2-MG
MMP-14/MT1-MMP	Kollagen I/II/III, Gelatin, Fibronectin, Laminin, Entactin, Vitronectin, Aggrecan	CD44, transglutaminase, $\alpha$ 2-MG, $\alpha$ 1-PI
MMP-15/MT2-MMP	Aggrecan, Entactin, Fibronectin, Laminin, Tenascin	Transglutaminase
MMP-16/MT3-MMP	Kollagen III, Fibronectin, Gelatin	Transglutaminase
MMP-17/MT4-MMP	Gelatin	$\alpha$ 2-MG, TNF- $\alpha$

**Tabelle : Die wichtigsten Substrate der MMPs.**

IGFBP = Insulin Like Growth Factor Binding Protein, HB-EGF = Heparin Bound Epidermal Growth Factor,  $\alpha$ 1-AC =  $\alpha$ 1-Antichymotrypsin,  $\alpha$ 2-MG =  $\alpha$ 2-Makroglobulin,  $\alpha$ 1-PI =  $\alpha$ 1-Proteinase Inhibitor (Lynch and Matrisian, 2002).

Da sich die Substratspektren der MMPs weitgehend überschneiden, sind diese Enzyme vermutlich in vielen Funktionen redundant. Wie viele andere MMPs kann MMP-9 eine Reihe von strukturellen Proteinen der EZM abbauen (siehe Tabelle). Jedoch besitzen nur die Gelatinasen, MMP-2 und MMP-9, die Fibronectin Typ II-ähnlichen Domänen (siehe Abb. 2) und damit die Möglichkeit Kollagen Typ IV effektiv zu binden und abzubauen (Olson et al., 1998). Das Kollagen Typ IV ist Hauptbestandteil der Basalmembran (BM), die Epithel- und Endothelzellen von interstitiellem Gewebe abgrenzt und somit für die Zellmigration eine Barriere darstellt. Dies ist von besonderem Interesse bei der Invasion und Metastasierung von Tumorzellen, die ebenfalls durch die BM in das umliegende Gewebe einwandern, weshalb die Degradation der BM durch MMP-2 und MMP-9 hierbei eine Schlüsselfunktion einnimmt (Stetler-Stevenson et al., 1993).

Andererseits bauen auch hier die MMPs die EZM nicht unkontrolliert ab, da für die Migration Adhäsionspunkte benötigt werden. Zum Beispiel kann MMP-9 durch spezifische Spaltung von Kollagen Typ IV Epitope freilegen, an die die Zellen über Integrine während der Invasion binden, was ebenso für die Metastasierung von Bedeutung ist (Hangai et al., 2002). Zusätzlich werden bei der Degradation von Proteinen aus der EZM gebundene Wachstumsfaktoren und Zytokine freigesetzt. Einige dieser Faktoren sind durch spezielle Bindeproteine inaktiviert oder liegen in der Proform vor und können durch die MMPs aktiviert werden (Egeblad and Werb, 2002).

Einige weitere Substrate von MMP-9 zeigen, dass dieses Enzym auch regulatorische Funktionen auf das Immunsystem ausübt. So können die CXC-Chemokine GRO- $\alpha$ , CTAP-III und PF-4 durch MMP-9 abgebaut werden, wogegen die Prozessierung von IL-8 dessen Wirkung steigert (Van den Steen et al., 2000). Ebenso kann MMP-9 das membrangebundene proTNF- $\alpha$  (Schonbeck et al., 1998) und aktives TGF- $\beta$  (durch Proteolyse des TGF- $\beta$ -bindenden Proteins) freisetzen (Yu and Stamenkovic, 2000). MMP-9 ist auch in der Lage, die Interaktionen von Zellen zu beeinflussen, indem es Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 (Fiore et al., 2002) und Endothelin (Fernandez-Patron et al., 2001) spaltet. Durch `shedding` mittels MMP-9 wird zudem der Rezeptor IL-2R $\alpha$  inaktiviert, was wie viele der hier

genannten Funktionen mit einer Unterdrückung der Immunantwort durch Tumorzellen im Zusammenhang steht (Sheu et al., 2001).

Eine weitere Funktion ist die Regulation der Angiogenese, auf die MMP-9 durch die Freisetzung von VEGF einen stimulierenden Einfluss hat (Bergers et al., 2000). Andererseits setzt MMP-9 bei der Prozessierung von Plasmin, Kollagen Typ IV und Kollagen Typ XVIII auch die Angiogenese-Inhibitoren Angiostatin (Patterson and Sang, 1997), Tumstatin (Hamano et al., 2003) und Endostatin (Ferrerias et al., 2000) frei, die ebenso für die Blutgefäßbildung essentiell sind. Diese zahlreichen und unterschiedlichen Substrate verweisen auf die sehr komplexen und verschiedenen Funktionen von MMP-9.

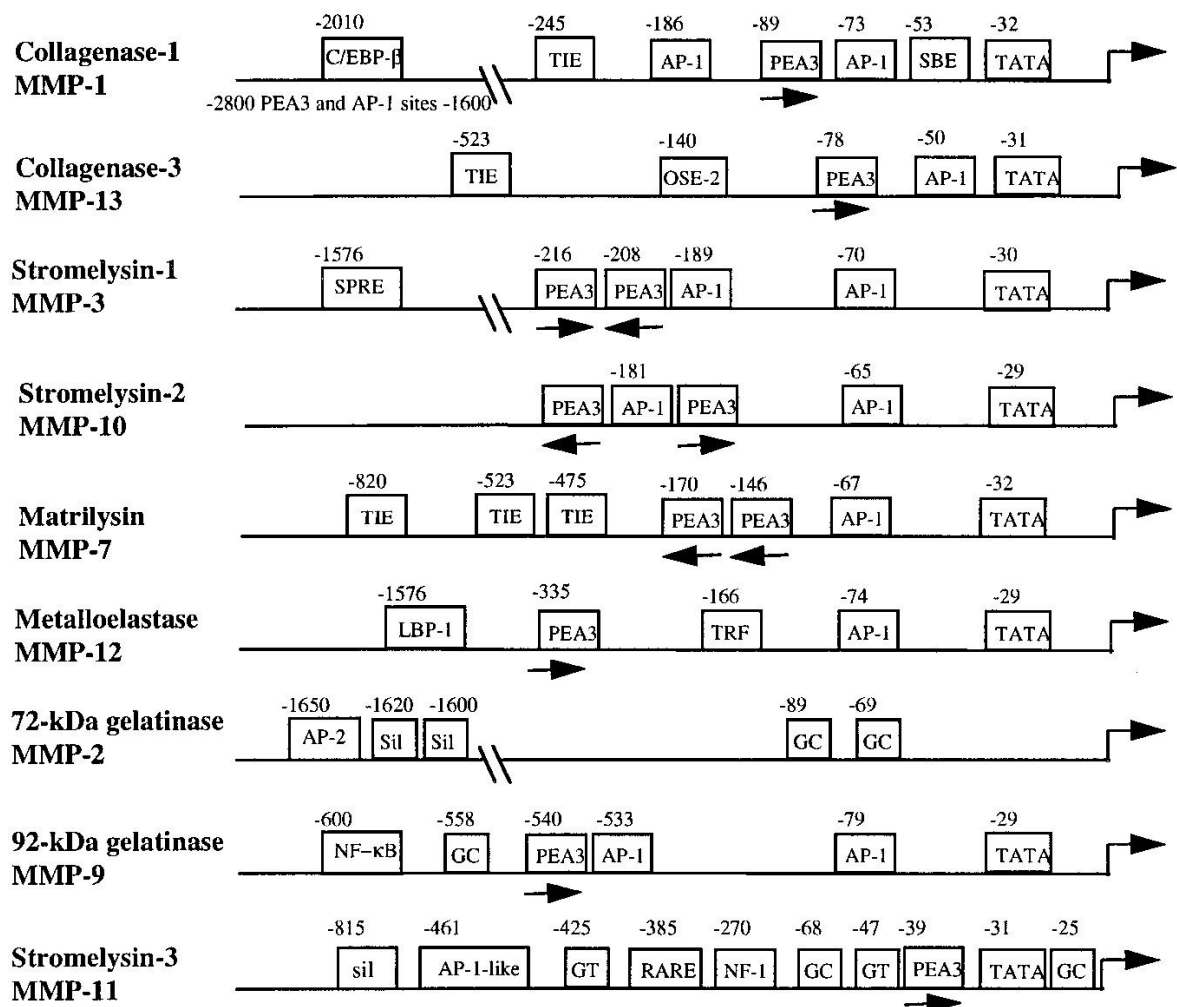
## **1.6 Regulation der MMP-9-Genexpression**

Im allgemeinen wird MMP-9, wie die meisten anderen MMPs nur in geringen Mengen von unstimulierten Zellen produziert. Mit Ausnahme der neutrophilen Granulozyten, die MMP-8 und MMP-9 in Vesikeln speichern und nach Stimulation sezernieren, werden die MMPs meist zelltypspezifisch durch die Aktivierung der Transkription reguliert und unmittelbar nach ihrer Translation sekretiert. Zu den wichtigsten physiologischen Stimulatoren der MMP-9-Transkription zählen viele Zytokine und Wachstumsfaktoren wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PDGF, TGF- $\alpha$ , EGF, bFGF und NGF. Im Gegensatz dazu sind mit TGF- $\beta$  und IFN $\alpha$  nur wenige reprimierende Faktoren bekannt (Van den Steen et al., 2002).

Im Promotor von MMP-9 liegen zahlreiche Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren, die die Genexpression regulieren können. Mit den AP-1-Promotor-Elementen an den Positionen -533 und -79 liegen gleich zwei Bindungsstellen für den wichtigen Transkriptionsfaktor AP-1 vor, der durch Zytokine und Wachstumsfaktoren aktiviert wird (Westermarck and Kahari, 1999). Die AP-1-Komplexe setzen sich aus Homo- oder Heterodimeren der Transkriptionsfaktoren Jun (c-Jun, JunB, JunD), Fos (c-Fos, Fra-1, Fra-2, FosB) oder ATF (ATF1-4, ATF6, ATFx, B-ATF) zusammen, wobei die jeweilige spezielle Zusammensetzung für unterschiedliche Affinitäten und Effekte verantwortlich gemacht wird. Die

Spezifität dieser Faktoren wird vermutlich durch Protein-Kinasen und Interaktionen mit Kofaktoren reguliert (Karin et al., 1997).

Unmittelbar neben einem AP-1-Element befindet sich mit dem PEA3-Element (-540) eine Bindungsstelle für ETS-Transkriptionsfaktoren. Die Faktoren der ETS-Familie sind Helix-Turn-Helix-Proteine, die meist als Monomere an die DNA binden und als Koaktivatoren mit anderen Transkriptionsfaktoren kooperieren. Auch die ETS-Proteine werden über Signaltransduktionen von Wachstumsfaktoren aktiviert und das Zusammenspiel von spezifischen AP-1- und ETS-Transkriptionsfaktoren gilt als essentiell für die induzierte Genexpression von MMP-9 (Gum et al., 1996). Sowohl im Promotor von MMP-9 wie auch von anderen



**Abb 4: Vergleich der MMP-Promotoren.**

Die regulatorischen Elemente AP-1 und PEA3 sind in den Promotoren für eine vollständige Aktivierung der MMP-Expression essentiell, wobei vermutlich die Entfernung der Elemente voneinander ebenfalls eine Rolle spielt (aus Westermarck und Kähäri, 1999).



induzierbaren MMPs bilden die benachbarten Elemente AP-1 und PEA3 die zentrale Stelle der Genregulation (siehe Abb. 4). Ebenfalls scheint für die Aktivierung des Promotors dabei der Abstand zwischen diesen Elementen von Bedeutung zu sein (Crawford and Matrisian, 1996).

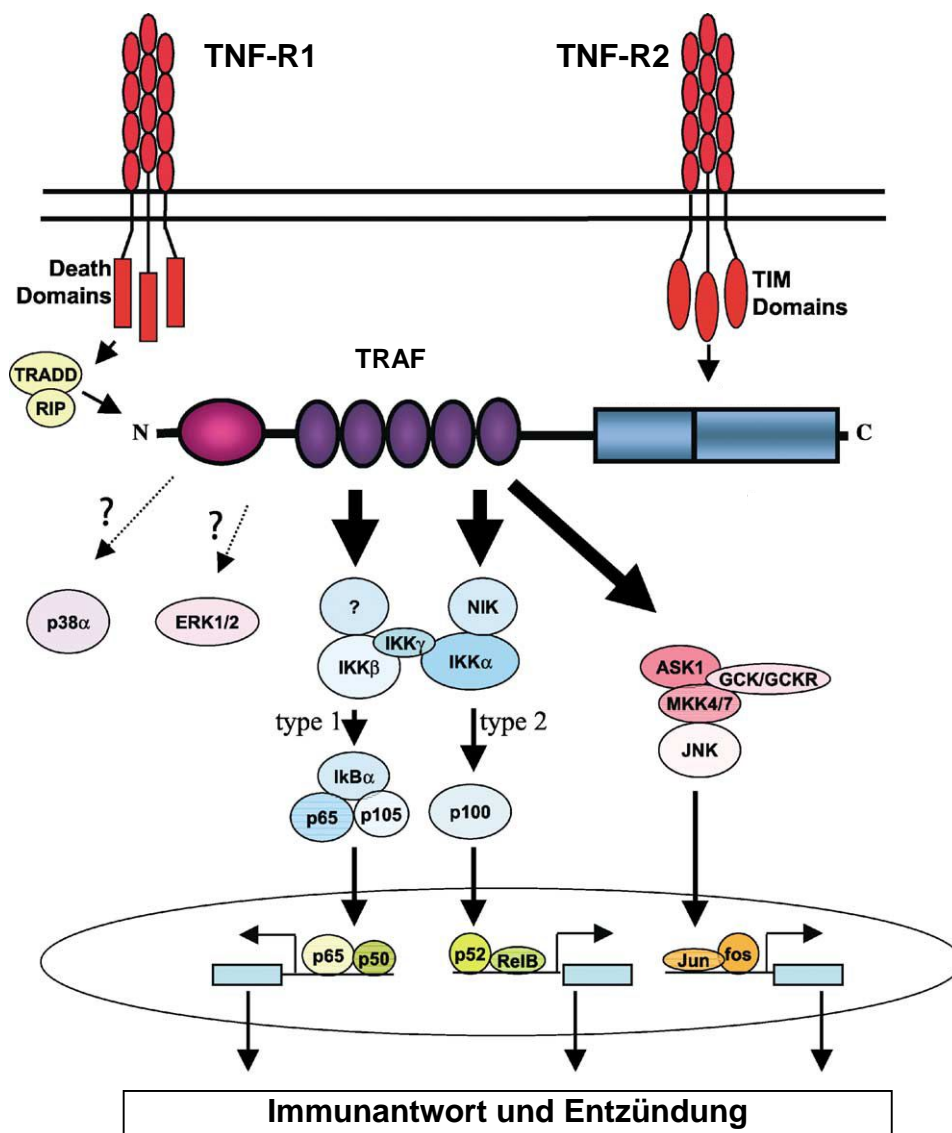
Darüber hinaus ist im MMP-9-Promotor eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B (-600) vorhanden. Dieser Faktor wird hauptsächlich durch eine TNF- $\alpha$ - oder IL-1 $\beta$ -induzierte Signaltransduktion aktiviert und trägt ebenfalls zur Stimulation des MMP-9-Promotor bei (Sato and Seiki, 1993). Eine Beteiligung konnte zudem durch Inhibition der Signaltransduktion von NF $\kappa$ B und Hemmung der MMP-9 mRNA-Expression nachgewiesen werden (Yan et al., 2001a), wobei hier auch die Histonacetylierung eine Rolle spielen dürfte (Yan et al., 2002). Zwar genügte ein Minimalpromotor mit nur einem proximalem AP-1-Element, um die TNF- $\alpha$ -stimulierte Expression zu vermitteln, doch ist wahrscheinlich die Kooperation der Elemente AP-1, PEA3 und NF $\kappa$ B für eine vollständige TNF- $\alpha$ -induzierte MMP-9-Promotoraktivität notwendig (He, 1996).

Im Gegensatz zur relativ ähnlichen Proteinstruktur unterscheiden sich die Promotoren von MMP-2 und MMP-9 erheblich. Das Fehlen der entsprechenden regulatorischen Elemente im MMP-2 Promotor ist die Ursache dafür, dass MMP-2 meist nicht von Zytokinen wie TNF- $\alpha$  reguliert wird. Vielmehr wird in vielen Zellen MMP-2 konstitutiv exprimiert, was auf die für *housekeeping genes* typischen GC-Elemente zurückgeführt wird.

## 1.7 TNF- und die Rezeptoren TNF-R1 und TNF-R2

Das Zytokin TNF- $\alpha$  spielt eine zentrale Rolle in der Immunantwort und wird hauptsächlich von Monozyten und aktivierten Makrophagen nach einer Entzündung, Infektion oder Verletzung produziert. Das Wirkungsspektrum von TNF- $\alpha$  reicht vom Auslösen der Apoptose, über Differenzierung von Zellen bis zur Aktivierung und Migration von Leukozyten (McDermott, 2001). TNF- $\alpha$  ist der bekannteste Vertreter einer Familie von 17 verschiedenen Zytokinen und wird als Typ 2-Membranprotein (proTNF- $\alpha$ ) produziert. Dies kann von der Metalloprotease ADAM-17 (*TNF- Converting Enzyme, TACE*) gespalten und so freigesetzt

werden. Freies TNF- $\alpha$  aktiviert als Trimer ausschliesslich den TNF-Rezeptor 1 (TNF-R1), der seltener aber auch durch membrangebundenes proTNF- $\alpha$  stimuliert werden kann. Im Gegensatz dazu bindet und aktiviert proTNF- $\alpha$  hauptsächlich TNF-R2. TNF-R2 unterstützt aber auch die Aktivierung von TNF-R1, indem der TNF-R2 freies TNF- $\alpha$  ohne Aktivierung bindet und an den TNF-R1 weitergibt (*ligand passing*) (Vandenabeele et al., 1995; Hehlhans and Mannel, 2002). Neben diesen vielfältigen Möglichkeiten der Aktivierung durch TNF- $\alpha$  unterscheiden sich die beiden TNF-Rezeptoren in den intrazellulären Domänen.



**Abb 5: Aktivierung der Signaltransduktionen durch TNF- .**

Die TNF-Rezeptoren 1 und 2 vermitteln über Interaktion mit den Adapterproteinen TRAF die Induktion der Signaltransduktionen von JNK und NF $\kappa$ B. Wie die TNF-Rezeptoren die Aktivierung von p38 und ERK1/2 ermöglichen, sowie die Beteiligung der TRAF ist bisher noch nicht geklärt (aus Dempsey et al., 2003).

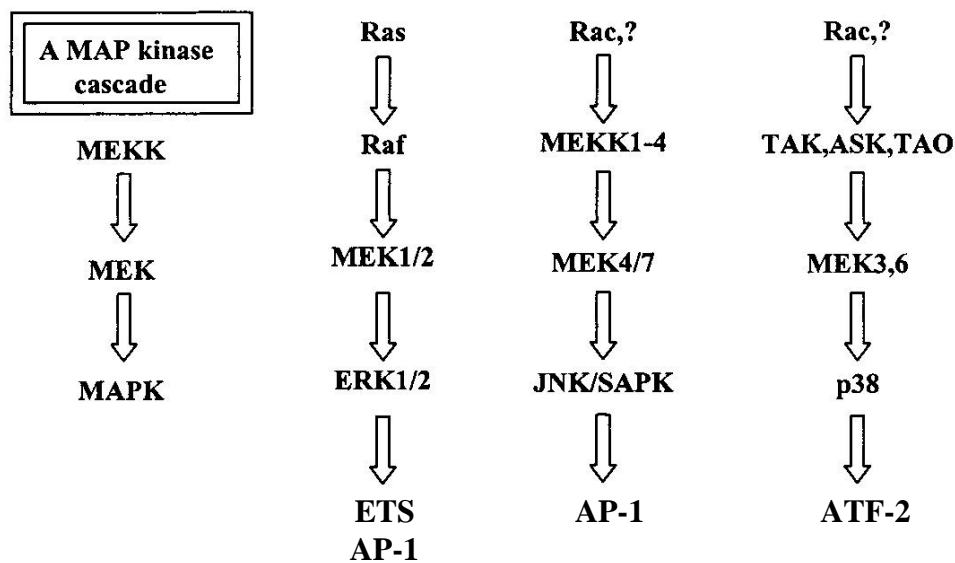
TNF-R1 enthält eine intrazelluläre *death domain* (DD) und TNF-R2 besitzt ein *TRAF-interacting motif* (TIM). Trotz der unterschiedlichen Domänen können beide Rezeptoren die Adaptermoleküle TRAF (TNFR associated factor) binden und die Signaltransduktionen von NF $\kappa$ B, sowie der MAPK aktivieren (siehe Abb. 5) (Dempsey et al., 2003).

## 1.8 Die Regulation von NF $\kappa$ B

NF $\kappa$ B erfüllt wichtige Funktionen bei der Regulation der Apoptose und aktiviert zahlreiche Gene, die mit Entzündungsprozessen zusammenhängen (Dempsey et al., 2003). Der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B liegt im inaktiven Zustand im Zytosol als Komplex mit dem inhibitorischen Protein I $\kappa$ B vor und wird hauptsächlich durch TNF- $\alpha$  aktiviert. Sowohl TNF-R1 wie auch TNF-R2 können die Kinasen NIK (NF $\kappa$ B Inducing-Kinase) und IKK (I $\kappa$ B Kinase) aktivieren. Das Protein I $\kappa$ B wird von diesen Kinasen phosphoryliert, daraufhin ubiquitiniert und durch das Proteasom degradiert (Mercurio and Manning, 1999). Der freie Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B kann darauf als Homo- oder Heterodimer in den Zellkern gelangen und dort an spezifische Promotorelemente binden, um die Transkription zu regulieren. Die Familie der NF $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren beinhaltet u.a. p50 und p52 (die aus den Proteinen p105 bzw. p100 prozessiert werden) und die Faktoren p65 (RelA), RelB und c-Rel (siehe Abb. 5).

## 1.9 Die MAPK-Signaltransduktionen

In allen eukaryotischen Organismen regulieren die MAPK wichtige zelluläre Prozesse wie z.B. Differenzierung und Proliferation. Die MAPK sind dabei zentrale Effektoren von Signaltransduktionen, die durch Zytokine, Wachstumsfaktoren und andere Stimuli ausgelöst werden. In diesen Signalketten sind jeweils drei Proteinkinasen nacheinander in Kaskaden angeordnet (siehe Abb. 6), die meistens nach Stimulation einer Rezeptor-Tyrosinkinase über G-Proteine (Ras, Rac) aktiviert werden (Chen et al., 2001). Die MAPK werden durch spezifische zweifache Phosphorylierung an dem charakteristischen Motiv T-X-Y aktiviert. Zu



**Abb. 6: Die Signaltransduktionen der MAPK-Kaskaden.**  
 (Abkürzungen siehe Verzeichnis Seite 4) (aus Chen et al., 2001).

ihren Substraten zählen sowohl zytoplasmatische, wie nukleäre Proteine (Lewis et al., 1998). Mittels Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, was zur DNA-Bindung und Promotoraktivierung führt, regulieren die MAPK die Genexpression. Die Anordnung von mehreren Kinasen in Kaskaden erlaubt dabei eine Amplifikation und genaue Regulierung des Signals (Robinson and Cobb, 1997). An der Signaltransduktion sind darüber hinaus noch Verbindungsproteine beteiligt, die Translokation und Spezifität regulieren (Pearson et al., 2001). Obwohl die MAPK-Module aus strukturell ähnlichen Komponenten aufgebaut sind, vermitteln sie weitgehend unterschiedliche biologische Funktionen. Drei MAPK-Signaltransduktionswege, benannt nach den zentralen Effektorproteinen ERK1/2, p38 und JNK wurden bisher im Detail charakterisiert und werden nachfolgend kurz beschrieben:

### 1.9.1 ERK

Die ERK1/2-Signaltransduktion ist sehr häufig aktiviert und hauptsächlich mit Proliferation, aber auch mit vielen anderen Prozessen verbunden. Die Kaskade dieser Kinasen wird meist ausgelöst durch Wachstumsfaktoren, die über die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren die ubiquitär exprimierte Kinase Raf-1 aktivieren. Diese Kinase phosphoryliert MEK1/2, welche ausschließlich ERK1/2 durch eine

Phosphorylierung der Reste Tyrosin 204 und Threonin 202 aktiviert. Wie alle MAPK kann ERK1/2 seine Substrate sowohl an Serin- wie Threoninresten phosphorylieren. Zu den mehr als 50 bekannten Substraten von ERK1/2 zählen Kinasen, zytosolische Proteine und die Transkriptionsfaktoren Elk-1, c-Fos und c-Jun. MEK1/2 und ERK1/2 sind häufig und in einem ungefähr äquimolaren Verhältnis vorhanden, weshalb nur die Aktivierung von MEK1/2 eine Amplifikation des Signals darstellt. In fast allen bisher untersuchten Zelllinien ist ERK2 stärker exprimiert als ERK1, was aber keine Auswirkung auf die Funktion hat, da ERK1 und ERK2 redundant sind (English et al., 1999). Eine essentielle Beteiligung der ERK1/2-Signaltransduktion an der Expression von MMP-9 und anderen MMPs wurde bereits in vielen Studien gezeigt (Westermarck and Kahari, 1999).

### **1.9.2 p38**

Die Kinase p38 ist Teil einer Signaltransduktion, die häufig mit Entzündungen verbunden ist und durch TNF- $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  aktiviert werden kann. Von den 4 Isoformen (p38 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ ) werden  $\alpha$  und  $\beta$  ubiquitär exprimiert, wogegen  $\gamma$  nur im Skelettmuskel und  $\delta$  in diversen Organen während der Embryonalentwicklung vorkommt. Die Aktivierung von p38 erfolgt durch spezifische Phosphorylierung mittels MEK3/6. Die Aktivierung von MEK3/6 selbst scheint allerdings auch durch Kinasen der JNK-Signaltransduktion möglich zu sein. Die Substrate von p38 sind neben der Kinase MAPKAP-2 vor allem die Transkriptionsfaktoren wie ATF-2, Elk-1 und SAP-1. Interessanterweise unterstützt p38 $\alpha$  durch eine Phosphorylierung von Histon 3 die Rekrutierung von NF $\kappa$ B an Promotoren. Eine wichtige Funktion von p38 ist auch die Regulation der Transkriptionsrate und die Stabilität der TNF- $\alpha$  mRNA (Kyriakis and Avruch, 2001). Eine Beteiligung von p38 an der PMA-stimulierten Expression von MMP-9 und der Aktivierung von AP-1-Transkriptionsfaktoren konnte bereits nachgewiesen werden (Simon et al., 2001). Deshalb könnte p38 auch bei der physiologischen Promotoraktivierung von MMP-9 durchaus eine Rolle spielen.

### **1.9.3 JNK**

Ähnlich wie p38 wird der Signaltransduktionsweg von JNK hauptsächlich durch die Zytokine der TNF-Familie, aber auch durch Stress und UV-Strahlung aktiviert. Die drei Gene JNK  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  codieren für mindestens zehn Splicevarianten dieser Kinase, die sich vermutlich geringfügig ein wenig in der Substratspezifität unterscheiden. Jedoch tragen alle Isoformen von JNK das gleiche Motiv, an dem sie von MEK4/7 durch Phosphorylierung an Tyrosin- und Threoninresten aktiviert werden. Substrate von JNK sind der Transkriptionsfaktor c-Jun (dessen N-terminales Ende phosphoryliert wird), ATF-2 und c-fos. Durch die JNK-aktivierten Transkriptionsfaktoren werden meist Gene aktiviert, die in Zytokin-Biosynthese, Immunantwort und Entzündungs-Reaktionen involviert sind. Welche Bedeutung JNK für die Regulation von MMP-9 hat zeigt, dass nach Inhibition von JNK die PMA-stimulierte MMP-9-Expression in Korrelation mit der Aktivität von c-Jun reduziert wurde (Shin et al., 2002).

Die Signaltransduktionswege von JNK und p38 sind allerdings nicht klar voneinander abzugrenzen, da auch über beide Wege die Kinasen MEK4/7 und MEK3/6 phosphoryliert werden können. Diese Signaltransduktionen sind oft unter den gleichen physiologischen Bedingungen aktiviert und werden deshalb manchmal als miteinander interagierend, parallel, redundant oder komplementär angesehen (Kyriakis and Avruch, 2001).

## **1.10 Vorkommen und Bedeutung von MMP-9 für Physiologie und Pathophysiologie**

### **1.10.1 Vorkommen von MMP-9**

Die MMP-9-Expression wurde zuerst nur in neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen gefunden, konnte später aber auch in weiteren Zelltypen wie Fibroblasten, Chondrozyten und T-Lymphozyten detektiert werden. Auffälligerweise konnte MMP-9 zudem in vielen transformierten Zellen sowie in Leukämie- und Tumorzelllinien nachgewiesen werden.

Wichtige physiologische Funktionen hat MMP-9 in Prozessen der Ovulation, der Embryonalentwicklung, der Wundheilung und der Immunantwort. Die verzögerte

Bildung der Blutgefäße und Knochen in MMP-9<sup>-/-</sup> Mäusen weisen auch auf eine Funktion in der Angiogenese sowie beim Aufbau und der Resorption der Knochen hin (van den Steen, 2001).

Eine erhöhte Expression und Beteiligung von MMP-9 wurde ausserdem bei Krankheiten wie Arthritis (Malemud et al., 2003), multipler Sklerose (Opdenakker et al., 2003), verschiedenen Leukämien und in verschiedenen Tumoren (Klein et al., 2004) gezeigt.

### **1.10.2 Bedeutung von MMP-9 in der Tumorbilogie**

Aufgrund der Überexpression vieler MMPs in Tumorgeweben ist deren Funktion für die Behandlung von Krebserkrankungen von besonderem Interesse. Meist ist die Überexpression der MMPs mit einer hohen Aggressivität des Tumors und einer schlechten Prognose assoziiert. Besonders bei Lungenkarzinomen, dem malignen Melanom und dem kolorektalen Karzinom ist eine stark erhöhte Bildung von MMP-2 und MMP-9 zu beobachten. Auch im Pankreas- und Blasenkrebs geht eine hohe MMP-9-Expression mit einem Rückfall einher, weshalb MMP-9 als diagnostischer und prognostischer Marker diskutiert wird (Vihinen and Kahari, 2002). In verschiedenen *in vitro*- und *in vivo*-Modellen wurde durch Antisense-Oligonukleotide sowie durch MMP-Inhibitoren eine Hemmung der Invasion und Metastasierung erreicht, womit die MMPs auch als Zielfaktoren einer wirksamen Therapie erkannt wurden (Overall and Lopez-Otin, 2002).

Vor allem durch den Abbau der BM aufgrund der Typ IV Kollagenaseaktivität wurde MMP-9 mit der Invasion von Tumorzellen und der Metastasierung in Zusammenhang gebracht. Experimente mit MMP-9-defizienten Mäusen bestätigten weiter, dass besonders im frühen Stadium der Tumorentstehung bei der Schaffung einer wachstumsfördernden Umgebung MMP-9 eine wichtige Rolle zukommt (siehe auch Abschnitt 1.5) (McCawley and Matrisian, 2001). Dazu gehört vor allem die Induktion von neuen Blutgefäßen (Neoangiogenese), die essentiell für die Versorgung des Tumors sind und somit entscheidend zum Tumorwachstum beitragen. Daran ist MMP-9 nicht nur, wie bereits erwähnt, am Umbau der BM beteiligt, sondern ermöglicht durch die Prozessierung von regulatorischen Proteinen wie VEGF, Angiostatin und Tumstatin, die Koordinierung der Angio-

genese (Pepper, 2001). Darüber hinaus wird vermutet, dass MMP-9 durch Prozessierung von TGF- $\beta$  und den Abbau verschiedener Chemokine die Immunantwort unterdrücken kann. Auch das *shedding* durch MMP-9 von Oberflächenproteinen wie ICAM-1 (das die Bindung von *Natural-Killer*-Zellen an Tumorzellen bewerkstelligt) und von IL-2R $\alpha$  behindert die Funktionen des Immunsystems (Egeblad and Werb, 2002).

Ursprünglich wurde die im Tumorgewebe verstärkte MMP-9-Sekretion den Tumorzellen selbst zugeschrieben, denen dadurch Invasion und Metastasierung ermöglicht wird. Schliesslich aber wurde festgestellt, dass ein Grossteil der MMP-9 im Tumor durch die Zellen des umgebenden Gewebes (Stroma) exprimiert wird, welche von Tumorzellen mit Wachstumsfaktoren und Zytokinen stimuliert werden (Itoh et al., 1999). Häufig sind Monozyten und Makrophagen, die in das Tumorgewebe einwandern die Hauptquelle von MMP-9. In einem Mausmodell wurde gezeigt, dass die Infiltration der Monozyten, für die MMP-9-Expression und Tumorprogression essentiell sind (Coussens et al., 2000). Zahlreiche Hinweise deuten auf einen engen Zusammenhang von Leukozyten-Infiltration, Entzündungs-Mechanismen und dem Wachstum maligner Tumore.

Eine zentrale Rolle nimmt dabei im Rahmen einer chronischen Entzündung die kontinuierliche Sekretion von TNF- $\alpha$  in einer niedrigen Konzentration ein. Im *in vitro*-Modell zeigte sich, dass die Invasion von Tumorzellen aufgrund der Makrophagen-Stimulation abhängig ist von der TNF- $\alpha$ -induzierten MMP-Expression (Hagemann et al., 2004). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass viele der bisherigen Untersuchungen auf eine wichtige Rolle von MMP-9 in verschiedenen Schritten der Tumorprogression deuten.

### **1.10.3 Therapiestrategien durch Inhibition der MMPs**

Aufgrund der verschiedenen MMPs und deren Redundanz wurden anfangs Breitspektrum-MMP-Inhibitoren in der Behandlung von Tumorerkrankungen erprobt. Trotz der positiven vorklinischen Ergebnisse konnten diese Inhibitoren im allgemeinen bei Patienten mit fortgeschrittenen Krebserkrankungen keine Verbesserung erzielen (Coussens et al., 2002). Spätere Untersuchungen im Mausmodell zeigten sogar eine erhöhte MMP-9-Expression und Metastasierung als Folge der



Behandlung mit unspezifischen MMP-Inhibitoren. Diese Effekte waren im übrigen bei neu entwickelten Gelatinase-spezifischen Inhibitoren nicht erkennbar, weshalb diese für zukünftige Studien vielversprechender erscheinen (Arlt et al., 2002). Die Steigerung der MMP-9-Expression durch Metalloproteinase-Inhibitoren weist aber auch auf die Bedeutung noch ungeklärter Mechanismen in der Regulation der MMP-9-Transkription hin.

Als eine wichtige alternative Strategie zur Hemmung der MMP-Aktivität wird deshalb die Inhibition der MMP-Synthese diskutiert. Die Transkription von MMP-9 wird, wie auch bei vielen anderen induzierbaren MMPs, hauptsächlich durch Stimulation mit Zytokinen und Wachstumsfaktoren reguliert (siehe Abschnitt 1.6). Eine Blockierung dieser extrazellulären Faktoren wie TNF- $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  durch neutralisierende Antikörper oder lösliche Rezeptoren sollte also in der Lage sein, die MMP-9 mRNA-Expressionen zu reduzieren. Eine weitere Möglichkeit, die MMP-9-Expression zu reprimieren, wäre mit der Zugabe von IFN- $\alpha$ , - $\beta$  oder - $\gamma$  ein Signal für die Hemmung der Promotoraktivität zu verabreichen. Diese Strategien sind allerdings sehr spezifisch auf ein Zielprotein hin ausgerichtet und könnten möglicherweise von den Tumorzellen umgangen werden. Ein vielversprechender Ansatz, die MMP-9-Produktion zu hemmen, wäre deshalb die Blockierung einer zentralen Signaltransduktion, z.B. MAPK oder NF $\kappa$ B, die die Induktion der MMP-9-Transkription vermittelt. Der große Vorteil läge darin einen zentralen Weg zu hemmen, der von vielen Zytokinen genutzt wird, die die MMP-9-Expression stimulieren können (Overall and Lopez-Otin, 2002).

## 1.11 Zielsetzung dieser Arbeit

Die MMP-9 ist an vielen Schritten der Tumorprogression wie Invasion, Metastasierung und Angiogenese beteiligt. Eine Inhibition der allgemeinen MMP-Aktivität stellte sich allerdings in der Therapie von Krebserkrankungen bisher als nicht wirksam heraus. Da im Vergleich zu gesundem Gewebe in vielen Tumoren MMP-9 deutlich überexprimiert ist, soll hier die spezifische Hemmung der MMP-9 Sekretion durch Eingreifen in die Signaltransduktion untersucht werden.

Die Hauptquelle von MMP-9 im Tumor stellen infiltrierende Monozyten und Makrophagen dar, die MMP-9 nach autokriner und exokriner Stimulation mit TNF- $\alpha$  exprimieren. Deshalb eignen sich als Zellmodell für eine *in vitro*-Untersuchung der regulatorischen Vorgänge vor allem Leukämiezelllinien, wie HL-60 und NB4, von denen bekannt ist, dass auch sie MMP-9 aufgrund einer autokrinen Stimulation durch TNF- $\alpha$  sezernieren. Ob dies ebenso auf die monozytäre Leukämiezelllinie THP-1 zutrifft, war bisher nicht bekannt. Primäres Ziel der vorliegenden Arbeit sollte es daher sein, zu klären, welche Signaltransduktionen die autokrin TNF- $\alpha$ -induzierte MMP-9-Expression in den THP-1 Zellen vermitteln und welchen Einfluss Inhibitoren der MAPK auf diese Proteinase-Expression ausüben

Da oft auch eine Aktivierung von NF $\kappa$ B mit einer TNF- $\alpha$ -Stimulation in Verbindung steht, war zudem zu prüfen, wie unter der Gabe eines Inhibitors gegen diesen Transkriptionsfaktor die MMP-9-Expression reguliert wird. Ausserdem sollte nach weiteren aktivierten Transkriptionsfaktoren gesucht werden, die mit der MMP-9-Expression korrelieren und für die Aktivierung des Promotors verantwortlich sein könnten.

Darüber hinaus sollte in einem *in vitro*-Invasionsmodell einem Zusammenhang von Regulation der MMP-9-Sekretion und der Invasion der THP-1 Zellen nachgegangen werden.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Geräte**

#### **Geräte in der Zellkultur**

Sterilbank HeraSafe (Heraeus Instruments)

Zellkulturbrutschrank Function line Typ BB16 (Heraeus Instruments)

Zentrifugen: Megafuge 1.0R (Heraeus Instruments)

    Biofuge pico (Heraeus Instruments)

    Universal 32 (Hettich Zentrifugen)

Inverses Mikroskop CK-2 (Olympus)

Epifluoreszenzmikroskop IX70 (Olympus)

Neubauer Zählkammer

#### **Ultraschall-Lanze**

Sonifier B-12, (Branson sonic power company)

#### **ELISA-Reader**

MPP 3408T Mikroplate Reader und Software zu Auswertung Mikrowin2000, Version 4.0 (Mikrotek Laborsysteme GmbH)

#### **Geräte für Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot**

XCell *SureLock*<sup>TM</sup> Mini-Cell (Invitrogen)

XCell II<sup>TM</sup> Blot Module (Invitrogen)

Amersham Pharmacia biotech power supply EPS 301, EPS 601

Inkubator UniHood (Uniequip)

Roller RM5 (Uniequip)

Taumler Polymax 1040 (Heidolph)

#### **Geräte für die Molekularbiologie**

Biophotometer (Eppendorf)

Thermomixer comfort (Eppendorf)

Elektrophoresekammer: Mini SUB Cell GT (BioRad)

2197 power supply (Bromma)

Twin-Vertical-Sequencegelapparat (Renner GmbH)

PTC-150 Minicycler™ (MJ Research)

LightCycler™ II (Roche)

### **Entwickler**

Entwickler Scopix LR5200 (Agfa)

### **Bilderfassungssystem**

Alle Gele und Filme wurden mit dem Image Scanner eingescannt und unter Verwendung der Software LabScan 3.0 (Amersham Pharmacia Biotech) analysiert.

## **2.2 Zelllinien**

Die Zelllinien THP-1, HL-60, NB4 und HT1080 wurden von Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen. Die HaCaT-Zelllinien II4-RT und A5 wurden freundlicherweise von Prof. Fusenig zur Verfügung gestellt.

### **THP-1**

Die THP-1 Zellen wurden aus dem peripheren Blut eines 1-jährigen Patienten mit akut monozytärer Leukämie (AML-M5) isoliert und aus 2 Zellklonen etabliert. Die Zelllinie wurde 1980 (Tsuchiya et al., 1980) erstmals beschrieben, ist nahezu diploid und trägt eine für diese Leukämie typische Translokation t(9; 11) (Odero et al., 2000). Die Zellen weisen neben Leukämie- auch Monozyten-typische Eigenschaften auf (Auwerx, 1991).

### **HL-60**

Die Zelllinie HL-60 wurde 1976 aus dem peripheren Blut einer 36-jährigen Patientin mit akuter Myeloblasten-Leukämie (AML-M2) etabliert (Gallagher et al., 1979). Die Zelllinie ist als weitgehend diploid charakterisiert worden (Volpi et al., 1996).

## **NB4**

Die NB4 Zelllinie entstammt dem Knochenmark einer 20-jährigen Patientin mit akuter Promyelozyten-Leukämie (AML-M3), (Lanotte et al., 1991). Die Zelllinie trägt die für die APL eine charakteristische Translokation t(15; 17), und der Karyotyp ist als weitgehend hypotetraploid mit einer Anzahl von 68 bis 90 Chromosomen beschrieben worden.

## **HT1080**

HT1080 ist eine humane Fibrosarkomazelllinie, die aus einer Tumorbiopsie eines 35 jährigen Patienten isoliert wurde (Rasheed et al., 1974).

## **HaCaT-Zellen: II4-RT und A5**

Die Zelllinie HaCaT besteht aus spontan immortalisierten aneuploiden Keratinozyten, die aus der Biopsie einer 62 jährigen Frau gewonnen wurden. Die Zelllinien II4-RT und A5 wurden durch stabile Transfektion der HaCat Zellen mit dem Onkogen c-Ha-*ras* erhalten (Boukamp et al., 1990). Im Mausmodell zeigte die Zelllinie A5 ein benignes, die Linie II-4RT ein malignes Verhalten, was mit einer niedrigen, bzw. hohen Kopienzahl des Gens c-Ha-*ras* korreliert.

## **2.3 Stimulantien**

Phorbol 12-Myristat-13-Acetat (PMA) (Sigma)

Tumor-Nekrosefaktor  $\alpha$ , rekombinant, human (TNF- $\alpha$ ) (PAN Systems GmbH)

Okadainsäure (Calbiochem)

## **2.4 Antikörper**

### **2.4.1 Einsatz in der Zellkultur**

Von der Firma R&DSystems wurden folgende neutralisierende Antikörper und Kontrollantikörper bezogen:

Monoklonaler Anti-hu-TNF- $\alpha$ Antikörper	(= Anti-TNF- $\alpha$ )
Monoklonaler Anti-hu-sTNF RI Antikörper	(= Anti-TNF-R1)
Monoklonaler Anti-hu-TNF RII/TNFRSF1B Antikörper	(= Anti-TNF-R2)

Isotypische Kontrollantikörper: Maus IgG<sub>1</sub>-Fraktion  
Maus IgG<sub>2A</sub>-Fraktion

## **2.4.2 Einsatz im Western Blot**

Folgende Antikörper der Firma Cell Signaling wurden benutzt:

Anti-Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) (E10)

Anti-p42 MAP Kinase (3A7)

Anti-Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)

Anti-Kaninchen-IgG, HRP-konjugierter Antikörper

Anti-Maus-IgG, HRP-konjugierter Antikörper

## **2.5 Inhibitoren**

### **2.5.1 Protease-Inhibitor**

Der TACE-Inhibitor Ro32-7315 wurde entwickelt von der Firma Roche (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. HW Krell, Roche) und inhibiert mit hoher Spezifität (IC<sub>50</sub> 5,2 nM) die Metalloproteinase ADAM-17 (TACE, TNF- $\alpha$  converting enzyme) (Beck et al., 2002).

### **2.5.2 Inhibitoren der intrazellulären Signaltransduktionswege**

Sämtliche Inhibitoren der Signaltransduktion wurden von der Firma Calbiochem bezogen:

#### **PD985059**

Dieses zellgängige Imidazolderivat ist ein selektiver, nicht mit ATP kompetitiver Inhibitor von MEK1/2, der die Phosphorylierung und Aktivierung von ERK1/2 blockiert (Alessi et al., 1995).

#### **SB202190 und SB203580**

Diese spezifischen Inhibitoren hemmen die Aktivität von p38, so dass die nachfolgenden Substrate wie ATF-2 oder MAPKAP-2 (MAPK-activated proteinkinase 2) nicht phosphoryliert werden können. In Monozyten und THP-1 Zellen wird die

LPS-induzierte Biosynthese von TNF- $\alpha$  durch diese Inhibitoren unterdrückt. Auch bei einer hohen Inhibitorkonzentration von 100  $\mu$ M werden die nah verwandten Kinasen JNK oder ERK1/2 nicht signifikant gehemmt (Lee et al., 1994).

### **SB202474**

Die Verbindung SB202474 stellt ein Strukturanalogon zu den eingesetzten Inhibitoren SB202190 und SB203580 dar und diente als Negativkontrolle (Lee et al., 1994).

### **L-JNK-Inhibitor Peptid 1(L-JNK-I1)**

Dieser Inhibitor besteht aus einer Domäne von 20 Aminosäuren des Proteins JIP-1/IB1, das die Interaktion von JNK und c-Jun komplett blockiert und dadurch die Aktivierung von Zielproteinen durch JNK hemmt. Dieses Peptid ist kovalent an 10 Aminosäuren des HIV-TAT<sub>48-57</sub> Proteins gebunden, wodurch die Zellgängigkeit des Inhibitors erreicht wird (Bonny et al., 2001).

### **L-JNK-Inhibitor Peptid 1, inaktives Kontrollpeptid**

Das Kontrollmolekül zu L-JNK-I1 besitzt nicht die Domäne des JIP-1/IB1 Proteins und besteht nur aus dem HIV-TAT<sub>48-57</sub> Peptid.

### **SN50**

Dieser Inhibitor enthält die Kernlokalisationssequenz der Untereinheit p50 des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B. Diese Sequenz inhibiert die Translokation des aktiven NF $\kappa$ B Komplexes in den Zellkern. Durch Bindung an eine hydrophobe Region wird dem Inhibitor die Zellgängigkeit verliehen (Lin et al., 1995).

### **SN50M, inaktives Kontrollpeptid**

In dem Kontrollpeptid SN50M befinden sich zwei Mutationen der Kernlokalisationssequenz (K363N und R364G), die eine Bindung des Moleküls an NF $\kappa$ B verhindern.

## 2.6 Puffer und Färbelösungen

Folgende Puffer und Färbelösungen wurden verwendet:

PBS:	0,8 % NaCl, 0,02 % KCl, 0,14 % Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,02 % KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Trypanblaulösung:	PBS pH 7,2 mit 0,5 % BSA und 2 mM EDTA, 0,5 % (v/v) Trypanblau
Elektrodenpuffer:	200 mM Tris-HCl, 1,9 M Glycin, 3,5 mM SDS; 1 mM NaN <sub>3</sub>
Zymographie Probenpuffer:	250 mM Tris-HCl pH 6,8, 40 % Glycerin, 280 mM SDS, 5 mg Bromphenolblau
Konservierungslösung:	5 % Glycerin, 20 % EtOH
PhastGel Blue R Tabletten (Pharmacia, 17-0518-01)	

Novex Zymogram Renaturing Buffer (10x) (Invitrogen, #LC2670)

Novex Zymogram Developing Buffer (10x) (Invitrogen, #LC2671)

NuPAGE™MOPS SDS Running Buffer (20x) (Invitrogen, #NP0001)

NuPAGE™ Transfer Buffer (20x) (Invitrogen, #NP0006)

NuPAGE™LDS Sample Buffer (4x) (Invitrogen, #NP0007)

NuPAGE™Sample Reducing Agent (10x) (Invitrogen, #NP0004)

## 2.7 Gebrauchsfertige Kits, Gele und Zymografien

ECL Western Blotting analysis systems, RPN 2108 (Amersham Pharmacia Biotech)

RNeasy Mini Kit (Quiagen)

RNase-free DNase Set (Quiagen)

1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)

LightCycler™-FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche)

NuPAGE™ Novex 4-12 % Bis-Tris Gel, Boxen # NP0321, NP0322, NP0323, NP0329 (Invitrogen)

Novex 10 % Zymogram (Gelatine) Gel, Boxen # EC6175, EC61752, EC61755 (Invitrogen)



## **2.8 Plastikwaren**

Einfrierampullen (Nunc)

Zellkulturplatten 6-, 12-, 24-, 48-well (Nunc)

Reagiergefäße: Microtubes 1,5 ml, 72.690 (Sarstedt)

Zentrifugenröhrchen: 15 ml, 62.554502 PP; 50 ml, 62.547.254 PP;

Gewebekulturflaschen mit Belüftungsfunktion: 25 cm<sup>2</sup>, 83.1810.002; 75 cm<sup>2</sup>, 83.1813.002; 175cm<sup>2</sup>, 83.1812.002 (Sarstedt)

UVette 0030 106.300 (Eppendorf)

## **2.9 Filme**

Amersham Hyperfilm (30 x 40 cm) RPN2104K

Hyperfilm™ ECLRPN3103K (Amersham Bioscience)

## **2.10 Zellkultur**

### **2.10.1 Kultivierung und Aufbewahrung der Zellen**

#### **Material:**

RPMI 1640-Medium mit L-Glutamin (PAA Laboratories), DMEM mit L-Glutamin (PAA), fötales Kälberserum (PAA Laboratories), L-Glutamin (Biochrom KG), Penicillin/Streptomycin (Biochrom KG), Plasmocin, Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % / 0,02 %) in PBS (Biochrom KG).

Die Zelllinien THP-1, HL-60 und NB4 wurden in RPMI 1640-Medium kultiviert, dem 10 % fötales Kälberserum (FKS), 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin-Streptomycin und 25 ng/ml Plasmocin zugesetzt war. Die Inaktivierung des im FKS enthaltenen Komplement erfolgte durch 30-minütiges Erhitzen auf 56°C. Für die Haltung der Stammkultur wurden die Zellen in einer Polystyrolflasche 12,5 cm<sup>2</sup> mit einer Zelldichte von ca.  $0,2 \times 10^6$  Zellen/ml ausgesät, im Brutschrank (Heraeus) bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> Partialdruck und Wasserdampfsättigung inkubiert und durch Zugabe von frischem Medium im Abstand von 3-4 Tagen im Verhältnis 1 : 5 passagiert.

Die adhärenenten Zelllinien HT1080, A5 und II4-RT wurden in DMEM mit 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin und 100 U/ml Penicillin-Streptomycin bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>-Partialdruck und Wasserdampfsättigung inkubiert. Die Zellen konfluent bewachsener Flaschen wurden durch Inkubation mit 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung für etwa 5 Minuten bei 37°C abgelöst. Die Zugabe von serumhaltigem Medium stoppte die Trypsinaktivität und die Vermehrung der Zellen erfolgte durch Verdünnung im Verhältnis von 1 : 6 mit frischem FKS-haltigen DMEM Medium.

In Gegenwart von Dimethylsulfoxid (DMSO) können Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren und über längere Zeit gelagert werden. Zum Einfrieren wurden die Zellen 8 Minuten bei 1200 rpm (Megafuge 1.0R; Heraeus) abzentrifugiert, in Einfriermedium (70 % RPMI 1640, 20 % FKS, 10 % DMSO) resuspendiert und in eine Einfrierampulle (Nunc) überführt. Anschließend wurden die Zellen bei -80°C über Nacht langsam abgekühlt und konnten danach bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Zellen, die wieder in Kultur genommen werden sollten,

wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, in RPMI 1640-Medium überführt und abzentrifugiert, um das im Einfriermedium enthaltene DMSO auszuwaschen. Das Zellpellet wurde in Medium mit 10 % FKS resuspendiert und für 5-10 Tage in einer Dichte von ca.  $0,5-1 \times 10^6$  Zellen/ml ausgesät, bis die Zellen wieder proliferierten.

### **2.10.2 Zellzahlbestimmung**

Um die lebenden von den toten Zellen zu unterscheiden, wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit 1 Volumen 0,5 % Trypanblaulösung (0,5 % w/v) (Sigma) gemischt. Trypanblau kann nicht in vitale Zellen gelangen, dringt aber in die toten Zellen ein und lässt diese im Lichtmikroskop dunkler erscheinen. Die Lebendzellzahl wurde in der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

### **2.10.3 Isolierung von CD14<sup>+</sup> Monozyten**

#### **Material:**

Zur Separation der Monozyten wurden von der Firma Miltenyi Biotec folgende Materialien bezogen: Magnetischer Zellseparator (MiniMACS), Säulenadapter, positive Selektionssäule (MACS), MACS kolloidale super-paramagnetische Microbeads konjugiert mit Maus Anti-hu-CD14 Antikörpern, Ficoll-Paque Lösung (Amersham Pharmacia).

#### PBS/BSA/EDTA:

PBS, 0,5 % BSA, 2mM EDTA.

Bei dieser Methode binden Anti-CD14-Antikörper, die mit kleinen Eisenpartikeln (Microbeads) verbunden sind spezifisch an CD14<sup>+</sup>-Zellen. In einem sehr starken Magnetfeld werden die mit Antikörpern markierten Zellen an einer Säule zurückgehalten und von den nicht markierten Zellen getrennt (Zahler et al., 1997). Zur Isolierung von Monozyten wurden je ca. 10 ml Blut aus mehreren gesunden Versuchspersonen entnommen, in EDTA-Röhrchen überführt, das EDTA-Vollblut mit PBS/BSA/EDTA im Verhältnis 1 : 5 verdünnt und damit eine Ficoll-Paque-Lösung überschichtet. Die mononukleären Zellen bildeten nach einer 20-minütigen Dichtegradienten-Zentrifugation bei 400 g und 20°C eine weiße Interphase (*buffy*

coat`)). Diese Schicht wurde abgenommen, mit 6 ml PBS/BSA/EDTA vermischt und bei 200 g für 10 Minuten zentrifugiert. Nach zweimaliger Wiederholung dieses Reinigungsschritts erfolgte die Inkubation von  $10^7$  Zellen in 80  $\mu$ l PBS/BSA/EDTA mit 20  $\mu$ l CD14-Microbeads für 15 Minuten bei 8°C. Die Zellen wurden in 500  $\mu$ l PBS/BSA/EDTA aufgenommen und auf eine im Magnetfeld befestigte äquilibrierte Selektionssäule gegeben. Das Magnetfeld hielt die CD14<sup>+</sup>-Zellen durch die gebundenen Microbeads an der Säule zurück, während die restlichen Zellen mit PBS/BSA/EDTA ausgewaschen wurden. Danach konnte die Säule aus dem Magnetfeld entnommen und die CD14<sup>+</sup>-Zellen mit 5 ml PBS/BSA/EDTA eluiert werden.

#### **2.10.4 Serumfreie Zellkultur, Stimulation der Zellen und Gewinnung von konditionierten Medien**

Zur Untersuchung der Zellen und für den Nachweis der MMP-9 sollten störende Einflüsse durch Komponenten des FKS wie Wachstumsfaktoren, Zytokine und Proteasen ausgeschlossen werden. Deshalb wurden die Zellen für alle Experimente unter serumfreien Bedingungen mit RPMI 1640-Medium, das 1 % Nutridoma, 2 mM L-Glutamin und 100 U/ml Penicillin-Streptomycin enthielt, kultiviert. Das Serum wurde durch Abzentrifugieren der Zellen und dreimaliges Waschen mit PBS entfernt, bevor die Inkubation der Zellen in einer Konzentration von  $1-2 \times 10^6$  Zellen/ml mit Stimulantien, Antikörpern oder Inhibitoren im serumfreien Medium erfolgte. Das konditionierte Medium wurde nach 24 Stunden geerntet, indem die Zellsuspension für 4 Minuten bei 4500 rpm (Biofuge pico, Heraeus) und 4°C abzentrifugiert und der Überstand abgenommen wurde.

## 2.10.5 Invasionsassay

### Material:

Matrigel™, humane EZM, Einsätze für 24-*well*-Platten (Porengröße 8 µm) (BD Biosciences)

Für Untersuchungen des Invasionsverhaltens von Zellen wurde die Membran von 24-*well*-Einsätzen mit Matrigel beschichtet, um *in vitro* eine Basalmembran (BM) nachzubilden. Matrigel ist ein löslicher Basalmembran-Extrakt, der aus Engelbreth-Holm-Swarm-Sarkomen von Mäusen gewonnen wird und enthält neben Kollagen Typ IV, weitere Proteine der EZM und Proteoglykane (Kleinman et al., 1982; Kleinman et al., 1986). Bei diesen Versuchen wurde auf die Oberfläche der Membran von 24-*well*-Einsätzen (BD, Durchmesser 9 mm, Porengröße 8 µm) jeweils 20 µg Matrigel pipettiert. Bei der Beschichtung war zu beachten, dass Matrigel nicht die Temperatur von 4°C übersteigt und vorzeitig geliert, weshalb Medien und Pipettenspitzen vorgekühlt werden mussten. Das Matrigel wurde bei 4°C aufgetaut, eine 1 µg/µl Stammlösung in serumfreiem RPMI 1640 Medium hergestellt und 20 µl davon vermischt mit 80 µl Nutridoma-haltigem Medium auf die Membran eines Einsatzes aufgebracht. Das Matrigel polymerisierte durch Trocknen der Zellkultureinsätze in der Sterilbank. Das Rehydrieren des Matrigels fand durch Zugabe von 200 µl serumfreiem Medium und einer 2-stündigen Inkubation bei 37°C statt. Der Überstand wurde danach abgenommen und jeweils 300000 Zellen wurden in 200 µl serumfreiem Medium in einen Einsatz, auf die rekonstituierte BM gegeben. In das *well* der Platte, wurden 600 µl RPMI 1640 Medium mit 2% Humanserum als chemotaktischer Zusatz eingesetzt. Um bei Verwendung von Kinase-Inhibitoren eine gleichbleibende Konzentration der Inhibitoren bzw. der entsprechenden Kontrollmoleküle während des Versuchs zu gewährleisten, waren diese jeweils in beiden Kompartimenten vorhanden. Nach 24 Stunden wurden die in das *well* gewanderten Zellen gesammelt und in der Neubauer-Kammer gezählt. Die Invasionsrate wurde als Quotient der gewanderten Zellen gegenüber den eingesetzten Zellen berechnet.

## 2.11 Molekularbiologische Methoden

### 2.11.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen

Für die Gewinnung der Gesamt-RNA wurden die Zellen bei 4°C für 4 Minuten bei 4500 rpm pelletiert und einmal mit kaltem PBS gewaschen. Die Isolierung der RNA aus den Zellen erfolgte unter Verwendung des RNeasy Mini Kit (Quiagen). Maximal  $5 \times 10^6$  Zellen wurden mit 350 µl Lysepuffer (mit 145 mM Mercaptoethanol versetzt) behandelt und auf eine QIAshredder spin column pipettiert. Eine 2-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm homogenisierte das visköse Lysat. Der Durchlauf wurde mit 1 Volumen 70%igem Ethanol vermischt und auf die RNeasy spin mini column gegeben. Die folgenden Schritte erfolgten nach den Angaben des Herstellers. Mit DNase I (RNase-free DNase Set, Quiagen) wurde die verbliebene DNA verdaut, um deren störende Amplifikation in der nachfolgenden quantitativen PCR zu vermeiden. Die RNA wurde anschließend mit RNase freiem Wasser von der Säule eluiert. Konzentration und Reinheit der RNA wurden UV-spektralphotometrisch durch Bestimmung der Absorption bei 260 nm beziehungsweise des Quotienten  $A_{260} / A_{280}$  gemessen.

### 2.11.2 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription der mRNA wurde 1 µg der isolierten Gesamt-RNA eingesetzt und die cDNA mit dem „*First strand cDNA-synthesis kit for RT-PCR (AMV)*“ (Roche) synthetisiert. Die cDNA-Synthese erfolgte in 1 x Reaktionspuffer, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, dNTP-Mix (je 1 mM) und 1,6 µg Oligo-p[dT]<sub>15</sub>, 50 Units Rnase Inhibitor und 20 Units AMV Reverse Transkriptase. Die Reaktionsansätze wurden mit sterilem Wasser auf 20 µl Volumen aufgefüllt, 10 Minuten bei 25°C für die Bindung der Primer und 1 Stunde bei 42°C für die reverse Transkription inkubiert. Die daran anschließende Denaturierung von 5 Minuten bei 95°C, sollte eine Störung durch die Reverse Transkriptase bei der folgenden Quantifizierung verhindern. Aliquots aus diesem Ansatz wurden in einer Verdünnung von 1 : 10 in die quantitative PCR eingesetzt.

### 2.11.3 Quantitative PCR

Die Quantifizierung der mRNA erfolgte mit dem LightCycler™ unter Verwendung von LightCycler™-FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche) und spezifischer LightCycler™-Primer-Sets (Search LC, Heidelberg). Für jeden Reaktionsansatz wurden in LightCycler™-Kapillaren 2 µl des Master-Mix, 2 µl Primer und 6 µl Wasser, sowie anschließend die Probe bzw. externer Standard oder Wasser zugegeben und mit sterilem Wasser auf 20 µl Volumen aufgefüllt. Das PCR-Protokoll bestand aus 10 Minuten bei 95°C zur Aktivierung der Hot Start Taq Polymerase (Kellogg et al., 1994) und Denaturierung der DNA, gefolgt von mindestens 35 Zyklen bestehend aus 10 Sekunden Denaturierung bei 95°C, 10 Sekunden Hybridisierung bei 68°C (target temperature), bzw. 58°C (secondary target temperature) und 16 Sekunden Amplifikation bei 72°C. Die Quantifizierung der vorhandenen DNA-Kopien beruhte auf der Messung der Fluoreszenz, die durch die Bindung des Farbstoffs SYBR Green I an doppelsträngige DNA entstand (Schneeberger et al., 1995). Die Quantifizierung der Expression von *housekeeping genes* (Cyclophilin B, GAPDH und G6PDH) wurde zur Normalisierung der Expression der Zielgene verwendet und diente zur internen Kontrolle der Effizienz der RT-PCR, sowie zum Abgleich der cDNA-Menge in den verschiedenen Proben. Das Ergebnis der relativen Quantifizierung der mRNA-Expression errechnete sich als Quotient aus der spezifischen Expression von Zielgenen zu *housekeeping gene* und wurde in Prozent zur unstimulierten Probe oder Kontrolle ausgedrückt.

### 2.11.4 Electrophoretic Mobility Gel Shift Assay (EMSA)

#### 2.11.4.1 Grundprinzip des EMSA

Diese Methode wurde angewandt, um aktivierte Transkriptionsfaktoren nachzuweisen, die in den Zellkern gelangen und an spezifische regulatorische Elemente der DNA binden können. Die Inkubation von Zellkernextrakten mit radioaktiv markierten doppelsträngigen Oligonukleotiden, die die Sequenz regulatorischer Elemente enthielten, ermöglicht die spezifische Detektion aktivierter Transkriptionsfaktoren.

Die Auftrennung von gebundenen und ungebundenen Oligonukleotiden erfolgte mittels PAGE. Die unterschiedlichen Laufstrecken der Oligonukleotide konnten

durch anschließende Autoradiographie detektiert werden (Lane et al., 1992; Ausubel, 1991; Stone and Hughes, 1991).

#### **2.11.4.2 Präparation und Markierung der Oligonukleotide**

##### **Material:**

##### 10 x Polynukleotidkinase-(PNK)-Puffer:

500 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 50 mM DTT, 1 mM Spermidin, pH 8,2.

##### 10 x Klenow-Puffer:

500 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, pH 7,5.

Klenow-Enzym, dGTP, dCTP, dTTP (Roche Diagnostics), alpha[P<sup>32</sup>]-dATP (Hartmann Analytik).

Für die Detektion von Transkriptionsfaktoren, welche an die Elemente AP-1, PEA3 und NFκB binden, wurden folgende Oligonukleotide verwendet. Die Konsensussequenzen sind jeweils unterstrichen:

##### **AP-1**

5`-GATCTGTGACTCAGCGCGAG-3`

5`-GATCTCGCGCTGAGTCACAG-3`

##### **NF B**

5`-GTTAGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3`

5`-GTTGCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT-3`

##### **PEA3**

5`-GATCTACAGGAAGTCGCGAG-3`

5`-GATCTCGCGACTTCCTGTAG-3`



Oligonukleotide, die AP-1- und NF $\kappa$ B-Faktoren binden wurden freundlicherweise zu Verfügung gestellt von Dr. Bachmeier (Abt. Klinische Chemie und Biochemie der Chirurgie, LMU München). Die Herstellung der PEA3 Sonde erfolgte aus 2 Einzelsträngen DNA (bezogen von der Fa. Invitrogen). Für die Zusammenlagerung der beiden Einzelstränge zu einer doppelsträngigen Sonde wurden 10  $\mu$ l 10 x PNK Puffer, jeweils 10  $\mu$ l der beiden Oligonukleotide mit einer Konzentration von 100 pmol/ $\mu$ l und 70  $\mu$ l aqua bidest. auf 98°C im Wasserbad erhitzt. Über Nacht wurde der Ansatz langsam im Wasserbad auf Raumtemperatur abgekühlt, wobei sich die Stränge zusammenlagerten (*Annealing*). Die erfolgreiche Hybridisierung der Sonde wurde mittels Elektrophorese in einem Agarosegel und darauffolgender Ethidiumbromid-Färbung der DNA überprüft.

Zur Markierung der Sonde wurden mit Klenow-Enzym die einzelsträngigen Überhänge mit dem radioaktiven Nukleotid alpha[P<sup>32</sup>]-dATP aufgefüllt. Für diese Reaktion wurden 2  $\mu$ l 10 x Klenow-Puffer, jeweils 2  $\mu$ l (500  $\mu$ M) der nicht-radioaktiven Nukleotide dGTP, dCTP und dTTP mit 1  $\mu$ l (100 ng) der Sonde, 1-2  $\mu$ l (10 mCi / ml) alpha[P<sup>32</sup>]-dATP, 1  $\mu$ l (2 U) Klenow-Enzym pipettiert und mit aqua bidest. auf ein Volumen von 20  $\mu$ l gebracht. Die Reaktion inkubierte für 30 Minuten bei 37°C und die Fällung der markierten Sonde fand mit 50  $\mu$ l EtOH (100 %) und 7  $\mu$ l LiCl (8 M) über Nacht bei -20°C statt. Nach 30-minütigem Zentrifugieren bei 15000 rpm und 4°C, wurde das Pellet mit EtOH (70 %) gewaschen, an der Luft getrocknet und in 50  $\mu$ l aqua bidest. aufgenommen. 1  $\mu$ l der radioaktiven Sonde wurde abgenommen und der Zerfall mit dem Counter gemessen. Für eine effiziente Reaktion sollte 1  $\mu$ l der Sonde zwischen 50000 und 100000 cpm aufweisen.

### 2.11.4.3 Herstellung von Zellkernextrakten

#### **Material:**

##### Puffer I:

0,5 % Nonidet P-40, 0,1 mM EDTA, 20 mM HEPES pH 7,9, 10 % Glycerin, 1 mM Dithiothreitol, 0,4 mM Phenylmethyl-Sulfonylfluoride (PMSF), 3 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin, 2 µg/ml Pepstatin.

##### Puffer II:

0,5 % Nonidet P-40, 0,4 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 20 mM HEPES pH 9, 10 % Glycerin, 1 mM Dithiothreitol, 0,4 mM (PMSF), 3 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin, 2 µg/ml Pepstatin.

Zur Gewinnung von Zellkernextrakten wurden  $5 \times 10^6$  Zellen in 2 ml serumfreien RPMI-1640 Medium zwischen 30 Minuten und 8 Stunden mit Kinase-Inhibitoren inkubiert. Sämtliche nachfolgenden Schritte erfolgten bei 4°C und unter Verwendung vorgekühlter Puffer. Die Zellen wurden 1 Minute bei 4500 rpm abzentrifugiert, das Pellet in 200 µl Puffer I resuspendiert, für 10 Minuten auf Eis inkubiert und die Zellkerne bei 1000 g für 10 Minuten pelletiert und der Überstand verworfen. Ein osmotischer Schock durch Zugabe von 100 µl Puffer II und eine 30-minütige Inkubation auf Eis lysierte die Zellkerne. Die so gewonnene Suspension wurde anschließend 10 Minuten bei 15000 g abzentrifugiert, der Überstand mit gelösten Kernproteinen aliquotiert und bei -80°C gelagert. Ein Aliquot der Kernextrakte wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Micro-BCA-Assay benutzt, um den Einsatz gleicher Proteinmengen zu gewährleisten.

#### 2.11.4.4 Herstellung der Polyacrylamidgele

**Material:**

10 x DBB Puffer:

250 mM Tris-HCl, 1,9 M Glycin, 10 mM EDTA, pH 8.

Rotiphorese Acrylamid, Gel 40, 29 : 1, TEMED, Ammoniumpersulfat (APS) (Roth). Zur Auftrennung wurde ein 5%iges Polyacrylamidgel mit folgender Zusammensetzung hergestellt: 5 ml Polyacrylamid, 4 ml 10 x DBB-Puffer, 31 ml aqua dest., 40 µl TEMED, 200 µl APS (10 %). Die Elektrophorese erfolgte in einer Twin-Vertical-Sequence-Gelkammer mit 1 x DBB Laufpuffer bei 4°C und nach 20 Minuten Vorlauf bei 20 mA.

#### 2.11.4.5 EMSA und Autoradiographie

**Material:**

4 x Bindungspuffer (Standard: für AP-1 bzw. PEA3):

28 mM HEPES, 400 mM KCl, 14,4 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,9.

4 x Bindungspuffer (NFκB):

88 mM HEPES, 280 mM KCl, 8,8 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,9 (pH jeweils mit KOH eingestellt).

poly [d(I-C)] (Roche)

Für einen Reaktionsansatz wurden 5 µl 4 x Bindungspuffer, 3 µl Glycerin (75 %), 1 µl poly[d(I-C)] [1 µg/µl], 3 bis 10 µg Kernextrakt, 1 µl der markierten Sonde (50000 - 100000 cpm) vermischt und für 20 Minuten auf Eis gestellt. Eine kompetitive Reaktion erfolgte durch Zugabe eines 10-fachen Überschusses an nicht-radioaktiver Sonde 15 Minuten vor Inkubation mit dem markierten Oligonukleotid. Das ganze Volumen von 20 µl eines Reaktionsansatzes wurde jeweils in eine Tasche auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Eine Tasche mit einem Marker (Bromphenolblau) befüllt, erlaubte die Kontrolle des Gellaufs, der bei 40 mA zwischen 3 und 4 Stunden dauerte. Danach wurde das Gel mit Hilfe eines Bogens

Whatmanpapier von der Glasplatte abgezogen und getrocknet. Die Detektion radioaktiver Signale erfolgte durch Exponieren eines Amersham Hyperfilm für 1-10 Tage bei -80°C und Entwicklung in einem Scopix LR 5200 (Agfa).

## **2.12 Proteinchemische Methoden**

### **2.12.1 Herstellung der Zelllysate zur Analyse phosphorylierter Proteine**

Zur Analyse der intrazellulären phosphorylierten Proteine, speziell der p38 und ERK1/2, wurden  $5 \times 10^5$  Zellen abzentrifugiert, mit 200µl NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4 x) (Invitrogen) vermischt und mittels Ultraschall lysiert. Alle Schritte wurden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt und die Extrakte bei -20°C gelagert.

### **2.12.2 Herstellung der Triton X-100 Zellextrakte**

#### **Material:**

#### TBS-Puffer:

50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4.

#### Lysepuffer:

TBS-Puffer; 1 % Triton X-100 Extrakt, 5 mM EDTA, 1 Tablette Complete™ Mini EDTA-free.

Zur Extraktion von intrazellulären und zellassozierten Proteinen wurden die Zellen bei 4500 rpm (3000 g) abzentrifugiert und mit kaltem TBS gewaschen. Die Lyse fand in 1 ml Lysepuffer/ $10^7$  Zellen für 30 Minuten bei 4°C unter gelegentlichem Vortexen statt. Die unlöslichen Bestandteile wurden bei 14000 g und 4°C für 10 min abzentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen, direkt verwendet oder bei -20°C eingefroren.

### 2.12.3 Reinigung der Gelatinasen

#### **Material:**

##### Waschpuffer:

50 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,02 % Brij35, pH 7,5.

##### Elutionspuffer:

50 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,02 % Brij35, 5 % DMSO, pH 7,5.

Gelatin Sepharose™ 4B (Amersham)

Die Reinigung der Gelatinasen beruht auf der selektiven Bindung des Substrats Gelatine. An Sepharose als Trägermatrix gebunden konnte die Gelatine verwendet werden um die Gelatinasen aus Zellextrakten zu reinigen (Masure et al., 1991; Opdenakker et al., 1991). Zu 100 µl Gelatine-Sepharose-Suspension wurden zweimal 1 ml Waschpuffer pipettiert und bei 13000 g für 1 Minuten abzentrifugiert. Nach Zugabe des Triton X-100 Extrakt von stimulierten Zellen zur Gelatine-Sepharose erfolgte die Inkubation über Nacht auf dem Roller bei 4°C. Danach wurde die Gelatine-Sepharose 1 Minute bei 3000 g abzentrifugiert und der Überstand mit den ungebundenen Proteinen abgenommen. Dreimaliges Waschen der Gelatine-Sepharose mit 1 ml Waschpuffer und eine 1-minütige Zentrifugation bei 3000 g entfernte nicht-spezifisch gebundene Proteine. Durch Zugabe von 100 µl Elutionspuffer und 10-minütiges Schütteln wurden die gebundenen Proteine eluiert. Mit der folgenden Zentrifugation bei 13000 g für 1 Minute wurde die Gelatine-Sepharose pelletiert, der Überstand abgenommen, in ein neues Tube überführt und bei -20°C eingefroren. Der Elutionsschritt wurde zweimal wiederholt.

### 2.12.4 Quantitative Proteinbestimmung

Die Quantifizierung von Proteinen mit der BCA-Methode beruht auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen durch Proteine in alkalischer Lösung. Durch eine Bindung der  $\text{Cu}^{+}$ -Ionen an Bichinonsäure (BCA) bildet sich ein Komplex aus, welcher eine starke Absorption bei 562 nm aufweist, die linear mit der Proteinkonzentration ansteigt (Smith et al., 1985; Wiechelman et al., 1988). Die Proben (Kernextrakte) wurden

1 : 5 verdünnt und in 96-well-Platten mit den Färbereagenzien im Verhältnis 1 : 1 nach den Angaben des Herstellers vermischt (Endvolumen 200 µl). Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C erfolgte die colorimetrische Messung im ELISA-Reader. Bei jeder Proteinbestimmung wurde zur Quantifizierung auf derselben Platte eine Eichkurve mit Albumin als Proteinstandard in Verdünnung von 1 µg/ml bis 1000 µg/ml erstellt.

### **2.12.5 Gelatine-Zymografie**

#### **Material:**

##### Probenpuffer:

250 mM Tris-HCl pH 6,8, 40 % Glycerin, 280 mM SDS, 5 mg Bromphenolblau).

##### Elektrodenpuffer:

200 mM Tris-HCl, 1,9 M Glycin, 3,5 mM SDS, 1 mM NaN<sub>3</sub>.

##### Färbelösung:

10 % Färbestocklösung PhastGel Blue R(Pharmacia), 30 % Methanol, 10 % Essigsäure.

##### Konservierungslösung:

5 % Glycerin, 20 % EtOH.

Novex Zymogram Renaturing Buffer (10 x)

Novex Zymogram Developing Buffer (10 x) (Invitrogen)

Um die gelatinolytischen Enzyme MMP-2 und MMP-9 zu messen, wurde die Technik der Zymografie angewandt. Zymogramme (Substrat-Gele) weisen nach elektrophoretischer Trennung proteolytische Aktivität proteinhaltiger Proben durch Spaltung von im Gel eingegossenen Substraten nach (Heussen and Dowdle, 1980). Die Spezifität wird durch das im Gel verwendete Substrat Gelatine erreicht, das nur die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 verdauen können. Die Proben dürfen bei der Zymografie nicht reduziert werden, da dies die Enzyme irreversibel denaturieren würde. Der Zellkulturüberstand wurde mit vierfach konzentriertem Probenpuffer vermischt und auf ein 0,1 % Gelatine enthaltendes 10%iges Tris-Glycin Polyacrylamidgel aufgetragen. Als Molekulargewichtsstandard diente

parallel aufgetragenes konditionierte Medium von PMA-stimulierten HT1080 Zellen. Die Elektrophorese dauerte 70 Minuten bei 200 V, 40 mA und 40 W. Danach wurde im Gel befindliches SDS unter leichtem Schütteln zweimal 15 Minuten lang mit 50 ml Renaturierungspuffer aus dem Gel ausgewaschen. Durch diese Behandlung erreichte man eine Wiederherstellung der Aktivität der aufgetrennten Gelatinasen und Aktivierung der Proenzyme durch eine SDS-bedingte Konformationsänderung. Im Anschluss daran wurde für 15 Minuten mit 50 ml Entwicklungspuffer gewaschen und über Nacht auf dem Schüttler bei 37°C in 50 ml Entwicklungspuffer inkubiert. Nach der Färbung der Gelatine im Gel durch 90 Minuten Inkubation mit 50 ml Färbelösung zeigte sich Gelatinase-Aktivität entsprechend durch proteolytisch abgebautes Substrat, sichtbar als helle lysierte Zone gegenüber einem dunklen Hintergrund. Danach wurde das Zymogramm in einer Konservierungslösung für 30 Minuten inkubiert, in Folien eingepackt und getrocknet.

### **2.12.6 Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)**

#### **Material:**

Novex 4-12 % Bis-Tris Polyacrylamid Gradientengel (Invitrogen)

NuPAGE™ MOPS SDS Running Buffer (Invitrogen)

Zur Detektion von intrazellulären Proteinen mussten die Zellysate (siehe Abschnitt 2.11.1) zuerst elektrophoretisch aufgetrennt werden. Dazu wurden 18 µl Lysat mit 2 µl 500 mM DTT versetzt und für 5 Minuten auf 99°C erhitzt, um die Disulfidbrücken durch Reduktion zu trennen und die Proteine vollständig zu denaturieren. Die Auftrennung der Proben erfolgte über ein Fertiggel unter Verwendung von NuPAGE™ MOPS SDS Running Buffer in einer Novex Minicell Gelkammer bei 300 V, 40 mA und 100 W für 70 Minuten (Gorg et al., 1980). Als Molekulargewichtsstandards wurden der `MagicMark™` (Invitrogen) und zur Kontrolle der Transfer-Effizienz der Pre-Stained Protein Low Standard (Gibco) aufgetragen.

## 2.12.7 Western Blot

### **Material:**

#### Stripping Buffer:

62,5 mM Tris-HCl, 2 % SDS, 100 mM 2-Mercaptoethanol, pH 6,7.

#### TBS-T:

137 mM NaCl, 20 mM Tris, 0,1 % Tween-20, pH 7,6.

NuPAGE™ Transfer Buffer.

Die Proteine bzw. Phosphorylierungen von p38 MAPK und p42/44 MAPK wurden mit den Antikörpern Anti-p42 MAPK, Anti-Phospho-p42/44 MAPK, Anti-phospho-p38 MAPK nachgewiesen. Dazu wurden die Proteine nach der Elektrophorese mit dem `XCell II Blot Module` in `NuPAGE™ Transfer Buffer`, der 10 % Methanol enthielt, 60 Minuten lang bei 40 V, 150 mA und 100 W auf eine mit Methanol aktivierte PVDF Membran (Millipore, Bedford, MA) transferiert. Die Sättigung aller freien Protein-bindungsstellen auf der Membran gelang durch Schütteln für eine Stunde in TBS-T-Puffer mit 5 % (w/w) Milchpulver (Blotting grade, Roth) (Hoffman et al., 1991). Nach kurzem Waschen der Membran mit TBS-T erfolgte die Inkubation mit den jeweiligen primären Antikörpern in einer Konzentration von 1 µg/ml in TBS-T für mindestens eine Stunde. Danach sollten unspezifisch gebundene Antikörper durch Schütteln für dreimal eine Minute und für zweimal 15 Minuten mit TBS-T abgewaschen werden. Darauf folgte eine Inkubation von 15 Minuten mit den 1 : 1000 in TBS-T verdünnten sekundären Antikörpern, an die Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war (ECL Systems, Amersham). Die Membran wurde wieder dreimal eine Minute und zweimal für 15 Minuten mit TBS-T gewaschen, bevor die Detektion mittels Chemilumineszenzfarbstoffen (ECL systems, Amersham) und durch Exponieren eines Röntgenfilms, je nach Signalstärke für 1 bis 15 Minuten, möglich war (Whitehead et al., 1979). Aufeinanderfolgende Detektion von mehreren Antigenen auf derselben Membran erfolgte nach dem Entfernen der Antikörper mit Stripping Buffer für 45 Minuten bei 50°C. Nach diesem Schritt und anschließendem Waschen in TBS-T konnten mit anderen primären Antikörpern weitere Antigene detektiert werden.



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Die basale MMP-9-Expression in THP-1 Zellen

Die akut myeloischen Leukämiezellen HL-60 und NB4 zeichnen sich durch eine konstitutive MMP-9-Sekretion aus, die durch eine autokrine TNF- $\alpha$ -Stimulation induziert wird (Ries et al., 1994; Ismail et al., 1998). Zunächst sollte nachgewiesen werden, ob die basale MMP-9-Produktion der THP-1 Zellen analog dazu ebenfalls durch autokrine TNF- $\alpha$ -Stimulation hervorgerufen wird. Hierfür wurden TNF- $\alpha$ -neutralisierende Antikörper (Anti-TNF- $\alpha$ ) verwendet, die die biologische Funktion des löslichen TNF- $\alpha$ , sowie die der membranständigen Form proTNF- $\alpha$  blockieren. Die THP-1 Zellen zeigten eine basale MMP-9 mRNA-Expression, die durch die TNF- $\alpha$ -neutralisierenden Antikörper konzentrationsabhängig gesenkt wurde. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen wurde die MMP-9 mRNA-Expression schon bei Zugabe von 0,01  $\mu\text{g/ml}$  Anti-TNF- $\alpha$  partiell reduziert und durch 10  $\mu\text{g/ml}$  Anti-TNF- $\alpha$  eine maximale Hemmung auf 20 % der ursprünglichen Expression erreicht (Abb. 7A). Dagegen lösten 10  $\mu\text{g/ml}$  des Kontrollantikörpers nicht nur keine Hemmung, sondern vielmehr eine leichte Stimulation der MMP-9 mRNA-Expression aus. Die Analyse der Zellkultur-Überstände in der Gelatine-Zymografie zeigte, dass in Übereinstimmung mit den mRNA-Daten durch die Neutralisierung von TNF- $\alpha$  auch die Proteinsynthese und -sekretion von MMP-9 konzentrationsabhängig reduziert wurde (Abb. 7B). Bereits 0,1  $\mu\text{g/ml}$  Anti-TNF- $\alpha$  inhibierte signifikant die MMP-9-Sekretion. Durch 1  $\mu\text{g/ml}$  Anti-TNF- $\alpha$  wurde die maximale

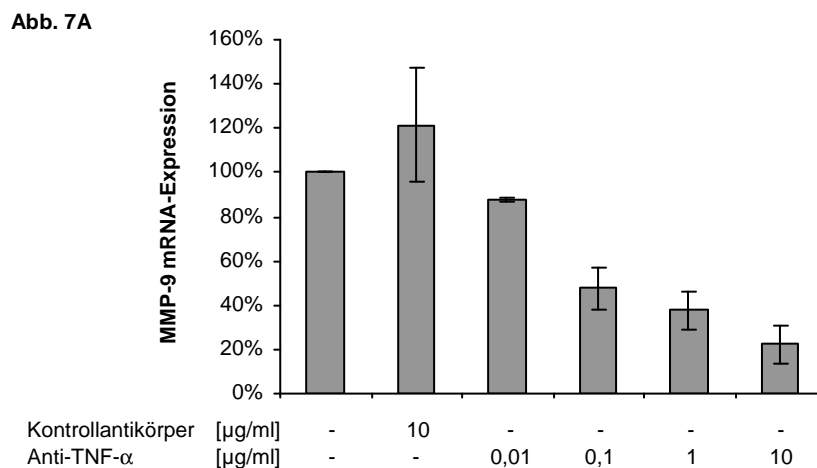
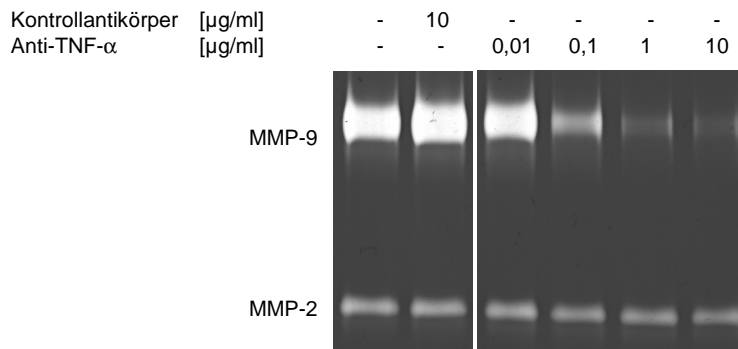


Abb. 7B



**Abb. 7: Analyse der MMP-9-Expression nach Neutralisierung von autokrinem TNF- $\alpha$  in THP-1 Zellen.**

THP-1 Zellen ( $1 \times 10^6/\text{ml}$ ) wurden unter serumfreien Bedingungen für 24 Stunden in Gegenwart oder Abwesenheit TNF- $\alpha$ -neutralisierender Antikörper (Anti-TNF- $\alpha$ ) oder mit unspezifischen Kontrollantikörpern in den angegebenen Konzentrationen kultiviert. **(A)** Aus den Zellen wurde die RNA isoliert und mittels qRT-PCR die MMP-9 mRNA-Expression gemessen und gegen Cyclophilin B (CPB) normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung einer Dreifachbestimmung eines von 3 unabhängigen Experimenten in Prozent zur unbehandelten Kontrolle (100%). **(B)** Zur Untersuchung der sekretierten Gelatinasen wurde ein 10  $\mu\text{l}$ -Aliquot der Kulturüberstände mittels Zymografie analysiert. (Detaillierte Ergebnisdarstellung im Text)

Hemmung der MMP-9-Proteinsekretion erreicht, wobei auch durch 10  $\mu\text{g/ml}$  Anti-TNF- $\alpha$  diese nicht vollständig gehemmt werden konnte. Wie in der Zymografie zu sehen ist, setzten die THP-1 Zellen zudem MMP-2 frei. Die MMP-2-Sekretion wurde jedoch im Gegensatz zu MMP-9 auch bei der höchsten Anti-TNF- $\alpha$ -Konzentration nicht beeinflusst. Dies zeigt die konstitutive Produktion von MMP-2 im Unterschied zur Regulation der MMP-9-Expression durch TNF- $\alpha$ . Die MMP-2-Expression kann deshalb als Kontrolle dafür dienen, dass während der Experimente generelle Mechanismen der Transkription, Translation und Sekretion nicht beeinträchtigt wurden.

### 3.2 Charakterisierung der autokrinen TNF- $\alpha$ -Stimulation

TNF- $\alpha$  vermittelt seine Funktionen über die Rezeptoren TNF-R1 und TNF-R2, die durch unterschiedliche Mechanismen aktiviert werden und auch verschiedene Signaltransduktionen auslösen können. Deshalb sollte mittels spezifisch neutralisierender Antikörper der an der autokrin stimulierten MMP-9-Expression, beteiligte Rezeptor identifiziert werden. Die Neutralisierung von TNF-R1 reduzierte die MMP-9 mRNA-Expression im Vergleich zu den unbehandelten Zellen auf

bis zu 60 % der unbehandelten Kontrolle. Dagegen zeigten die TNF-R2-neutralisierenden Antikörper auch bei maximaler Konzentration [25 µg/ml] keine signifikante Hemmung der MMP-9 mRNA-Transkription (Abb. 8A). Interessanterweise wiesen die Ansätze mit 1 µg/ml Anti-TNF-R1 oder Anti-TNF-R2 eine leichte Stimulation der MMP-9 mRNA-Expression auf. Durch die gleichzeitige Inhibition beider TNF-α Rezeptoren war, verglichen mit der Neutralisierung von

Abb. 8A

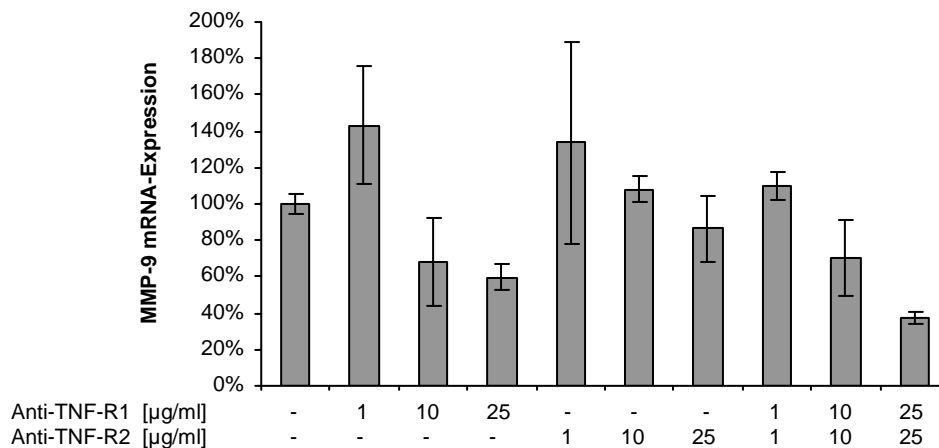
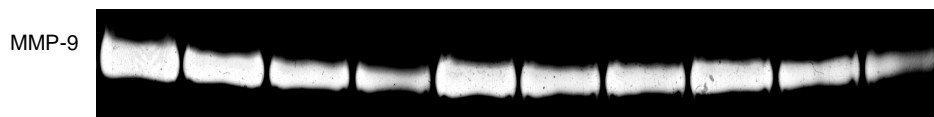


Abb. 8B

Anti-TNF-R1 [µg/ml]	-	1	10	25	-	-	-	1	10	25
Anti-TNF-R2 [µg/ml]	-	-	-	-	1	10	25	1	10	25



IgG1 [µg/ml]	-	1	10	25	-	-	-	1	10	25
IgG2A [µg/ml]	-	-	-	-	1	10	25	1	10	25

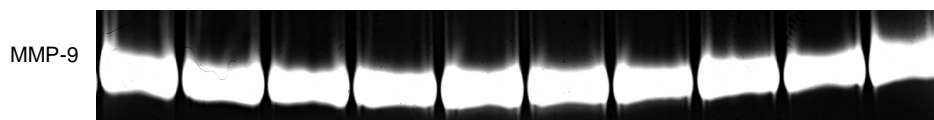


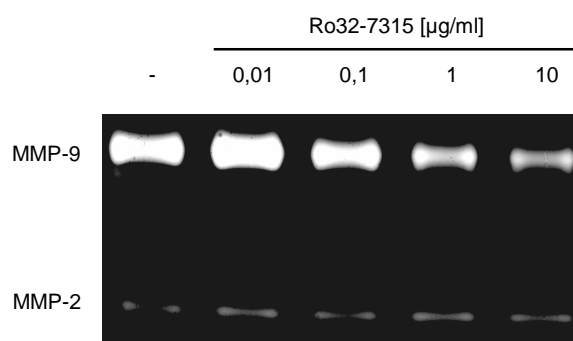
Abb. 8: Untersuchung der MMP-9-Expression nach Blockierung der TNF-Rezeptoren.

THP-1 Zellen ( $2 \times 10^6$ /ml) wurden für 24 Stunden mit den neutralisierenden Antikörpern gegen TNF-R1 (Anti-TNF-R1), TNF-R2 (Anti-TNF-R2) oder beiden Antikörpern zusammen versetzt. Zur Kontrolle wurden die Zellen unbehandelt oder mit isotypischen Kontrollantikörpern inkubiert. (A) Die MMP-9 mRNA wurde mit qRT-PCR gemessen und gegen CPB mRNA-Expression normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung aus einem repräsentativen von 3 unabhängigen Versuchen. (B) Die Zellkulturüberstände wurden 1:5 verdünnt und die Gelatinsesekretion mittels Zymografie analysiert. (Detaillierte Angabe der Ergebnisse im Text)

TNF-R1 alleine, eine stärkere Reduktion der MMP-9 mRNA-Expression auf 40 % festzustellen. Die Zymografie korrelierte auch hier mit den Daten der qRT-PCR: So senkten nur die Blockierungen von TNF-R1 sowie von TNF-R1 und TNF-R2 zusammen konzentrationsabhängig die MMP-9-Proteinsekretion (Abb. 8B, oberes Bild). Auch in diesem Experiment blieb bei Zugabe der Antikörper Anti-TNF-R1 und Anti-TNF-R2 die MMP-2-Sekretion unverändert. Eine Inkubation der Zellen mit Kontrollantikörpern hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die MMP-9- oder MMP-2-Proteinsynthese (Abb. 8B, unteres Bild).

Nachdem TNF-R2 alleine keinen signifikanten Effekt hatte, konnte auf eine nur indirekte Beteiligung von TNF-R2 (*ligand passing*) an der Aktivierung von TNF-R1 geschlossen werden. Diese Ergebnisse weisen auf TNF-R1 als den hier verantwortlichen Rezeptor hin, der sowohl durch freigesetztes TNF- $\alpha$  als auch von proTNF- $\alpha$  aktiviert werden kann.

Durch einen spezifischen TACE-Inhibitor sollte nun untersucht werden wie TNF-R1 in der autokrinen TNF- $\alpha$ -Stimulation aktiviert wird und die MMP-9-Expression vermittelt. Die Inkubation der THP-1 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des hochspezifischen TACE-Inhibitors Ro32-7315 reduzierte dosisabhängig die MMP-9-Freisetzung aus den Zellen während die MMP-2-Sekretion unverändert blieb (Abb. 9). Wie anhand der Trypanblaufärbung überprüft wurde, war auch die Vitalität der Zellen durch den Inhibitor in den eingesetzten Konzentrationen nicht beeinträchtigt. Die basale MMP-9-Produktion in THP-1 Zellen beruhte also auf Aktivität von TACE zur Freisetzung von TNF- $\alpha$ .



**Abb. 9: Auswirkung der Inhibition von TACE auf die MMP-9-Sekretion.**

THP-1 Zellen wurden in einer Dichte von  $1 \times 10^6$ /ml unter serumfreien Bedingungen für 24 Stunden unbehandelt oder mit verschiedenen Konzentrationen des TACE-Inhibitors Ro32-7315 inkubiert. Die Kulturüberstände wurden in der Zymografie auf gelatinolytische Aktivität untersucht. (Detaillierte Darstellung des Ergebnis im Text)

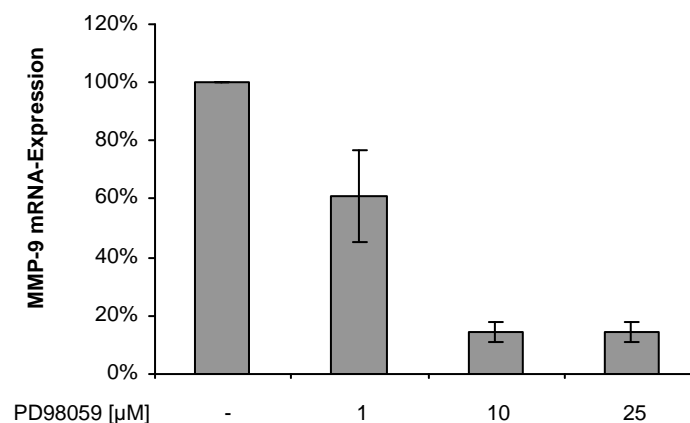
### 3.3 Untersuchungen zur Signaltransduktion der autokrin TNF- $\alpha$ -stimulierten MMP-9-Expression

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse können die THP-1 Zellen als Modell einer kontinuierlichen TNF- $\alpha$ -Stimulation angesehen werden. Anhand dieses Modells sollten nun die zugrunde liegenden regulatorischen Mechanismen einer autokrin TNF- $\alpha$ -induzierten MMP-9-Expression untersucht werden. Da die MAPK zentrale Vermittler von extrazellulären Stimuli darstellen, sollten mit Hilfe von Inhibitoren der MAPK die Signaltransduktionen identifiziert werden, welche an der MMP-9-Expression beteiligt sind.

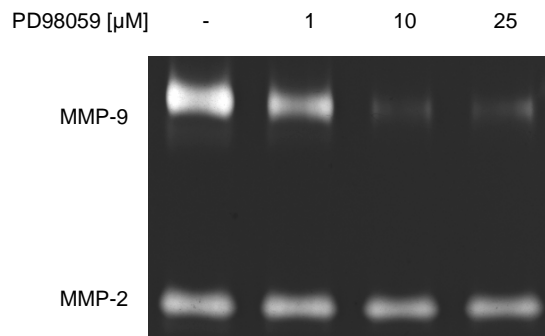
#### 3.3.1 Inhibition der ERK1/2-Signaltransduktion

Zur Untersuchung der ERK1/2-Signaltransduktion wurde der zellgängige MEK1/2-Inhibitor PD98059 verwendet, welcher die Phosphorylierung und damit die Aktivierung von ERK1/2 blockiert. Die Inkubation der THP-1 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen dieses Inhibitors verursachte eine dosisabhängige Hemmung der MMP-9 mRNA-Expression. Schon 1  $\mu$ M PD98059 reduzierte die MMP-9 mRNA-Transkription auf 60% der unbehandelten Kontrolle. Eine maximale Hemmung der MMP-9 mRNA-Expression auf 20% konnte bereits bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M beobachtet werden (Abb. 10A). In Übereinstimmung mit den mRNA-Daten konnte durch den Inhibitor auch eine deutliche Reduktion der MMP-9-Proteinsynthese nachgewiesen werden. Dagegen blieb die MMP-2-Sekretion in Gegenwart des MEK1/2 Inhibitors wie in der Zymografie gezeigt unverändert (Abb. 10B).

Abb. 10A



**Abb. 10B**

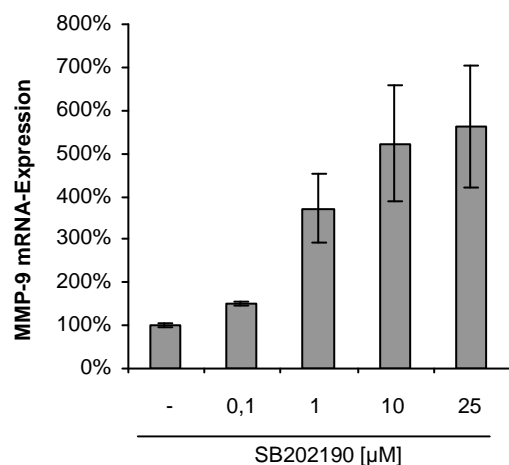
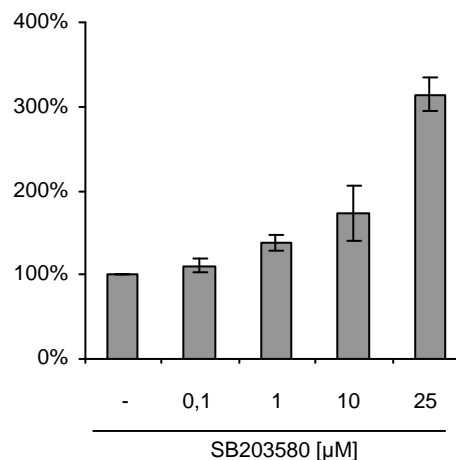
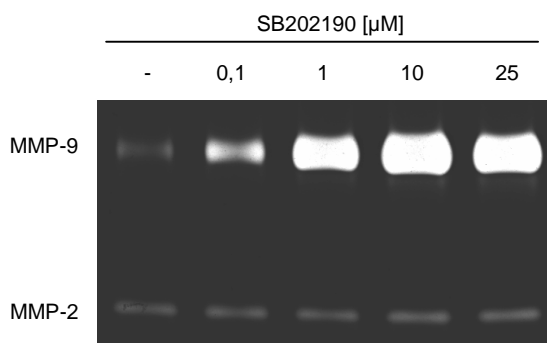
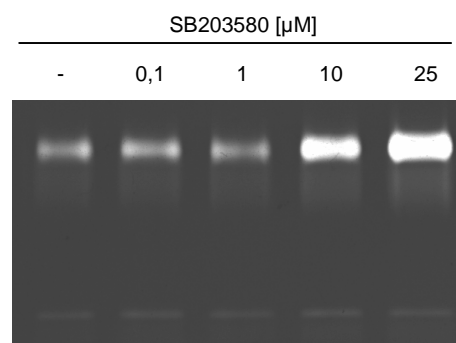


**Abb. 10: Analyse der MMP-9-Expression nach Blockierung der ERK1/2-Signaltransduktion.**

THP-1 Zellen ( $1 \times 10^6/\text{ml}$ ) wurden unbehandelt oder mit verschiedenen Konzentrationen des MEK1/2-Inhibitors PD98059 für 24 Stunden inkubiert. **(A)** Die qRT-PCR Analyse der MMP-9 mRNA-Expression erfolgte unter Abgleich der Expression von CPB. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus einer Triplikatbestimmung von 3 unabhängigen Experimenten. **(B)** Die MMP-9-Sekretion wurde mittels Zymografie der Kulturüberstände untersucht. (Detaillierte Angabe der Resultate siehe Text)

### 3.3.2 Inhibition von p38

An der intrazellulären Übermittlung TNF- $\alpha$ -induzierter Effekte ist häufig die p38-Signaltransduktion beteiligt. Um die Bedeutung der p38 MAPK für die autokrin TNF- $\alpha$ -induzierte MMP-9-Expression zu untersuchen, wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des p38-Inhibitors SB202190 inkubiert. Überraschenderweise kam es unter diesen Bedingungen zu einer dosisabhängigen Steigerung der MMP-9 mRNA-Expression (Abb. 11A). Dieser Effekt konnte bei Verwendung eines weiteren p38-Inhibitors (SB203580) bestätigt werden (Abb. 11C). Dabei wurde durch 25  $\mu\text{M}$  SB202190 eine 6-fache Steigerung, mit 25  $\mu\text{M}$  SB203580 eine 3,5-fache Stimulation der MMP-9-Expression erreicht (Abb. 11A,C). Die dosisabhängige Stimulation der MMP-9-Expression in Gegenwart der p38-Inhibitoren konnte auf Proteinebene durch die Zymografie bestätigt werden (Abb. 11B, D). In Korrelation zur mRNA stieg die MMP-9-Proteinsekretion ab einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  SB202190 bzw. 10  $\mu\text{M}$  SB203580 an. Diese Daten lassen vermuten, dass die p38-Aktivität in den THP-1 Zellen im umgekehrten Verhältnis zur MMP-9-Expression steht.

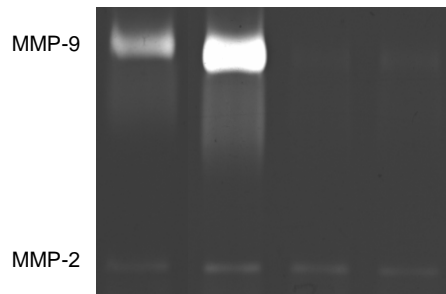
**Abb. 11A****Abb. 11C****Abb. 11B****Abb. 11D****Abb. 11: Untersuchung der MMP-9-Expression nach Inhibition von p38.**

THP-1 Zellen ( $1 \times 10^6$ /ml) wurden für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen der p38-Inhibitoren (**A, B**) SB202190 oder (**C, D**) SB203580 inkubiert. (**A, C**) Die MMP-9 mRNA-Expression wurde mit qRT-PCR gemessen und gegen CPB mRNA abgeglichen. Die Abbildungen zeigen Mittelwerte und Standardabweichung aus einer Dreifachbestimmung jeweils eines repräsentativen von drei unabhängigen Experimenten. (**B, D**) Die Gelatinase-Sekretion wurde durch zymografische Analyse der Zellkulturüberstände untersucht. (Detaillierte Angabe der Resultate im Text)

### 3.3.3 Analyse der Interaktion von p38 und ERK1/2

Da p38 und ERK1/2 die MMP-9-Expression gegensätzlich regulierten, galt es einen gegenseitigen Einfluss der beiden Kinasen zu überprüfen. Dafür erfolgte die Inkubation der Zellen mit den Inhibitoren PD98059 und SB202190 alleine oder zusammen in verschiedenen Konzentrationen. Die Analyse der Kulturüberstände mittels Zymografie ergab, dass die MMP-9-Sekretion durch die Blockierung beider Signaltransduktionswege ebenso gehemmt wurde wie durch die Inhibition von MEK1/2 alleine (Abb. 12).

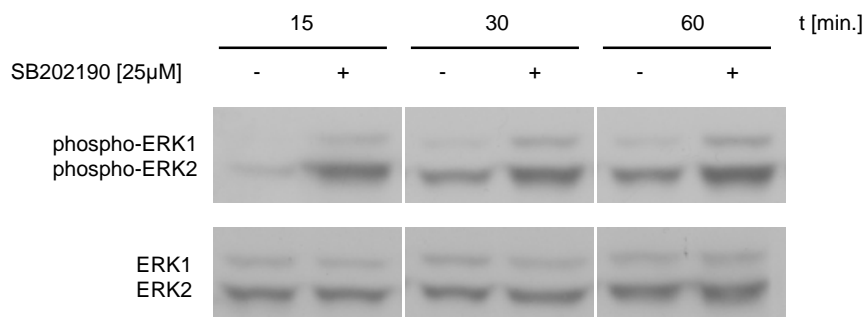
SB202190 [ $\mu\text{M}$ ]	-	25	-	25
PD98059 [ $\mu\text{M}$ ]	-	-	25	25



**Abb. 12: Auswirkung gleichzeitiger Inhibition der p38- und ERK1/2-Signalwege auf die MMP-9-Sekretion.**

$1 \times 10^6$  Zellen/ml wurden mit verschiedenen Konzentrationen der Inhibitoren SB202190 oder PD98059 alleine oder zusammen für 24 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und der Überstand mit Gelatin-Zymografie analysiert. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch mit der Inhibitor-Konzentration von 25  $\mu\text{M}$ . (Detaillierte Ergebnisdarstellung im Text)

Daraus war zu folgern, dass eine durch die p38-Inhibition gesteigerte MMP-9-Expression eine gleichzeitige Aktivität von ERK1/2 voraussetzte. Zur genaueren Aufklärung, ob ERK1/2 nur essentiell für die MMP-9-Expression oder ein direkter Zusammenhang zwischen p38 und ERK1/2 bestand, wurden die Zellen mit dem p38-Inhibitor SB202190 inkubiert. Die Aktivierung von ERK1/2 sollte darauf anhand der Detektion der spezifischen Phosphorylierung im Western Blot analysiert werden. Schon nach 15-minütiger Behandlung der Zellen mit dem p38-Inhibitor SB202190 war eine deutliche Steigerung der ERK1/2-Phosphorylierung



**Abb. 13: Analyse der Phosphorylierung von ERK1/2 im Western Blot nach Hemmung von p38.**

THP-1 Zellen wurden mit 25  $\mu\text{M}$  SB202190 oder einem nicht-inhibitorischen Kontrollmolekül (-) inkubiert. Nach den angegebenen Zeiten wurden die Zellen lysiert und im Western Blot mit einem spezifischen Antikörper (E10) die phosphorylierten Proteine von ERK1/2 detektiert (obere Reihe). Zur Kontrolle wurden die Antikörper entfernt und die Membran mit Antikörpern (3A7) gegen das gesamte ERK1/2 Protein inkubiert (untere Reihe). (Detaillierte Darstellung der Resultate im Text)

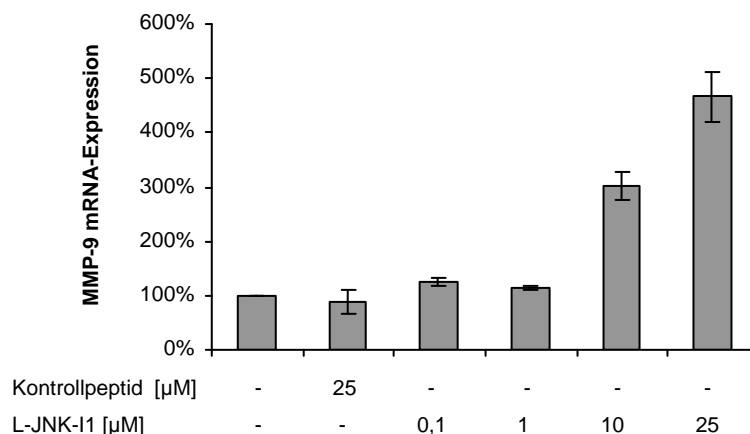


gegenüber der Kontrolle erkennbar, die für den Zeitraum von 1 Stunde anhielt (Abb. 13, obere Reihe). Um sicherzustellen, dass im Western Blot gleiche Mengen an ERK1/2 aufgetragen waren, wurde unter Verwendung eines entsprechenden Antikörpers auch die Gesamtmenge von phosphoryliertem und unphosphoryliertem ERK1/2 detektiert (Abb.13, untere Reihe). Ein deutlich stärkeres Signal wurde hier wie auch in allen folgenden Western Blots für ERK2 als für ERK1 festgestellt. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse jedoch eine Korrelation von Stimulation der MMP-9-Expression und erhöhter Aktivität von ERK1/2 durch die Inhibition von p38.

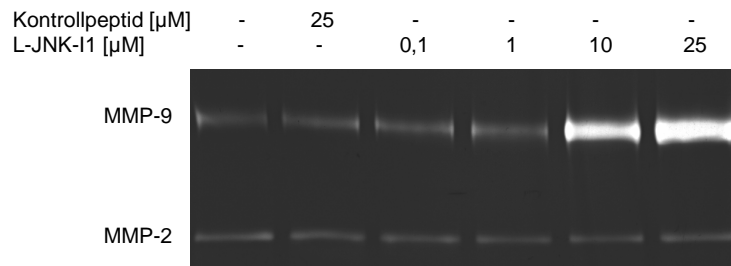
### 3.3.4 Inhibition von JNK

Die Signaltransduktion von JNK kann von TNF- $\alpha$  aktiviert werden und hat einige beteiligte Kinasen und intrazelluläre Substrate mit p38 gemeinsam. Zur Inhibition von JNK wurde mit (L)-JNK-I1 ein spezieller wasserlöslicher Peptid-Inhibitor benutzt, der nicht in DMSO gelöst werden musste, wodurch mögliche Differenzierungseffekte auf die THP-1 Zellen vermieden werden konnten. Wie schon bei der Inhibition von p38 beobachtet, verstärkte die Inkubation der Zellen mit dem JNK-Inhibitor konzentrationsabhängig die basale MMP-9 mRNA-Expression (Abb. 14A). Bei Konzentrationen von 10  $\mu$ M und 25  $\mu$ M des Inhibitors wurde die MMP-9 mRNA-Expression um das 3- bzw. 4,5-fache stimuliert. Die Gelatine-Zymografie bestätigte die dosisabhängige Steigerung der MMP-9-Expression bedingt durch den JNK-Inhibitor auch auf Proteinebene, wobei die MMP-2-

Abb. 14A



**Abb. 14B**



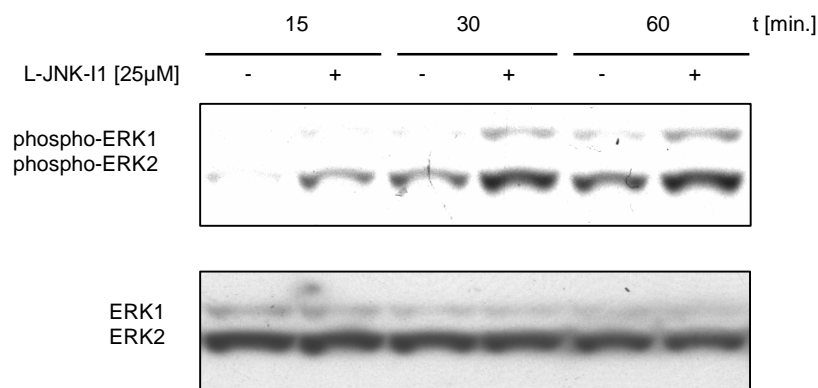
**Abb. 14: Untersuchung der MMP-9-Expression nach Inhibition von JNK.**

THP-1 Zellen ( $1 \times 10^6/\text{ml}$ ) wurden mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors L-JNK-I1, beziehungsweise  $25 \mu\text{M}$  des Kontrollpeptids inkubiert. **(A)** Die MMP-9 mRNA wurde mit qRT-PCR quantifiziert und gegen die Expression von CPB normalisiert. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung von 3 unabhängigen Experimenten. **(B)** Aliquots von  $10 \mu\text{l}$  des Zellkulturüberstandes wurden in der Zymografie untersucht. (Detaillierte Ergebnisangabe im Text)

Sekretion unverändert blieb. Die Zugabe des Kontrollpeptids hatte bei einer maximalen Konzentration von  $25 \mu\text{M}$ , keinen Einfluss auf die MMP-9 mRNA-Expression und Proteinsekretion (Abb. 14B).

### 3.3.5 Analyse der Interaktion von JNK und ERK1/2

Da die Hemmung von JNK analog zur Inhibition der verwandten p38-Signaltransduktion eine Steigerung der MMP-9-Expression auslöste, stellte sich die Frage, ob auch hier eine Erhöhung der ERK1/2-Phosphorylierung beteiligt war.



**Abb. 15: Analyse der Phosphorylierung von ERK1/2 im Western Blot nach Inhibition von JNK.**

THP-1 Zellen ( $1 \times 10^6/\text{ml}$ ) wurden mit L-JNK-I1 (+) beziehungsweise dem Kontrollpeptid (-) in einer Konzentration von  $25 \mu\text{M}$  für die angegebenen Zeiträume inkubiert. Die Zellextrakte wurden mit Antikörpern untersucht, die spezifisch phosphoryliertes ERK1/2 (oben), bzw. das gesamte ERK1/2 (unten) erkennen. (Detaillierte Angabe der Resultate im Text)

Deshalb wurden THP-1 Zellen mit 25  $\mu\text{M}$  L-JNK-I1 bzw. dem inaktiven Kontrollpeptid behandelt und die Zelllysate mittels Western Blot analysiert. Die Inhibition von JNK in den THP-1 Zellen führte innerhalb 60 Minuten zu einer erkennbaren Steigerung der ERK1/2-Phosphorylierung im Vergleich zu Zellen, die mit dem Kontrollmolekül behandelt wurden (Abb. 15, oberes Bild). Die Kontrolle mit Antikörpern, die das gesamte ERK1/2 detektierten, demonstrierte vergleichbare Mengen ERK1/2 Protein in den Proben (Abb. 15, unteres Bild).

### 3.3.6 Gleichzeitige Inhibition von p38 und JNK

Die Inhibition von p38 sowie JNK löste jeweils über erhöhte ERK1/2-Aktivität eine gesteigerte MMP-9-Expression aus. Deshalb sollte überprüft werden, ob eine gleichzeitige Hemmung beider Signalwege in den Zellen einen synergistischen oder additiven Effekt nach sich zieht. Die Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  L-JNK-I1 führte zu einer 3-fachen und mit 10  $\mu\text{M}$  SB202190 zu einer 4,5-fachen Stimulation der MMP-9 mRNA-Expression. Bei gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit beiden Inhibitoren addierten sich diese Effekte sogar zu einer 7-fachen Stimulation der MMP-9 mRNA-Transkription verglichen mit unbehandelten Zellen (Abb. 16A). Die zymografische Analyse der Zellkulturüberstände belegte einen additiven Effekt der Inhibitoren von p38 und JNK auf die MMP-9-Synthese und bestätigte damit die Daten der qRT-PCR (Abb. 16B).

Abb. 16A

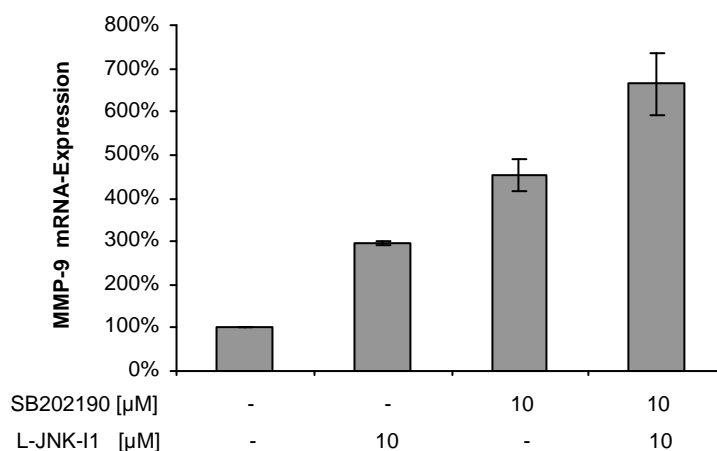


Abb. 16B

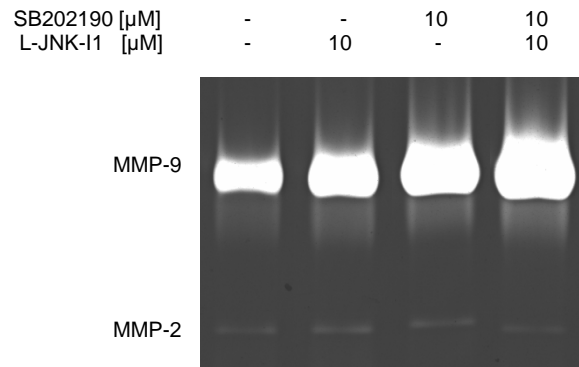


Abb. 16: Untersuchung der MMP-9-Expression bei gleichzeitiger Hemmung von p38 und JNK.

THP-1 Zellen ( $1 \times 10^6$ /ml) wurden unbehandelt, mit beiden Inhibitoren alleine oder zusammen für 24 Stunden inkubiert. (A) Die MMP-9 mRNA wurde gemessen und gegen die CPB-Expression abgeglichen. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt, dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung einer repräsentativen Dreifachbestimmung. (B) Jeweils ein Aliquot des konditionierten Mediums wurde in der Zymografie analysiert. (Detaillierte Angabe der Ergebnisse im Text)

### 3.3.7 Hemmung von Protein-Phosphatasen

Eine mögliche Erklärung für die oben beobachtete erhöhte ERK1/2-Aktivierung und der darausfolgenden Stimulationen der MMP-9-Expression wäre die Blockierung eines negativen Feedback-Mechanismus. Die Deaktivierung von ERK1/2 wird durch Serin/Threonin-spezifische Protein-Phosphatasen ermöglicht, von denen einige durch Zugabe von Okadainsäure gehemmt werden können [PP2A ( $IC_{50} = 0.1$  nM), PP1 ( $IC_{50} = 10 - 15$  nM) und PP2B ( $IC_{50} = 5$   $\mu$ M)]. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen der Okadainsäure für 24 Stunden inkubiert und die MMP-9-Sekretion zymografisch analysiert (Daten nicht gezeigt). Bis zu einer Konzentrationen von 3 nM war kein Unterschied in der basalen MMP-9-Expression sichtbar, weshalb die Phosphatasen PP1 und PP2A vermutlich nicht an der Deaktivierung von ERK1/2 beteiligt waren. Höhere Konzentrationen von Okadainsäure [30 nM] wirkten sich zytotoxisch aus, wie mittels der Trypanblau-Färbung nachgewiesen wurde.

### 3.3.8 Bedeutung von NF $\kappa$ B

Die TNF- $\alpha$ -stimulierte Genexpression wird neben den MAPK vor allem durch den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B vermittelt. Da der MMP-9-Promotor ebenfalls über ein regulatorisches Element für NF $\kappa$ B verfügt, wurde eine Beteiligung dieses Faktors an der basalen MMP-9-Expression in THP-1 Zellen untersucht. Der NF $\kappa$ B-Inhibitor SN50 enthält eine Domäne des Inhibitors I $\kappa$ B, die eine Translokation von NF $\kappa$ B aus dem Zytosol in den Zellkern blockiert. Die THP-1 Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von SN50 oder dem nicht an den NF $\kappa$ B-Komplex bindenden Kontrollpeptid SN50M inkubiert. Der NF $\kappa$ B-Inhibitor bewirkte bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M erstaunlicherweise eine Stimulation der MMP-9 mRNA-

Abb. 17A

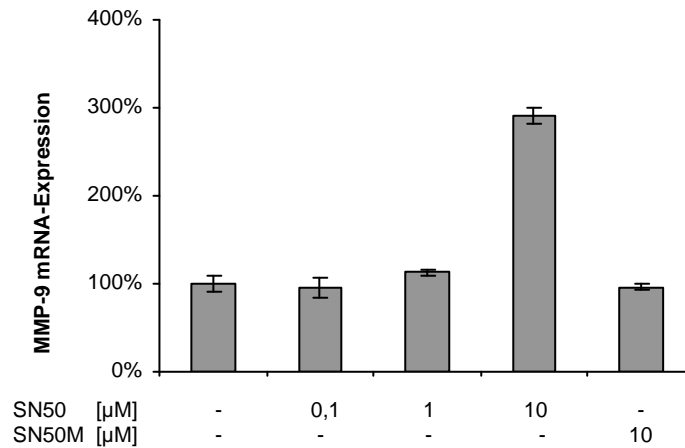


Abb. 17B

SN50 [ $\mu$ M]	0,1	1	10	-
SN50M [ $\mu$ M]	-	-	-	10

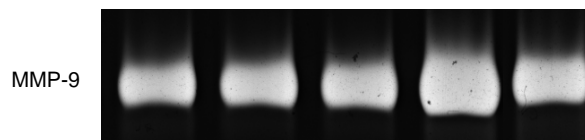


Abb. 17: Untersuchung der MMP-9-Expression nach Inhibition von NF  $\kappa$  B.

THP-1 Zellen ( $1 \times 10^6$ /ml) wurden mit verschiedenen Konzentrationen des NF $\kappa$ B-Inhibitors SN50 beziehungsweise mit 10  $\mu$ M des Kontrollpeptids SN50M für 24 Stunden inkubiert. **(A)** Die MMP-9 mRNA wurde quantifiziert und gegen die CPB mRNA normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung aus einer Dreifachbestimmung von drei unabhängigen Versuchen. **(B)** Aliquots der konditionierten Medien wurden zymografisch analysiert. (Detaillierte Angabe der Resultate siehe Text)

Expression, während das Kontrollpeptid keine entsprechende Wirkung zeigte (Abb. 17A). Die Analyse der Zellkulturüberstände in der Gelatine-Zymografie bestätigte die Daten der qRT-PCR, wobei auch festgestellt werden konnte, dass die konstitutive MMP-2-Sekretion nicht beeinträchtigt wurde (Abb. 17B).

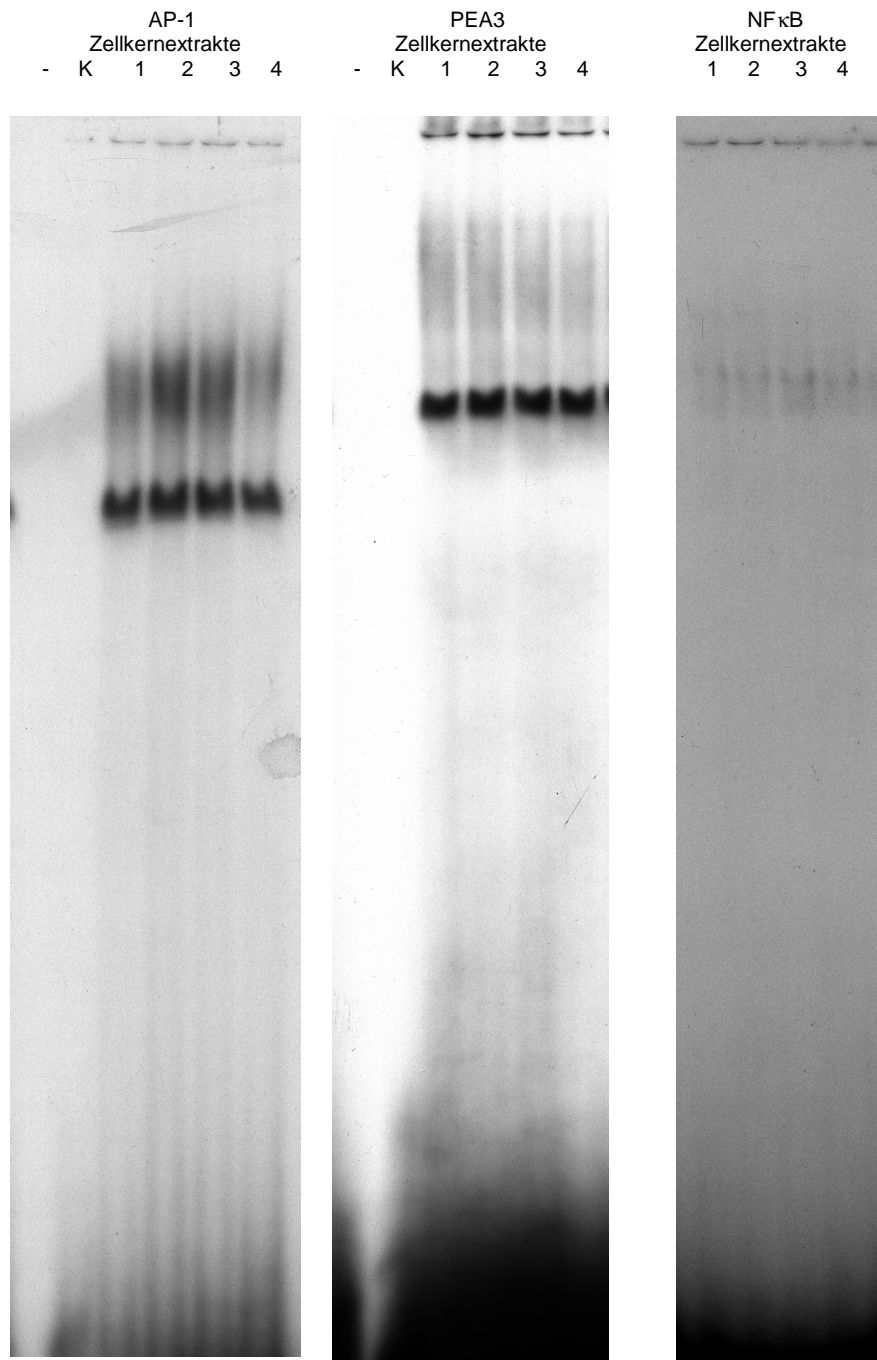
### **3.3.9 Untersuchung aktiver Transkriptionsfaktoren**

Nachdem sich bisher nur ERK1/2 für die MMP-9-Transkription verantwortlich zeigte, sollte die beobachtete Korrelation von ERK1/2-Aktivierung und MMP-9 mRNA-Expression näher untersucht werden. Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren, die von ERK1/2 reguliert werden und den MMP-9-Promotor stimulieren könnten, wurde mittels *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) analysiert. Die ausgewählten DNA-Oligomere sollten Transkriptionsfaktoren detektieren, welche an die Elemente AP-1, PEA3 und NF $\kappa$ B binden. Dafür wurden zunächst Zellen in der bezüglich der MMP-9-Expression maximal wirksamen Konzentration von 25  $\mu$ M mit PD98059 (4), SB202190 (3) und dem Kontrollmolekül (2) SB202474 oder unbehandelt (1) inkubiert (siehe Abb. 18). Die Durchführung des Experiments erfolgte wie im Abschnitt 2.8.4 beschrieben, wobei von jedem Ansatz Proben zwischen 30 Minuten und 8 Stunden im zeitlichen Verlauf geprüft wurden. Doch weder in Gegenwart des MEK1/2-Inhibitors PD98059 (4) noch des p38-Inhibitors SB202190 (3) konnte im Vergleich zu den Kontrollen (1 und 2) in der Autoradiografie eine veränderte Bindung der Faktoren NF $\kappa$ B, PEA3 und AP-1 festgestellt werden (Abb.18). Die Regulation der MMP-9-Expression durch die Kinase-Inhibition konnte auf der Ebene dieser Transkriptionsfaktoren also nicht nachvollzogen werden.

### **3.3.10 Einfluss der ERK1/2- und p38-Inhibitoren auf die THP-1 Zellen im Invasionsassay**

Da MMP-9 effizient Kollagen Typ IV, den Hauptbestandteil der Basalmembran, abbaut, sollte eine mögliche Funktion der MMP-9-Sekretion für die Invasivität untersucht werden. Hierzu wurden THP-1 Zellen im Invasionsassay sowohl unter Verwendung von Matrigel (Maus-EZM) wie auch von humaner EZM als Migrations-Barriere eingesetzt. In beiden Fällen blieb die Invasionsrate der Zellen nach

24 Stunden mit den Kinase-Inhibitoren PD98059, SB202190 oder dem Kontrollmolekül SB202474, unverändert (Daten nicht gezeigt). Es konnte jedoch beobachtet werden, dass bei Beschichtung mit humaner EZM deutlich höhere Migrationsraten erzielt wurden als mit Matrigel in der gleichen Proteinkonzentration. Dies lässt darauf schließen, dass die humane EZM entweder deutlich effizienter degradiert werden konnte oder stimulierende Faktoren enthielt.



**Abb. 18: Untersuchung von aktivierten Transkriptionsfaktoren im EMSA.**

THP-1 Zellen ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden für Zeiträume zwischen 30 Minuten und 8 Stunden unbehandelt (1), oder in einer Konzentration von 25  $\mu$ M mit SB202474 (2), SB202190 (3), PD98059 (4) inkubiert. Die Zellkernextrakte wurden mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden inkubiert, die die angegebenen Transkriptionsfaktoren binden. Eine Tasche wurde nur mit einem Extrakt ohne markiertes Oligonukleotid beladen (-). Ein weiterer Extrakt wurde zur Konkurrenz mit einem 10-fachen Überschuss von unmarkierten Oligonukleotiden inkubiert, bevor die radioaktive Sonde zugegeben wurde (K). Gezeigt sind repräsentative Autoradiografien von Ansätzen mit Extrakten aus Zellen, die für 4 Stunden stimuliert wurden. (Detaillierte Ergebnisangabe im Text)



### 3.4 Untersuchung der exogen TNF- $\alpha$ -stimulierten MMP-9-Expression und der beteiligten Signaltransduktionen

#### 3.4.1 Charakterisierung der exogen TNF- $\alpha$ -stimulierten MMP-9-Expression

Um einen Vergleich von autokrin mit exogen TNF- $\alpha$ -stimulierter MMP-9-Expression in den THP-1 Zellen anstellen zu können, sollten die Bedingungen einer exogenen Stimulation mit TNF- $\alpha$  charakterisiert werden. Die Zellen wurden deshalb unbehandelt oder mit den neutralisierenden Antikörpern gegen TNF-R1 bzw. TNF-R2 in einer Konzentration von 25  $\mu$ g/ml vorinkubiert und anschliessend mit 50 ng/ml TNF- $\alpha$  stimuliert. Wie erwartet stimuliert TNF- $\alpha$  die mRNA MMP-9-

Abb. 19A

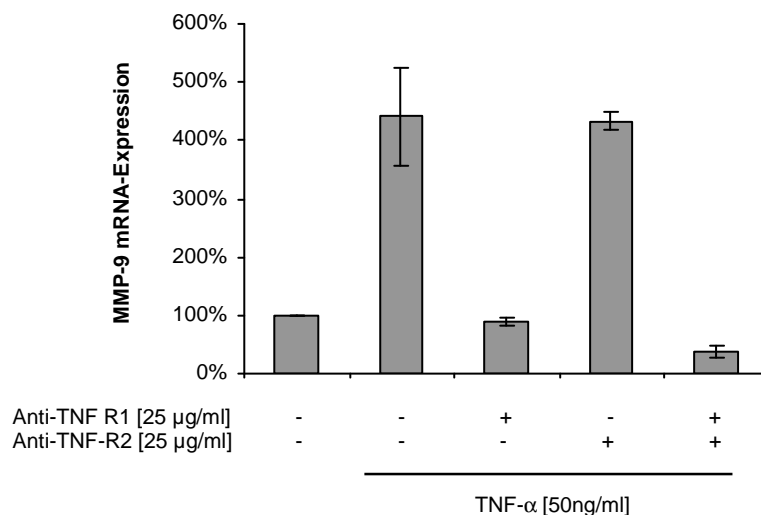


Abb. 19B

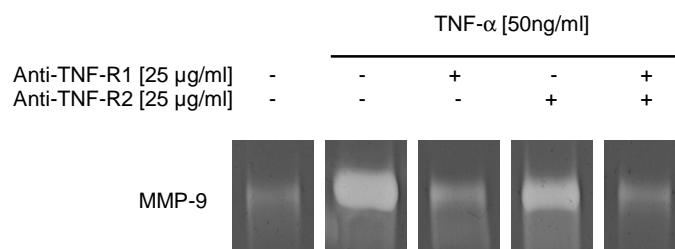


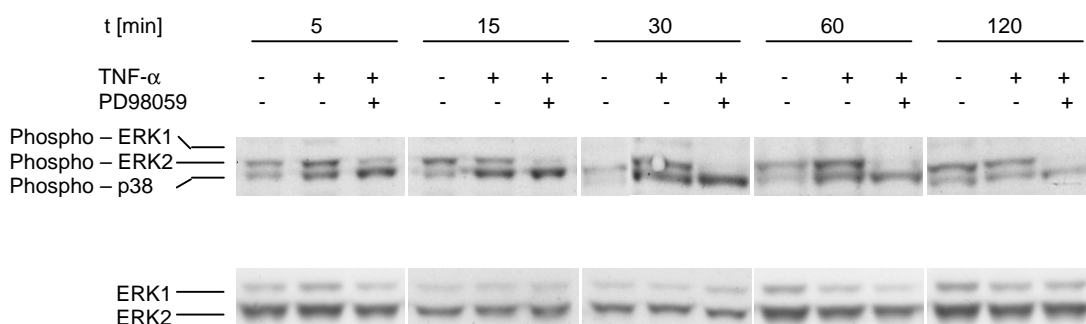
Abb. 19: Charakterisierung der exogen TNF- $\alpha$ -stimulierten MMP-9-Expression.

THP-1 Zellen ( $1,5 \times 10^6$ /ml) wurden für 30 Minuten mit Medium oder den Antikörpern Anti-TNF-R1 bzw. Anti-TNF-R2 in einer Konzentration von 25  $\mu$ g/ml vorinkubiert. Anschliessend wurden die Zellen für 24 Stunden mit 50 ng/ml TNF- $\alpha$  stimuliert. (A) Mittels qRT-PCR wurde die MMP-9 mRNA-Expression gemessen und gegen die CPB mRNA normalisiert. (B) Die Zellkulturüberstände wurden mittels Zymografie analysiert. (Detaillierte Ergebnisangabe im Text)

Expression. Die TNF-R1-neutralisierenden Antikörper blockierten vollständig diese Stimulation von MMP-9, wogegen die Anti-TNF-R2 Antikörper alleine keine Wirkung zeigten. Jedoch senkte Anti-TNF-R2 die TNF- $\alpha$ -stimulierte MMP-9 mRNA-Expression in Kombination mit Anti-TNF-R1 auf 50 % der unstimulierten Kontrolle (Abb. 19A). Die Untersuchung der konditionierten Medien in der Zymografie zeigte in Übereinstimmung mit den Daten der qRT-PCR eine Stimulation der MMP-9-Sekretion durch Zugabe von TNF- $\alpha$ . Die Blockierung von TNF-R1 alleine oder von TNF-R1 und TNF-R2 zusammen reduzierte die gesteigerte MMP-9 Proteinsynthese (Abb. 19B). Die exogene Stimulation mit TNF- $\alpha$  induzierte also vergleichbar mit den autokrin TNF- $\alpha$ -stimulierten Bedingungen die MMP-9-Expression über TNF-R1.

### 3.4.2 Einfluss von exogenem TNF- $\alpha$ auf ERK1/2 und p38

Da sowohl exogenes wie autokrines TNF- $\alpha$  die MMP-9-Expression durch Aktivierung von TNF-R1 induzierte, sollte die Signaltransduktion nach exogener Stimulation untersucht werden. Dazu wurden THP-1 Zellen unbehandelt oder in Gegenwart des MEK1/2-Inhibitor PD98059 vorinkubiert, bevor mit TNF- $\alpha$  für verschiedene Zeiträume stimuliert wurde. Die Analyse der Zelllysate im Western Blot zeigte eine erhöhte Phosphorylierung sowohl von ERK2 als auch von p38 nach der Behandlung der Zellen mit TNF- $\alpha$  (Abb. 20, obere Reihe). Die Stimulation beider Kinasen trat schon 5 Minuten nach Zugabe von TNF- $\alpha$  auf und



**Abb. 20: Nachweis von TNF- $\alpha$ -stimulierter ERK1/2- und p38-Phosphorylierung im Western Blot.**

6 x 10<sup>5</sup> THP-1 Zellen wurden für 5 Minuten unbehandelt oder mit 25  $\mu$ M PD98059 vorinkubiert und für verschiedene Zeiträume mit oder ohne 50 ng/ml TNF- $\alpha$  stimuliert. Die Zellen wurden 10 x LDS-Probenpuffer lysiert und im Western Blot phosphoryliertes ERK1/2 und p38 detektiert. Die Proben wurden ebenfalls zur Kontrolle mit Antikörpern gegen das gesamte ERK1/2 Protein detektiert. (Detaillierte Angabe der Resultate im Text)

war für ungefähr eine Stunde erkennbar. In den mit PD98059 behandelten Zellen war die von TNF- $\alpha$  induzierte ERK2-Phosphorylierung nach 15 Minuten nicht mehr nachweisbar, wogegen die Aktivierung von p38 durch den MEK1/2-Inhibitor nicht beeinträchtigt wurde. Der Nachweis des gesamten ERK1/2 Proteins in den Proben zeigt, dass in den Proben gleiche Mengen des Proteins vorhanden waren (Abb. 20, untere Reihe).

### 3.4.3 Inhibition von ERK1/2

Im folgenden Versuch sollte nachgewiesen werden, dass ERK1/2 auch an der mit exogenem TNF- $\alpha$  stimulierten MMP-9-Produktion beteiligt ist. Dazu erfolgte eine Vorbehandlung der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des MEK1/2-Inhibitors, gefolgt von einer Stimulation mit TNF- $\alpha$ . Auffällig war eine leichte Stimulation, der durch TNF- $\alpha$  induzierten MMP-9-Expression bei einer Konzen-

Abb. 21A

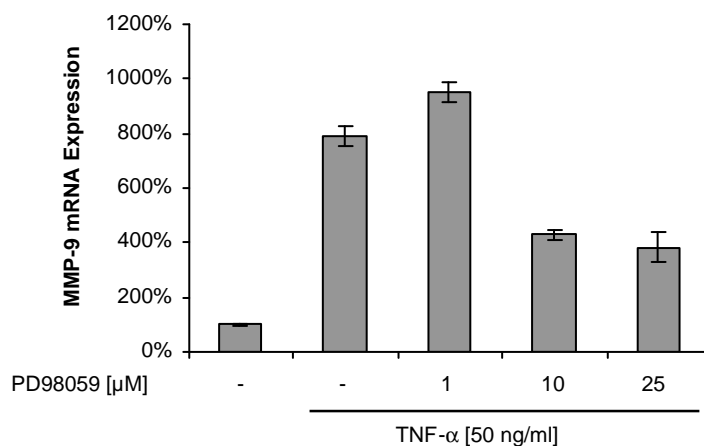


Abb. 21B

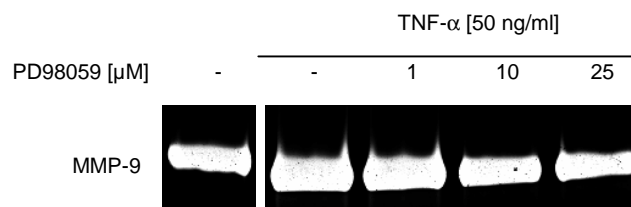


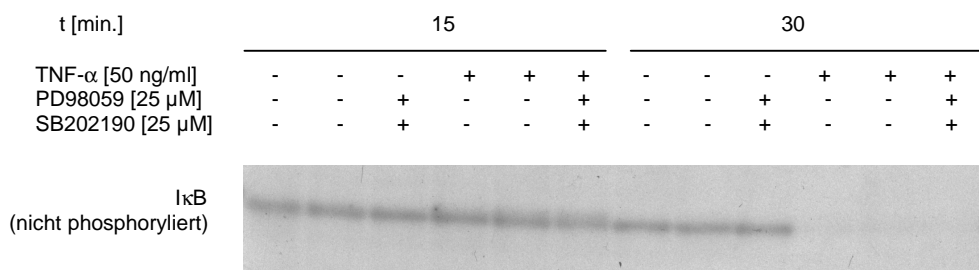
Abb. 21: Analyse der TNF- $\alpha$ -stimulierten MMP-9-Expression nach Hemmung der ERK1/2-Aktivierung.

THP-1 Zellen ( $1 \times 10^6$ /ml) wurden für 5 Minuten mit verschiedenen Konzentrationen von PD98059 inkubiert und für 24 Stunden mit 50 ng/ml TNF- $\alpha$  stimuliert. **(A)** Die MMP-9 mRNA-Expression, normalisiert gegen CPB wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte eines Triplikats von 2 unabhängigen Versuchen. **(B)** Die Analyse der MMP-9-Sekretion erfolgte durch Zymografie des Zellkulturüberstandes. (Detaillierte Ergebnisangabe im Text)

tration von 1  $\mu\text{M}$  PD98059. Tatsächlich wurde ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  PD98059 die TNF- $\alpha$ -stimulierte MMP-9 mRNA-Expression um etwa 50% gesenkt (Abb. 21A). Damit war bereits nahezu die maximale Hemmung erreicht und die MMP-9-Expression konnte durch 25  $\mu\text{M}$  PD98059 nicht signifikant stärker gehemmt werden. Die Stimulation durch TNF- $\alpha$ , sowie die Hemmung der MMP-9-Sekretion durch PD98059 wurden auf Proteinebene durch die Zymografie der Zellkulturüberstände bestätigt (Abb. 21B). In der Zymografie wurde die Sekretion von MMP-2 aus den THP-1 Zellen weder durch TNF- $\alpha$  noch den Inhibitor PD98059 beeinflusst, was die unterschiedlichen Regulationen von MMP-2 und MMP-9 bestätigt.

### 3.4.4 Einfluss von exogenem TNF- $\alpha$ auf die Aktivierung von NF $\kappa$ B

Da durch die Blockierung der ERK1/2-Signaltransduktion keine vollständige Hemmung der exogen TNF- $\alpha$ -stimulierten MMP-9-Expression erreicht werden konnte, wurde auch eine Beteiligung von NF $\kappa$ B nicht ausgeschlossen. Um dies zu klären sollte zuerst die Aktivierung der NF $\kappa$ B-Signaltransduktion durch TNF- $\alpha$  belegt werden. Als Nachweis diente hierbei die Phosphorylierung des endogenen Inhibitors I $\kappa$ B, was eine Freigabe und Aktivierung von NF $\kappa$ B zur Folge hat. Der benutzte Antikörper detektierte spezifisch nur das unphosphorylierte Epitop von I $\kappa$ B und zeigte im Western Blot also nur Signale, die eine nicht aktivierte NF $\kappa$ B-Signaltransduktion repräsentieren. Die Stimulation der THP-1 Zellen mit TNF- $\alpha$  zeigte nach 15 Minuten noch keine Änderung, dagegen war nach 30 Minuten kein Signal



**Abb. 22: Nachweis der Aktivierung von NF  $\kappa$ B durch Stimulation mit TNF- $\alpha$ .**

THP-1 Zellen ( $1,5 \times 10^6/\text{ml}$ ) wurden unbehandelt oder mit PD98059 bzw. SB202190 für 5 Minuten vorinkubiert. Danach wurde Medium oder TNF- $\alpha$  zugegeben und die Zellen nach 15 oder 30 Minuten lysiert. Die Analyse im Western Blot erfolgte durch Antikörper die spezifisch nur das unphosphorylierte Epitop von I $\kappa$ B erkennen. (Detaillierte Angabe der Resultate im Text)

mehr sichtbar und I $\kappa$ B folglich komplett phosphoryliert. Gleichzeitig sollte in diesem Versuch einer möglichen Wechselwirkung der Kinase-Inhibitoren PD98059 und SB202190 mit der NF $\kappa$ B-Signaltransduktion nachgegangen werden. Damit konnte nachgewiesen werden, dass sowohl unter autokriner wie exogener TNF- $\alpha$  Stimulation PD98059 und SB202190 die Signaltransduktion von NF $\kappa$ B nicht beeinflussten (Abb. 22).

### 3.4.5 Inhibition von NF B

Da die exogene Stimulation mit TNF- $\alpha$  wie erwartet zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B führte, sollte nun seine Beteiligung an der MMP-9-Expression unter diesen Bedingungen überprüft werden. Die Zellen wurden dafür mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors SN50 oder 10  $\mu$ M des Kontrollpeptids SN50M inkubiert. Jedoch konnte die exogen TNF- $\alpha$ -stimulierte MMP-9 mRNA-Expression durch den NF $\kappa$ B-Inhibitor nicht gehemmt werden, sondern wurde vielmehr dosisabhängig erhöht. Die maximale Stimulation war bei 10  $\mu$ M SN50 messbar, dagegen zeigte das Kontrollpeptid SN50M bei 10  $\mu$ M keinen Einfluss (Fig. 23A). Die zymografische Analyse der konditionierten Medien bestätigte auf Proteinebene die Daten der qRT-PCR (Fig. 23B). Allerdings war aufgrund der bereits starken Stimulation der MMP-9-Proteinsynthese durch TNF- $\alpha$  nur eine kleine Steigerung der MMP-9-Sekretion durch 10  $\mu$ M SN50 erkennbar. Der Inhibitor SN50 hatte also den gleichen Effekt auf die exogen wie auf die autokrin TNF- $\alpha$ -stimulierte MMP-9-Expression.

Abb. 23A

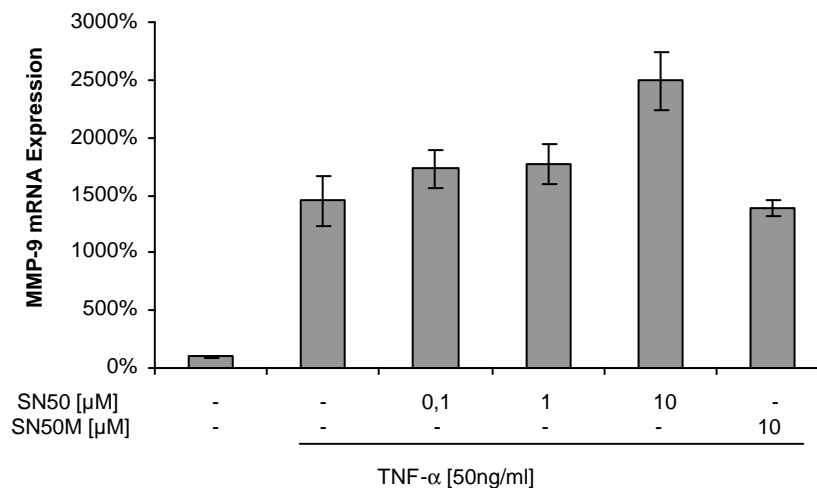


Abb. 23B

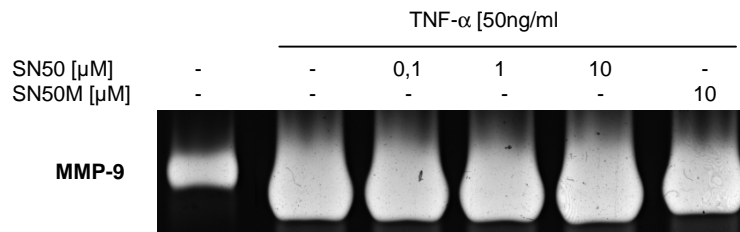


Abb. 23: Analyse der TNF- $\alpha$ -stimulierten MMP-9-Expression nach Hemmung von NF- $\kappa$ B.

THP-1 Zellen ( $1 \times 10^6$ /ml) wurden 5 Minuten mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitor SN50 oder 10  $\mu$ M des Kontrollpeptids SN50M vorbehandelt, bevor mit 50 ng/ml TNF- $\alpha$  für 24 Stunden stimuliert wurde. **(A)** Die MMP-9 mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR bestimmt und gegen die Expression von CPB normalisiert. **(B)** Die Sekretion der MMP-9 wurde mittels Zymografie analysiert.

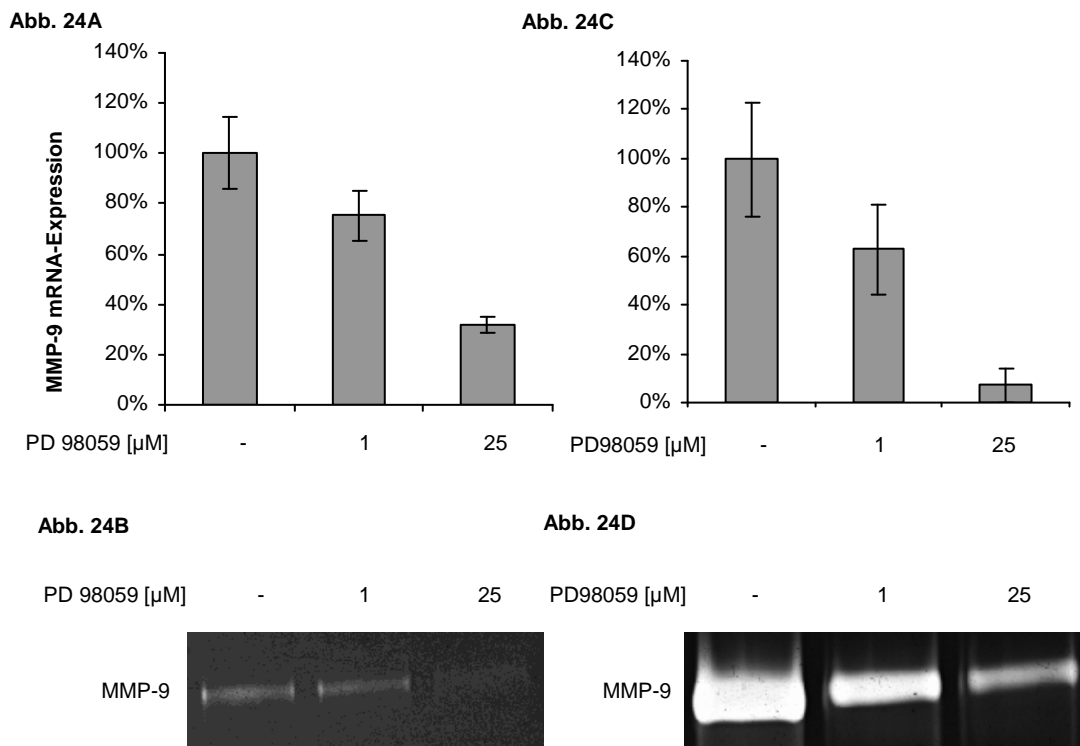
### 3.5 Untersuchung der Signaltransduktion der autokrin TNF- $\alpha$ -stimulierten MMP-9-Expression in den Leukämiezelllinien HL-60 und NB4

Der in dieser Arbeit bei THP-1 Zellen aufgedeckte Mechanismus der autokrinen TNF- $\alpha$ -Stimulation ist auch in weiteren akut myeloischen Leukämiezelllinien, nämlich von HL-60 und NB4 (Ries et al., 1994; Ismail et al., 1998), für eine konstitutive Sekretion von MMP-9 verantwortlich. Deshalb sollte die hier in den THP-1 Zellen demonstrierte Bedeutung von ERK1/2 auch in diesen beiden Zelllinien untersucht werden.

#### 3.5.1 Inhibition von ERK1/2

Mit der Inhibition von ERK1/2 in den Zelllinien NB4 und HL60 sollte hier analog zu den THP-1 Zellen zuerst die Wirkung auf die durch autokrines TNF- $\alpha$  stimulierte MMP-9-Expression überprüft werden. Dafür wurden die Zellen für 24 Stunden mit 1  $\mu$ M bzw. 25  $\mu$ M PD98059 inkubiert, was tatsächlich bei beiden Zelllinien eine konzentrationsabhängige Hemmung der MMP-9 mRNA-Expression auslöste. In den HL60 Zellen senkte die Inhibition der ERK1/2-Signaltransduktion die Expression auf 40% (Abb. 24A) und in den NB4 Zellen auf 10% (Abb. 24C) der unbehandelten Kontrollen. Die zymografische Analyse der Zellkulturüberstände zeigte nach Zugabe des MEK1/2-Inhibitors ebenfalls eine drastische Reduktion

der MMP-9-Proteinsekretion. Nach Behandlung der HL-60 Zellen mit 25  $\mu\text{M}$  PD98059 war fast kein Enzym mehr detektierbar, da die basale MMP-9-Freisetzung dieser Zellen generell sehr gering war (Abb. 24B). Die NB4 Zellen hingegen wiesen eine vergleichsweise starke MMP-9-Sekretion auf, die durch PD98059 signifikant aber nicht vollständig blockiert werden konnte (Abb. 24D). Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass die kontinuierliche Syntese von MMP-9 mRNA und Protein in HL-60 und NB4 Zellen über die ERK1/2-Aktivität reguliert wird.



**Abb. 24: Analyse der MMP-9-Expression in HL-60 und NB4 Zellen nach Inhibition des ERK1/2-Signalwegs.** Die Zelllinien HL60 und NB4 wurden jeweils in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml mit verschiedenen Konzentrationen von PD98059 für 24 Stunden inkubiert. **(A)** Die MMP-9 mRNA-Expression der HL60 Zellen wurde gegen GAPDH und **(C)** der NB4 Zellen gegen CPB normalisiert. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung von einem von 3 Experimenten. **(B)** 30  $\mu\text{l}$  der Kulturüberstände der HL60 Zellen wurden unverdünnt und **(D)** der NB4 Zellen in der Verdünnung 1:10 zymografisch analysiert. (Detaillierte Angabe der Ergebnisse im Text)

### 3.5.2 Inhibition von p38

Zur Untersuchung der Bedeutung von p38 für die MMP-9-Expression in den Zelllinien HL60 und NB4 wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des p38-Inhibitors SB202190 inkubiert. Die Analyse der MMP-9 mRNA-Expression aus den HL60 Zellen zeigte eine konzentrationsabhängige Stimulation durch 0,1  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  SB202190 (Abb. 25A). Dagegen trat bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  SB202190 eine Reduktion der MMP-9 mRNA um 50% auf. In Übereinstimmung mit den Daten der qRT-PCR war in der Zymografie das Maximum der MMP-9-Sekretion bei 1  $\mu\text{M}$  SB202190 vorhanden. Die MMP-9-Sekretion wurde nicht bei 0,1  $\mu\text{M}$  SB202190, jedoch durch 10  $\mu\text{M}$  des p38-Inhibitors geringfügig stimuliert, was vermuten lässt, dass die MMP-9 mRNA-Expression vorübergehend erhöht war und später wieder absank (Abb. 25B).

Abb. 25A

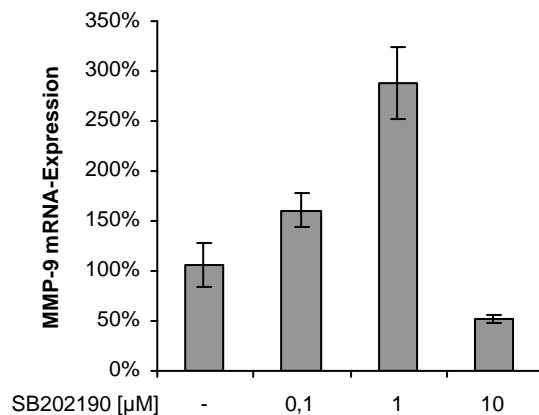


Abb. 25C

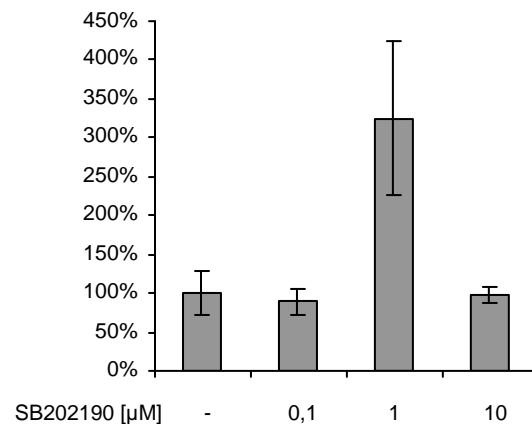


Abb. 25B

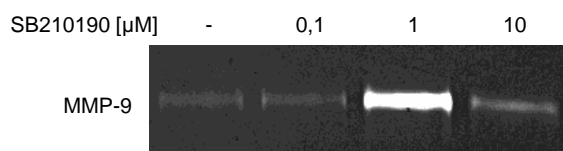
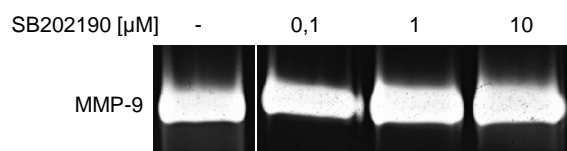


Abb. 25D



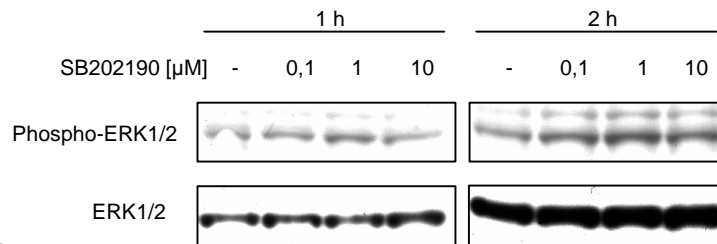
**Abb. 25: Untersuchung der MMP-9-Expression in HL-60 und NB4 nach Hemmung von p38.**

Die Zelllinien (A, B) HL60 und (C, D) NB4 wurden in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors SB202190 für 24 Stunden inkubiert. (A, C) Die quantifizierte MMP-9 mRNA wurde normalisiert zu GAPDH bzw. zu CPB. Gezeigt sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung von zwei Experimenten. Zur Analyse in der Zymografie wurden die Zellkulturüberstände (B) von HL60 unverdünnt und (D) von NB4 Zellen in einer Verdünnung von 1:5 aufgetragen. (Detaillierte Angabe der Resultate im Text)

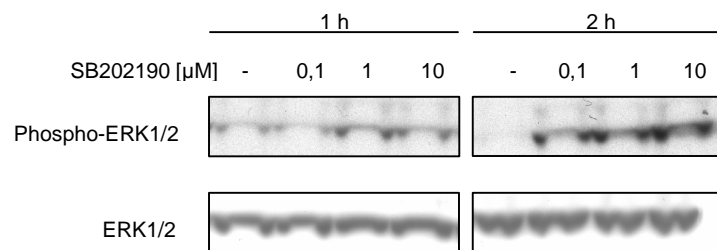


Auch in den NB4 Zellen stimulierte 1  $\mu\text{M}$  des p38-Inhibitors die MMP-9 mRNA-Expression, jedoch war keine Änderung mit 0,1  $\mu\text{M}$  oder 10  $\mu\text{M}$  SB202190 (Abb. 25C) zu beobachten. Ähnlich wie in den HL60 Zellen war auch die MMP-9-Proteinsynthese bei 1  $\mu\text{M}$  und bei 10  $\mu\text{M}$  des p38-Inhibitors leicht erhöht (Abb. 25D).

**Abb.26A**



**Abb. 26B**



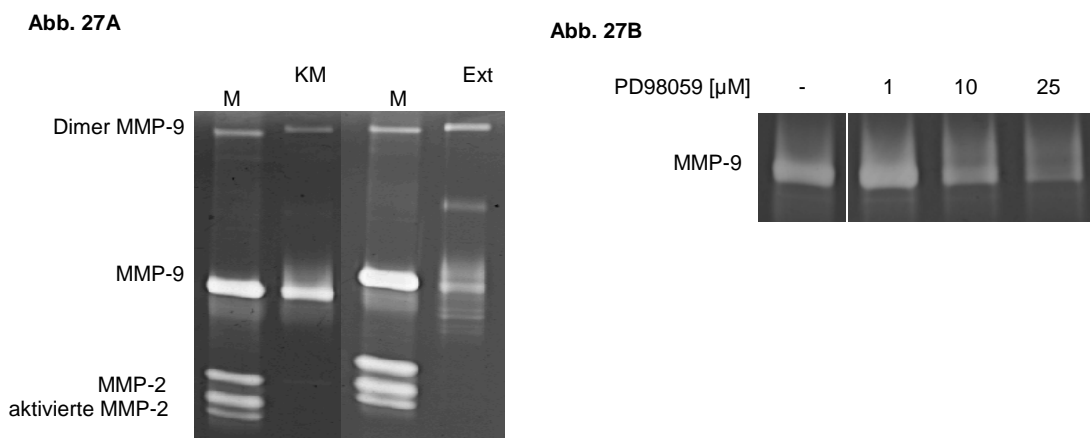
**Abb. 26: Analyse der ERK1/2-Phosphorylierung in HL60 und NB4 Zellen nach Inhibition von p38.**

(A) HL60 und (B) NB4 Zellen wurden in einer Dichte von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml für den angegebenen Zeitraum mit verschiedenen Konzentration von SB202190 inkubiert. Die Lysate der Zellen wurden im Western Blot mit Antikörpern gegen phosphoryliertes ERK1/2 (oben) bzw. gesamtes ERK1/2 Protein (unten) analysiert. (Detaillierte Ergebnis-angabe der im Text)

Da in HL60 und NB4 Zellen durch Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  SB202190 die Synthese von MMP-9 mRNA und Protein stimuliert wurde, sollte getestet werden, ob unter diesen Bedingungen auch eine veränderte Aktivität von ERK1/2 auftritt. Nach Inkubation der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des p38-Inhibitors erfolgte hierfür die Detektion von phosphoryliertem ERK1/2. Sowohl die HL-60 als auch die NB4 Zellen zeigten in einem Zeitraum von 1 und 2 Stunden der Behandlung mit 1  $\mu\text{M}$  SB202190 eine gesteigerte Phosphorylierung von ERK1/2 (Abb. 26A, B). Nach 2 Stunden wurde sogar in allen mit SB202190 behandelten Ansätzen eine stärkere Aktivierung von ERK1/2 festgestellt. Diese Daten lassen vermuten, dass der Einfluss von p38 auf die MMP-9-Expression auch bei den HL60 und NB4 Zellen über die ERK1/2-Signaltransduktion vermittelt wird.

### 3.6 Inhibition von ERK1/2 in Monozyten

Nachdem die zentrale Rolle von ERK1/2 in der basalen MMP-9-Synthese der Zelllinien THP-1, HL60 und NB4 demonstriert worden war, stellte sich die Frage, inwiefern dies spezifisch auf Leukämiezelllinien zutrifft. Deshalb sollte auch die Regulation der MMP-9 an primären Monozyten untersucht werden, die zudem den myeloiden Leukämiezellen, besonders den THP-1 Zellen ähnlich sind. Für die Isolierung aus peripherem Blut wurde eine Methode verwendet, die auf markierten Antikörpern beruht und eine zellschonende Anreicherung der Monozyten erlaubte ohne diese zu stimulieren. Die Zellen wurden unter serumfreien Bedingungen in Kultur genommen und unstimuliert oder mit verschiedenen Konzentrationen des MEK1/2 Inhibitors für 24 Stunden behandelt. Um die Synthese und Sekretion von MMP-9 von isolierten Monozyten nachzuweisen, wurden konditioniertes Medium (KM) und Triton-X-100 Extrakt (Ext) der unstimulierten Monozyten mittels Zymografie analysiert. Anhand des zum Vergleich aufgetragenen Markers (M, konditioniertes Medium von PMA-stimulierten HT1080 Zellen) konnte gezeigt werden, dass die Monozyten unter diesen nicht-stimulierenden Bedingungen monomeres sowie dimeres MMP-9 sezernieren (Abb. 27A). Im Extrakt wurden zusätzlich noch weitere kleinere MMP-9-Formen detektiert. Eine gelatinolytische



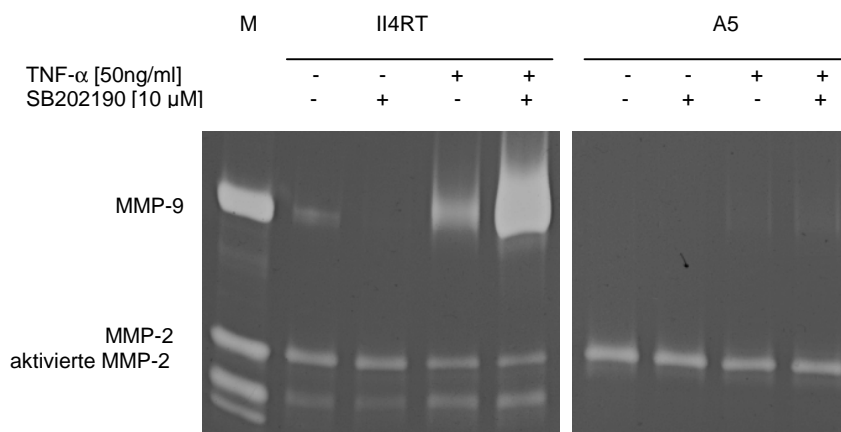
**Abb. 27: Analyse der MMP-9 Expression primärer Monozyten nach Hemmung der ERK1/2-Aktivierung.**

Aus peripherem Blut mehrerer Personen wurden mit CD14-MACS selektiv Monozyten isoliert und in einer Dichte von  $1,5 \times 10^6/\text{ml}$  in serumfreien Medium für 24 Stunden inkubiert. **(A)** Das konditionierte Medium (KM) und ein Triton-X-100-Extrakt (Ext) von unstimulierten Zellen wurden zymografisch untersucht. Konditioniertes Medium von PMA-stimulierten HT1080 Zellen wurde als Marker (M) aufgetragen. **(B)** Auf diese Weise isolierte Monozyten wurden unbehandelt oder mit verschiedenen Konzentrationen von PD98059 inkubiert und die MMP-9 Sekretion mittels Zymografie analysiert. (Detaillierte Angabe der Resultate im Text)

Aktivität, die bezüglich des Molekulargewichtsstandards zwischen der Größe des MMP-9-Monomers und -Dimers lag, entsprach vermutlich einem kovalentem Komplex von MMP-9 mit einem anderen Protein. Die zymografische Analyse der konditionierten Medien von mit PD98059 behandelten Ansätzen zeigte, dass auch in Monozyten die MMP-9-Sekretion konzentrationsabhängig durch den MEK1/2-Inhibitor gehemmt wurde (Abb. 27B). Die MMP-9-Proteinsynthese wurde ab 10  $\mu\text{M}$  des Inhibitors geringfügig gehemmt und mit 25  $\mu\text{M}$  PD98059 maximal gehemmt. Dagegen führte der MEK1/2-Inhibitor in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  zu einer leicht erhöhten MMP-9-Sekretion.

### 3.7 Inhibition von p38 in HaCaT Keratinozyten

In einer kürzlich publizierten Studie wurde bereits in den HaCaT Zellen eine Korrelation von TNF- $\alpha$ , ERK1/2 und der MMP-9-Expression demonstriert (Holvoet et al., 2003). Da in diesen Zellen offenbar die TNF- $\alpha$ -induzierte MMP-9-Expression durch die gleiche Signaltransduktion vermittelt wird wie in den THP-1 Zellen sollte hier auch der Einfluss von p38 untersucht werden. 2 Zellklone dieser Zelllinie, II-4RT und A5, die eine hohe bzw. niedrige Aktivität der Signaltransduktion von Ras-Raf-ERK1/2 auszeichnet, wurden dafür mit oder ohne SB202190 unter



**Abb. 28: Untersuchung der MMP-9-Expression in II4-RT und A5 HaCaT Zellen nach Stimulation mit TNF- und Inhibition von p38.**

Eine Vorbehandlung der konfluenten HaCaT Keratinozyten II-4RT und A5 in Gegenwart oder Abwesenheit von SB202190 erfolgte für 5 Minuten. Wie angegeben wurden die Zellen für 24 Stunden ohne oder mit 50 ng/ml TNF- $\alpha$  inkubiert. 30  $\mu\text{l}$  der Kulturüberstände wurden in der Zymografie im Vergleich zu einem Marker (M, konditioniertes Medium von PMA-stimulierten HT1080 Zellen) aufgetragen. (Detaillierte Angabe der Ergebnisse im Text)

serumfreien Bedingungen vorinkubiert. Anschliessend wurden die Zellen für 24 Stunden unbehandelt belassen oder TNF- $\alpha$  zugegeben, da diese Zellen über keine autokrine TNF- $\alpha$ -Stimulation verfügen. Wie die Zymografie zeigt, sezernierten die II-4RT Zellen konstitutiv MMP-9, was aber der p38-Inhibitor blockierte. Zugabe von TNF- $\alpha$  stimulierte die MMP-9-Produktion in den II4-RT Zellen, was durch die Inhibition von p38 noch deutlich verstärkt wurde. Die MMP-2-Sekretion der nicht-aktivierten Form schien sich dabei insgesamt nicht zu verändern, während hingegen eine verstärkte Prozessierung des Proenzym zur aktivierten Form von MMP-2 nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  auftrat (Abb. 28). Eine konstitutive MMP-9-Sekretion konnte bei den A5 Zellen nicht festgestellt werden, und auch durch TNF- $\alpha$  wurde die MMP-9-Proteinexpression nur geringfügig induziert. Der p38-Inhibitor hatte hier unter basalen Bedingungen keinen Einfluss und nach TNF- $\alpha$ -Stimulation war nur eine durch den p38-Inhibitor erhöhte MMP-9-Expression feststellbar (Abb. 28). Zusammengefasst lässt sich daraus schließen lässt, dass auch in Tumorzellen die TNF- $\alpha$ -induzierte MMP-9-Expression durch Inhibition von p38 stimuliert werden kann.

## **4 Diskussion**

Die Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9) ist in Geweben vieler maligner Tumore überexprimiert und fördert aufgrund ihrer multiplen Funktionen das Wachstum und die Metastasierung von Tumorzellen. Ein wichtiger physiologischer Faktor in der Stimulation der MMP-9-Expression ist TNF- $\alpha$ , der in vielen Tumoren kontinuierlich sezerniert, ebenfalls das Wachstum verstärkt. Neben Tumorzellen setzen vor allem auch Monozyten, die Tumorgewebe infiltrieren, MMP-9 frei und begünstigen dadurch die Tumorprogression.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Regulation der MMP-9-Expression in Zelllinien untersucht, die durch autokrine Stimulation mit TNF- $\alpha$  charakterisiert sind. Im Mittelpunkt stand dabei die Analyse der Beteiligung der Signaltransduktionen der MAPK und von NF $\kappa$ B mit dem Ziel durch spezifische Inhibition der Signaltransduktion die MMP-9-Sekretion zu senken. Ein besseres Verständnis der Regulation der MMP-9-Expression als bedeutendes Element der Tumorprogression könnte Grundlage für einen neuen therapeutischen Ansatz sein. Die hier untersuchte Strategie einer Modulation der MMP-9-Expression auf der Ebene der Signaltransduktion ist insofern von Bedeutung, als sich eine Hemmung der MMP-Aktivität durch direkte MMP-Inhibitoren in klinischen Studien bisher weitgehend nicht als effektive Behandlung darstellt.

### **4.1 Charakterisierung der autokrin TNF- $\alpha$ -stimulierten MMP-9-Expression**

Zur Untersuchung der MMP-9-Expression wurde die Leukämiezelllinie THP-1 gewählt, da diese monozytäre Eigenschaften aufweist und durch eine konstitutive Freisetzung von MMP-9 charakterisiert ist. Letzteres ist insofern ungewöhnlich, als die MMP-9-Synthese unter physiologischen Bedingungen ebenso wie in Zellkultur stringent reguliert wird und im Prinzip nur nach geeigneter Stimulation erfolgt. Deshalb sollte zunächst geklärt werden, ob möglicherweise ein autokriner Regelkreis, wie er aus anderen Leukämiezelllinien (HL-60 und NB4) bekannt ist, hierfür in den THP-1 Zellen verantwortlich ist. In der Tat bedingte eine autokrine TNF- $\alpha$ -Stimulation der THP-1 Zellen die kontinuierliche MMP-9 mRNA-Expression

und Proteinsekretion, wie dies auch in den HL-60 Zellen gezeigt wurde (Ries et al., 1994). Bei genauerer Charakterisierung wurde nachgewiesen, dass freigesetztes lösliches TNF- $\alpha$  durch eine Aktivierung von TNF-R1 die Induktion von MMP-9 vermittelte, was übereinstimmt mit der Regulation in NB4 Zellen (Ismair et al., 1998). Diese Stimulation durch lösliches TNF- $\alpha$ , das an den TNF-R1 bindet, ist im allgemeinen auch die vorherrschende Art der Signalübermittlung durch das Zytokin TNF- $\alpha$  (Hehlhans and Mannel, 2002).

Mit der Neutralisierung von TNF- $\alpha$  durch spezifische Antikörper konnte in den THP-1 Zellen eine sehr effektive, aber nicht vollständige Blockierung der basalen MMP-9-Expression erreicht werden. Eine mögliche Erklärung dafür wäre einerseits, dass nicht alle TNF- $\alpha$  Moleküle neutralisiert wurden. Andererseits ist auch ein leichter unspezifischer stimulatorischer Effekt denkbar, der durch die Anti-TNF- $\alpha$  Antikörper hervorgerufen wurde, da auch die Kontrollantikörper die MMP-9 mRNA-Expression minimal steigerten.

Die Blockierung von TNF-R1 durch neutralisierende Antikörper inhibierte ebenfalls die MMP-9-Expression, erwies sich aber verglichen mit der Neutralisierung von TNF- $\alpha$  als weniger effizient. Die Hemmung von TNF-R2 hingegen hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Synthese von MMP-9. Jedoch führte die gleichzeitige Neutralisierung von TNF-R1 und TNF-R2 zu einer stärkeren Hemmung der MMP-9-Expression als die Blockierung von TNF-R1 alleine. Daraus lässt sich folgern, dass TNF-R2 die MMP-9-Expression nicht unmittelbar regulierte, sondern über den Mechanismus des *ligand passing* von löslichem TNF- $\alpha$ , wodurch die Aktivierung von TNF-R1 verstärkt wurde. Interessanterweise überwog hier erst bei höheren Antikörper-Konzentrationen die inhibitorische Wirkung. Die beobachtete leichte Stimulation der MMP-9 mRNA-Expression durch geringe Konzentrationen von Anti-TNF-R1 und Anti-TNF-R2 hing vielleicht mit einer von den Antikörpern begünstigten Trimerisierung der Rezeptoren und dadurch ausgelösten Aktivierung zusammen.

Der Einsatz des spezifischen TACE-Inhibitors Ro32-7315 belegte schließlich, dass die Zellmembran-assoziierte Aktivität von TACE für die TNF- $\alpha$ -Freisetzung und die so induzierte MMP-9-Expression verantwortlich war. Dies steht im Einklang mit einer Untersuchung von Robinson et al., bei der die MMP-9-Expression der THP-1

Zellen durch einen unspezifischen Metalloproteinase-Inhibitor gesenkt worden war (Robinson et al., 2002). Die Regulation durch autokrine Stimulation mit TNF- $\alpha$  wurde zudem für die MMP-1-Expression in U937 Zellen gezeigt und könnte deshalb auch für andere MMPs in Leukämiezellen von Bedeutung sein (Callaghan et al., 1996).

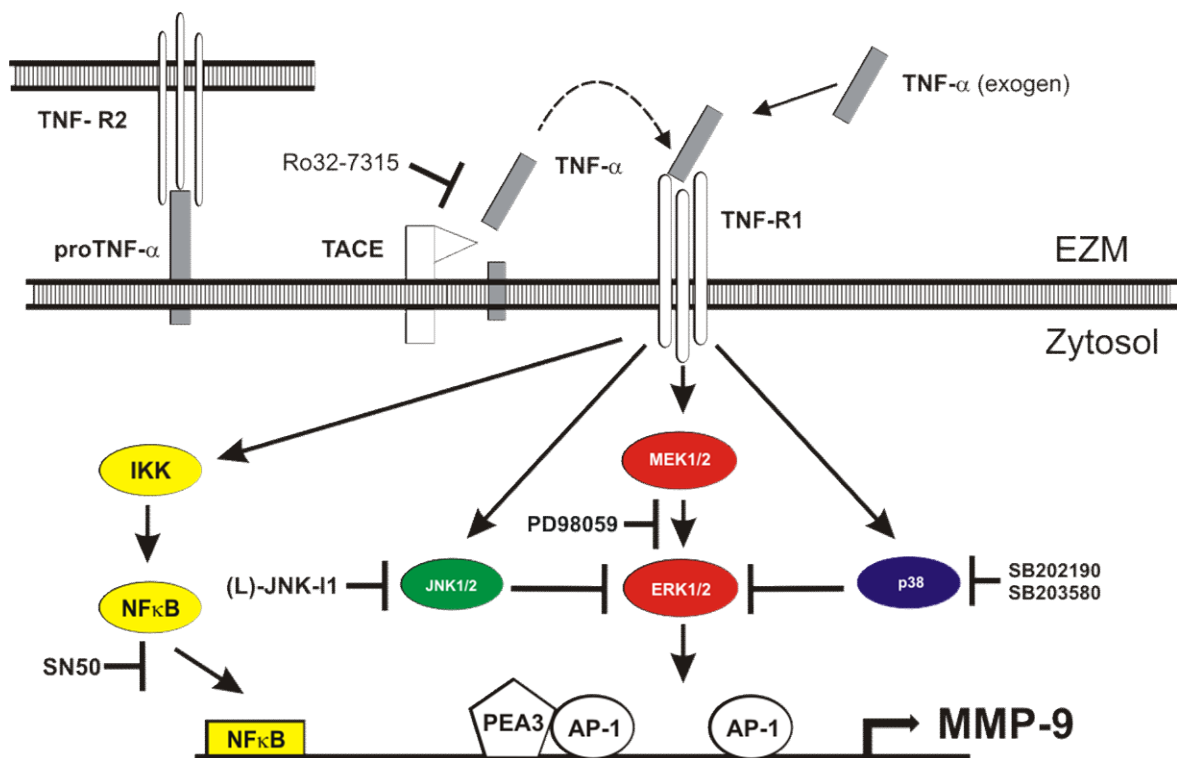
## **4.2 Regulation der basalen MMP-9-Expression durch die Signaltransduktion**

Wie hier und auch von anderen Autoren gezeigt, weisen somit THP-1, HL-60 und NB4 Zellen übereinstimmend eine basale MMP-9-Expression auf, die durch autokrine TNF- $\alpha$ -Stimulation ausgelöst wird. Die intrazelluläre Signaltransduktion des TNF-R1 aktiviert unter anderem die MAPK. Die spezifische Blockierung der ERK1/2-Signaltransduktion reduzierte in allen drei Zelllinien deutlich und konzentrationsabhängig die MMP-9 mRNA-Expression und Proteinsynthese. Auch in unstimulierten primären humanen Monozyten konnte in dieser Arbeit so mittels MEK1/2-Inhibitoren eine Senkung der MMP-9-Proteinsekretion erreicht werden. Diese Ergebnisse belegen erstmalig die zentrale Bedeutung von ERK1/2 für die basale und autokrin TNF- $\alpha$ -induzierte MMP-9-Genexpression. Frühere Untersuchungen in verschiedenen anderen Zelllinien ließen bereits eine essentielle Rolle von ERK1/2 für die PMA-induzierte MMP-9-Expression vermuten (Genersch et al., 2000).

Durch die Inhibition der MAPK p38 und JNK in den THP-1 Zellen wurde die MMP-9-Expression jedoch nicht unterdrückt. Im Gegensatz zur Inhibition von MEK1/2 lösten diese Inhibitoren sogar eine unerwartete, starke und konzentrationsabhängige Steigerung der MMP-9 mRNA-Expression und Proteinsynthese aus. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von p38 und JNK mit einer gesteigerten Aktivierung der Kinase ERK1/2 assoziiert war, was vermutlich die Stimulation der MMP-9-Expression bewirkte.

Auch in den HL-60 und NB4 Zellen wurde durch die Inhibition von p38 die MMP-9-Expression nicht signifikant gehemmt. Allerdings war hier keine konzentrationsabhängige Steigerung zu beobachten, möglicherweise weil HL-60 und NB4 Zellen

weniger differenziert sind als die monozytären THP-1 Zellen. Eine spezifische Stimulation der MMP-9 mRNA-Expression und Proteinsekretion trat in den HL-60 und NB4 Zellen nur bei einem 1  $\mu$ M des p38-Inhibitors SB202190. Mit einer höheren Konzentration des p38-Inhibitors war keine gesteigerte mRNA-Synthese aber eine MMP-9-Sekretion verbunden, was auf eine eventuell vorübergehende Steigerung der mRNA hindeutet. Dies entsprach auch dem Muster der ERK1/2-Phosphorylierung, die anfangs nur von 1  $\mu$ M des p38 Inhibitors verstärkt wurde. Zusammengefasst weisen die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse aber auf eine zentrale Rolle von ERK1/2 bei der Regulation der autokrin TNF- $\alpha$ -stimulierten Expression von MMP-9 hin. Durch die Inhibition von p38 und JNK wurde die MMP-9-Expression der THP-1 Zellen in Abhängigkeit von ERK1/2 stimuliert. Daraus kann geschlossen werden, dass die aktiven Kinasen p38 und JNK als negative Regulatoren der ERK1/2-Aktivität und der MMP-9-Expression agieren



**Abb 29: Modell der TNF- $\alpha$ -regulierten MMP-9-Expression in THP-1 Zellen.** Freies autokrines oder exogenes appliziertes TNF- $\alpha$  bindet an TNF-R1 und induziert die Aktivität von MAPK und NF $\kappa$ B. Die stimulierte ERK1/2-Signaltransduktion induziert die MMP-9-Expression, was aber durch die aktiven Kinasen JNK1/2 und p38 partiell gehemmt werden kann. Die Signaltransduktion von NF $\kappa$ B interagiert nicht mit den MAPK, eine Inhibition von NF $\kappa$ B kann aber die MMP-9-Expression steigern.



können (Abb. 29).

Auf eine mögliche negative Regulation der ERK1/2 Signaltransduktion durch die Interaktion mit p38 weisen bereits frühere Untersuchungen mittels *in vitro*-Kinaseassays hin (Kalmes et al., 1999). Übereinstimmend mit den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnissen wurde kürzlich belegt, dass der p38-Inhibitor SB203580 in U937 und THP-1 Zellen verschiedene Proteine der ERK1/2-Signaltransduktion aktivieren kann (Numazawa et al., 2003). Jedoch wurden in dieser Studie keine spezifischen Auswirkungen auf die Genregulation untersucht.

Bisher konnte nur in wenigen Zellen eine spezifische Regulation der MMPs durch interagierende Signaltransduktionen gezeigt werden. In PC12 Zellen führte die Hemmung von p38 zu einer Stimulation der EGF-regulierten ERK1/2-Aktivität und MMP-3-Expression (New et al., 2001), sowie der PDGF-induzierten MMP-1-Produktion von Fibroblasten (Endo et al., 2003). Interessanterweise wurde kürzlich in primären LPS-stimulierten Monozyten eine differentielle Regulation der MMP-9-Expression durch ERK1/2 und p38 beschrieben (Lai et al., 2003), was mit den eigenen Ergebnissen in THP-1 Zellen und primären Monozyten übereinstimmt. Möglicherweise stellt die Interaktion von p38 mit ERK1/2 einen für die MMP-Expression charakteristischen Mechanismus zur Regulation dar.

Abgesehen von den eigenen hier vorgestellten Daten sind keine Ergebnisse zur Rolle der JNK bei der MMP-Synthese bekannt. Interessanterweise wurde aber gezeigt, dass die Inhibition von JNK die verstärkte Expression einer Serinprotease und dadurch die proteolytische Aktivierung des Proenzym von MMP-9 bewirkt (Rangaswami et al., 2005).

Ein möglicher Mechanismus, durch den die Hemmung von p38 und JNK die ERK1/2-Signaltransduktion verstärken könnte, wäre die Unterbrechung einer negativen *Feedback*-Regulation. Diese kann auf der Inaktivierung von ERK1/2 durch spezifische Proteinphosphatasen beruhen. Die in dieser Arbeit durchgeführte Hemmung der Protein-Phosphatase PP2A mittels Okadainsäure hatte allerdings keine Wirkung, weshalb ihre Beteiligung an der Regulation der MMP-9-Expression ausgeschlossen wurde. Im Gegensatz dazu wurde in Fibroblasten demonstriert, dass eine Inhibition von p38 zur Inaktivierung der Phosphatasen

PP1/PP2A führt, was wiederum eine erhöhte Aktivität von MEK1/2 und verstärkte MMP-1-Expression zur Folge hatte (Westermarck et al., 2001).

### **4.3 Einfluss von Transkriptionsfaktoren auf die basale MMP-9-Expression**

Ein wichtiger durch TNF- $\alpha$  aktivierbarer Transkriptionsfaktor ist NF $\kappa$ B, für den Bindungsstellen im MMP-9-Promotor beschrieben sind (Abb. 29). Erstaunlicherweise reduzierte jedoch die Blockierung von NF $\kappa$ B nicht die autokrin TNF- $\alpha$ -stimulierte MMP-9-Synthese. Eine hohe Konzentration des NF $\kappa$ B-Inhibitors verursachte sogar eine Stimulation von MMP-9 mRNA-Expression und Proteinsynthese. Da der verwendete Inhibitor erst seit kurzem kommerziell erhältlich ist, liegen bisher keine publizierte Daten zur MMP-Genexpression vor. Möglicherweise ist der stimulatorische Effekt des Inhibitors durch Hemmung von Isoformen der NF $\kappa$ B zu erklären wurden, die die Genexpression inhibieren, zum Beispiel indem sie aktivierende Faktoren binden (Sequestrierung).

Zur Aufklärung der Regulation von MMP-9 durch p38 und ERK1/2 in THP-1 Zellen wurden aktivierte Transkriptionsfaktoren untersucht, die von TNF- $\alpha$  und den MAPK reguliert werden und an den MMP-9-Promotor binden können. Nach Inhibition von ERK1/2 oder p38 in den THP-1 Zellen war im EMSA allerdings keine signifikante Änderung in der DNA-Bindung von den Faktoren AP-1, PEA3 und NF $\kappa$ B festzustellen. Die Regulation der MMP-9-Expression durch die MAPK konnte deshalb auf der Ebene der Transkriptionsfaktoren nicht nachvollzogen werden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass im EMSA viele Transkriptionsfaktoren einer Familie detektiert werden, die an dieselbe Sequenz binden. Komplexe aus Transkriptionsfaktoren, die an das identische Oligonukleotid binden, könnten jedoch eine unterschiedliche Zusammensetzung aufweisen. Welche Bedeutung dies haben kann wurde von anderen am Beispiel des MMP-1-Promotor gezeigt, der dem MMP-9-Promotor sehr ähnlich ist. Dort wirkten sich unterschiedliche Transkriptionsfaktoren der Ets-1 Familie aktivierend oder reprimierend auf das AP-1 Element und die Regulation des MMP-1-Promotors aus (Westermarck et al., 1997). Deshalb wäre die Identifizierung spezifischer Muster von AP-1 und

Ets-Komplexen, die die Promotoren verschiedener MMP gleichzeitig regulieren und mit der Metastasierung assoziiert sind, von großem therapeutischem Nutzen.

#### **4.4 Einfluss der Gelatinasen auf die Invasion der THP-1 Zellen**

Da MMP-9 das Kollagen Typ IV degradiert, wurde die Fähigkeit von THP-1 Zellen durch eine rekonstituierte Basalmembran zu wandern untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Zellinvasion nicht beeinflusst wurde durch eine Modulation der MMP-9-Sekretion über die Inhibition von ERK1/2 oder p38. Dies könnte damit erklärt werden, dass MMP-9 als inaktives Proenzym sezerniert wird und unter experimentellen Bedingungen möglicherweise keine verstärkte Aktivierung des Proenzym erfolgen konnte. Diese ist abhängig von der Präsenz aktivierender Proteasen und wird zudem beeinflusst durch TIMP-1, den physiologischen Inhibitor, der an proMMP-9 bindet. Interessanterweise zeigten frühere Untersuchungen einen Zusammenhang zwischen der Invasion und der MMP-2-Expression der THP-1 Zellen (Popp et al., 2003). Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass MMP-2 mehr an der Degradation der BM beteiligt ist, während MMP-9 eventuell mehr regulatorische Funktionen zukommen.

Im Gegensatz zu MMP-9 wird MMP-2 von THP-1 Zellen konstitutiv sezerniert. Die MMP-2-Sekretion konnte deshalb als Kontrolle dienen, dass die verwendeten Inhibitoren nicht zytotoxisch wirken und keinen allgemeinen Einfluss auf Transkription, Translation und Sekretion von Proteinen oder auf die Proliferation der Zellen hatten.

#### **4.5 Exogen TNF- $\alpha$ -induzierte Signaltransduktion und MMP-9-Expression**

Die Zugabe von exogenem TNF- $\alpha$  zu den THP-1 Zellen stimulierte erwartungsgemäß die MMP-9-Expression, was ebenfalls über die Aktivierung von TNF-R1 erfolgte. Da die autokrine und exogene TNF- $\alpha$ -Stimulation der MMP-9-Expression über den gleichen Rezeptor reguliert wurde, kann von der exogenen Situation auch auf die Signaltransduktion unter autokrinen Bedingungen

geschlossen werden. Als Folge der exogenen Stimulation mit TNF- $\alpha$  konnten die aktivierten Signaltransduktionen von ERK1/2, p38 und NF $\kappa$ B nachgewiesen werden. Auffällig in den THP-1 Zellen ist die Aktivierung von ERK1/2 durch TNF- $\alpha$ , die in anderen Zelllinien offenbar nicht möglich oder nur schwach nachweisbar ist. Im Vergleich dazu werden die entzündungsfördernden Kinasen JNK und p38 durch TNF- $\alpha$  typischerweise deutlich stärker aktiviert, da sie auch als Hauptwege der TNF- $\alpha$ -induzierten Signaltransduktion gelten (Wajant et al., 2003). Trotzdem konnte nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  nur die Kinase p38, jedoch nicht JNK in seiner phosphorylierten Form gefunden werden, was vielleicht an einer zu geringen Expression von JNK lag.

Wie die Blockierung durch den MEK1/2-Inhibitor bewies, wurde auch die durch exogenes TNF- $\alpha$  stimulierte MMP-9-Expression durch die ERK1/2-Signaltransduktion vermittelt. Allerdings wurde die TNF- $\alpha$ -stimulierte MMP-9 mRNA-Transkription nicht bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M PD98059 gehemmt, sondern vielmehr geringfügig erhöht. Der Grund hierfür dürfte sein, dass TNF-R1 von ERK1/2 phosphoryliert und dadurch internalisiert werden kann (Cottin et al., 1999; Van Linden et al., 2000). Eine Hemmung dieses Mechanismus durch PD98059 würde also zu einer erhöhten Rezeptorzahl an der Zelloberfläche und erhöhten Aktivität führen, die durch eine zu geringe Inhibitorkonzentration nicht blockiert werden konnte. Dies könnte auch ein Grund sein, weshalb die exogen TNF- $\alpha$ -stimulierte MMP-9-Expression nicht so effektiv blockiert werden konnte, wie dies unter autokrinen Bedingungen der Fall war.

Die Induzierung der MMP-9-Expression aufgrund einer TNF- $\alpha$ -abhängigen ERK1/2-Signaltransduktion wurde vor kurzem übereinstimmend mit den hier gezeigten Ergebnissen auch in Muskelzellen gefunden (Moon et al., 2004). Darüber hinaus wurde eine Korrelation einer TNF- $\alpha$ -stimulierten MMP-9-Expression und der damit verbundenen ERK1/2-Aktivität in den HaCaT Keratinozyten beobachtet (Holvoet et al., 2003). In dem Ras-überexprimierenden HaCaT-Klon H4-RT konnte in der vorliegenden Arbeit demonstriert werden, dass eine Inhibition von p38 die TNF- $\alpha$ -stimulierte MMP-9-Expression noch weiter zu steigern vermag. Dies könnte auf eine Verstärkung der TNF- $\alpha$ -induzierten ERK1/2-Aktivität zurück-

zuföhren sein. Die MMP-9-Sekretion von HaCaT Zellen mit einer geringeren Ras-Aktivität (A5-Zellen) konnten kaum durch TNF- $\alpha$  und den p38-Inhibitor stimuliert werden, was vermuten lässt, dass hierfür eine ausreichende Aktivität der Ras-abhängigen ERK1/2-Signaltransduktion erreicht werden muss.

Obwohl hinreichend gezeigt ist, dass TNF- $\alpha$  in vielen Zellsystemen die MMP-9 Expression induziert, liess sich bisher nur in wenigen Fällen ein Zusammenhang mit den Signaltransduktionen von p38 oder JNK belegen (Westermarck and Kahari, 1999). So wurde bisher nur nach der vergleichsweise unphysiologischen Stimulation mit PMA die induzierte MMP-9-Expression durch Inhibition von JNK oder p38 gehemmt (Shin et al., 2002; Simon et al., 1998).

Die Zugabe von exogenem TNF- $\alpha$  zu den THP-1 Zellen aktivierte auch die Signaltransduktion von NF $\kappa$ B, wie anhand der Phosphorylierung von I $\kappa$ B gezeigt werden konnte. Die Inhibition von NF $\kappa$ B konnte allerdings die exogen TNF- $\alpha$ -stimulierte MMP-9-Expression nicht hemmen. Wie schon unter autokrinen Bedingungen beobachtet, wurde die MMP-9-Expression durch eine hohe Konzentration des NF $\kappa$ B-Inhibitors noch gesteigert. Auch interagierten ERK1/2 und p38 nicht mit der Signaltransduktion von NF $\kappa$ B, da sich nach Inhibition von diesen Kinasen die Phosphorylierung von I $\kappa$ B und die Aktivierung von NF $\kappa$ B im EMSA nicht veränderten. Damit wurde erneut demonstriert, dass in den THP-1 Zellen die TNF- $\alpha$ -induzierte ERK1/2-Signaltransduktion die MMP-9-Expression direkt und nicht über NF $\kappa$ B aktiviert. Dieser Mechanismus unterscheidet sich von der in Muskelzellen beschriebenen Regulation, bei der die TNF- $\alpha$ -aktivierte ERK1/2 die MMP-9-Expression über NF $\kappa$ B reguliert (Moon et al., 2004).

Wie schon anhand eines verkürzten MMP-9-Promotorkonstrukts nachgewiesen wurde, ist für die Induktion mit TNF- $\alpha$  eine AP-1 nicht aber eine NF $\kappa$ B-Bindungsstelle essentiell (He, 1996). Trotzdem ist das NF $\kappa$ B-Element häufig an einer starken TNF- $\alpha$ -induzierten Aktivierung des MMP-9-Promotors beteiligt. Eine Aktivierung der MMP-9-Transkription durch NF $\kappa$ B wäre trotz des NF $\kappa$ B-Inhibitors allerdings denkbar, da der Inhibitor am Promotor bereits gebundenes NF $\kappa$ B nicht hemmen kann, sondern nur die Translokation des neu aktivierten Faktors. Neuere Daten lassen die Aufgabe von NF $\kappa$ B in der Aktivierung des Chromatins vermuten

(Yan et al., 2004), was in diesem Fall erklären würde, dass eine neue Bindung von NF $\kappa$ B nicht mehr notwendig wäre.

#### **4.6 Die Rolle von TNF- $\alpha$ in der MMP-9-Expression und Tumorprogression**

Die essentielle Rolle von TNF- $\alpha$  in der Tumorprogression wurde bereits in einigen Mausmodellen dargestellt. Bei der Entstehung von Hautkrebs wurde diesbezüglich darüber hinaus ein Zusammenhang mit der Aktivierung von AP-1 nachgewiesen (Arnott et al., 2002). Eine weitergehende neue Studie an Mäusen wies auf die Bedeutung von MMP-9 in der TNF- $\alpha$ -induzierten Tumorprogression hin, da durch TNF- $\alpha$ -Behandlung von Kolonkarzinomzellen die MMP-9-Expression sowie Tumorzell-Adhäsion, -Invasion und die Metastasierung in Lunge und Leber ausgelöst wurden. Diese Vorgänge konnten durch die Blockierung des ERK1/2-Signaltransduktionsweges unterdrückt werden, was die essentielle Rolle von ERK1/2 in der TNF- $\alpha$ -induzierten MMP-9-Expression und Tumorprogression untermauert (Choo et al., 2005). Da nur der TNF-R1, nicht aber die Aktivierung der ERK1/2-Signaltransduktion vermitteln kann (Jupp et al., 2001), könnte dies die Erklärung sein, weshalb TNF- $\alpha^{-/-}$ - und TNFR-1 $^{-/-}$ -Mäuse gegen einige Tumorarten resistent sind, nicht aber TNF-R2-Knock-out-Mäuse (Arnott et al., 2004).

In Tumoren wird TNF- $\alpha$  durch aktivierte Monozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten freigesetzt, die Teil einer ersten Antwort des Immunsystems auf Tumorzellen sind. Einerseits können hohe lokale TNF- $\alpha$ -Konzentrationen zu einer massiven Immunantwort mit akuter Entzündung und Nekrose führen, was eine Hemmung des Tumorwachstums zur Folge hat. Andererseits fördert die kontinuierliche Freisetzung von TNF- $\alpha$ , wie sie auch in einer chronischen Entzündung auftritt, die Tumorprogression, indem die Expression vieler anderer Zytokine, Proteasen, Wachstums- und Angiogenesefaktoren induziert werden. Die Bildung neuer Blutgefäße, bei der MMP-9 eine wichtige Rolle spielt, ist für das Tumorwachstum ebenso charakteristisch wie für Entzündungsprozesse und die Wundheilung (Balkwill and Coussens, 2004).

Eine interessante Parallele von Tumoren und Entzündung ist auch die Tatsache, dass sowohl in Tumoren, wie in chronische Entzündungsherde Immunzellen einwandern, die für die Expression von Zytokinen und MMPs verantwortlich sind. Vermutlich ziehen deshalb chronisch entzündliche Erkrankungen des Magen-Darm-Trakts wie Morbus Crohn oder Bowel's Disease auch ein erhöhtes Risiko für eine Tumorerkrankung nach sich (Balkwill and Coussens, 2004). Bei der rheumatoiden Arthritis, die ebenfalls durch infiltrierende Monozyten sowie der Sekretion von TNF- $\alpha$  und der Bildung von MMP-9 charakterisiert ist, konnte die chronische Entzündung durch TNF- $\alpha$ -neutralisierende Antikörper behandelt werden (Lipsky et al., 2000). Erkrankungen wie Alzheimer und multiple Sklerose, wurden ebenfalls mit einer chronischen Entzündung assoziiert, da auch hier vermehrt Monozyten, aktivierte Makrophagen und sowie eine erhöhte MMP-9-Expression gefunden wurde. Inwiefern eine TNF- $\alpha$ -induzierte ERK1/2-Signaltransduktion daran beteiligt ist, und ob eine Inhibition dieses Signalwegs einen therapeutischen Erfolg haben kann, muss erst noch untersucht werden.

#### **4.7 Bedeutung der MAPK-Inhibition für die Therapie**

Die Inhibition der intrazellulären Signaltransduktion gilt als vielversprechender alternativer Ansatz für therapeutische Anwendungen. Verschiedene Inhibitoren zur Blockierung der Signaltransduktionswege von NF $\kappa$ B, JNK, p38 und befinden sich derzeit in klinischen Studien zur Therapie von Entzündungs- und Tumorerkrankungen (Malemud et al., 2003; Sebolt-Leopold and Herrera, 2004; Yamamoto and Gaynor, 2001). Aufgrund der in der hier vorgelegten Dissertationsarbeit beschriebenen Ergebnisse muss man allerdings erwarten, dass durch eine Verwendung dieser Hemmstoffe die MMP-9-Expression nicht gesenkt werden kann. Im Gegenteil könnte vor allem bei infiltrierenden Monozyten eine Aktivierung von ERK1/2 und eine dadurch bedingte Induktion der MMP-9-Sekretion auftreten. Dies beinhaltet die Gefahr, dass durch die Funktion von MMP-9 Tumorinvasion, Metastasierung und Angiogenese gefördert werden. Die Möglichkeit solcher unerwarteten Nebenwirkungen wurde bereits in einem Experiment bestätigt, in dem die Inhibition von p38 die VEGF-abhängige Angiogenese verstärkte

(Issbrucker et al., 2003). Ob MMP-9, die bestimmte Funktionen in der Angiogenese erfüllt, in diesem Fall verstärkt exprimiert war, wurde nicht untersucht und kann nur vermutet werden. Aufgrund der Ähnlichkeit der Promotoren von MMP-9 mit anderen induzierbaren MMP-Promotoren, wie denen von MMP-1, -3, -7 und -13, ist nicht auszuschliessen, dass vielleicht auch andere MMPs verstärkt exprimiert werden. Die Aktivität von ERK1/2 spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Produktion verschiedener weiterer MMPs (Westermarck and Kahari, 1999). Unsere Untersuchungen legen nunmehr nahe, dass die ERK1/2-Signaltransduktion ein geeignetes Ziel zur Blockade der MMP-9-Expression darstellt. In vielen verschiedenen Tumorzellen sind erhöhte Aktivitäten der ERK1/2-Signaltransduktion beobachtet worden. Daher wird gegenwärtig in klinischen Studien die Wirksamkeit von MEK1/2-Inhibitoren zur Hemmung von Wachstum und Invasion maligner Tumore überprüft (Sebolt-Leopold and Herrera, 2004). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen auf molekularer Ebene, dass MEK1/2-Inhibitoren effizient und gezielt die MMP-9-Expression blockieren, was den therapeutischen Einsatz dieser Wirkstoffe vielversprechend erscheinen lässt.



## 5 Zusammenfassung

Die Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) wird in Tumoren häufig verstärkt exprimiert. MMP-9 fördert die Tumorprogression zum einen durch erhöhte Degradation diverser Komponenten der extrazellulären Matrix und zum anderen durch Aktivierung und Inaktivierung von regulatorischen Proteinen mittels limitierter Proteolyse. Es wurde gezeigt, dass nicht nur Tumorzellen selbst MMP-9 produzieren, sondern auch Leukozyten, die Tumorgewebe infiltrieren, sezernieren MMP-9 und sind so an der Metastasierung beteiligt. Ziel dieser Arbeit war es im Zellkulturmodell von Leukämiezellen Mechanismen der intrazellulären Signaltransduktion zu identifizieren, durch deren Blockade möglicherweise ein gezieltes Abschalten der MMP-9-Synthese erreicht werden könnte.

An der monozytären Leukämiezelllinie THP-1, konnte gezeigt werden, dass deren basale MMP-9-Expression auf einer autokrinen Stimulation mit TNF- $\alpha$  beruht. Durch gezielte Blockierung von TACE und den Einsatz neutralisierender Antikörper gegen die TNF-Rezeptoren wurde nachgewiesen, dass aus den Zellen freigesetztes lösliches TNF- $\alpha$  primär über den TNF-R1 die MMP-9-Expression induzierte.

Eine Beteiligung der drei physiologisch bedeutensten Mitogen-activated Protein-Kinases (MAPK) an der intrazellulären Signaltransduktion wurde daraufhin untersucht. Wie gezeigt werden konnte, wurde die autokrin TNF- $\alpha$ -stimulierte MMP-9 mRNA-Expression und Proteinsynthese in den THP-1 Zellen durch Verwendung von Inhibitoren der ERK1/2 signifikant blockiert. Dagegen führte die Hemmung von p38 oder JNK zu einer deutlichen Steigerung der MMP-9-Expression, die wiederum mit einer Aktivierung von ERK1/2 einherging. Daraus konnte geschlossen werden, dass die MMP-9-Transkription durch ERK1/2-Aktivität reguliert wird, die ihrerseits einer negativen Modulation durch die Kinasen p38 und JNK unterliegt. Eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B an der MMP-9-Expression konnte nicht nachgewiesen werden, weshalb dem ERK1/2-Signalweg eine zentrale Rolle in der Regulation der MMP-9-Expression zugeschrieben werden muss.

Bei der Analyse aktivierter Transkriptionsfaktoren, die an die Elemente AP-1, PEA3 sowie NF $\kappa$ B im MMP-9-Promotor binden und die Transkription induzieren könnten, ließ sich allerdings kein Zusammenhang zur ERK1/2-Aktivität erkennen. Möglicherweise sind für die Aktivierung der MMP-9-Expression einzelne Isoformen von Faktoren, die hier nicht detektiert werden konnten, oder andere Transkriptionsfaktoren verantwortlich.

Obwohl die MMP-9-Proteinsekretion durch die Inhibition von ERK1/2 und p38 negativ bzw. positiv reguliert wurde, korrelierte dies nicht mit dem *in vitro* Invasionsverhalten der THP-1 Zellen durch eine rekonstituierte Basalmembran. Der Grund hierfür dürfte sein, dass das invasive Potential der Zellen nicht nur eine Freisetzung sondern auch eine Aktivierung des MMP-9-Proenzym im extrazellulären Milieu voraussetzt.

Eine exogene Zugabe von TNF- $\alpha$  führte zu einer deutlichen Erhöhung der basalen MMP-9-Expression in THP-1 Zellen. Analog zum autokrinen Mechanismus wurde die parakrine Stimulation ebenfalls über TNF-R1 vermittelt. Die Zugabe von TNF- $\alpha$  aktivierte ERK1/2, p38 und NF $\kappa$ B. Die Blockierung der ERK1/2-Signaltransduktion hatte auch hier eine Hemmung der MMP-9-Expression zur Folge. Jedoch gelang es nicht durch Verwendung eines NF $\kappa$ B-Inhibitors die exogen TNF- $\alpha$ -stimulierte MMP-9-Expression zu hemmen.

Die in den THP-1 Zellen erhaltenen Daten konnten in HL-60 und NB4 Zellen sowie in primären Monozyten zum großen Teil bestätigt werden. Auch in diesen Zellen wurde die MMP-9-Expression durch Blockierung der ERK1/2-Signaltransduktion nicht aber durch Inhibition der p38 gehemmt. Bestimmte Konzentrationen des p38-Inhibitors verursachten in den HL-60 und NB4 Zellen, wie zuvor bei den THP-1 Zellen eine Erhöhung der ERK1/2-Aktivität und MMP-9-Freisetzung. In allen Experimenten blieb die konstitutiv MMP-2-Sekretion unverändert, was zeigt, dass aufgrund der differentiellen Regulation der Gelatinasen MMP-9 spezifisch gehemmt werden kann.

Aus den hier vorgelegten Untersuchungen läßt sich ableiten, dass die Hemmung der ERK1/2-Signaltransduktion nicht aber von p38 und JNK dazu geeignet ist in einer Tumorthherapie die TNF- $\alpha$ -induzierte MMP-9-Expression zu senken.

## 6 Literaturverzeichnis

- 1 Ala-Aho, R. and Kahari, V.M. (2005). Collagenases in cancer. *Biochimie* 87, 273-286.
- 2 Alessi, D.R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D.T., and Saltiel, A.R. (1995). PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 270, 27489-27494.
- 3 Arlt, M., Kopitz, C., Pennington, C., Watson, K.L., Krell, H.W., Bode, W., Gansbacher, B., Khokha, R., Edwards, D.R., and Kruger, A. (2002). Increase in gelatinase-specificity of matrix metalloproteinase inhibitors correlates with antimetastatic efficacy in a T-cell lymphoma model. *Cancer Res.* 62, 5543-5550.
- 4 Arnott, C.H., Scott, K.A., Moore, R.J., Hewer, A., Phillips, D.H., Parker, P., Balkwill, F.R., and Owens, D.M. (2002). Tumour necrosis factor-alpha mediates tumour promotion via a PKC alpha- and AP-1-dependent pathway. *Oncogene* 21, 4728-4738.
- 5 Arnott, C.H., Scott, K.A., Moore, R.J., Robinson, S.C., Thompson, R.G., and Balkwill, F.R. (2004). Expression of both TNF-alpha receptor subtypes is essential for optimal skin tumour development. *Oncogene* 23, 1902-1910.
- 6 Ausubel, F. M. *Current protocols in molecular biology.* 1991. Wiley Interscience, New York.
- 7 Auwerx, J. (1991). The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia* 47, 22-31.
- 8 Balkwill, F. and Coussens, L.M. (2004). Cancer: an inflammatory link. *Nature* 431, 405-406.
- 9 Bannikov, G.A., Karelina, T.V., Collier, I.E., Marmer, B.L., and Goldberg, G.I. (2002). Substrate binding of gelatinase B induces its enzymatic activity in the presence of intact propeptide. *J. Biol. Chem.* M110931200.
- 10 Beck, G., Bottomley, G., Bradshaw, D., Brewster, M., Broadhurst, M., Devos, R., Hill, C., Johnson, W., Kim, H.J., Kirtland, S., Kneer, J., Lad, N., Mackenzie, R., Martin, R., Nixon, J., Price, G., Rodwell, A., Rose, F., Tang, J.P., Walter, D.S., Wilson, K., and Worth, E. (2002). (E)-2(R)-[1(S)-(Hydroxycarbamoyl)-4-phenyl-3-butenyl]-2'-isobutyl-2'-(methanesulfonyl)-4-methylvalerohydrazide (Ro 32-7315), a selective and orally active inhibitor of tumor necrosis factor-alpha convertase. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 302, 390-396.
- 11 Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T.H., Itoh, T., Tamaki, K., Tanzawa, K., Thorpe, P., Itohara, S., Werb, Z., and Hanahan, D. (2000).

Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat. Cell Biol.* 2, 737-744.

- 12 Bonny, C., Oberson, A., Negri, S., Sauser, C., and Schorderet, D.F. (2001). Cell-permeable peptide inhibitors of JNK: novel blockers of beta-cell death. *Diabetes* 50, 77-82.
- 13 Boukamp, P., Stanbridge, E.J., Foo, D.Y., Cerutti, P.A., and Fusenig, N.E. (1990). c-Ha-ras oncogene expression in immortalized human keratinocytes (HaCaT) alters growth potential in vivo but lacks correlation with malignancy. *Cancer Res.* 50, 2840-2847.
- 14 Callaghan, M.M., Lovis, R.M., Rammohan, C., Lu, Y., and Pope, R.M. (1996). Autocrine regulation of collagenase gene expression by TNF-alpha in U937 cells. *J. Leukoc. Biol.* 59, 125-132.
- 15 Chakrabarti, S. and Patel, K.D. (2005). Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. *Exp. Lung Res.* 31, 599-621.
- 16 Chakraborti, S., Mandal, M., Das, S., Mandal, A., and Chakraborti, T. (2003). Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol. Cell Biochem.* 253, 269-285.
- 17 Chen, Z., Gibson, T.B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C., and Cobb, M.H. (2001). MAP kinases. *Chem. Rev.* 101, 2449-2476.
- 18 Choo, M.K., Sakurai, H., Koizumi, K., and Saiki, I. (2005). Stimulation of cultured colon 26 cells with TNF-alpha promotes lung metastasis through the extracellular signal-regulated kinase pathway. *Cancer Lett.* 230, 47-56.
- 19 Cottin, V., Van Linden, A., and Riches, D.W. (1999). Phosphorylation of tumor necrosis factor receptor CD120a (p55) by p42(mapk/erk2) induces changes in its subcellular localization. *J. Biol. Chem.* 274, 32975-32987.
- 20 Coussens, L.M., Fingleton, B., and Matrisian, L.M. (2002). Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* 295, 2387-2392.
- 21 Coussens, L.M., Tinkle, C.L., Hanahan, D., and Werb, Z. (2000). MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* 103, 481-490.
- 22 Crawford, H.C. and Matrisian, L.M. (1996). Mechanisms controlling the transcription of matrix metalloproteinase genes in normal and neoplastic cells. *Enzyme Protein* 49, 20-37.
- 23 Dempsey, P.W., Doyle, S.E., He, J.Q., and Cheng, G. (2003). The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14, 193-209.

- 24 Egeblad, M. and Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Rev. Cancer* 2, 161-174.
- 25 Endo, H., Utani, A., and Shinkai, H. (2003). Activation of p38 MAPK suppresses matrix metalloproteinase-1 gene expression induced by platelet-derived growth factor. *Arch. Dermatol. Res.* 294, 552-558.
- 26 English, J., Pearson, G., Wilsbacher, J., Swantek, J., Karandikar, M., Xu, S., and Cobb, M.H. (1999). New insights into the control of MAP kinase pathways. *Exp. Cell Res.* 253, 255-270.
- 27 Fernandez-Patron, C., Zouki, C., Whittal, R., Chan, J.S., Davidge, S.T., and Filep, J.G. (2001). Matrix metalloproteinases regulate neutrophil-endothelial cell adhesion through generation of endothelin-1[1-32]. *FASEB J.* 15, 2230-2240.
- 28 Ferreras, M., Felbor, U., Lenhard, T., Olsen, B.R., and Delaisse, J. (2000). Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases. *FEBS Lett.* 486, 247-251.
- 29 Fiore, E., Fusco, C., Romero, P., and Stamenkovic, I. (2002). Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9/gelatinase B) proteolytically cleaves ICAM-1 and participates in tumor cell resistance to natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Oncogene* 21, 5213-5223.
- 30 Gallagher, R., Collins, S., Trujillo, J., McCredie, K., Ahearn, M., Tsai, S., Metzgar, R., Aulakh, G., Ting, R., Ruscetti, F., and Gallo, R. (1979). Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 54, 713-733.
- 31 Genersch, E., Hayess, K., Neuenfeld, Y., and Haller, H. (2000). Sustained ERK phosphorylation is necessary but not sufficient for MMP-9 regulation in endothelial cells: involvement of Ras-dependent and -independent pathways. *J Cell Sci* 113 Pt 23, 4319-4330.
- 32 Goldberg, G.I., Strongin, A., Collier, I.E., Genrich, L.T., and Marmer, B.L. (1992). Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin. *J Biol Chem* 267, 4583-4591.
- 33 Gorg, A., Postel, W., Westermeier, R., Gianazza, E., and Righetti, P.G. (1980). Gel gradient electrophoresis, isoelectric focusing and two-dimensional techniques in horizontal, ultrathin polyacrylamide layers. *J. Biochem. Biophys. Methods* 3, 273-284.
- 34 Gum, R., Lengyel, E., Juarez, J., Chen, J.H., Sato, H., Seiki, M., and Boyd, D. (1996). Stimulation of 92-kDa gelatinase B promoter activity by ras is mitogen-activated protein kinase kinase 1-independent and requires multiple

transcription factor binding sites including closely spaced PEA3/ets and AP-1 sequences. *J Biol Chem* 271, 10672-10680.

- 35 Hagemann, T., Robinson, S.C., Schulz, M., Trumper, L., Balkwill, F.R., and Binder, C. (2004). Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF- $\alpha$  dependent up-regulation of matrix metalloproteases. *Carcinogenesis* 25, 1543-1549.
- 36 Hamano, Y., Zeisberg, M., Sugimoto, H., Lively, J.C., Maeshima, Y., Yang, C., Hynes, R.O., Werb, Z., Sudhakar, A., and Kalluri, R. (2003). Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin. *Cancer Cell* 3, 589-601.
- 37 Hangai, M., Kitaya, N., Xu, J., Chan, C.K., Kim, J.J., Werb, Z., Ryan, S.J., and Brooks, P.C. (2002). Matrix metalloproteinase-9-dependent exposure of a cryptic migratory control site in collagen is required before retinal angiogenesis. *Am. J. Pathol.* 161, 1429-1437.
- 38 He, C. (1996). Molecular mechanism of transcriptional activation of human gelatinase B by proximal promoter. *Cancer Lett.* 106, 185-191.
- 39 Hehlhans, T. and Mannel, D.N. (2002). The TNF-TNF receptor system. *Biol. Chem.* 383, 1581-1585.
- 40 Heussen, C. and Dowdle, E.B. (1980). Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal. Biochem.* 102, 196-202.
- 41 Hoffman, W.L., Jump, A.A., Kelly, P.J., and Ruggles, A.O. (1991). Binding of antibodies and other proteins to nitrocellulose in acidic, basic, and chaotropic buffers. *Anal. Biochem.* 198, 112-118.
- 42 Holvoet, S., Vincent, C., Schmitt, D., and Serres, M. (2003). The inhibition of MAPK pathway is correlated with down-regulation of MMP-9 secretion induced by TNF-alpha in human keratinocytes. *Exp. Cell Res.* 290, 108-119.
- 43 Huhtala, P., Tuuttila, A., Chow, L.T., Lohi, J., Keski-Oja, J., and Tryggvason, K. (1991). Complete structure of the human gene for 92-kDa type IV collagenase. Divergent regulation of expression for the 92- and 72-kilodalton enzyme genes in HT-1080 cells. *J Biol Chem* 266, 16485-16490.
- 44 Ismail, M.G., Ries, C., Lottspeich, F., Zang, C., Kolb, H.J., and Petrides, P.E. (1998). Autocrine regulation of matrix metalloproteinase-9 gene expression and secretion by tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in NB4 leukemic cells: specific involvement of TNF receptor type 1. *Leukemia* 12, 1136-1143.
- 45 Issbrucker, K., Marti, H.H., Hippenstiel, S., Springmann, G., Voswinckel, R., Gaumann, A., Breier, G., Drexler, H.C., Suttorp, N., and Clauss, M. (2003).

p38 MAP kinase--a molecular switch between VEGF-induced angiogenesis and vascular hyperpermeability. *FASEB J.* 17, 262-264.

- 46 Itoh, T., Tanioka, M., Matsuda, H., Nishimoto, H., Yoshioka, T., Suzuki, R., and Uehira, M. (1999). Experimental metastasis is suppressed in MMP-9-deficient mice. *Clin. Exp. Metastasis* 17, 177-181.
- 47 Jones, C.B., Sane, D.C., and Herrington, D.M. (2003). Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in acute coronary syndrome. *Cardiovasc. Res.* 59, 812-823.
- 48 Jupp, O.J., McFarlane, S.M., Anderson, H.M., Littlejohn, A.F., Mohamed, A.A., MacKay, R.H., Vandenabeele, P., and MacEwan, D.J. (2001). Type II tumour necrosis factor-alpha receptor (TNFR2) activates c-Jun N-terminal kinase (JNK) but not mitogen-activated protein kinase (MAPK) or p38 MAPK pathways. *Biochem. J.* 359, 525-535.
- 49 Kalmes, A., Deou, J., Clowes, A.W., and Daum, G. (1999). Raf-1 is activated by the p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, SB203580. *FEBS Lett.* 444, 71-74.
- 50 Karin, M., Liu, Z., and Zandi, E. (1997). AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 240-246.
- 51 Kellogg, D.E., Rybalkin, I., Chen, S., Mukhamedova, N., Vlasik, T., Siebert, P.D., and Chenchik, A. (1994). TaqStart Antibody: "hot start" PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against Taq DNA polymerase. *Biotechniques* 16, 1134-1137.
- 52 Klein, G., Vellenga, E., Fraaije, M.W., Kamps, W.A., and de Bont, E.S. (2004). The possible role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in cancer, e.g. acute leukemia. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* 50, 87-100.
- 53 Kleinman, H.K., McGarvey, M.L., Hassell, J.R., Star, V.L., Cannon, F.B., Laurie, G.W., and Martin, G.R. (1986). Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry* 25, 312-318.
- 54 Kleinman, H.K., McGarvey, M.L., Liotta, L.A., Robey, P.G., Tryggvason, K., and Martin, G.R. (1982). Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry* 21, 6188-6193.
- 55 Kyriakis, J.M. and Avruch, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev.* 81, 807-869.
- 56 Lai, W.C., Zhou, M., Shankavaram, U., Peng, G., and Wahl, L.M. (2003). Differential regulation of lipopolysaccharide-induced monocyte matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-9 by p38 and extracellular signal-

- regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinases. *J. Immunol.* *170*, 6244-6249.
- 57 Lane, D., Prentki, P., and Chandler, M. (1992). Use of gel retardation to analyze protein-nucleic acid interactions. *Microbiol. Rev.* *56*, 509-528.
- 58 Lanotte, M., Martin-Thouvenin, V., Najman, S., Balerini, P., Valensi, F., and Berger, R. (1991). NB4, a maturation inducible cell line with t(15;17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3). *Blood* *77*, 1080-1086.
- 59 Lee, J.C., Laydon, J.T., McDonnell, P.C., Gallagher, T.F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M.J., Heys, J.R., Landvatter, S.W., and . (1994). A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* *372*, 739-746.
- 60 Lewis, T.S., Shapiro, P.S., and Ahn, N.G. (1998). Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv. Cancer Res.* *74*, 49-139.
- 61 Lin, Y.Z., Yao, S.Y., Veach, R.A., Torgerson, T.R., and Hawiger, J. (1995). Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF-kappa B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence. *J. Biol. Chem.* *270*, 14255-14258.
- 62 Lipsky, P.E., van der Heijde, D.M., St Clair, E.W., Furst, D.E., Breedveld, F.C., Kalden, J.R., Smolen, J.S., Weisman, M., Emery, P., Feldmann, M., Harriman, G.R., and Maini, R.N. (2000). Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group. *N. Engl. J. Med.* *343*, 1594-1602.
- 63 Lynch, C.C. and Matrisian, L.M. (2002). Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication. *Differentiation* *70*, 561-573.
- 64 Malemud, C.J., Islam, N., and Haqqi, T.M. (2003). Pathophysiological mechanisms in osteoarthritis lead to novel therapeutic strategies. *Cells Tissues. Organs* *174*, 34-48.
- 65 Masure, S., Proost, P., Van Damme, J., and Opdenakker, G. (1991). Purification and identification of 91-kDa neutrophil gelatinase. Release by the activating peptide interleukin-8. *Eur. J. Biochem.* *198*, 391-398.
- 66 McCawley, L.J. and Matrisian, L.M. (2001). Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr. Opin. Cell Biol.* *13*, 534-540.
- 67 McDermott, M.F. (2001). TNF and TNFR biology in health and disease. *Cell Mol. Biol. (Noisy. -le-grand)* *47*, 619-635.
- 68 Mercurio, F. and Manning, A.M. (1999). Multiple signals converging on NF-kappaB. *Curr. Opin. Cell Biol.* *11*, 226-232.



- 69 Milner, J.M. and Cawston, T.E. (2005). Matrix metalloproteinase knockout studies and the potential use of matrix metalloproteinase inhibitors in the rheumatic diseases. *Curr. Drug Targets. Inflamm. Allergy* 4, 363-375.
- 70 Moon, S.K., Cha, B.Y., and Kim, C.H. (2004). ERK1/2 mediates TNF- $\alpha$ -induced matrix metalloproteinase-9 expression in human vascular smooth muscle cells via the regulation of NF- $\kappa$ B and AP-1: Involvement of the ras dependent pathway. *J. Cell Physiol* 198, 417-427.
- 71 Morgunova, E., Tuuttila, A., Bergmann, U., Isupov, M., Lindqvist, Y., Schneider, G., and Tryggvason, K. (1999). Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: activation mechanism revealed. *Science* 284, 1667-1670.
- 72 Nagase, H. (1997). Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 378, 151-160.
- 73 New, L., Li, Y., Ge, B., Zhong, H., Mansbridge, J., Liu, K., and Han, J. (2001). SB203580 promotes EGF-stimulated early morphological differentiation in PC12 cell through activating ERK pathway. *J. Cell Biochem.* 83, 585-596.
- 74 Numazawa, S., Watabe, M., Nishimura, S., Kurosawa, M., Izuno, M., and Yoshida, T. (2003). Regulation of ERK-mediated signal transduction by p38 MAP kinase in human monocytic THP-1 cells. *J. Biochem. (Tokyo)* 133, 599-605.
- 75 O'Connell, J.P., Willenbrock, F., Docherty, A.J., Eaton, D., and Murphy, G. (1994). Analysis of the role of the COOH-terminal domain in the activation, proteolytic activity, and tissue inhibitor of metalloproteinase interactions of gelatinase B. *J Biol Chem* 269, 14967-14973.
- 76 Odero, M.D., Zeleznik, L., Chinwalla, V., and Rowley, J.D. (2000). Cytogenetic and molecular analysis of the acute monocytic leukemia cell line THP-1 with an MLL-AF9 translocation. *Genes Chromosomes. Cancer* 29, 333-338.
- 77 Olson, M.W., Toth, M., Gervasi, D.C., Sado, Y., Ninomiya, Y., and Fridman, R. (1998). High affinity binding of latent matrix metalloproteinase-9 to the  $\alpha$ 2(IV) chain of collagen IV. *J Biol Chem* 273, 10672-10681.
- 78 Opdenakker, G., Masure, S., Proost, P., Billiau, A., and Van Damme, J. (1991). Natural human monocyte gelatinase and its inhibitor. *FEBS Lett.* 284, 73-78.
- 79 Opdenakker, G., Nelissen, I., and Van Damme, J. (2003). Functional roles and therapeutic targeting of gelatinase B and chemokines in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2, 747-756.
- 80 Opdenakker, G., Van den Steen, P.E., and Van Damme, J. (2001). Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions. *Trends Immunol.* 22, 571-579.

- 81 Overall, C.M. and Lopez-Otin, C. (2002). Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat. Rev. Cancer* 2, 657-672.
- 82 Patterson, B.C. and Sang, Q.A. (1997). Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9). *J Biol Chem* 272, 28823-28825.
- 83 Pearson, G., Robinson, F., Beers, G.T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M.H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* 22, 153-183.
- 84 Pepper, M.S. (2001). Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 1104-1117.
- 85 Popp, O., Heindinger, M., Ruiz-Heinrich, L., Ries, C., Jochum, M., and Gil-Parrado, S. (2003). The calpastatin-derived calpain inhibitor CP1B reduces mRNA expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and invasion by leukemic THP-1 cells. *Biol. Chem.* 384, 951-958.
- 86 Ramos-DeSimone, N., Hahn-Dantona, E., Siple, J., Nagase, H., French, D.L., and Quigley, J.P. (1999). Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. *J Biol Chem* 274, 13066-13076.
- 87 Rangaswami, H., Bulbule, A., and Kundu, G.C. (2005). JNK1 differentially regulates osteopontin-induced nuclear factor-inducing kinase/MEKK1-dependent activating protein-1-mediated promatrix metalloproteinase-9 activation. *J. Biol. Chem.* 280, 19381-19392.
- 88 Rasheed, S., Nelson-Rees, W.A., Toth, E.M., Arnstein, P., and Gardner, M.B. (1974). Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer* 33, 1027-1033.
- 89 Ries, C., Kolb, H., and Petrides, P.E. (1994). Regulation of 92-kD gelatinase release in HL-60 leukemia cells: tumor necrosis factor- $\alpha$  as an autocrine stimulus for basal- and phorbol ester-induced secretion. *Blood* 83, 3638-3646.
- 90 Robinson, M.J. and Cobb, M.H. (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 180-186.
- 91 Robinson, S., Scott, K., and Balkwill, F. (2002). Chemokine stimulation of monocyte matrix metalloproteinase-9 requires endogenous TNF- $\alpha$ . *Eur. J. Immunol.* 32, 404-412.
- 92 Rudd, P.M., Mattu, T.S., Masure, S., Bratt, T., Van den Steen, P.E., Wormald, M.R., Kuster, B., Harvey, D.J., Borregaard, N., Van Damme, J., Dwek, R.A., and Opdenakker, G. (1999). Glycosylation of natural human neutrophil gelatinase B and neutrophil gelatinase B-associated lipocalin. *Biochemistry* 38, 13937-13950.

- 93 Sato, H. and Seiki, M. (1993). Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. *Oncogene* 8, 395-405.
- 94 Schneeberger, C., Speiser, P., Kury, F., and Zeillinger, R. (1995). Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. *PCR Methods Appl.* 4, 234-238.
- 95 Schonbeck, U., Mach, F., and Libby, P. (1998). Generation of biologically active IL-1b by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1b processing. *J. Immunol.* 161, 3340-3346.
- 96 Sebolt-Leopold, J.S. and Herrera, R. (2004). Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nat. Rev. Cancer* 4, 937-947.
- 97 Sheu, B.C., Hsu, S.M., Ho, H.N., Lien, H.C., Huang, S.C., and Lin, R.H. (2001). A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression. *Cancer Res.* 61, 237-242.
- 98 Shin, M., Yan, C., and Boyd, D. (2002). An inhibitor of c-jun aminoterminal kinase (SP600125) represses c-Jun activation, DNA-binding and PMA-inducible 92-kDa type IV collagenase expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1589, 311-316.
- 99 Simon, C., Goepfert, H., and Boyd, D. (1998). Inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase by SB 203580 blocks PMA-induced Mr 92,000 type IV collagenase secretion and in vitro invasion. *Cancer Res.* 58, 1135-1139.
- 100 Simon, C., Simon, M., Vucelic, G., Hicks, M.J., Plinkert, P.K., Koitschev, A., and Zenner, H.P. (2001). The p38 SAPK pathway regulates the expression of the MMP-9 collagenase via AP-1-dependent promoter activation. *Exp. Cell Res.* 271, 344-355.
- 101 Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85.
- 102 Stamenkovic, I. (2003). Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J. Pathol.* 200, 448-464.
- 103 Stetler-Stevenson, W.G., Liotta, L.A., and Kleiner, D.E.J. (1993). Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *FASEB J* 7, 1434-1441.
- 104 Stone, S. R. and Hughes, M. J. Jost JP. *A Laboratory Guide to In Vitro Studies of Protein-DNA Interactions.* 163-183. 1991.

- 105 Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., and Tada, K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer* 26, 171-176.
- 106 Van den Steen, P.E., Dubois, B., Nelissen, I., Rudd, P.M., Dwek, R.A., and Opdenakker, G. (2002). Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev. Biochem. Mol. Biol.* 37, 375-536.
- 107 Van den Steen, P.E., Proost, P., Wuyts, A., Van Damme, J., and Opdenakker, G. (2000). Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO- $\alpha$  and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood* 96, 2673-2681.
- 108 Van Linden, A.A., Cottin, V., Leu, C., and Riches, D.W. (2000). Phosphorylation of the membrane proximal region of tumor necrosis factor receptor CD120a (p55) at ERK consensus sites. *J. Biol. Chem.* 275, 6996-7003.
- 109 Vandenabeele, P., Declercq, W., Beyaert, R., and Fiers, W. (1995). Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell Biol.* 5, 392-399.
- 110 Vihinen, P. and Kahari, V.M. (2002). Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int. J. Cancer* 99, 157-166.
- 111 Visse, R. and Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ. Res.* 92, 827-839.
- 112 Volpi, E.V., Vatcheva, R., Labella, T., and Gan, S.U. (1996). More detailed characterization of some of the HL60 karyotypic features by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet. Cytogenet.* 87, 103-106.
- 113 Wajant, H., Pfizenmaier, K., and Scheurich, P. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death. Differ.* 10, 45-65.
- 114 Westermarck, J. and Kahari, V.M. (1999). Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J* 13, 781-792.
- 115 Westermarck, J., Li, S.P., Kallunki, T., Han, J., and Kahari, V.M. (2001). p38 mitogen-activated protein kinase-dependent activation of protein phosphatases 1 and 2A inhibits MEK1 and MEK2 activity and collagenase 1 (MMP-1) gene expression. *Mol. Cell Biol.* 21, 2373-2383.
- 116 Westermarck, J., Seth, A., and Kahari, V.M. (1997). Differential regulation of interstitial collagenase (MMP-1) gene expression by ETS transcription factors. *Oncogene* 14, 2651-2660.

- 117 Whitehead, T.P., Kricka, L.J., Carter, T.J., and Thorpe, G.H. (1979). Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory. *Clin. Chem.* 25, 1531-1546.
- 118 Wiechelman, K.J., Braun, R.D., and Fitzpatrick, J.D. (1988). Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.* 175, 231-237.
- 119 Wilhelm, S.M., Collier, I.E., Marmer, B.L., Eisen, A.Z., Grant, G.A., and Goldberg, G.I. (1989). SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J. Biol. Chem.* 264, 17213-17221.
- 120 Yamamoto, Y. and Gaynor, R.B. (2001). Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J. Clin. Invest* 107, 135-142.
- 121 Yan, C., Wang, H., Aggarwal, B., and Boyd, D.D. (2004). A novel homologous recombination system to study 92 kDa type IV collagenase transcription demonstrates that the NF-kappaB motif drives the transition from a repressed to an activated state of gene expression. *FASEB J.* 18, 540-541.
- 122 Yan, C., Wang, H., and Boyd, D.D. (2001a). KiSS-1 represses 92-kDa type IV collagenase expression by down-regulating NF-kappa B binding to the promoter as a consequence of Ikappa Balpha -induced block of p65/p50 nuclear translocation. *J. Biol. Chem.* 276, 1164-1172.
- 123 Yan, C., Wang, H., Toh, Y., and Boyd, D.D. (2002). Repression of 92 kDa type IV collagenase expression by MTA1 is mediated through direct interactions with the promoter via a mechanism which is both dependent and independent of histone de/acetylation. *J Biol. Chem.*
- 124 Yan, L., Borregaard, N., Kjeldsen, L., and Moses, M.A. (2001b). The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (mmp) activity is a complex of gelatinase b/mmp-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (ngal). modulation of mmp-9 activity by ngal. *J Biol Chem* 276, 37258-37265.
- 125 Yu, Q. and Stamenkovic, I. (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-b and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 14, 163-176.
- 126 Zahler, S., Kowalski, C., Brosig, A., Kupatt, C., Becker, B.F., and Gerlach, E. (1997). The function of neutrophils isolated by a magnetic antibody cell separation technique is not altered in comparison to a density gradient centrifugation method. *J. Immunol. Methods* 200, 173-179.

## 7 Danksagung

Die vorliegenden Arbeiten zur vorliegenden Dissertations wurden in der Abteilung für Klinische Chemie und Biochemie der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Innenstadt durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Helmut Kolb danke ich herzlich für die akademische und wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit und für die Vertretung der Dissertation vor der Fakultät.

Frau Prof. Dr. Marianne Jochum möchte ich für die Bereitstellung der notwendigen Mittel und für die Förderung der Arbeit in vielerlei Hinsicht danken.

Herrn Dr. Christian Ries danke ich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren, sowie für Betreuung im Labor, wertvolle Tipps, fachliche Ratschläge und die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Sehr herzlich möchte ich mich bei allen für die Zusammenarbeit in der Arbeitsgruppe Ries und bei allen Mitarbeitern der Klinischen Chemie der Chirurgie bedanken.

Meiner Familie danke ich für die außergewöhnliche Unterstützung, die ich durch sie erfahren durfte.

Die Arbeit wurde unterstützt von der DFG im Rahmen des SFB469 und von der Wilhelm Sander-Stiftung.

## 8 Lebenslauf

### Angaben zur Person:

Name: **Michael Heidinger**

Anschrift: Trausnitzstrasse 40  
81671 München  
Tel. (089) 49003739  
E-mail: [Michael-Heidinger@gmx.de](mailto:Michael-Heidinger@gmx.de)

Geburtstag- und ort: 05. Januar 1974 Rosenheim

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet (1 Kind)

**Schulausbildung:** Ignaz-Günther Gymnasium, Rosenheim

Abschluß: Abitur, 1994

**Studium:** Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität, 1994 – 2000

Abschluß: Diplom-Biologe

Diplomarbeit bei Herrn PD Dr. Dirk Eick im Hämatologikum der GSF Großhadern.

Thema: *Die Wirkung von konditional exprimierten RNA Polymerase II Mutanten auf die Expression des c-myc Gens`.*

### Promotion:

Seit dem 01.04.2001 Anfertigung der Dissertation an der Klinischen Chemie und Biochemie der Chirurgie der Poliklinik - Innenstadt der LMU München

### Publikation:

Modulation of Autocrine TNF- $\alpha$  Stimulated Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9) Expression by Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs) in THP-1 Monocytic Cells

Michael Heidinger, Helmut Kolb, Hans-Willi Krell, Marianne Jochum, and Christian Ries

Biological Chemistry Vol. 387 (1), 2006 (in press)