

Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. Gradinger)

In vitro Verhalten der Matrixmetalloproteinase-9
nach hydrostatischer Hochdruckbehandlung

Johannes Schauwecker

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. W. Mittelmeier
2. Univ.-Prof. Dr. M. Schmitt

Die Dissertation wurde am 11.10.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 17.11.2004 angenommen.

Meinen Eltern und meinem Großvater Heinz

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	8
Abkürzungen und Einheiten	9
<u>1. Einleitung</u>	<u>11</u>
<u>2. Material und Methoden</u>	<u>14</u>
2.1 Physikalische Grundlagen	14
2.2 Hochdruckanlage	16
2.3 Material und Geräte	18
2.3.1 Probengefäße	18
2.3.2 Photometer	19
2.3.3 Zymographieapparatur	20
2.3.4 Weitere Materialien und Geräte	20
2.4 Puffer und Lösungen	21
2.5 Untersuchtes Enzym	22
2.5.1 Isolierte humane Matrixmetalloproteinase-9	22
2.5.2 Rekombinante humane Matrixmetalloproteinase-9	23
2.5.3 <i>In vitro</i> Aktivierung der Matrixmetalloproteinase-9	23
2.6 Verdünnungsreihen der Matrixmetalloproteinase-9	23
2.7 Hochdruckbehandlung der Matrixmetalloproteinase-9	25
2.7.1 Allgemeines	25
2.7.2 Herstellung der Untersuchungsproben	26
2.7.3 Druckbehandlung	26
2.7.4 Analyse der Untersuchungsproben	27
2.8 Messung der Matrixmetalloproteinase-9-Aktivität	27
2.8.1 Grundlagen	27
2.8.2 Durchführung	28
2.8.3 Auswertung	29

2.9 Zymographischer Nachweis der Matrixmetalloproteinase-9	29
2.9.1 Grundlagen	29
2.9.2 Herstellung der Untersuchungsproben	30
2.9.3 Durchführung	31
2.9.4 Auswertung	33
2.10 Statistik	34
3. Ergebnisse	35
3.1 Verdünnungsreihen der Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9)	35
3.1.1 Isolierte MMP-9 – Activity-Assay	35
3.1.2 Rekombinante MMP-9 – Activity-Assay	36
3.2 MMP-9 nach hydrostatischem Hochdruck (HHD)	37
3.2.1 Herstellerangaben für MMP-9 Activity-Assay	37
3.2.2 Standardkurve für MMP-9 Activity-Assay	37
3.2.3 Isolierte MMP-9 nach HHD – Activity-Assay	38
3.2.4 Rekombinante MMP-9 nach HHD – Activity-Assay	43
3.2.5 Isolierte MMP-9 nach HHD – Zymographie	48
3.2.6 Rekombinante MMP-9 nach HHD – Zymographie	48
3.3 Zymographischer Nachweis der MMP-9	49
3.3.1 Pro-MMP-9	49
3.3.2 Aktivierte MMP-9	50
3.3.3 Pro-MMP-9 und aktivierte MMP-9 inkubiert in EDTA-Puffer	50
3.3.4 Pro-MMP-9 und aktivierte MMP-9 inkubiert in PMSF-Puffer	51
4. Diskussion	52
4.1 Rekonstruktion von Knochendefekten	52
4.2 Extrakorporale Tumordevitalisierung	55
4.3 Hochdrucktechnologie	56
4.4 Matrixmetalloproteinasen	58
4.4.1 Matrixmetalloproteinasen allgemein	58
4.4.2 Matrixmetalloproteinase-9	63
4.5 Diskussion der Ergebnisse	66
4.6 Ausblick	73

5. Zusammenfassung	75
6. Literaturverzeichnis	76
Anhang	94
Ergebnisdaten	94
Danksagung	99
Lebenslauf	100

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schema der Druckeinwirkung.....	14
Abb. 2	Phasendiagramm von Wasser.....	15
Abb. 3	Hochdruckanlage Aufsicht.....	17
Abb. 4	Hochdruckanlage Steuereinheit.....	18
Abb. 5	Probengefäße und Parafilm®.....	19
Abb. 6	Gelapparatur mit Powersupply.....	20
Abb. 7	96-Well-Mikrotiterplatte mit Verdünnungsreihen.....	24
Abb. 8	Verdünnungsreihe isolierte MMP-9.....	35
Abb. 9	Verdünnungsreihe rekombinante MMP-9.....	36
Abb. 10	Herstellerangaben für MMP-9 Activity-Assay.....	37
Abb. 11	Standardkurve für MMP-9 Activity-Assay.....	37
Abb. 12	Isolierte MMP-9 nach HHD – Activity-Assay, 1. Messung.....	38
Abb. 13	Isolierte MMP-9 nach HHD – Activity-Assay, 2. Messung.....	38
Abb. 14	Isolierte MMP-9 nach HHD – Activity-Assay, 3. Messung.....	39
Abb. 15	Isolierte MMP-9 nach HHD – Activity-Assay, 4. Messung.....	39
Abb. 16	Isolierte MMP-9 nach HHD – Activity-Assay, 5. Messung.....	40
Abb. 17	Isolierte MMP-9 nach HHD – „keine Aktivierung“.....	40
Abb. 18	Isolierte MMP-9 nach HHD – „Aktivierung nach HHD“.....	41
Abb. 19	Isolierte MMP-9 nach HHD – „Aktivierung vor HHD“.....	42
Abb. 20	Rekombinante MMP-9 nach HHD – Activity-Assay, 1. Messung...	43
Abb. 21	Rekombinante MMP-9 nach HHD – Activity-Assay, 2. Messung...	43
Abb. 22	Rekombinante MMP-9 nach HHD – Activity-Assay, 3. Messung...	44
Abb. 23	Rekombinante MMP-9 nach HHD – Activity-Assay, 4. Messung...	44
Abb. 24	Rekombinante MMP-9 nach HHD – Activity-Assay, 5. Messung...	45

Abb. 25	Rekombinante MMP-9 nach HHD – „keine Aktivierung“	45
Abb. 26	Rekombinante MMP-9 nach HHD – „Aktivierung nach HHD“	46
Abb. 27	Rekombinante MMP-9 nach HHD – „Aktivierung vor HHD“	47
Abb. 28	Isolierte MMP-9 nach HHD – Zymographie	48
Abb. 29	Rekombinante MMP-9 nach HHD – Zymographie	49
Abb. 30	Pro-MMP-9 – Zymographie.....	49
Abb. 31	Aktivierte MMP-9 – Zymographie.....	50
Abb. 32	MMP-9 inkubiert in EDTA-Puffer – Zymographie.....	50
Abb. 33	MMP-9 inkubiert in PMSF-Puffer – Zymographie	51
Abb. 34	Proteinstruktur der Matrixmetalloproteinasen	60

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Zusammensetzung des Trenngels.....	31
Tab. 2	Zusammensetzung des Sammelgels.....	31
Tab. 3	Puffer und Lösungen für die Zymographie.....	32
Tab. 4	Familie der Matrixmetalloproteinasen	59
Tab. 5	Substrate der Matrixmetalloproteinase-9	63

Abkürzungen und Einheiten

Abb.	Abbildung
APMA	p-Aminophenylmercuric acid
BSA	bovines Serumalbumin
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
δ	Differenz
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FGF	Fibroblast Growth Factor
HHD	hydrostatischer Hochdruck
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin
K	Kelvin
Kap.	Kapitel
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
M	Mol

mA	Milli-Ampère
max.	maximal
mg	Milligramm
min	Minute(n)
mm	Millimeter
mM	Milli-Mol
MMP	Matrixmetalloproteinase(n)
MPa	Mega-Pascal (1 MPa = 10 bar = 10^6 Newton/m ²)
µm	Mikrometer
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVC	Polyvinylchlorid
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TEMED	N',N',N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF	Transforming Growth Factor
TIMP	Tissue Inhibitor of Matrixmetalloproteinases
TNF	Tumornekrosefaktor
uPA	Urokinase-type Plasminogen Activator
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
W	Watt
z.B.	zum Beispiel
ZnCl ₂	Zinkchlorid

1. Einleitung

Während kleinere Knochendefekte bereits mit zufriedenstellenden biologischen und biomechanischen Ergebnissen rekonstruiert werden können, ist die Versorgung großer segmentaler Defekte, wie sie bei Knochentumoren entstehen, schwierig und geht häufig mit Komplikationen einher.

Sämtliche Verfahren zur Defektrekonstruktion nach Knochenresektionen, bei denen kein autologer Knochen verwendet wird, sind mit mehr oder weniger großen Nachteilen verbunden. Gute Ergebnisse im Sinne einer biologischen Lösung würden sich mit dem entnommenen Knochensegment selbst erreichen lassen, was aber eine vollständige Inaktivierung der Tumorzellen und eine weitgehende Erhaltung der biologischen und biomechanischen Eigenschaften voraussetzt.

Bisher werden klinisch oder experimentell zur Tumordevitalisierung von Knochen thermische und radioaktive Verfahren eingesetzt, die eine einzeitige Reimplantation des autologen Knochensegmentes ermöglichen, sich aber allesamt negativ auf die biologischen und biomechanischen Eigenschaften des Knochens auswirken [Urist et al.: 1974, 586-593; Knaepler et al.: 1991, 194-199].

Eine Alternative zur Behandlung von tumorbefallenen Knochensegmenten könnte hydrostatischer Hochdruck (HHD) sein. Durch hydrostatischen Hochdruck wird die Replikationsfähigkeit von pro- und eukaryontischen Zellen, Tumorzellen eingeschlossen, nachhaltig ausgeschaltet [Diehl et al.: 2003, 1851-1855], ohne dass es zu negativen Veränderungen der Biomechanik des Knochens kommt [Steinhauser et al.: 2004, eingereicht].

Ziel des gesamten Forschungsprojektes ist es, ein betroffenes Knochensegment onkologisch korrekt *en bloc* steril vom Patienten zu entnehmen. Nachdem makroskopische Tumoranteile debridiert worden sind, werden durch extrakorporale Behandlung mit HHD Tumorzellen bzw. Mikroorganismen devitalisiert. Anschließend erfolgt zur Defektrekonstruktion die orthotope Reimplantation des genau passenden autologen Segmentes. Dies könnte als neues und überlegenes Verfahren zur Tumordevitalisierung in

der orthopädischen Chirurgie eine vielversprechende Therapieoption darstellen.

Die Hochdrucktechnologie (statischer hydrostatischer Hochdruck bis 1000 MPa) wird bisher in der Medizin nicht eingesetzt. Zur Haltbarmachung von Lebensmitteln (z.B. Konfitüren und Säfte) wird das Verfahren bereits seit ca. 100 Jahren untersucht und seit ca. 20 Jahren industriell verwendet [Cheffel: 1995, 75-90].

Für die Etablierung des Hochdruckverfahrens in der Medizin ist es notwendig, die Veränderung von mechanischen, biologischen und biochemischen Eigenschaften infolge HHD-Behandlung zu kennen.

Aufgrund der besonderen Bedeutung der Matrixmetalloproteinase-9 für den physiologischen und pathologischen Knochenstoffwechsel untersucht die vorliegende Arbeit den Einfluss von hydrostatischem Hochdruck auf das Protein bzw. das enzymatische Profil.

Matrixmetalloproteinasen (MMP) sind eine Familie von mindestens 25 proteolytischen Enzymen mit einem zentralem Zinkatom, die für die meisten Auf- und Abbauvorgänge an der Extrazellulärmatrix (Remodeling) verantwortlich sind. MMP beeinflussen die Proliferation, Morphogenese und Apoptose von Zellen sowie deren Migration, Gewebeinvasion und zahlreiche weitere Funktionen [Vu et al.: 2000, 2123-2133].

Physiologisch sind MMP bereits in der Embryogenese an zahlreichen enzymatischen Prozessen beteiligt [Vu et al.: 2000, 2123-2133]. Deutlich erhöhte Konzentrationen finden sich bei der Wund- und Knochenheilung [Holmbeck et al.: 1999, 81-92; Armstrong et al.: 2002, 12-18].

Pathologisch spielen MMP eine wichtige Rolle bei der Tumorgenese und Tumorneoangiogenese [Stetler-Stevenson et al.: 1993, 1434-1441], bei Arthritiden [Zucker et al.: 1994, 2329-2333] sowie bei aseptischen Endoprothesenlockerungen [Takagi: 1996, 3-29; Diehl et al.: 2004, 711-715].

Die Matrixmetalloproteinase-9 gehört zur Untergruppe der Gelatinasen und hat eine Schlüsselfunktion bei ossären Resorptions- und Umbauvorgängen [Okada et al.: 1995, 311-322; Rice et al.: 1997, 479-486; Delaisse et al.: 2000, 223-234]. Pathologische Bedeutung hat MMP-9 bei sämtlichen osteolytischen Defekten aufgrund ihrer Überexpression in Osteoklasten [Reponen et al.:

1994, 1091-1102]. Weiterhin findet sich bei Osteosarkomen eine deutlich erhöhte MMP-9-Konzentration, wodurch Tumorinvasion und Metastasierung unterstützt werden [Peng et al.: 2002, 745-750].

Ein möglicher Anstieg der MMP-9-Konzentration bzw. –aktivität durch die HHD-Therapie würde einem Einwachsen des reimplantierten Knochensegmentes infolge verstärkter osteolytischer Vorgänge entgegenwirken.

Untersuchungen müssen klären, welchen Einfluss die HHD-Behandlung auf die Konzentration bzw. Aktivität von MMP-9 hat. Es soll gezeigt werden, dass sich die MMP-9 Konzentration bzw. Enzymaktivität infolge einer HHD-Therapie nicht wesentlich verändert.

2. Material und Methoden

2.1 Physikalische Grundlagen

Für den verwendeten hydrostatischen Hochdruck gelten die Gesetzmäßigkeiten von Druck in Flüssigkeiten.

Das Pascalsche Prinzip besagt, dass sich Druck in einer Flüssigkeit ungehindert nach allen Seiten und auf die Wände des Behälters in gleicher Größe verteilt [Tipler: 1994, 347]. Darauf beruht auch die Isostatik, welche besagt, dass die Ausbreitung von Druck in Flüssigkeit gleichmäßig und ohne relevante zeitliche Verzögerung erfolgt. Dies gilt auch für eine untersuchte Substanz, die in keinem direkten Kontakt mit dem druckübertragenden Medium steht, sofern das die Probe umgebende Material flexibel ist.

Nach diesen beiden Gesetzen ist Druck bis zu einer bestimmten Viskosität des Druckmediums gleichmäßig und ohne zeitliche Verzögerung auf die gesamte Untersuchungsprobe wirksam. Es kann also davon ausgegangen werden, dass der Druck im gesamten Probengefäß gleichgroß ist und dem in der Druckkammer indirekt gemessenen Druck entspricht.

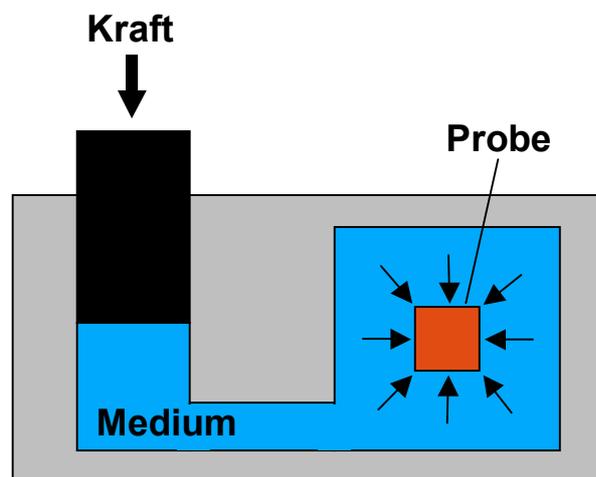


Abb. 1: Schema der Druckeinwirkung

Das Volumen ist die am stärksten von Druck beeinflusste physikalische Größe. Wichtig für das Verständnis druckinduzierter Einflüsse auf physikalische und chemische Reaktionen ist dabei das Prinzip von Le Chatelier und Braun: Wird auf ein System im Gleichgewicht durch Änderung der äußeren Bedingungen

ein Zwang bzw. eine Störung ausgeübt, reagiert das System mit einer Gleichgewichtsverschiebung derart, dass die Wirkung dieser Störung möglichst gering ist [Meschede: 2004, 266]. Das bedeutet, dass physikalische und chemische Vorgänge (Phasenübergang, molekulare Transformation, chemische Reaktion), die mit einer Volumenverringerung einhergehen, unter HHD bevorzugt ablaufen, während umgekehrt Vorgänge, die mit einer Volumenzunahme verbunden sind, vermindert ablaufen. Volumenveränderungen aufgrund innerer Strukturveränderungen von Proteinen beeinflussen die Gleichgewichtskonstante der reversiblen oder irreversiblen Denaturierungsreaktion sowie die Reaktionsgeschwindigkeit von enzymatischen Reaktionen [Heremans et al.: 1998, 353-370].

Flüssigkeiten werden bei hohem Druck in unterschiedlichem Maße komprimiert und zeigen unterschiedliche Phasenübergänge. Für Untersuchungen bis 600 MPa ist Wasser geeignet. Bis zu einem Druck von 208 MPa senkt HHD den Gefrierpunkt von Wasser um bis zu 22 K [Wagner: 1994, 515-525]. Oberhalb von 625 MPa liegt Wasser bei Temperaturen über 0 °C bereits eisförmig vor [Bridgman: 1912, 441-558; Tauscher: 1995, 3-13], so dass in höheren Druckbereichen ölartige Druckmedien verwendet werden müssen.

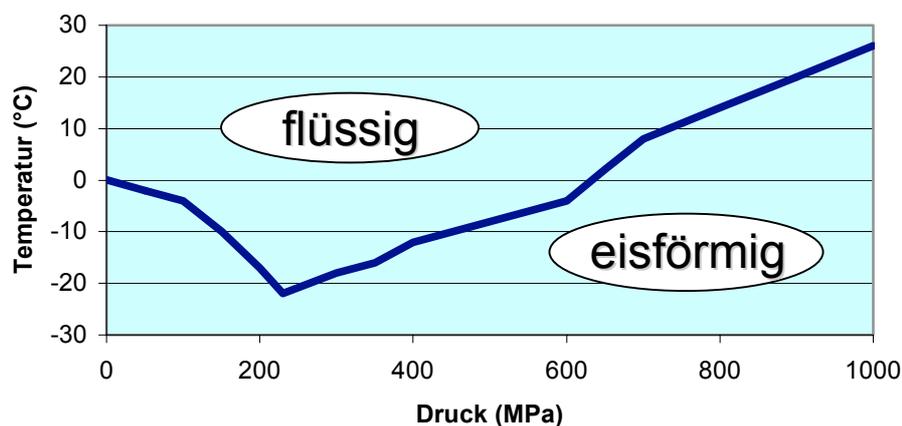


Abb. 2: Phasendiagramm von Wasser [Tauscher: 1995, 3-13]

Im Gegensatz zu Gasen ist der Volumenverlust von Flüssigkeiten unter Druck nur relativ gering. Das bei den Untersuchungen verwendete Druckmedium Wasser weist im Vergleich zu den meisten organischen Flüssigkeiten eine sehr niedrige Kompressibilität auf. Im Temperaturbereich von 0 bis 20 °C wird für Wasser eine Kompressibilität von ca. 7% bei 200 MPa bzw. 12% bei

400 MPa angegeben [Knorr: 1999, 485-491]. Von der gleichen Kompressibilität kann bei den untersuchten Enzymlösungen ausgegangen werden.

Der druckinduzierte Temperaturanstieg ist abhängig vom verwendeten Druckmedium und der Ausgangstemperatur. Der für die vorliegenden Untersuchungsbedingungen (Druckmedium Wasser, Ausgangstemperatur 5 °C) Temperaturanstieg von 1-2 K pro 100 MPa [Makita: 1992, 87-95; Knorr: 1999, 485-491] ist zum einen in Bezug auf die vorliegenden Untersuchungen zu vernachlässigen und wird zum anderen durch einen Heiz-Kühl-Thermostaten korrigiert.

2.2 Hochdruckanlage

Alle Untersuchungen wurden mit der Hochdruckanlage der Firma SITEC Sieber Engineering AG, Zürich, Schweiz (Modell 765.0050) durchgeführt.

Der Betriebsdruck ist mit 400 MPa angegeben. Als Druckmedium dient Wasser, da es aufgrund seiner geringen, dem Untersuchungsmedium ähnlichen Viskosität eine schnelle und gleichmäßige Druckübertragung auf die Untersuchungsprobe gewährleistet. Weitere Vorteile von Wasser als Druckmedium sind die einfache Handhabung und die günstige und umweltverträgliche Verfügbarkeit.

Der Druck wird anfangs manuell mittels einer Handpumpe erzeugt. Ab einem Druck von ca. 50 MPa wird der Druckaufbau von einer Spindelpresse übernommen, die von einem Elektromotor (1600 W Nennleistung, 4 ml Hubvolumen, 100 mm Hub) angetrieben wird. Die Geschwindigkeit des Elektromotors und somit die Druckaufbauzeit sind konstant ca. 100 MPa/min.

Die aus Edelstahl gefertigte Druckkammer zur Aufnahme der Untersuchungsproben hat ein Volumen von 50 ml und ist vollständig mit Wasser gefüllt. Sie ist mit einem Heizmantel zur Temperaturvariation und einem 4 cm dicken Stahlmantel umgeben. Die Druckkammer wird von oben befüllt und mit einem druckstabilen Schraubverschluss abgedichtet.

Im System zwischen Spindelpresse und Druckkammer befindet sich ein Drucksensor, der mit der Schaltmesseinheit verbunden ist und den Druck auf 1 bar (entspricht 0,1 MPa) genau misst.

Die Anlage verfügt über fünf spezielle Hochdruckventile, die zum einen das System gegenüber dem Umgebungsdruck abdichten und zum anderen auch eine Unterteilung innerhalb der Hochdruckanlage ermöglichen.

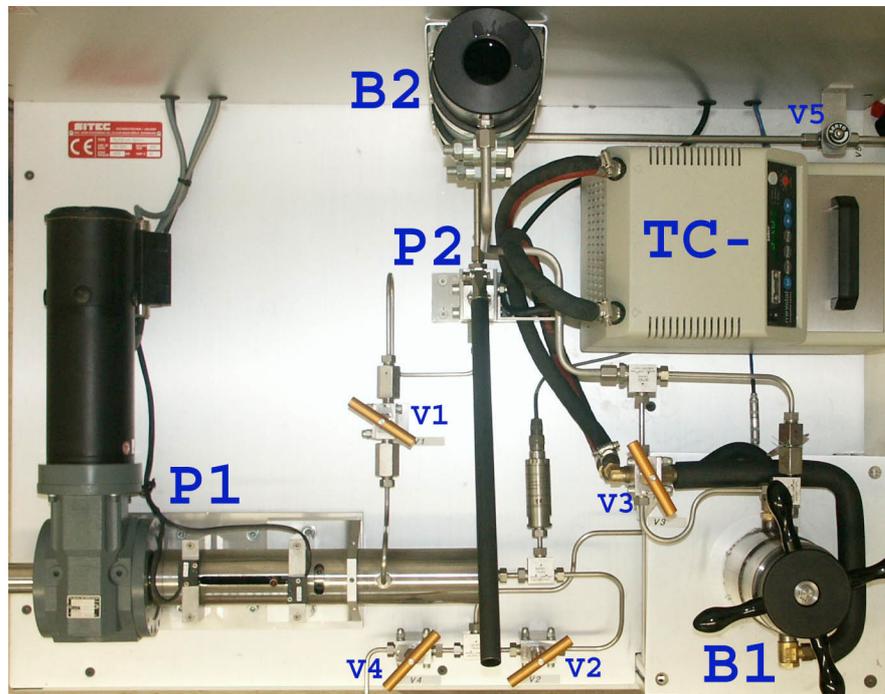


Foto: B. Frey

Abb. 3: Hochdruckanlage Aufsicht

P1: Spindelpresse, P2: Handpumpe, B1: Druckkammer, B2: Überdruckbehälter, TC: Heiz-Kühl-Thermostat, V1-5: Ventile

In die Hochdruckanlage ist ein Heiz-Kühl-Aggregat integriert, das je nach Druckmedium Temperaturen von -25 °C bis 120 °C in der Druckkammer herstellen kann (mit Wasser zwischen 1 °C und 50 °C). Die gewünschte Untersuchungstemperatur kann direkt am Heiz-Kühl-Aggregat eingestellt werden. Der eingestellte Wert wird permanent mit dem Istwert, der von einem Thermostat in der Druckkammer gemessen wird, abgeglichen. Die Temperatur wird über die gesamte Druckdauer konstant gehalten.

Über einen Druckausgleichsbehälter kann der Druck zum einen nach Ende der Druckhaltephase kontrolliert abgelassen werden. Zum anderen ist er durch eine auf 450 MPa eingestellte Berstscheibe mit dem Drucksystem verbunden und dient so zum Druckabfall bei unkontrollierten Druckspitzen, um Schäden am System zu vermeiden. Der Druckausgleichsbehälter wird auch zum Befüllen der Anlage mit Druckmedium verwendet.

An der Steuereinheit ist es möglich, Zieldruckwerte für den Automatikbetrieb einzustellen, aktuelle Druck- und Temperaturwerte im System genau abzulesen und die Hochdruckanlage manuell oder im Automatikbetrieb zu bedienen.

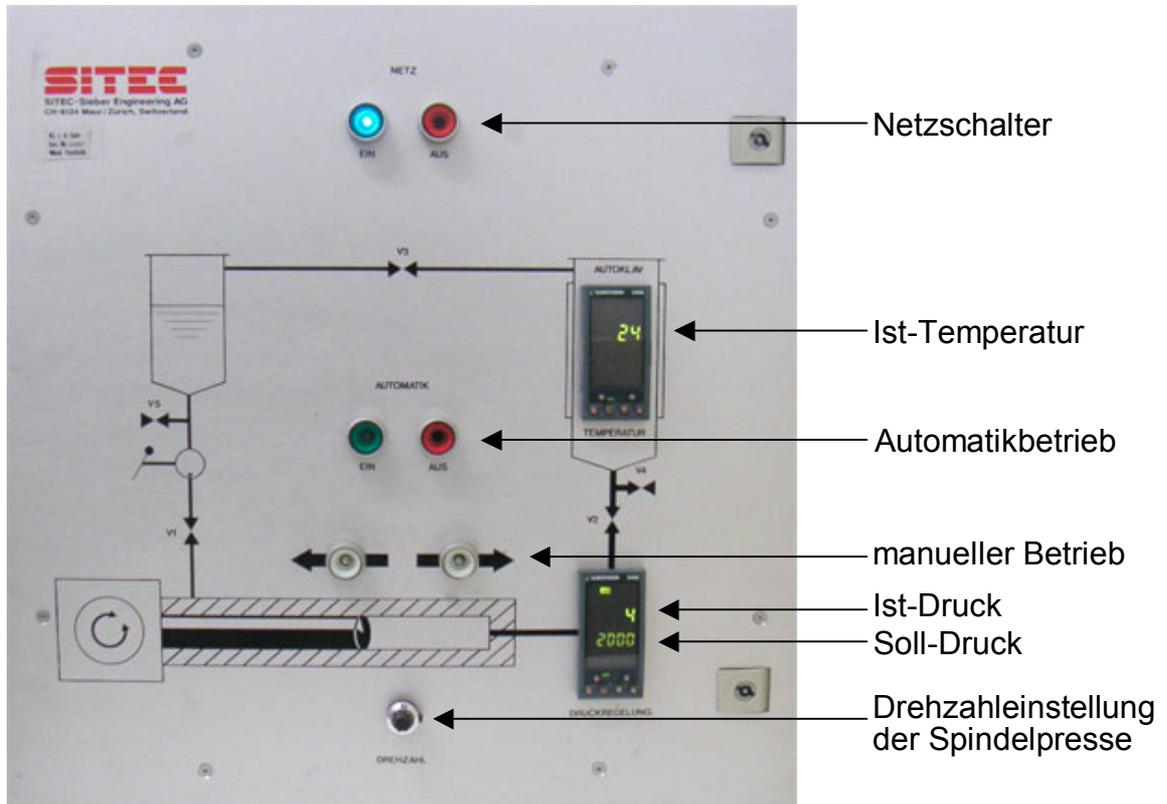


Abb. 4: Hochdruckanlage Steuereinheit

2.3 Material und Geräte

2.3.1 Probengefäße

Verwendet wurden Nalgene[®] Cryogenic Vials (Nalge Company, Rochester, NY, USA, Art. 5000-0012). Diese Gefäße, hergestellt für das Einfrieren von Substanzen in flüssigem Stickstoff, waren in Vorversuchen am stabilsten und auch hinsichtlich Volumen gut geeignet.

Die gewählten Probengefäße müssen für die Bedingungen in der Druckkammer geeignet, d.h. aus stabilem Material gefertigt, aber auch verformbar sein. Besonders kritisch ist der Verschlussmechanismus, der einer hohen mechanischen Belastung standhalten muss. Es darf weder Probenflüssigkeit austreten noch Flüssigkeit aus der Druckkammer in das Gefäß gelangen, da dies die Ergebnisse entscheidend verändern würde. Vorbereitende Untersuchungen mit tintengefärbten Lösungen in den Gefäßen

haben einen bis zur maximalen Druckstufe von 400 MPa dichten Verschluss gezeigt. Dabei wurde bei sämtlichen Versuchen der Verschlussbereich zusätzlich mit Parafilm® (American National Can Company, Joplin, MO, USA) abgedichtet, um das Risiko eines Flüssigkeitsaustritts bzw. –eintritts oder eines möglichen Ablösens des Deckels während der Gefäßverformung unter Druck weiter zu minimieren.

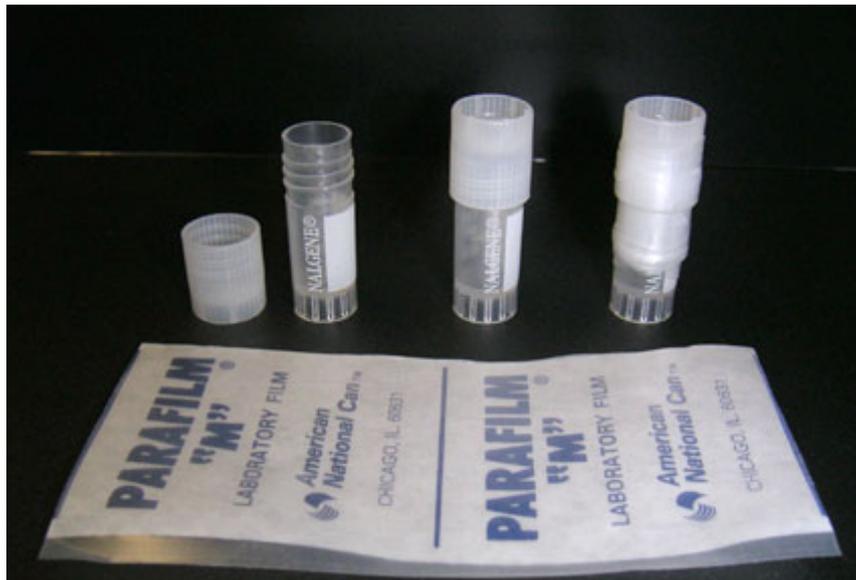


Abb. 5: Probengefäße und Parafilm®

Der geringen Verformung infolge Flüssigkeitskompression (siehe Kap. 2.1) können die verwendeten Gefäße standhalten, nicht aber der starken Verformung durch Kompression von Luft. Daher ist beim Befüllen darauf zu achten, dass sich keine Luft in den Gefäßen befindet, da diese während der Druckbehandlung sonst zerbrechen würden. Vollständig gefüllt fassen die Probengefäße ein Volumen von 2,3 ml.

2.3.2 Photometer

Die photometrischen Messungen erfolgten mit dem Multiscan Ascent® (Version 1.3.1, Labsystems, Research Technologies, Helsinki, Finland, Art. 1507 540). Als dazugehörige Software wurde vom selben Hersteller die Ascent® Software (Version 2.4 für Multiscan Ascent® Art. 1507 550) verwendet.

2.3.3 Zymographieapparat

Die elektrophoretische Auftrennung für die MMP-Zymographie erfolgte in der Gelapparatur Mini-Protean® 3 Cell (Bio-Rad, München, Deutschland, Art. 165-3301 + 165-3302). Zur Stromerzeugung wurde der Powersupply Lightning Volt (Owl Scientific, Portsmouth, NH, USA, Art. OSP-250L) verwendet.

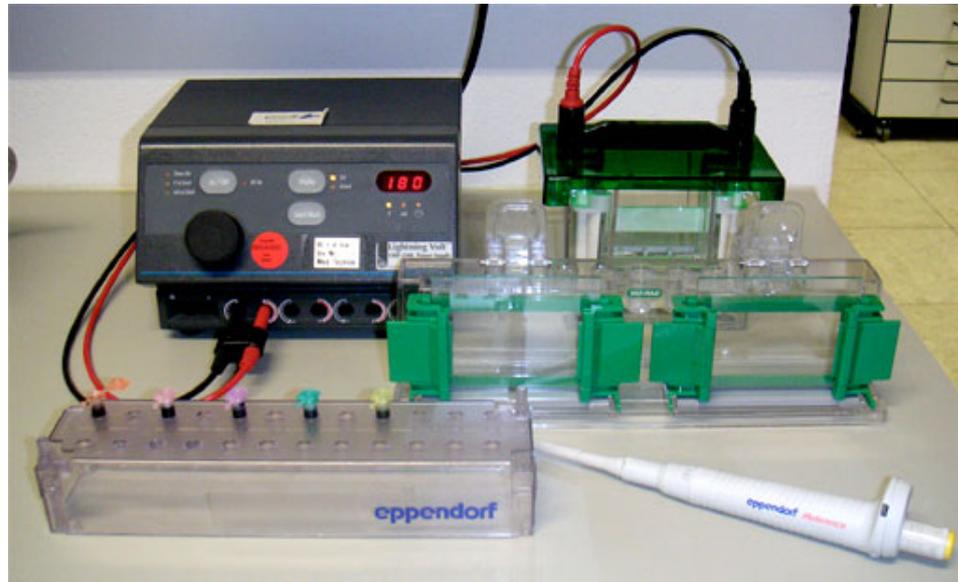


Abb. 6: Gelapparatur mit Powersupply

2.3.4 Weitere Materialien und Geräte

Im Folgenden werden alle weiteren Materialien und Geräte aufgezählt, die im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen verwendet worden sind:

- Computer (Intel Pentium II 266 MHz, Betriebssystem Microsoft Windows® 98, Software: Microsoft Office 97)
- Digitalkamera (Yakumo® Mega Image IV, Software: Adobe Photoshop 7.0)
- Eismaschine (Ziegra-Eismaschinen GmbH, Isernhagen, Deutschland)
- Vortex Mixer (NeoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- Thermomixer (comfort 5355, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Schüttel-Misch-Tisch (Titramax/Inkubator 1000, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland)
- Pipettierhilfe (Pipetus-Akku, Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland)

- Reaktionsgefäße (0,6 und 2,0 ml, Biozym GmbH, Hamburg, Deutschland)
- Eppendorf-Gefäße (unterschiedliche Volumina, Eppendorf AG)
- Eppendorf-Pipetten (unterschiedliche Volumina, Eppendorf AG)
- Sterile Einmal-Glaspipetten (Falcon[®], unterschiedliche Volumina, Becton Dickinson Labware Company, Franklin Lakes, NJ, USA)
- Sterile PVC-Röhrchen (Falcon[®] Blue Max, unterschiedliche Volumina, Becton Dickinson Labware Company)

2.4 Puffer und Lösungen

Im Folgenden werden sämtliche Puffer und Lösungen aufgezählt, die im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen verwendet worden sind:

- Ammonium-Persulfat >98% (Sigma, A-3678)
- APMA (p-Aminophenylmercuric acid) (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England, Art. RPN 2634)
- Brij[®] 35 (Sigma, Art. P-1254)
- Brillant Blau G Tabletten (50mg/Tablette) (Roth, Art. 9470.1)
- Bromphenol Blau (Sigma, Art. B-5525)
- BSA (bovines Serumalbumin) Fraktion V 96% (Sigma, Art. A-4503)
- CaCl₂ (Calciumchlorid) (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz, Art. 21097)
- ddH₂O (doppelt deionisiertes Wasser)
- Dimethylsulfoxid (Merck, Art. 8.02912)
- EDTA-Natrium (Ethyldiamintetraessigsäure) >99% (Roth, Art. 8043.1)
- Enzympuffer (modifiziert nach Verheijen et al. [Verheijen et al.: 1997, 603-609]): Tris-HCl-Puffer (50 mM, pH 7,5), 1,5 mM Natriumchlorid, 0,5 mM Calciumchlorid, 1 µM Zinkchlorid, 0,01% Brij[®] 35
- Essigsäure 100% (Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, NJ, USA, Art. 1.00063)
- Gelatine (Merck, Art. 1.04080)

- Glycerin Rotipuran >99,5% wasserfrei (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland, Art. 3783.1)
- Glycin Rotipuran >99% (Roth, Art. 3908.1)
- Isopropanol reinst
- NaCl (Natriumchlorid) (Merck, Art. 1.06404)
- Natronlauge 1 mol/l (Merck, Art. 1.09137)
- PBS (Phosphate-Buffered Saline) 0,01 M, pH 7,4 (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA, Art. P-3813)
- PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) (Sigma, Art. P-7626)
- Polyacrylamid Rotiphorese[®] Gel 29:1 (40%) (Roth, Art. A515.1)
- Salzsäure 1mol/l (Merck, Art. 1.09057)
- SDS (Sodiumdodecylsulfat) >99% (Sigma, Art. L-3771)
- TEMED (N',N',N',N'-Tetramethylethyldiamin) (Sigma, Art. T-9281)
- Tris-Puffer 99+% (Sigma, Art. T-8524)
- Triton X-100 (Sigma, Art. T-9284)
- ZnCl₂ (Zinkchlorid) (Merck, Art. 1.08816)

2.5 Untersuchtes Enzym

2.5.1 Isolierte humane Matrixmetalloproteinase-9

Aus humanen Blutkonserven-Leukozyten isolierte MMP-9 wurde uns von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. H. Tschesche, Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld überlassen [Tschesche et al.: 1986, 125-131; Nitsch et al.: 1990, 611-615; Tschesche et al.: 1992, 245-255; Hertfelder et al.: 1994, 441-447]. Das Protein wurde in PBS-Puffer gelöst, tiefgekühlt, in einer Konzentration von 4 mg/ml geliefert. Die Enzymlösung wurde zunächst in 50 Portionen à 2 ml mit einer Konzentration von 1 µg/ml und 20 Portionen à 2 ml mit einer Konzentration von 5 µg/ml aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Jedes Aliquot wurde nur ein Mal verwendet, um so ein wiederholtes Auftauen und Einfrieren des Enzyms zu vermeiden. Zum Verdünnen wurde ein spezieller

Enzympuffer (siehe Kap. 2.4) verwendet, um unter anderem Autoaktivierung und Adhäsion des Enzyms an die Gefäßwand möglichst gering zu halten.

2.5.2 Rekombinante humane Matrixmetalloproteinase-9

Verwendet wurde rekombinant hergestellte humane MMP-9 (Oncogene, Boston, MA, USA, Art. PF038). Das Enzym wurde tiefgekühlt als Lyophilisat geliefert und ebenfalls in Enzympuffer (siehe Kap. 2.4) gelöst. Es wurden 20 Aliquots à 1 ml mit einer Konzentration von 1 µg/ml hergestellt und bei –80 °C eingefroren.

2.5.3 *In vitro* Aktivierung der Matrixmetalloproteinase-9

Eine *in vitro* Aktivierung von MMP mit p-Aminophenylmercuric acid (APMA) ist weit verbreitet und gut erforscht [Okada et al.: 1992, 21712-21719; Nagase: 1997, 151-160; Brinckerhoff et al.: 2002, 207-214]. Auch der zur Versuchsauswertung verwendete Activity-Assay basiert auf einer Aktivierung mit APMA. Bei in dieser Arbeit verwendeter APMA handelt es sich um 352 mg (1 M) tiefgefrorene pulverförmige APMA, die in 1 ml Dimethylsulfoxid gelöst wurde. Vor jeder Anwendung wurden 10 µl davon in 10 ml des jeweils verwendeten Puffers gelöst, was als ready-to-use APMA bezeichnet wird und der in der Literatur empfohlenen Konzentration von 1 mM entspricht [Braunhut et al.: 1994, 13472-13479; Murphy et al.: 1995, 470-484]. Die mit ready-to-use APMA gemischten Enzymlösungen wurden für 1,5 h bei 37 °C inkubiert.

2.6 Verdünnungsreihen der Matrixmetalloproteinase-9

Um für nachfolgende Untersuchungen mit MMP-9 optimale Bedingungen zu gewährleisten, wurden Messungen von Verdünnungsreihen durchgeführt. Dabei wurden zum einen verschiedene bekannte Konzentrationen der untersuchten Enzyme mit der Auswertungs-Standardkurve des Herstellers sowie der Verdünnungsreihe des vom Hersteller mitgelieferten Enzyms verglichen, um später Aussagen über Messergebnisse unbekannter Konzentration machen zu können. Zweitens wurden drei unterschiedliche Pufferlösungen untersucht: 1. Reiner PBS-Puffer, 2. PBS-Puffer mit BSA (1%), 3. Enzympuffer (siehe Kap. 2.4).

Es wurden acht Eppendorfgefäße mit den Konzentrationen 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 und 256 ng/ml beschriftet und mit Ausnahme des 256-ng/ml-Gefäßes mit 500 µl PBS-Puffer gefüllt. Die Ausgangskonzentrationen der zu untersuchenden MMP-9 (isoliert 4 mg/ml, rekombinant 1 µg/ml) wurden mit PBS-Puffer auf eine Konzentration von 256 ng/ml verdünnt und 1 ml in das vorbereitete Eppendorfgefäß gefüllt. Davon wurden 500 µl in das 128-ng/ml-Gefäß abpipettiert und dieses 30 s auf dem Vortex Mixer geschüttelt. Von der 128-ng/ml-Probe wurden wiederum 500 µl entnommen und in das 64-ng/ml-Gefäß gegeben. Dieser Vorgang wurde fortgesetzt, bis sich im 2-ng/ml-Gefäß 1 ml Enzymlösung mit einer Konzentration von 2 ng/ml befanden. Analog dazu wurde eine zweite Verdünnungsreihe mit einem PBS-Puffer mit BSA (1%) und eine dritte mit einem speziellen Enzympuffer (siehe Kap. 2.4) angelegt.

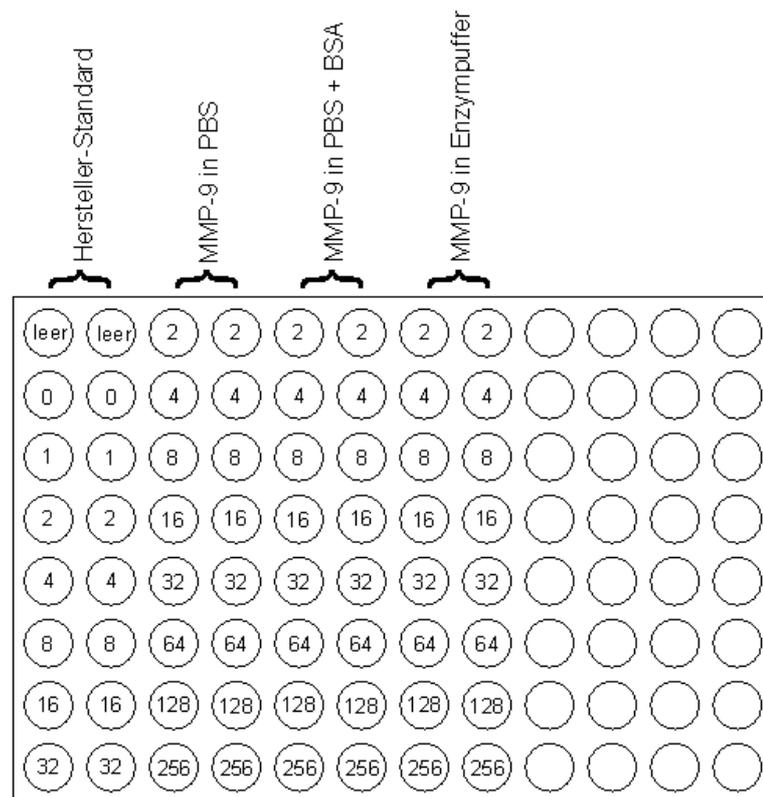


Abb. 7: 96-Well-Mikrotiterplatte mit Verdünnungsreihen

Die Untersuchungsproben wurden jeweils in zwei Wells auf die Mikrotiterplatte des MMP-9 Activity-Assay Systems aufgetragen (siehe Abb. 7) und der Assay wie beschrieben durchgeführt (siehe Kap. 2.8). Sämtliche Untersuchungsproben wurden mit ready-to-use APMA aktiviert.

2.7 Hochdruckbehandlung der Matrixmetalloproteinase-9

2.7.1 Allgemeines

Es wurden MMP-9-Lösungen einer definierten Konzentration hergestellt, druckbehandelt und im Anschluss mittels Activity-Assay die enzymatische Aktivität gemessen.

Die Verdünnungsreihen haben für isolierte MMP-9 eine Konzentration von 100 ng/ml und für rekombinante MMP-9 30 ng/ml als geeigneten Messbereich ergeben.

Aus der jeweils zu untersuchenden MMP-9 wurden drei unterschiedliche Proben hergestellt:

A: keine *in vitro* Aktivierung des Enzyms

B: *In vitro* Aktivierung des Enzyms nach Druckbehandlung

C: *In vitro* Aktivierung des Enzyms vor Druckbehandlung

Als Druckstufen wurden 200 und 400 MPa gewählt und zusätzlich jeweils eine nicht HHD-behandelte Kontrolle gemessen. Die Druckhaltezeit (Plateaudauer) betrug 10 min bei einer Temperatur in der Druckkammer von 5 °C.

Vorausgehende Untersuchungen haben gezeigt, dass sich die Ergebnisse bei 5 °C, 20 °C (Raumtemperatur) oder 37 °C (Körpertemperatur) nur in Bezug auf eine bei höheren Temperaturen vermehrte Autoaktivierung unterscheiden. Deshalb wurde für die Untersuchungen eine Temperatur von 5 °C gewählt.

Vor und nach der Druckbehandlung wurden die Untersuchungsproben auf Eis gelagert und die Untersuchungen ohne zeitliche Verzögerung durchgeführt.

Einmal aufgetautes Enzym wurde nicht für weitere Untersuchungen verwendet.

Die Untersuchung wurde für beide Enzyme (isolierte und rekombinante MMP-9) jeweils fünf Mal wiederholt.

2.7.2 Herstellung der Untersuchungsproben

Zur Herstellung der Untersuchungsproben wurden zunächst die benötigten Enzymlösungs aliquots (isolierte bzw. rekombinante MMP-9, Konzentration 1 µg/ml) aufgetaut. Für Proben A und B wurden 1 ml (0,3 ml)* MMP-9-Lösung (1 µg/ml) mit 9 ml (9,7 ml)* Enzypuffer gemischt und 30 s auf dem Vortex-Mixer geschüttelt. Für Probe C wurden 0,5 ml (0,15 ml)* MMP-9 Lösung mit 2 ml (2,35 ml)* Enzypuffer und 2,5 ml ready-to-use APMA gemischt und 30 s auf dem Vortex-Mixer geschüttelt. Somit hatten alle Untersuchungsproben die gewünschte Konzentration von 100 ng/ml (30 ng/ml)* MMP-9.

Es wurden 9 Probengefäße beschriftet (A Kontrolle, A 200 MPa, A 400 MPa, analog für B und C) und mit den entsprechenden Lösungen vollständig befüllt.

Die Proben der Gruppe C wurden anschließend zur Enzymaktivierung für 1,5 h bei 37 °C inkubiert, während die übrigen Proben auf Eis gelagert wurden.

Für die zymographische Messung von hochdruckbehandeltem MMP-9 wurden aufgrund der unterschiedlichen Sensitivität der Verfahren zwei separate Untersuchungsproben aus Enzypuffer und isolierter MMP-9 (200 ng/ml) bzw. rekombinanter MMP-9 (60 ng/ml) hergestellt. Diese beiden Proben wurden nicht *in vitro* aktiviert.

2.7.3 Druckbehandlung

Die Hochdruckanlage und das Heiz-Kühl-Aggregat wurden 30 min vor Versuchsbeginn eingeschaltet und auf 5 °C temperiert. Sobald die gewünschte Temperatur erreicht ist, kann die Druckkammer mit den Untersuchungsproben bestückt und dicht verschlossen werden.

Vor dem Druckaufbau wurde darauf geachtet, dass sich im System ausreichend Flüssigkeit befindet und gegebenenfalls über den Überdruckbehälter destilliertes Wasser bis zur Kontrollmarke nachgefüllt. Die Ventile 4 und 5 (siehe Abb. 3) waren während der gesamten Untersuchungsdauer dicht verschlossen und das Ventil 2 vollständig geöffnet. Zunächst wurde die Handpumpe mehrmals betätigt, um die Flüssigkeit im System gleichmäßig zu verteilen. Danach wurde das Ventil 3 dicht verschlossen.

*Angaben in Klammern beziehen sich auf rekombinante MMP-9

Mit der Handpumpe wurde ein Vordruck von ca. 50 MPa aufgebaut und danach das Ventil 1 verschlossen. Anschließend wurde an der Schalteinheit der gewünschte Zieldruck eingestellt und die Automatik gestartet. Die elektromotorisierte Spindelpresse stellte den gewünschten Druck her und hielt ihn über die vorgegebene Druckdauer (10 min) konstant.

Die Druckbehandlung kann in Druckaufbauphase, Druckhaltephase (Plateau) und Druckabbauphase eingeteilt werden. Die für die vorliegenden Untersuchungen angegebene Zeitdauer von 10 min bezieht sich auf die Druckhaltephase, d.h. die Zeitmessung wurde nach Erreichen des Zieldrucks gestartet und vor dem Druckabbau gestoppt. Es wurde darauf geachtet, dass Druckaufbau- und Druckabbaugeschwindigkeit bei allen Untersuchungen konstant ca. 100 MPa/min waren. Der Druck wurde abgebaut, indem die Spindelpresse nach Abschalten der Automatik per Druckknopf zurückgefahren wurde. Der verbleibende Restdruck wurde manuell über das Ventil 3 abgelassen. Ein kontrollierter und langsamer Druckabbau (ca. 100 MPa/min) war dabei sehr wichtig, damit die Probengefäße ihre Ausgangsform erreichen konnten, ohne zu bersten. Sobald der Druck vollständig entwichen war, konnten die Druckkammer geöffnet und die Proben entnommen werden.

2.7.4 Analyse der Untersuchungsproben

Die Untersuchungsproben A, B und C wurden jeweils in zwei Wells auf die Mikrotiterplatte des MMP-9 Activity-Assay Systems aufgetragen und der Assay wie im folgenden Kapitel beschrieben durchgeführt.

Die für die Zymographie vorgesehenen Untersuchungsproben wurden, wie in Kap. 2.9 beschrieben, auf zwei Gele aufgetragen und analysiert.

2.8 Messung der Matrixmetalloproteinase-9-Aktivität

2.8.1 Grundlagen

Die quantitative Bestimmung der MMP-9-Aktivität erfolgte mit dem BIOTRAK[®] MMP-9 Activity-Assay System (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England, Art. RPN 2634) nach dem Protokoll von Verheijen et al. [Verheijen et al.: 1997, 603-609].

Der Assay bestimmt spezifisch MMP-9. Dabei kann sowohl aktives MMP-9 einzeln als auch die Gesamtmenge MMP-9 quantitativ nachgewiesen werden.

Die Mikrotiterplatte ist mit einem spezifischen monoklonalen MMP-9-Antikörper beschichtet, der an eine Domäne des Enzyms bindet, die sowohl die Proform als auch die aktive Form besitzen [Fujimoto et al.: 1994, 79-88]. Nach Komplexierung von aktivem MMP-9 bzw. Aktivierung des komplexierten MMP-9 wird die Proform des Detektionsenzym proteolytisch in seine aktive Form gespalten. Dabei ist die Aktivierungssequenz des Detektionsenzym spezifisch für MMP-9. Aufgrund eines chromogenen Peptidsubstrates, das an das aktive Detektionsenzym bindet, kann eine photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 405 nm erfolgen [Capper et al.: 1999, 8-9]. Anhand einer Standardkurve kann die Konzentration in den Untersuchungsproben bestimmt werden. Bei dem mitgelieferten MMP-9-Standard handelt es sich nach Angaben des Herstellers um humane rekombinant hergestellte MMP-9 aus HT-1080 Fibrosarkomzellen [Okada et al.: 1992, 21712-21719].

2.8.2 Durchführung

Die Mikrotiterplatte wurde 1 h vor Auftragen der Proben aus dem Tiefkühlschrank genommen. Für die Standardreihe wurden 6 Eppendorfgefäße mit Konzentrationen 1, 2, 4, 8, 16 und 32 ng/ml beschriftet und mit Ausnahme des 32-ng/ml-Gefäßes mit 300 µl des mitgelieferten Assay-Puffers gefüllt. In das 32-ng/ml-Gefäß wurde 600 µl des MMP-9-Standards pipettiert. Davon wurden 300 µl in das 16-ng/ml-Gefäß abpipettiert und das Gefäß 30 s auf dem Vortex Mixer geschüttelt. Von der 16-ng/ml-Probe wurden wiederum 300 µl entnommen und in das 8-ng/ml-Gefäß gegeben. Dieser Vorgang wurde fortgesetzt, bis sich im 1-ng/ml-Gefäß 600 µl Enzymlösung mit einer Konzentration von 1 ng/ml befanden. In die ersten beiden Wells der Mikrotiterplatte wurden je 100 µl Assay-Puffer als Nullprobe der Standardreihe pipettiert. Danach wurden von der Standardreihe und den Untersuchungsproben je 100 µl in weitere Wells pipettiert. Sämtliche Untersuchungsproben wurden analog der Abb. 7 doppelt aufgetragen. Die Mikrotiterplatte wurde mit dem Deckel abgedeckt und bei 4 °C für 18 h inkubiert.

Anschließend wurde die gesamte Flüssigkeit aus der Mikrotiterplatte entfernt und die Wells vier Mal mit einem zum Assay gehörenden Waschpuffer gewaschen. Danach musste die Platte gut abgetropft werden, damit sich keine Flüssigkeit mehr in den Wells befand. In alle Wells der Standardreihe und alle Wells der Gruppe B wurde je 50 μl ready-to-use APMA pipettiert, in alle übrigen belegten Wells je 50 μl Assay-Puffer. Die Mikrotiterplatte wurde 30 s geschüttelt und anschließend bei 37 °C für 1,5 h inkubiert. Drei min vor Ende der Inkubationszeit wurde das Detektionsenzym mit dem Detektionssubstrat im Verhältnis 1:1 gemischt, 30 s auf dem Vortex-Mixer geschüttelt und sofort je 50 μl davon in alle belegten Wells pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde 30 s geschüttelt und direkt im Anschluss bei 450 nm Wellenlänge im ELISA-Reader gelesen, was die Absorptions-Ausgangswerte (t_0) ergab. Die Mikrotiterplatte wurde bei 37 °C für 1 h inkubiert, danach 30 s geschüttelt und dann wiederum bei 405 nm gelesen, was die Absorptions-Messwerte nach 1 h (t_1) ergab.

2.8.3 Auswertung

Zunächst wurde für alle Wells die Differenz zwischen t_1 - und t_0 -Werten gebildet. Da jede Probe in zwei Wells gemessen worden ist, wurden die Mittelwerte aus den zusammengehörenden Differenz-Wertepaaren gebildet. Um für die weitere Verwendung und graphische Darstellung ganze Werte zu erhalten, wurden alle Mittelwerte mit 1000 multipliziert. Die für die Ergebnisse angegebenen Werte der Enzymaktivität sind folglich definiert als mittlere Differenz der Absorption bei 405 nm ($\text{mean } \delta\text{Absorption}_{405} \times 1000$). Die gemessene Absorption steigt proportional zur Erhöhung der Enzymaktivität, so dass anhand der Absorptionsmesswerte auf die Höhe der MMP-9-Aktivität geschlossen werden kann.

2.9 Zymographischer Nachweis der Matrixmetalloproteinase-9

2.9.1 Grundlagen

Die MMP-Zymographie ist ein elektrophoretisches Verfahren zur Identifizierung proteolytischer Formen dieser Enzyme. Es ist möglich, aufgrund der unterschiedlichen Molekülgröße aktives von inaktivem Enzym zu unterscheiden und grobe quantitative Aussagen zu machen.

Zuerst erfolgt eine elektrophoretische Trennung von Proteinen auf einem denaturierenden, aber nicht reduzierenden gelatinehaltigen Polyacrylamidgel. Dabei wird durch Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS) eine ladungsunabhängige Auftrennung der Proteine nach Molekulargewicht erreicht. Anhand eines definierten Proteinstandards, der in eine Bahn aufgetragen wird, kann das Molekulargewicht der untersuchten Proben abgelesen werden. Am Ende der Laufzeit werden die Proteine renaturiert und in einem dem untersuchten Enzym entsprechenden Aktivierungspuffer inkubiert. Nach Färbung des Gels erscheinen die Stellen mit proteolytischer Aktivität durchsichtig, da hier die Gelatine von aktivem Enzym zersetzt worden ist [Hawkes et al.: 2001, 399-410].

Diese Art der Zymographie ist eine gut erforschte und häufig angewendete Technik zur qualitativen und semiquantitativen Detektion von MMP-9 und mit einem bis in den Picogramm reichenden Nachweisbereich sehr sensitiv [Kleiner et al.: 1994, 325-329; Pucci-Minafra et al.: 2001, 419-427]. Die Proform von MMP-9 hat ein Molekulargewicht von 92 kDa, während aktives MMP-9 infolge der proteolytischen Abspaltung mit 84 kDa leichter ist [Nakashima et al.: 1998, 694-700; Woessner et al.: 2000, 2; Muhs et al.: 2003, 8-15]. Während der Elektrophorese werden Proform und aktive Form von MMP-9 folglich in unterschiedliche Banden aufgetrennt und zersetzen bei nachfolgender Aktivierung an unterschiedlichen Stellen die im Gel vorhandene Gelatine.

Zum Nachweis, dass es sich bei den verwendeten Enzymen um MMP-9 gehandelt hat, wurde, wie vielfach in der Literatur beschrieben, je eine Zymographie mit einem Hemmstoff für Metalloproteinasen (EDTA) und einem Hemmstoff für Serin- und Cysteinproteinasen (PMSF) durchgeführt [Deutscher: 1990, 83-89; Yao et al.: 1996, 15580-15589].

2.9.2 Herstellung der Untersuchungsproben

Es wurden zuerst die nötigen Enzymlösungsaliquote der zu untersuchenden Enzyme aufgetaut:

1. isolierte MMP-9 (1 µg/ml)
2. rekombinante MMP-9 (1 µg/ml)
3. Standard MMP-9 aus MMP-9 Activity-Assay (64 ng/ml)

Durch Verdünnung mit Enzympuffer wurden folgende Untersuchungsproben gewünschter Konzentration hergestellt.

Für Gele 1,3 und 4:

- Lösung isolierte MMP-9 (200 ng/ml)
- Lösung rekombinante MMP-9 (64 ng/ml)
- Lösung Standard MMP-9 (64 ng/ml)

Für Gel 2:

- Lösung isolierte MMP-9 (200 ng/ml) mit ready-to-use APMA (33%)
- Lösung rekombinante MMP-9 (64 ng/ml) mit ready-to-use APMA (33%)
- Lösung Standard MMP-9 (64 ng/ml) mit ready-to-use APMA (33%)

Für Gel 3 und 4 als Positivkontrolle:

- Lösung rekombinante MMP-9 (128 ng/ml)

Alle APMA-haltigen Untersuchungsproben wurden vor dem weiteren Bearbeiten zur Enzymaktivierung für 1,5 h bei 37 °C inkubiert

Vor dem Auftragen auf die Gele wurden sämtliche Proben im Verhältnis 4:1 mit Probenpuffer gemischt und 30 s auf dem Vortex-Mixer geschüttelt.

2.9.3 Durchführung

Durchführung und verwendete Substanzen basierten auf den Angaben von Hawkes et al. [Hawkes et al.: 2001, 399-410].

Polyacrylamid Rotiphorese® Gel 29:1 (40%)	2,5 ml
1,5 M Tris-Puffer pH 8,6	2,5 ml
Gelatine	100,0 µl
SDS (10%ige Lösung)	100,0 µl
ddH ₂ O	4,75 ml
Ammonium-Persulfat (10%ige Lösung)	50,0 µl
TEMED	5,0 µl

Tab. 1: Zusammensetzung des Trenngels

(Angaben für zwei Minigele à 8,0 cm x 7,3 cm, Stärke 0,75 mm)

Polyacrylamid Rotiphorese® Gel 29:1 (40%)	1,25 ml
0,5 M Tris-Puffer pH 6,8	2,5 ml
SDS (10%ige Lösung)	100,0 µl
ddH ₂ O	6,1 ml
Ammonium-Persulfat (10%ige Lösung)	50,0 µl
TEMED	5,0 µl

Tab. 2: Zusammensetzung des Sammelgels

(Angaben für zwei Minigele à 8,0 cm x 7,3 cm, Stärke 0,75 mm)

<u>Proben-Puffer</u> : 250 mM Tris-Puffer, 275 mM SDS, in ddH ₂ O mit 40% Glycerin und 0,2% Bromphenol Blau, pH 6,8
<u>Laufpuffer</u> : 25 mM Tris-Puffer, 200 mM Glycin, 3,5 mM SDS, in ddH ₂ O
<u>Inkubationspuffer 1</u> : 50 mM Tris-Puffer, 5 mM CaCl ₂ , 200 mM NaCl, in ddH ₂ O mit 2,5% Triton X-100, pH 7,5
<u>Inkubationspuffer 2</u> : wie Inkubationspuffer 1, aber ohne Triton X-100
<u>EDTA-Puffer 1</u> : 50 mM Tris-Puffer, 200 mM NaCl, 100 mM EDTA-Natrium, in ddH ₂ O mit 2,5% Triton X-100, pH 7,5
<u>EDTA-Puffer 2</u> : wie EDTA-Puffer 1, aber ohne Triton X-100
<u>PMSF-Puffer 1</u> : 50 mM Tris-Puffer, 5 mM CaCl ₂ , 200 mM NaCl, 100 mM PMSF, in ddH ₂ O mit 2,5% Triton X-100, pH 7,5
<u>PMSF-Puffer 2</u> : wie PMSF-Puffer 1, aber ohne Triton X-100
<u>Färbelösung</u> : ddH ₂ O mit 30% Isopronanol, 10% Essigsäure und 0,2% Brillant blau G
<u>Entfärbelösung</u> : ddH ₂ O mit 10 % Isopropanol und 10 % Essigsäure

Tab. 3: Puffer und Lösungen für die Zymographie

Nachdem alle notwendigen Substanzen hergestellt worden waren, wurden zunächst zwei gelatinehaltige 12%ige Polyacrylamid-Trenngele (siehe Tab. 1) hergestellt, ca. 6 cm hoch in die Gießapparatur eingefüllt und 60 min polymerisieren gelassen. Das Sammelgel (siehe Tab. 2) wurde gemischt, bis zur Oberkante auf das Trenngel gegossen, mit einem Kamm zum Formen der Probenkammern versehen und 45 min polymerisieren gelassen. Nachdem die Gele vollständig polymerisiert waren, wurden sie aus der Gießapparatur entfernt und in der Elektrophoresekammer eingespannt. Die Elektrophoresekammer wurde zur Hälfte mit Laufpuffer gefüllt, so dass die Gele vollständig bedeckt waren.

Jedes Gel bietet Platz für 10 Untersuchungsproben. Aus Gründen der Übersicht wurden nur die Bahnen 2, 4, 6 und 8 belegt. In die Geltasche der Bahn 2 wurden 18 µl Proteinstandard (Precision Protein Standards[®], Firma Bio-Rad, München, Deutschland, Art. 161-0372) pipettiert. Von den Untersuchungsproben wurden jeweils 18 µl in die entsprechenden Geltaschen 4, 6 und 8 aufgetragen.

Es wurde für ca. 2,5 h bei 20 mA Gleichstrom elektrophorisiert. Anhand des mitlaufenden Proteinstandards war erkennbar, auf welcher Höhe sich der zu

erwartende Molekülgrößenbereich von MMP-9 zwischen 75 und 100 kDa befand.

Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die Gele vorsichtig von den Glasplatten abgelöst und 2 x 15 min unter Schwenken bei 20 °C in Inkubationspuffer 1 inkubiert. Der Inkubationspuffer 1 wurde bis auf 2 ml abgegossen und Inkubationspuffer 2 dazugegeben. Nach 15 min Schwenken bei Raumtemperatur wurden die Gele in Inkubationspuffer 2 bei 37 °C für 19 h inkubiert.

Nach dem Ende der Inkubationszeit wurde der Puffer abgegossen und die Gele mit ddH₂O 3 Mal gewaschen. Die Gele wurden ausreichend mit Färbelösung bedeckt und 1,5 h unter Schwenken gefärbt. Im Anschluss wurde die Färbelösung abgegossen und Entfärbelösung dazugegeben. Die nachfolgende Entfärbung wurde unter Schwenken und mehrmaligem Erneuern der Entfärbelösung solange durchgeführt, bis ein zufriedenstellendes Bild der Banden erkennbar war.

Bei den zymographischen Untersuchungen zur Enzymhemmung mit EDTA bzw. PMSF wurden lediglich die Inkubationspuffer für die Untersuchungsproben verändert (siehe Tab. 3) und zusätzlich eine Positivkontrolle (rekombinante MMP-9 32 ng/ml) in normalem Inkubationspuffer inkubiert. Alle übrigen Substanzen sowie der Ablauf waren identisch.

2.9.4 Auswertung

Die Gele wurden aus der Entfärbelösung genommen und nass auf eine Durchlichtplatte in einer Fotokammer gelegt. Mittels Digitalkamera wurden die Gele fotografiert und auf dem Computer gespeichert. Anhand des mitgelaufenen Proteinstandards konnte die Molekülgröße der untersuchten Proteine abgelesen werden. Anhand der Stärke der entfärbten Banden ließen sich ungefähre Aussagen über die Quantität machen.

2.10 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software SPSS (Version 11.5, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Dargestellt wurden die absoluten Ergebniswerte und daran anschließend jeweils aus den fünf Einzeluntersuchungen zusammengefasst der Mittelwert und das 95%-Konfidenzintervall.

Als Signifikanzniveau wurde $\alpha = 0,05$ gewählt und bei p-Werten kleiner als 0,05 von statistischer Signifikanz gesprochen.

Die Ausdrücke Mittel und Mittelwert werden analog verwendet und bezeichnen das arithmetische Mittel.

3. Ergebnisse

3.1 Verdünnungsreihen der Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9)

3.1.1 Isolierte MMP-9 – Activity-Assay

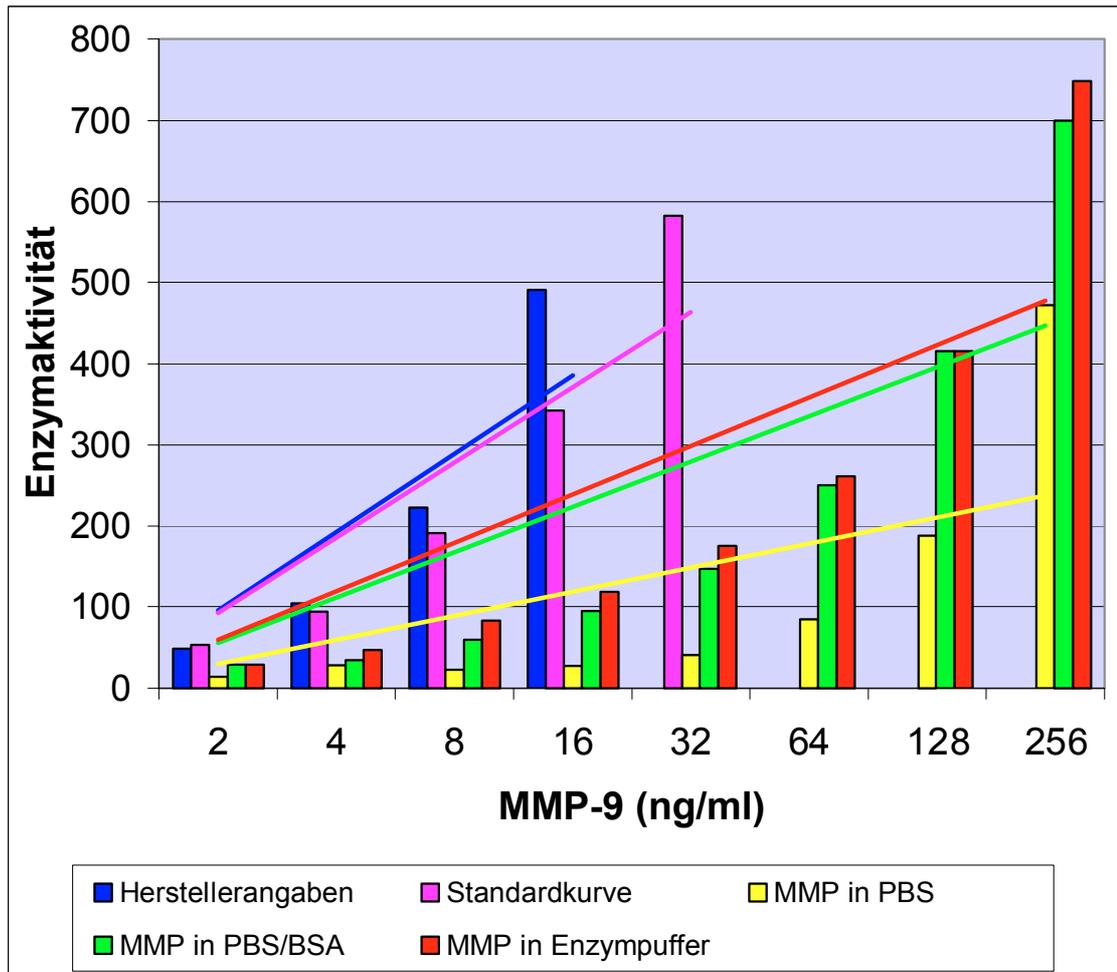


Abb. 8: Verdünnungsreihe isolierte MMP-9

Die im Folgenden verwendete Angabe der Enzymaktivität entspricht der im Activity-Assay gemessenen Absorption (siehe Kap. 2.8.3).

Die gemessenen Aktivitätswerte des Activity-Assay MMP-9-Standards zeigten nahezu keine Unterschiede gegenüber den vom Assay-Hersteller angegebenen Werten. Die untersuchte isolierte MMP-9 ergab verglichen mit dem Standard weniger als 50% Enzymaktivität bei gleicher Konzentration. Bezüglich der drei unterschiedlichen Pufferlösungen waren die Aktivitätswerte der MMP-9 in Enzypuffer am höchsten. MMP-9 in reinem PBS-Puffer zeigte

deutlich niedrigere Aktivitätswerte verglichen mit den beiden anderen verwendeten Pufferlösungen.

3.1.2 Rekombinante MMP-9 – Activity-Assay

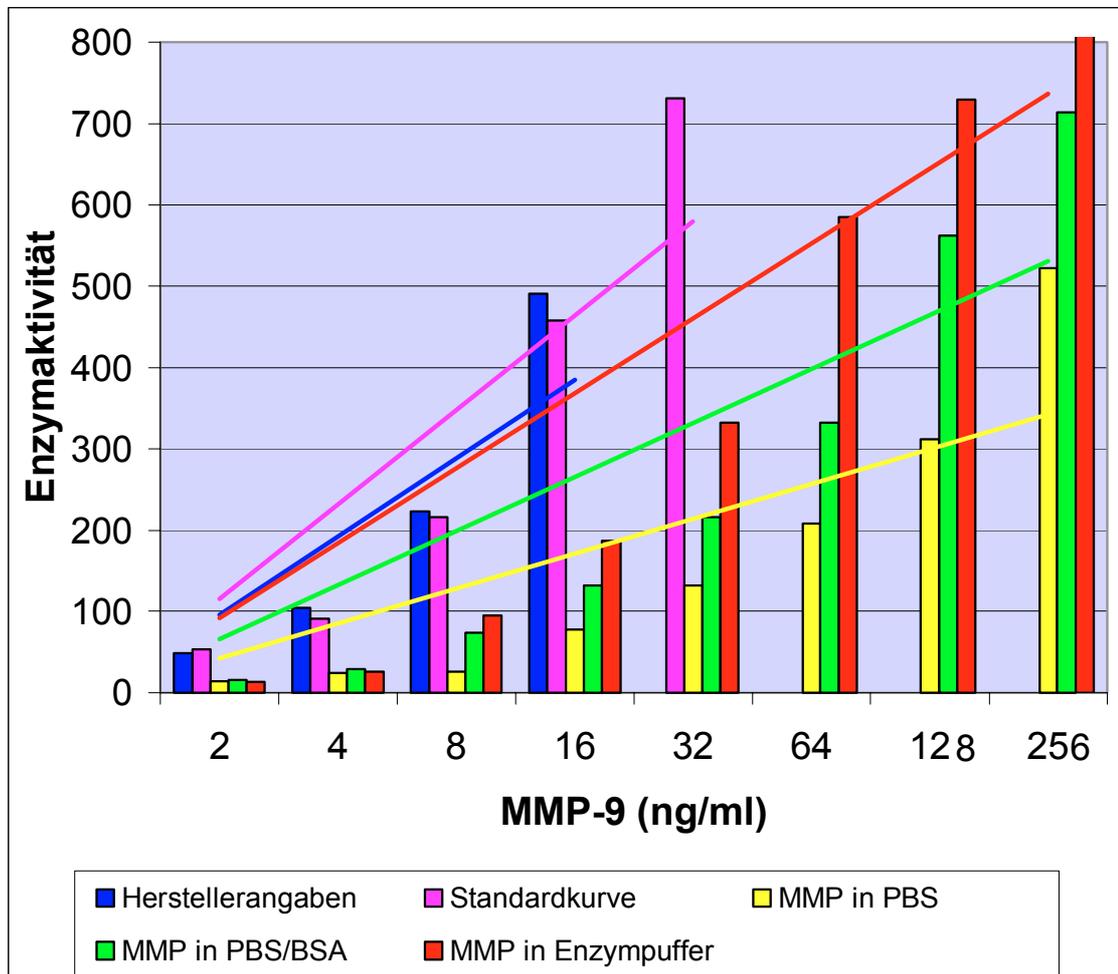


Abb. 9: Verdünnungsreihe rekombinante MMP-9

Die Ergebnisse der rekombinanten MMP-9 unterschieden sich hier nur geringfügig von denen der isolierten MMP-9. Die Enzymaktivität von rekombinanter MMP-9 war jedoch bei gleicher Konzentration insgesamt höher als die von isolierter MMP-9. Bezüglich der drei unterschiedlichen Pufferlösungen zeigte rekombinante MMP-9 in Enzypuffer ebenfalls die höchsten Aktivitätswerte.

3.2 MMP-9 nach hydrostatischem Hochdruck (HHD)

3.2.1 Herstellerangaben für MMP-9 Activity-Assay

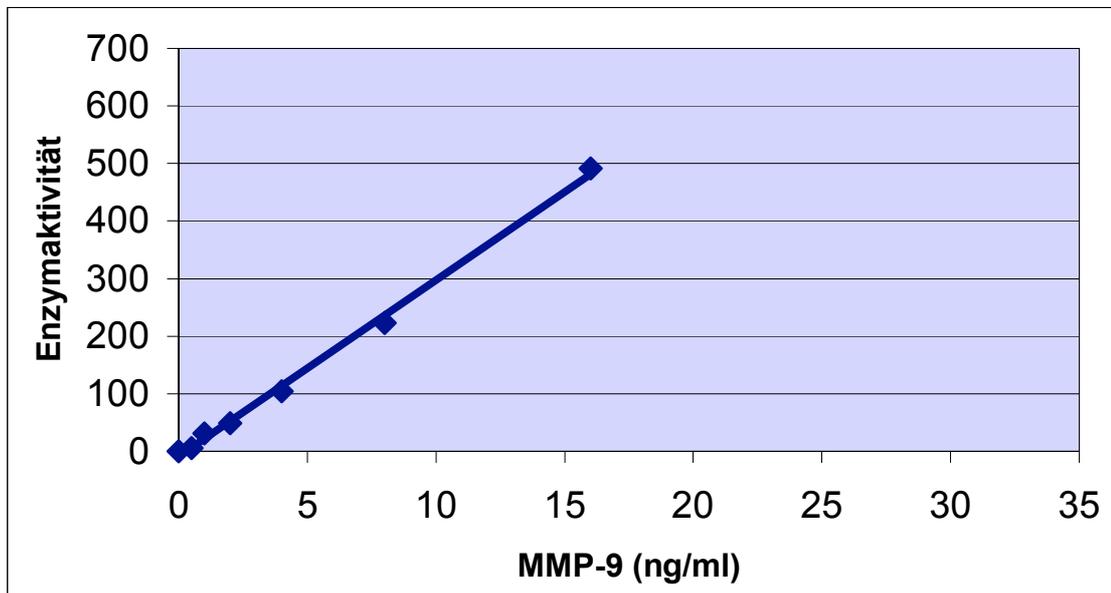


Abb. 10: Herstellerangaben für MMP-9 Activity-Assay

3.2.2 Standardkurve für MMP-9 Activity-Assay

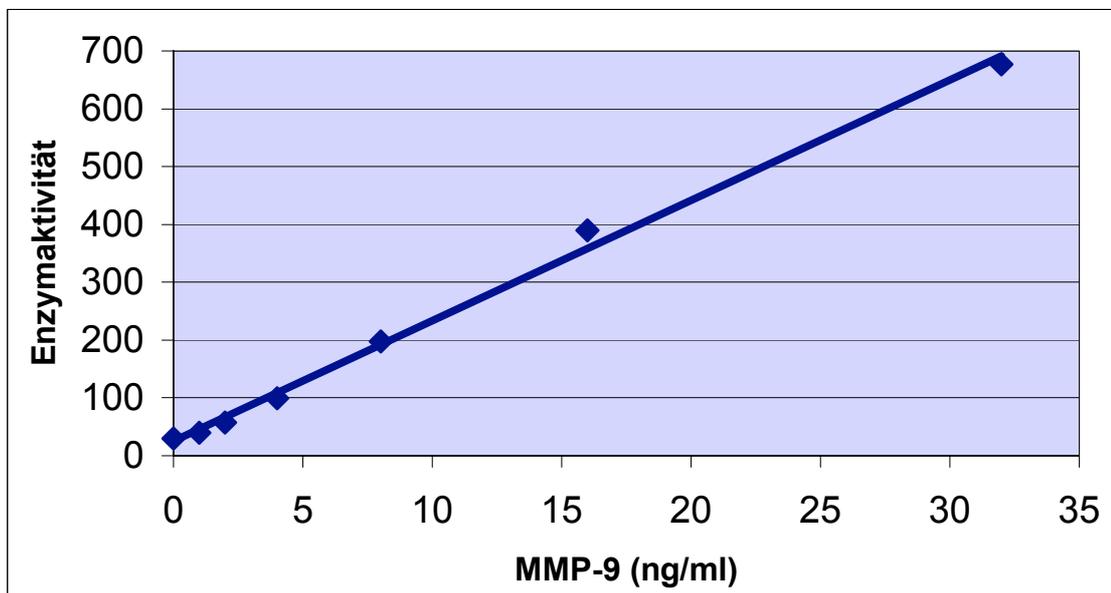


Abb. 11: Standardkurve für MMP-9 Activity-Assay

Bei jeder Messung von MMP-9 wurde eine Standardkurve (Verdünnungsreihe mit rekombinanter Standard-MMP-9 des Assay-Herstellers) mitgemessen. Beispielhaft ist eine Verdünnungsreihe dargestellt. Die gemessenen Aktivitätswerte entsprechen nahezu den vom Hersteller angegebenen Werten.

3.2.3 Isolierte MMP-9 nach HHD – Activity-Assay

1. Messung

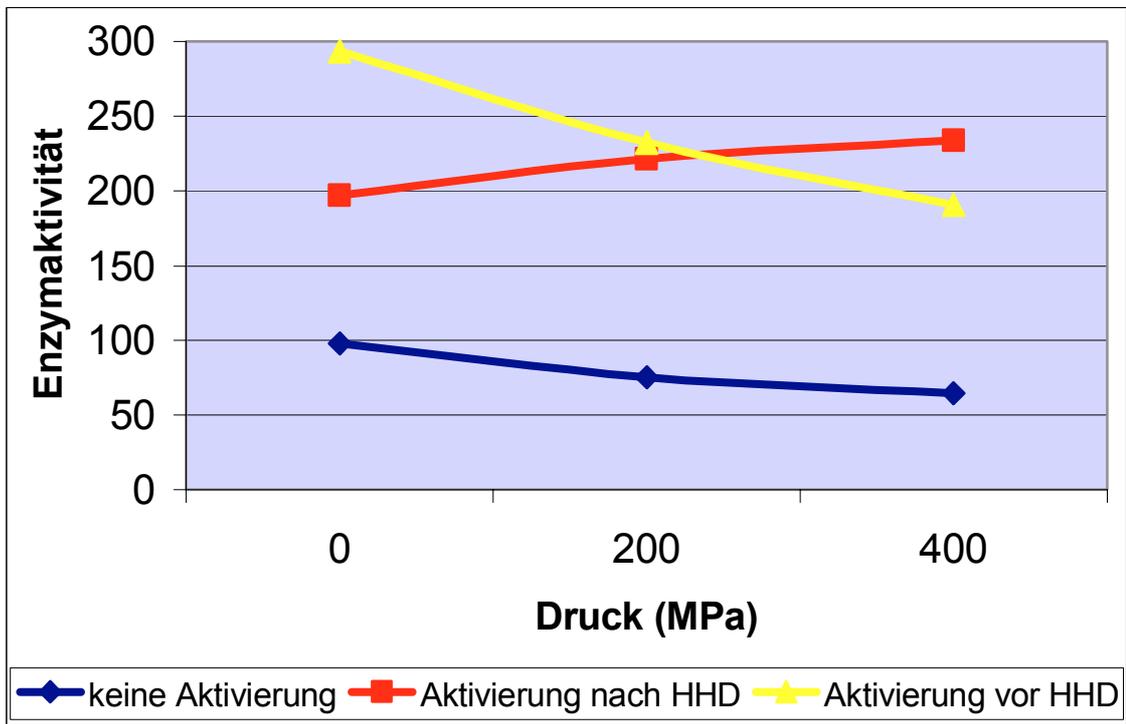


Abb. 12: Isolierte MMP-9 nach HHD – Activity-Assay, 1. Messung

2. Messung

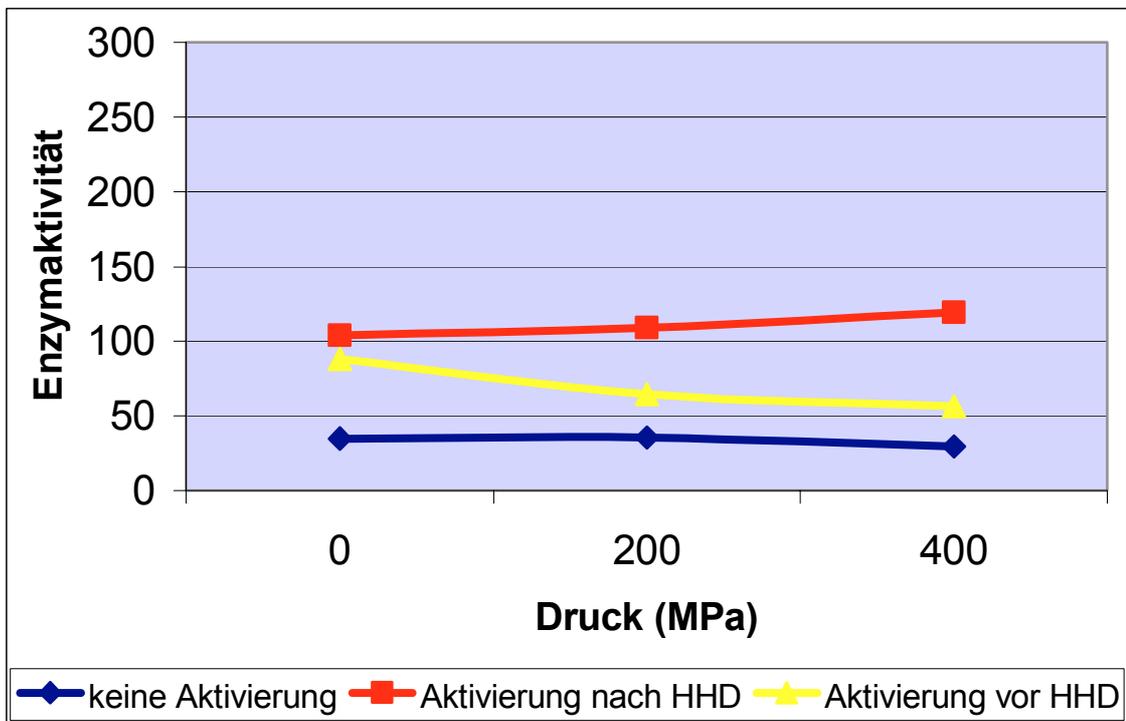


Abb. 13: Isolierte MMP-9 nach HHD – Activity-Assay, 2. Messung

3. Messung

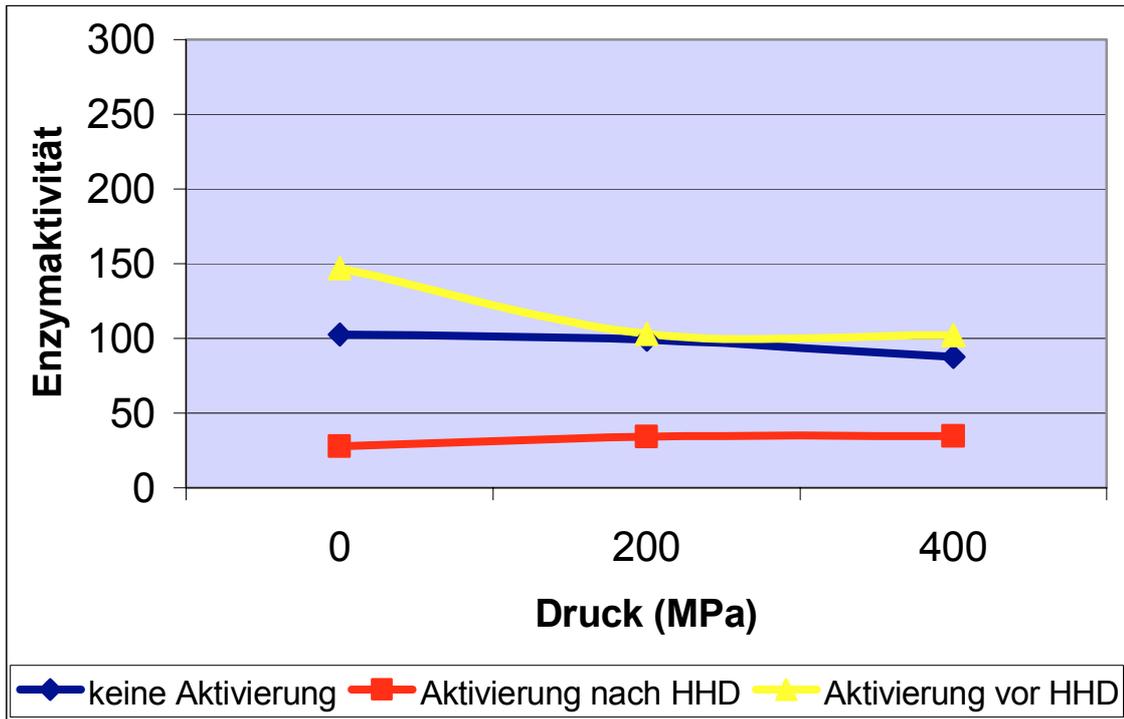


Abb. 14: Isolierte MMP-9 nach HHD – Activity-Assay, 3. Messung

4. Messung

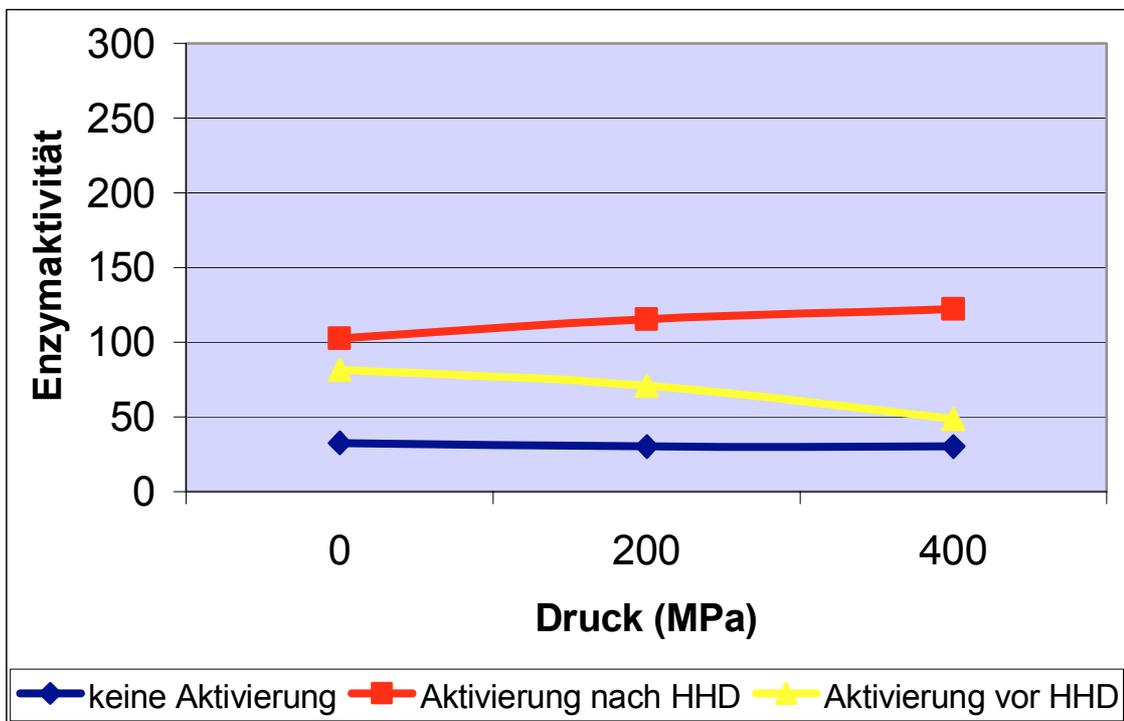


Abb. 15: Isolierte MMP-9 nach HHD – Activity-Assay, 4. Messung

5. Messung

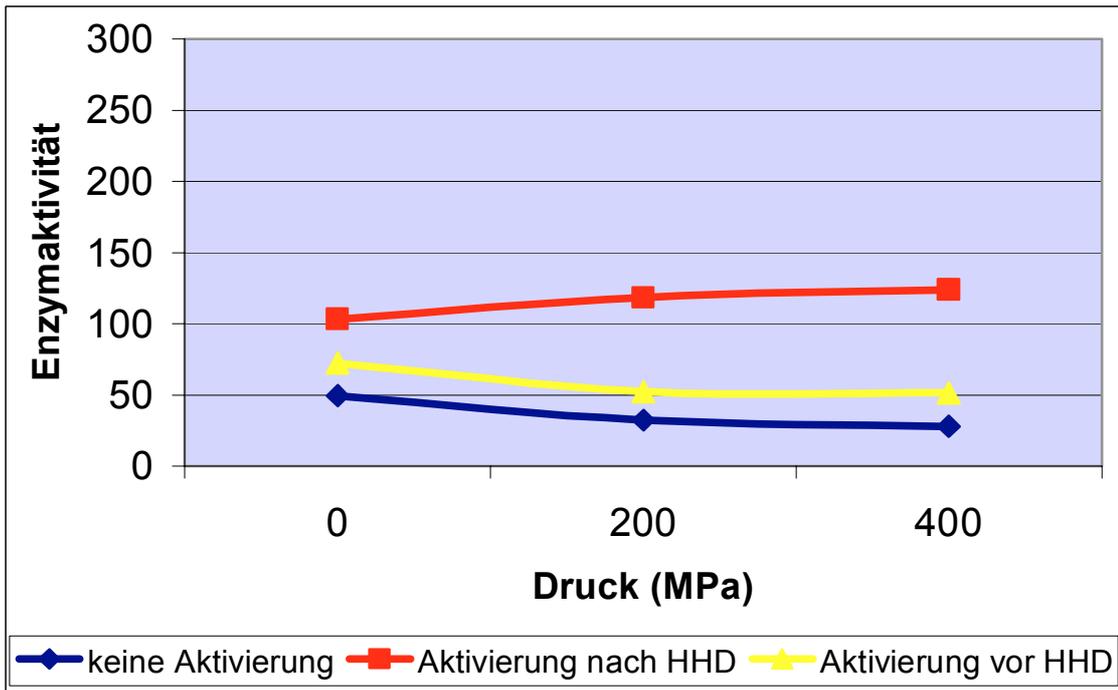


Abb. 16: Isolierte MMP-9 nach HHD – Activity-Assay, 5. Messung

Zusammenfassung „keine Aktivierung“

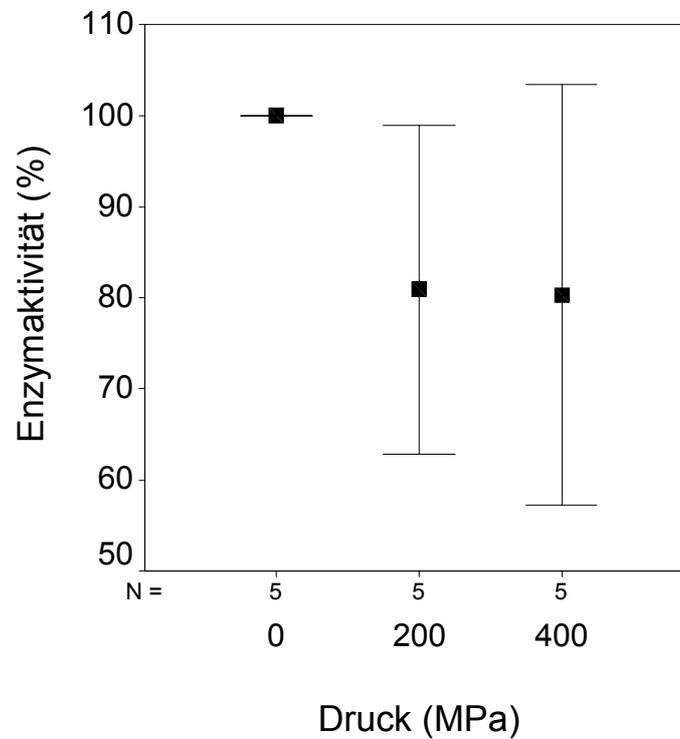


Abb. 17: Isolierte MMP-9 nach HHD – „keine Aktivierung“

Die im Folgenden zusammengefasste Darstellung der Ergebnisse erfolgt über die prozentuale Veränderung der Enzymaktivität, ausgehend von der nicht HHD-behandelten Kontrolle (Wert entspricht 100%). Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und das 95%-Konfidenzintervall.

Bei nicht artifiziell aktivierter isolierter pro-MMP-9 zeigte sich gegenüber der Kontrollgruppe eine geringfügige Verminderung der Enzymaktivität bei 200 MPa im Mittel auf 81%, die statistisch signifikant war ($p = 0,043$). Die ebenfalls geringfügige Verminderung der Aktivität im Mittel auf 80% bei 400 MPa war jedoch nicht statistisch signifikant ($p = 0,077$).

Zusammenfassung „Aktivierung nach HHD“

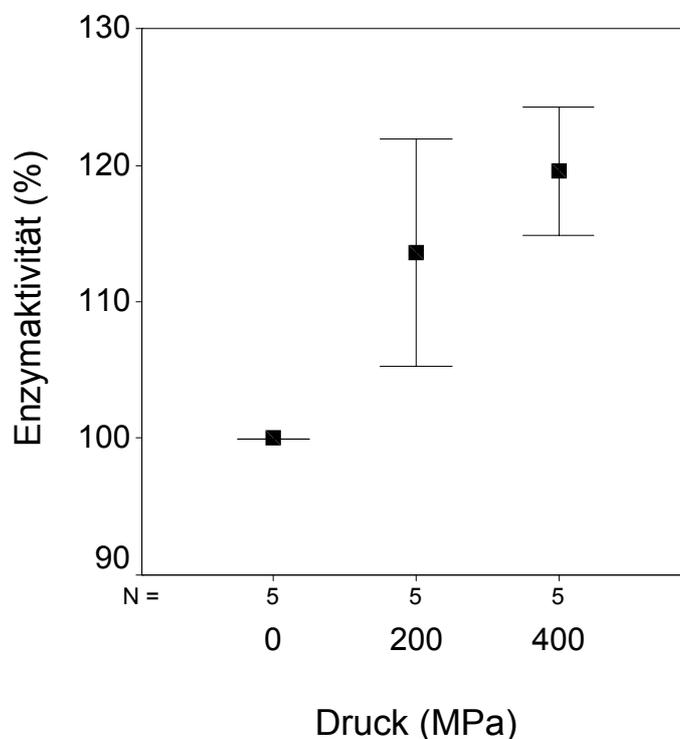


Abb. 18: Isolierte MMP-9 nach HHD – „Aktivierung nach HHD“

Bei nach HHD-Behandlung artifiziell aktivierter isolierter MMP-9 zeigte sich gegenüber der Kontrollgruppe eine im Mittel um 14% erhöhte Enzymaktivität nach 200 MPa ($p = 0,011$). Bei 400 MPa war die Aktivität im Mittel um 20% erhöht ($p < 0,001$). In beiden Fällen war die Erhöhung statistisch signifikant.

Zusammenfassung „Aktivierung vor HHD“

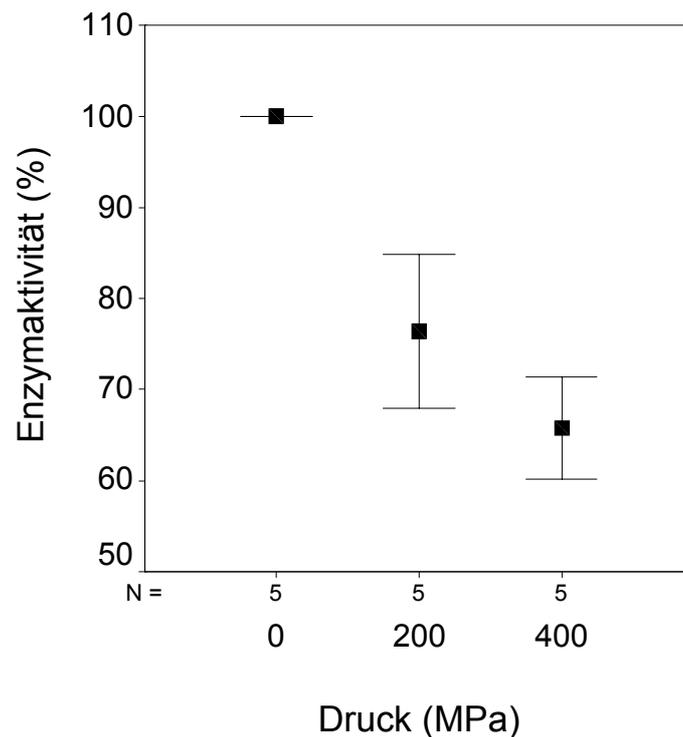


Abb. 19: Isolierte MMP-9 nach HHD – „Aktivierung vor HHD“

Bei vor HHD-Behandlung artifiziell aktivierter isolierter MMP-9 zeigte sich gegenüber der Kontrollgruppe bei 200 MPa eine Aktivitätsverminderung im Mittel auf 76% ($p = 0,002$). Bei 400 MPa war die Aktivität im Mittel auf 66% vermindert ($p < 0,001$). In beiden Fällen war die Verminderung statistisch signifikant.

3.2.4 Rekombinante MMP-9 nach HHD – Activity-Assay

1. Messung

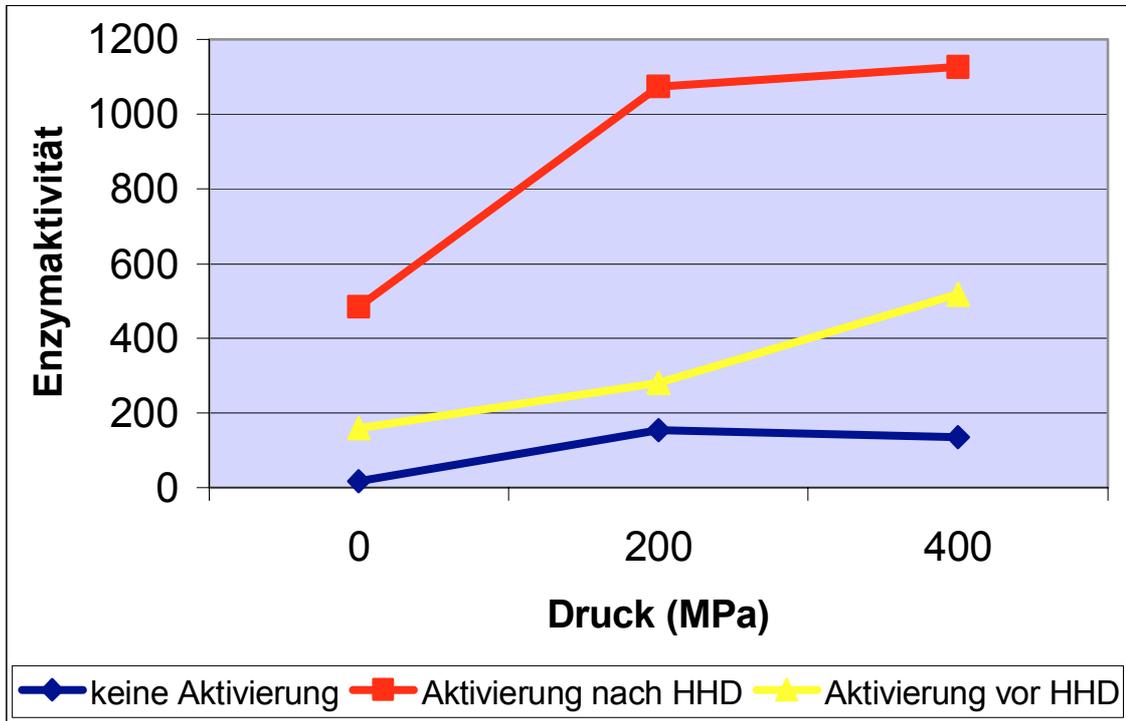


Abb. 20: Rekombinante MMP-9 nach HHD – Activity-Assay, 1. Messung

2. Messung:

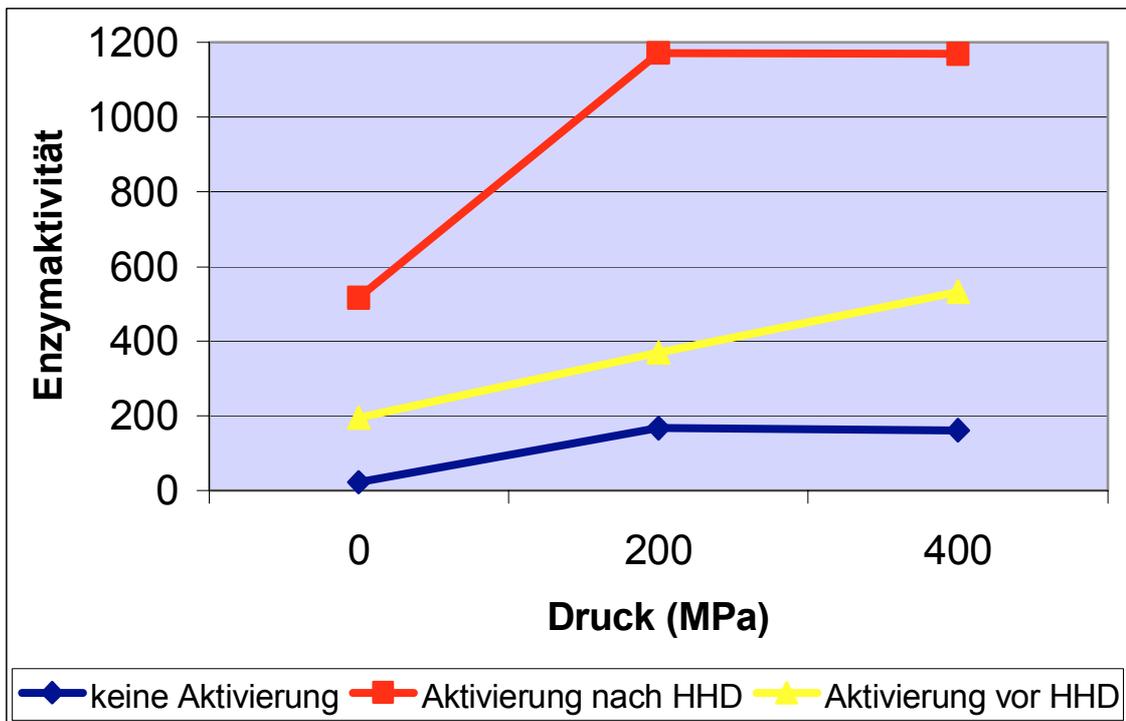


Abb. 21: Rekombinante MMP-9 nach HHD – Activity-Assay, 2. Messung

3. Messung

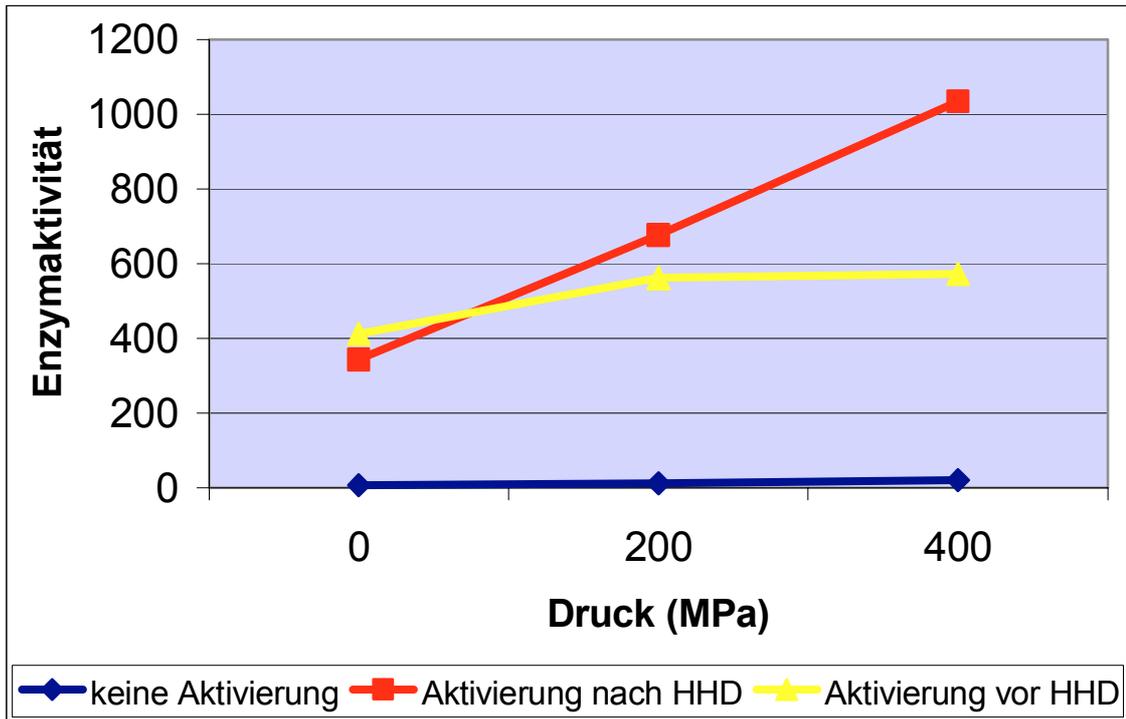


Abb. 22: Rekombinante MMP-9 nach HHD – Activity-Assay, 3. Messung

4. Messung

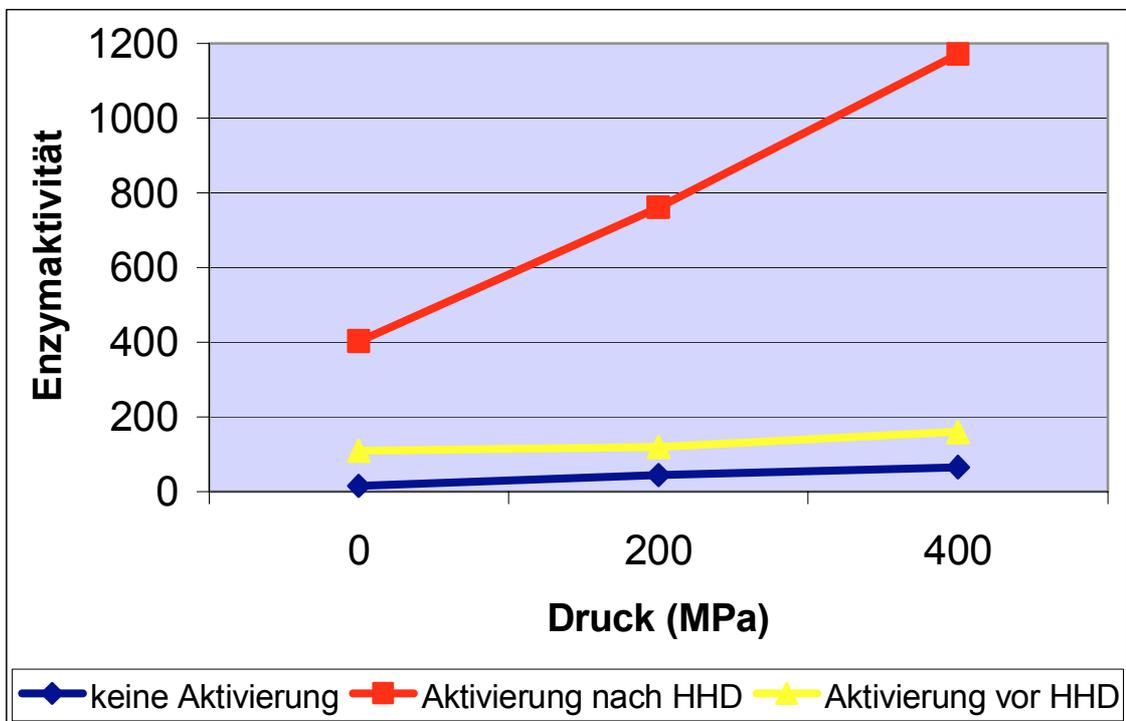


Abb. 23: Rekombinante MMP-9 nach HHD – Activity-Assay, 4. Messung

5. Messung

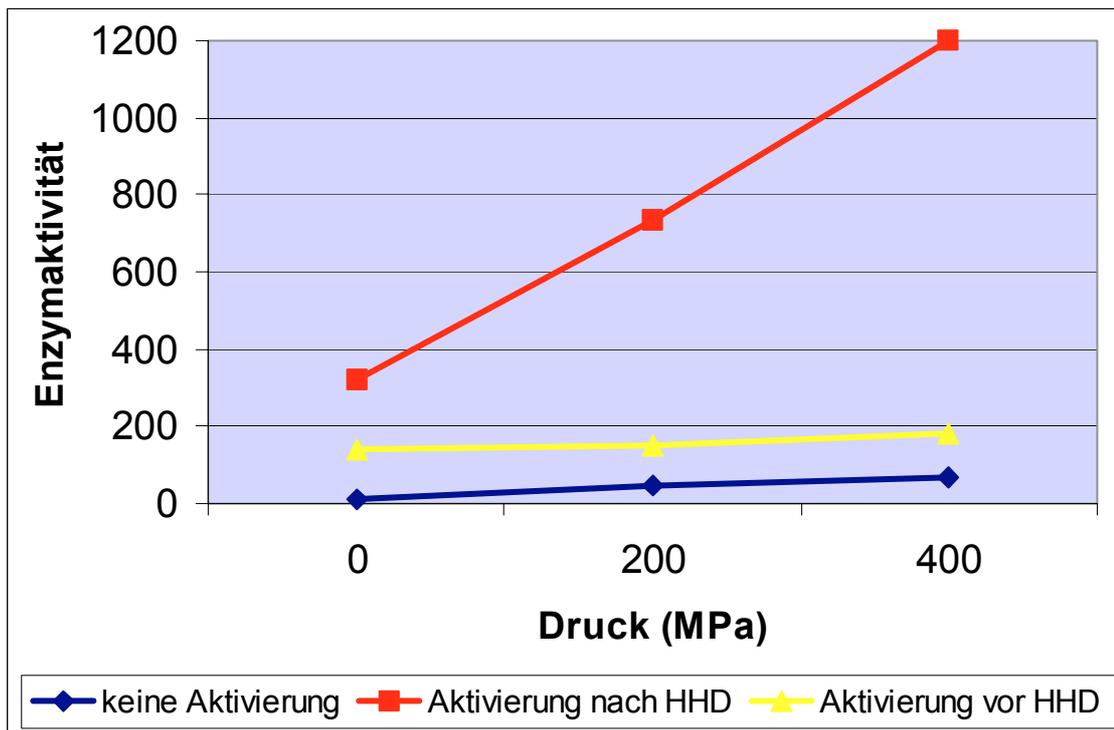


Abb. 24: Rekombinante MMP-9 nach HHD – Activity-Assay, 5. Messung

Zusammenfassung „keine Aktivierung“

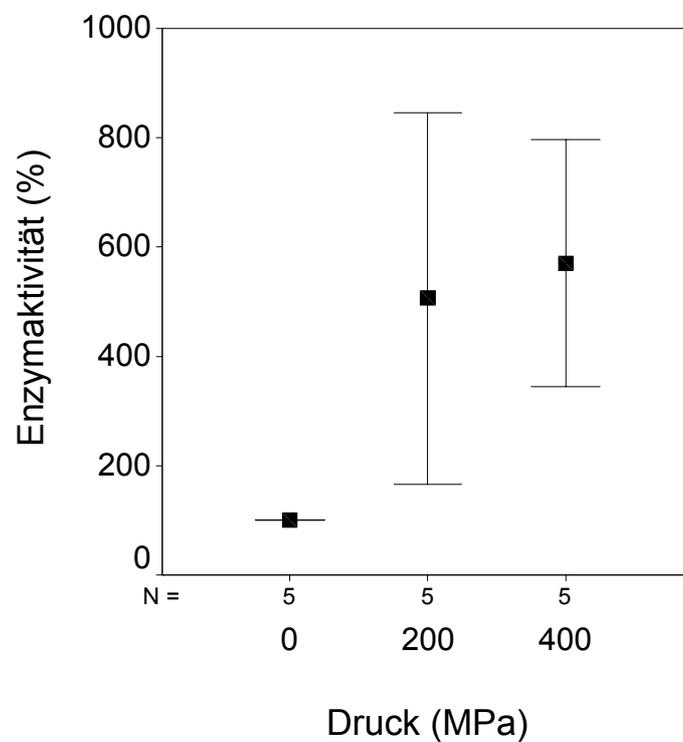


Abb. 25: Rekombinante MMP-9 nach HHD – „keine Aktivierung“

Die im Folgenden zusammengefasste Darstellung der Ergebnisse erfolgt über die prozentuale Veränderung der Enzymaktivität ausgehend von der nicht HHD-behandelten Kontrolle (Wert entspricht 100%). Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und das 95%-Konfidenzintervall.

Bei nicht artifiziell aktivierter rekombinanter pro-MMP-9 zeigte sich gegenüber der Kontrollgruppe eine deutliche Erhöhung der Enzymaktivität bei 200 MPa (Mittelwert 506%, $p = 0,03$) und 400 MPa (Mittelwert 571%, $p = 0,004$). In beiden Fällen war die Aktivitätserhöhung statistisch signifikant.

Zusammenfassung „Aktivierung nach HHD“

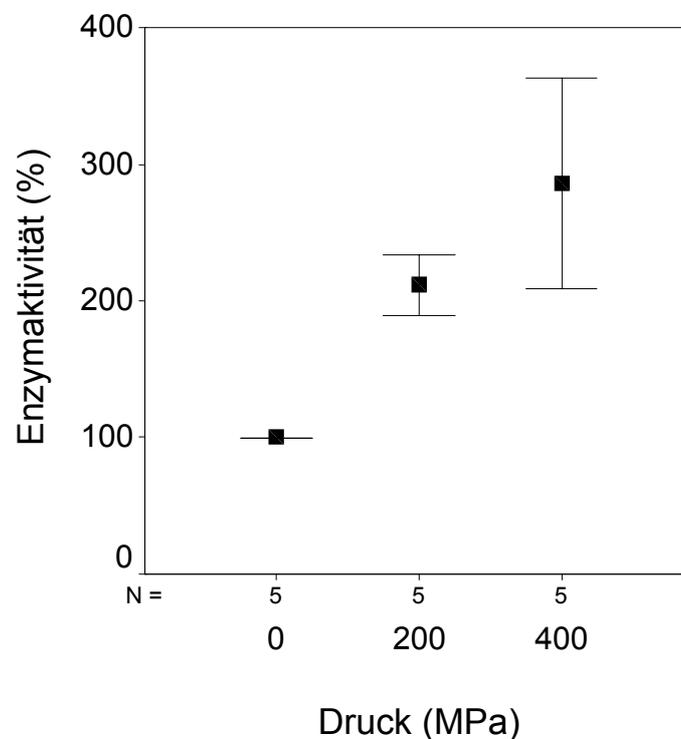


Abb. 26: Rekombinante MMP-9 nach HHD – „Aktivierung nach HHD“

Bei nach HHD-Behandlung artifiziell aktivierter rekombinanter MMP-9 zeigte sich gegenüber der Kontrollgruppe eine Verdoppelung (Mittelwert 212%) der Enzymaktivität bei 200 MPa ($p < 0,001$). Bei 400 MPa war die Aktivität im Mittel um 286% erhöht ($p = 0,003$). In beiden Fällen war die Erhöhung statistisch signifikant.

Zusammenfassung „Aktivierung vor HHD“

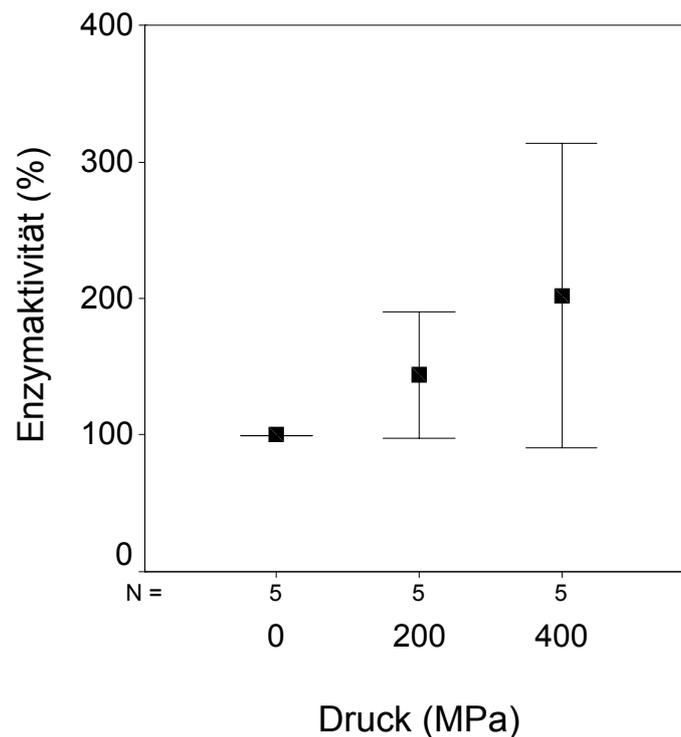


Abb. 27: Rekombinante MMP-9 nach HHD – „Aktivierung vor HHD“

Bei vor HHD-Behandlung artifiziell aktivierter rekombinanter MMP-9 zeigte sich gegenüber der Kontrollgruppe bei 200 MPa eine Aktivitätssteigerung im Mittel um 44% ($p = 0,058$). Bei 400 MPa war die Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe doppelt so hoch (Mittelwert 202%, $p < 0,064$). In beiden Fällen waren die Veränderungen statistisch nicht signifikant.

3.2.5 Isolierte MMP-9 nach HHD – Zymographie

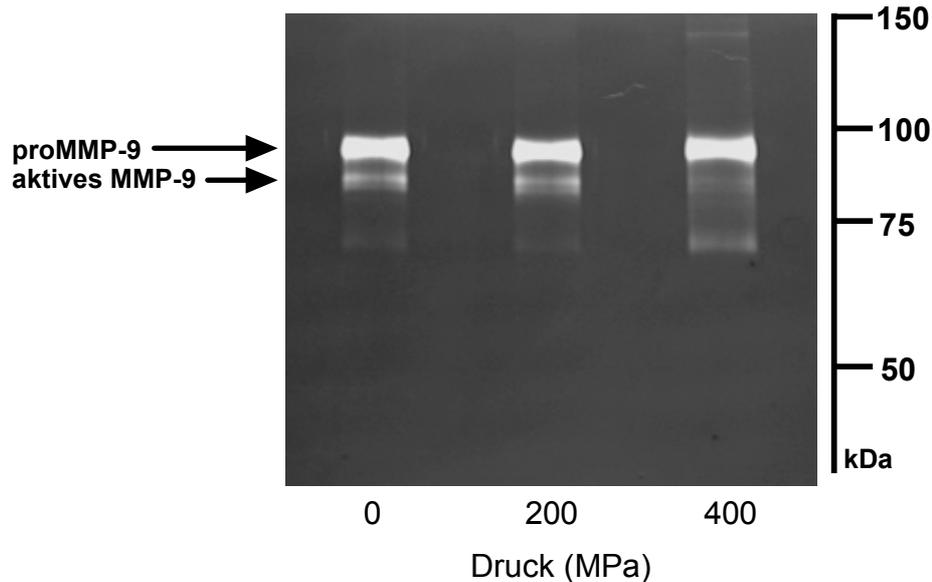


Abb. 28: Isolierte MMP-9 nach HHD – Zymographie

Bei der zymographischen Untersuchung von isolierter MMP-9 fanden sich bei der Kontrollgruppe wie auch nach HHD-Behandlung mit 200 MPa eine starke Bande im Bereich von pro-MMP-9 (92 kDa) sowie eine schwächere Bande im Bereich der aktiven MMP-9 (84 kDa) und eine sehr schwache Bande bei ca. 70 kDa. Nach HHD-Behandlung mit 400 MPa fanden sich ebenfalls eine starke Bande bei 92 kDa, die Bande im Bereich von 84 kDa war jedoch nur schwach erkennbar. Zusätzlich fand sich bei 400 MPa eine schwache Bande von 70 kDa.

3.2.6 Rekombinante MMP-9 nach HHD – Zymographie

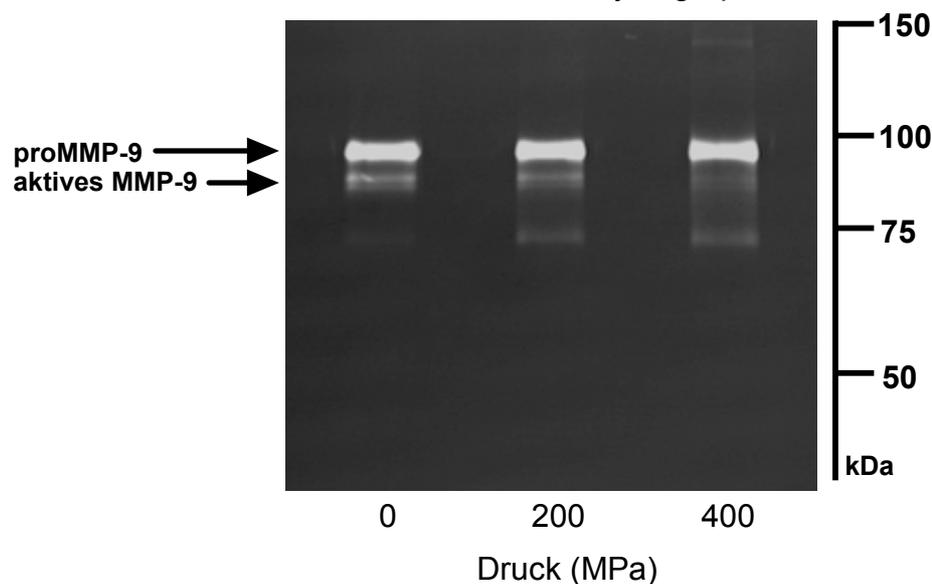


Abb. 29: Rekombinante MMP-9 nach HHD – Zymographie

Bei der zymographischen Untersuchung von rekombinanter MMP-9 fanden sich bei der Kontrollgruppe eine starke Bande im Bereich von pro-MMP-9 (92 kDa) sowie eine schwächere Bande im Bereich von aktiver MMP-9 (84 kDa). Nach HHD-Behandlung mit 200 MPa zeigte sich ebenfalls eine starke Bande bei 92 kDa sowie eine schwache Bande bei 84 kDa. Zusätzlich fand sich eine sehr schwache Bande bei ca. 70 kDa. Nach HHD-Behandlung mit 400 MPa fanden sich ebenfalls eine starke Bande bei 92 kDa und zwei schwache Banden im Bereich von 84 kDa und ca. 70 kDa.

3.3 Zymographischer Nachweis der MMP-9

3.3.1 Pro-MMP-9

(Gel 1)

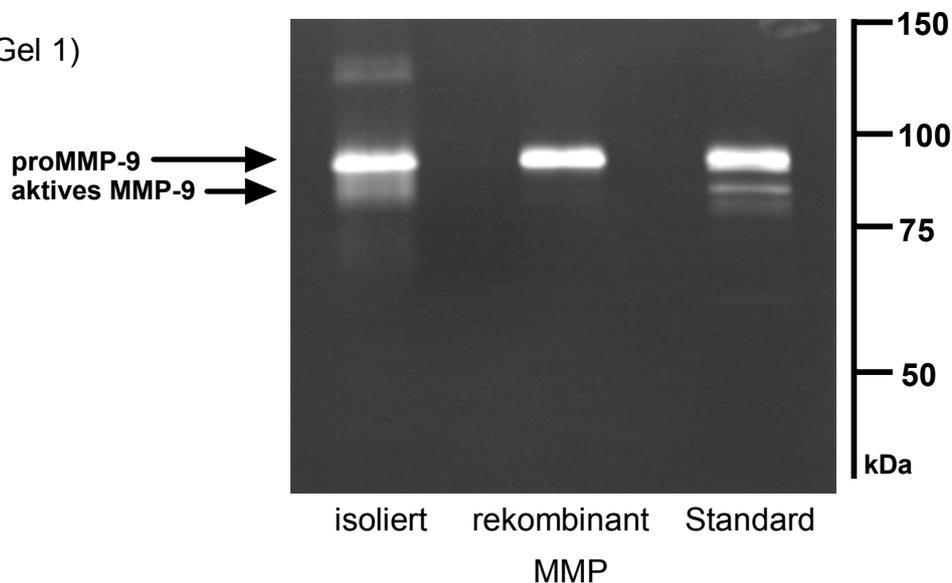


Abb. 30: Pro-MMP-9 – Zymographie

Alle drei MMP-9 zeigten starke Banden im Bereich von pro-MMP-9 (92 kDa). Bei isolierter MMP-9 und Standard-MMP-9 des Assay-Herstellers fand sich außerdem eine schwache Bande im Bereich von aktiver MMP-9 (84 kDa), die bei rekombinanter MMP-9 nicht erkennbar war. Isolierte MMP-9 zeigte eine schwache Bande im Bereich von 120 kDa.

3.3.2 Aktivierte MMP-9

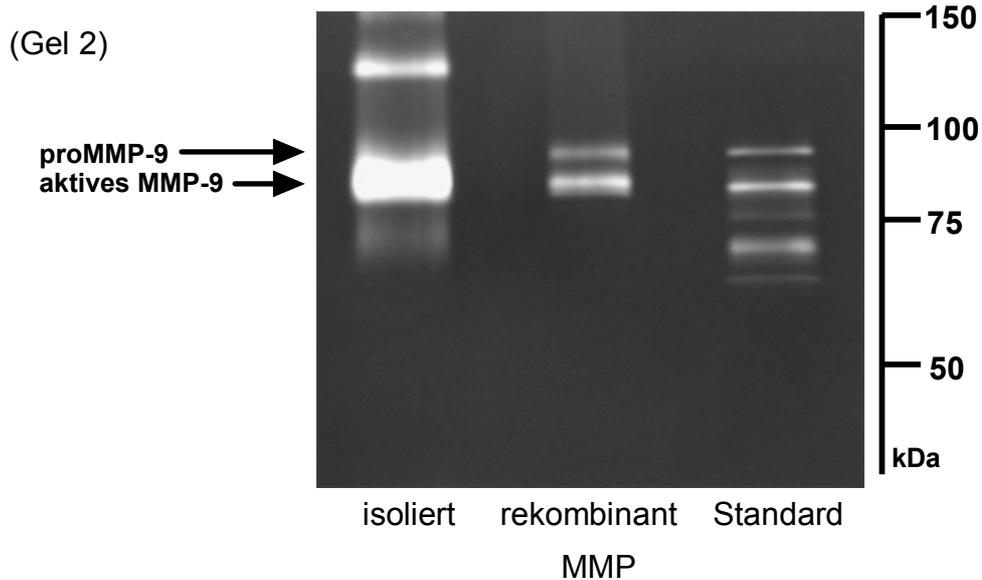


Abb. 31: Aktivierte MMP-9 – Zymographie

Es zeigten sich bei allen drei MMP-9 Banden im Bereich von aktiver MMP-9 (84 kDa). Bei rekombinanter MMP-9 und Standard-MMP-9 des Assay-Herstellers fand sich eine weitere Bande im Bereich von pro-MMP-9 (92 kDa), die bei isolierter MMP-9 nicht eindeutig abgrenzbar war. Standard MMP-9 zeigte eine dritte Bande im Bereich von 70 kDa und isolierte MMP-9 eine schwache Bande im Bereich von 120 kDa.

3.3.3 Pro-MMP-9 und aktivierte MMP-9 inkubiert in EDTA-Puffer

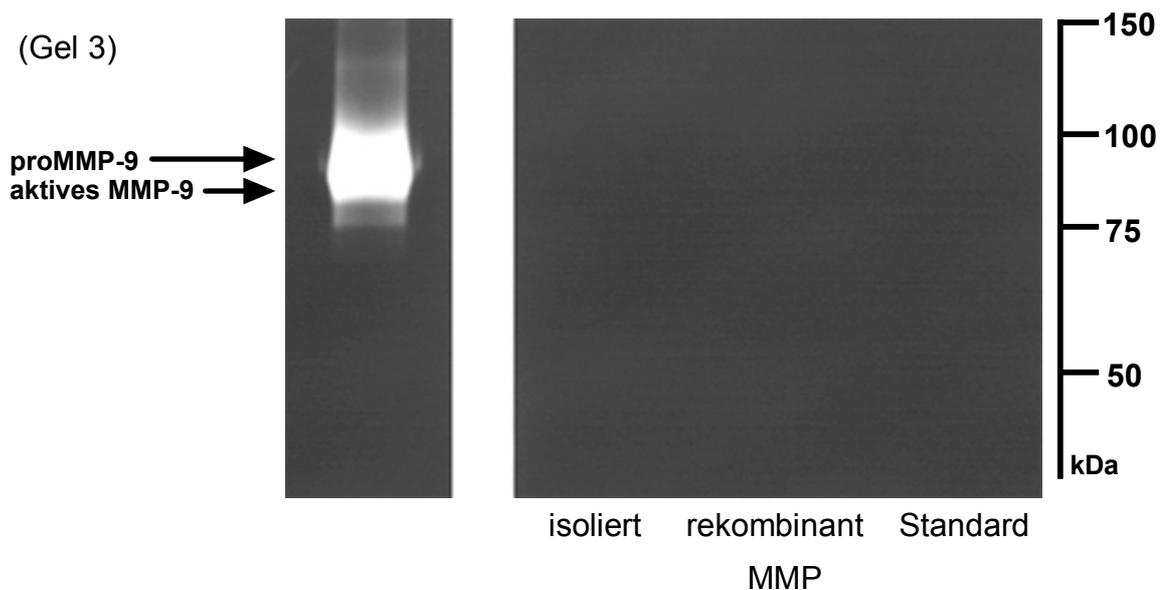


Abb. 32: MMP-9 inkubiert in EDTA-Puffer – Zymographie

Keines der untersuchten MMP-9 ließ sich nach Inkubation in EDTA-Puffer zymographisch nachweisen. Die Positivkontrolle zeigte eine deutlich Bande im Bereich von pro-MMP-9 (92 kDa) und aktivem MMP-9 (84 kDa).

3.3.4 Pro-MMP-9 und aktivierte MMP-9 inkubiert in PMSF-Puffer

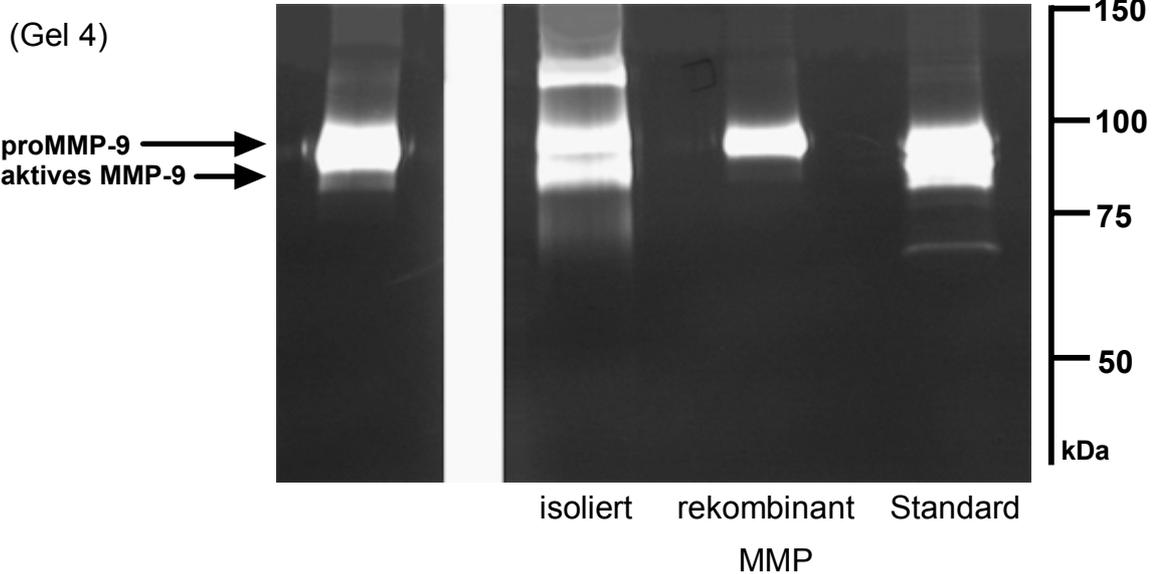


Abb. 33: MMP-9 inkubiert in PMSF-Puffer - Zymographie

Nach Inkubation aller untersuchter MMP-9 in PMSF-Puffer zeigte sich ein ähnliches Bild wie in Gel 1. Es fanden sich bei allen MMP-9 deutliche Banden im Bereich von pro-MMP-9 (92 kDa). Bei isolierter MMP-9 und Standard MMP-9 des Assay-Herstellers zeigte sich auch im Bereich von aktivem MMP-9 (84 kDa) eine Bande.

4. Diskussion

4.1 Rekonstruktion von Knochendefekten

Knochtumoren sind eine Hauptursache für große knöcherne Defekte und stellen ein zentrales Problem in der orthopädischen Versorgung dar. Der bei bösartigen Tumoren erforderliche Sicherheitsabstand bedeutet zusätzlich die Resektion von großen Teilen mechanisch erhaltenen und biologisch gesunden Gewebes.

Zur Rekonstruktion von Knochendefekten sind derzeit im wesentlichen fünf unterschiedliche Verfahren etabliert: Mechanische Endoprothesen, die Distraktionsosteosynthese sowie artifizierlicher, allogener oder autogener Knochenersatz.

Die Versorgung mit großen mechanischen Endoprothesen ist operationstechnisch sehr anspruchsvoll und hat auch bei bester Versorgung meist eine auf maximal 20 Jahre begrenzte Haltbarkeit bzw. Standzeit, was besonders bei jungen Patienten zahlreiche Revisionen erfordert [Horowitz et al.: 1993, 280-286; Mittermayer et al.: 2001, 167-177]. Nicht selten kommt es zu Komplikationen wie Infektionen, aseptischen Prothesenlockerungen und periprothetischen Frakturen [Natarajan et al.: 2003, 334-337]. Bei Kindern ist aufgrund des wachsenden Knochens eine endoprothetische Versorgung noch komplizierter als bei ausgewachsenen Personen.

Die segmentale Unterbrechung der knöchernen Kontinuität kann auch durch eine Distraktionsosteosynthese therapiert werden. Das Verfahren ist sehr langwierig und mit einer hohen Komplikationsrate verbunden [Faber et al.: 1991, 327-332; Hosny et al.: 2003, 303-306].

Die Versorgung mit synthetisch hergestellten artifizierlichen Knochenersatzmitteln (teilweise xenogenen Ursprungs) wie z.B. Kalziumphosphatkeramiken überzeugt durch gute osteokonduktive Eigenschaften und zeigt zufriedenstellende Ergebnisse bei kleinen Defekten [Mittelmeier et al.: 1998, 126-135]. Bei großen knöchernen Substanzverlusten ist die Stabilität jedoch nicht ausreichend [Mittelmeier et al.: 1996, 1087-1092].

Die Versorgung mit Fremdtransplantaten (allogener Knochenersatz) erzielt teilweise gute biologische Ergebnisse. Es besteht aber das Risiko von immunologischen Reaktionen (Transplantatabstoßung) [Hallfeldt et al.: 1992, 313-318] und Erregerübertragung (z.B. Bakterien, HIV oder Hepatitis C) [Simonds et al.: 1992, 726-732; Sutherland et al.: 1997, 215-222]. Sogar die Übertragung von Tumorzellen wurde beschrieben [Palmer et al.: 1999, 333-335]. Durch verschiedene chemische, thermische oder strahlentechnische Sterilisationsverfahren wird das Infektionsrisiko zwar in unterschiedlichem Maße vermindert, kann aber nie ganz ausgeschlossen werden. Ein weiteres Problem der bisher gängigen Sterilisationsverfahren ist die negative Wirkung auf die biologischen und biomechanischen Eigenschaften des Knochens [Sorger et al.: 2001, 66-74] auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

Zahlreiche chemische Sterilisationsverfahren wie z.B. die Behandlung mit Formaldehyd, Alkohol oder Peressigsäure wurden erprobt. Probleme der Substanzen sind die unzureichende Eindringtiefe in den Knochen, die unvollständige mikrobizide Wirkung, potentiell kanzerogene, mutagene oder toxische Nebenwirkungen sowie eine nur begrenzt mögliche Entfernung der Desinfektionslösungen vor der Implantation [Knaepler et al.: 1994, 1052-1057].

Bei thermischen Devitalisierungstechniken lassen sich das Autoklavieren (134 °C unter Dampfdruck) und Verfahren mit niedrigeren Temperaturen (z.B. Lobator-System, Firma Telos, Deutschland [Hofmann et al.: 1996, 498-508]) unterscheiden. Die entkeimende Wirkung beruht auf der Koagulation von Proteinen und der Zerstörung von Nukleinsäuren und zeigt meist gute Ergebnisse [Knaepler et al.: 1992, 477-484], wobei einige Keime wie z.B. Hepatitis-B-Viren gegenüber Temperaturen unter 100 °C resistent sind [Knaepler et al.: 1994, 1052-1057]. Während der Knochen durch Autoklavieren bis zu 85% seiner Stabilität einbüßt sind es bei langsamem Erhitzen auf nur 80 °C immer noch 20% Stabilitätsverlust [Knaepler et al.: 1994, 44-49; Viceconti et al.: 1996, 63-68]. Infolge thermischer Behandlung verschlechtert sich die osteoinduktive Potenz des Knochens, weshalb das Einwachsverhalten allogener thermisch behandelter Transplantate negativ bewertet wird [Zoricic et al.: 2002, 121-128].

Sterilisationsverfahren mittels ionisierender Strahlung (Beta- oder Gammastrahlung) wurden vielfach untersucht und beruhen auf der Zerstörung

von Nukleinsäuren. Um eine sichere Keim- bzw. Tumorzellinaktivierung zu gewährleisten sind sehr hohe Strahlendosen notwendig [Knaepler et al.: 1994, 72-73]. Mit ionisierender Strahlung behandelte Knochensegmente verfügten im Vergleich zu unbehandeltem Knochen über eine deutlich schlechtere biomechanische Stabilität und biologische Potenz [Urist et al.: 1974, 586-593; Sugimoto et al.: 1991, 492-497; Knaepler et al.: 1991, 194-199]. Weiterhin wird die Bildung toxischer Metabolite und freier Radikale mit mutagenen Eigenschaften diskutiert [Knaepler et al.: 1994, 1052-1057].

Autogene Knochentransplantate, also körpereigenes Gewebe, haben die besten biologischen Eigenschaften und erzeugen keine immunologischen Reaktionen wie Transplantatabstoßung oder Allergien. In der Regel wird dabei zur Defektrekonstruktion Knochengewebe an einer anderen Stelle des Körpers entnommen. Davon zu unterscheiden ist die Verwendung des betroffenen Knochensegmentes selbst mit einer orthotopen Reimplantation.

Die Entnahme von Knochen an einer anderen Stelle des Körpers, z.B. Beckenkammpongiosa oder Teile der Fibula, erfordert einen Zweiteingriff und ist aufgrund der begrenzten Substanzmenge nur bis zu einer bestimmten Defektgröße möglich [Rueger: 1998, 72-79]. Außerdem ist ein Zweiteingriff bei einigen Patienten aufgrund des instabilen Allgemeinzustandes gar nicht möglich. Sämtliche zusätzlichen operativen Eingriffe sind mit entsprechenden Risiken und Folgen im Sinne einer Entnahmemorbidität verbunden. Zu nennen sind beispielsweise Blutungen, Thromboembolien, Nervenverletzungen, Schmerzen oder Infektionen [Summers et al.: 1989, 677-680; Banwart et al.: 1995, 1055-1060]. Desweiteren sind die Operationsdauer verlängert und die Kosten erhöht.

Eine autologe Knochentransplantation bei Patienten mit Knochtumoren, also die Resektion des tumorbefallenen Knochensegmentes mit anschließender extrakorporaler Devitalisierung der Tumorzellen und orthotoper Reimplantation, bietet den Vorteil der fehlenden zusätzlichen Entnahmemorbidität, der meistens sehr guten anatomischen Passgenauigkeit und des Verzichts auf Fremdmaterial. Entscheidend für die Einheilung des Transplantats sind, neben der vollständigen Abtötung maligner Tumorzellen, die biomechanischen und biologischen Veränderungen infolge des gewählten Behandlungsverfahrens.

4.2 Extrakorporale Tumordevitalisierung

Bisher wurden klinisch oder experimentell zur extrakorporalen Tumordevitalisierung von Knochen thermische und radioaktive Verfahren untersucht. Beide Techniken bieten den Vorteil der einzeitigen Reimplantation des autologen Knochensegmentes, wirken sich aber negativ auf die biologischen und biomechanischen Eigenschaften des Knochens aus.

Die qualitative osteointegrative Wirkung unterschiedlicher Verfahren zur Abtötung von Knochentumorzellen kann in Bezug auf Osteoinduktion, Osteokonduktion und Osteogenese charakterisiert werden. Osteoinduktion bedeutet die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Vorläuferzellen des Knochen- bzw. Knorpelstoffwechsels und damit Anregung der Osteogenese [Reddi et al.: 1987, 207-212; Albrektsson et al.: 2001, 96-101]. Osteokonduktion beschreibt die Eigenschaft eines Knochenersatzes, als Leitschiene bzw. Grundgerüst für die vom umliegenden Gewebe einwachsenden Knochenzellen zu fungieren [Parikh: 2002, 142-148]. Osteogenese bezeichnet die Neusynthese von Knochenmatrix durch Knochenzellen.

Die in Kap. 4.1 beschriebene Technik des Autoklavierens wurde auch zur Behandlung eines resezierten tumorbefallenen Knochensegmentes angewendet, konnte sich aber aufgrund zahlreicher negativer Veränderungen der Knocheneigenschaften nicht durchsetzen [Sanjay et al.: 1997, 291-297; Bohm et al.: 1998, 57-65]. Wie bereits dargestellt verschlechtern sich die biomechanischen Eigenschaften des Knochens durch Autoklavieren (siehe Seite 53). Auch die osteoinduktiven Eigenschaften von autoklaviertem Knochen sind ungenügend [Asada et al.: 1997, 392-395]. Häufig beschriebene Komplikationen nach Reimplantation von autoklavierten Knochensegmenten sind Frakturen, Pseudarthrosen, Infektionen und Lockerungen des Osteosynthesematerials [Asada et al.: 1997, 392-395; Sanjay et al.: 1997, 291-297].

Ionisierende Strahlung wird seit einigen Jahren vereinzelt zur Behandlung von tumorbefallenen Knochen eingesetzt [Bohm et al.: 2003, 355-365]. Bei klinischen und experimentellen Untersuchungen zeigte sich eine deutliche Verschlechterung der biologischen und biomechanischen Eigenschaften wie z.B. eine Verminderung der mechanischen Stabilität, eine verzögerte

Frakturheilung bzw. Transplantateinheilung und die fehlende aktive Knochenneubildung aufgrund mangelnder osteoinduktiver Eigenschaften infolge der Zerstörung der Bone Morphogenetic Proteins [Urist et al.: 1974, 586-593; Sugimoto et al.: 1991, 492-497; Knaepler et al.: 1991, 194-199; Voggenreiter et al.: 1996, 583-588; Araki et al.: 1999, 196-206; Sys et al.: 2002, 174-178].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die langfristig besten Ergebnisse bei der Versorgung großer knöcherner Defekte mit autologen Knochentransplantaten erzielt werden könnten, indem bei vorliegendem Tumorbefall eine vollständige Inaktivierung von Tumorzellen ohne Verschlechterung der biologischen und biomechanischen Eigenschaften erreicht wird. Der ideale Knochenersatz lässt sich definieren als steril, tumorfrei, nicht toxisch oder immunologisch wirksam, mit hoher biologischer Potenz (osteogen und osteoinduktiv) bzw. körpereigen, mit guter Festigkeit bzw. Stabilität, einfach zu verarbeiten, passgenau, kostengünstig und in ausreichenden Mengen verfügbar. Bisherige Verfahrensweisen erfüllen wie im Vorigen dargestellt jeweils nur einen Teil der genannten Kriterien.

Hydrostatischer Hochdruck könnte aufgrund vielversprechender Ergebnisse experimenteller Untersuchungen ein alternatives Verfahren zur Tumordevitalisierung darstellen.

4.3 Hochdrucktechnologie

Bereits vor 100 Jahren wurde erstmals der Versuch einer Lebensmittelkonservierung mit hydrostatischem Hochdruck (HHD) beschrieben [Hite: 1899, 15-17]. Seit 25 Jahren wird die Forschung besonders in den USA und Japan weiter intensiviert und eine industrielle Nutzung der Hochdrucktechnologie (HHD bis 1000 MPa) zur Inaktivierung von Mikroorganismen in Lebensmitteln ermöglicht. Mittlerweile ist eine Vielzahl HHD-behandelter Lebensmittel, wie Fruchtsäfte, Marmeladen und Fleischprodukte auf dem Markt erhältlich [Watanabe et al.: 1991, 2175-2176; Selman: 1992, 205-209; Cheftel: 1995, 75-90]. Gegenüber der herkömmlichen thermischen Behandlung zur Haltbarmachung von Lebensmitteln (Pasteurisierung) sowie chemischen oder radioaktiven Sterilisierungsverfahren bietet die HHD-Technologie, die auch kalte Sterilisierung bzw. Pascalisation

genannt wird, den Vorteil, dass Farb- und Aromastoffe sowie Vitamine fast gar nicht verändert werden. Somit stellt die Hochdrucktechnologie ein wesentlich schonenderes Verfahren zur Lebensmittelkonservierung und Inaktivierung von Mikroorganismen dar [Mertens: 1993, 100-104; San Martin et al.: 2002, 627-645; Butz et al.: 2003, 233-236]. Eine druckinduzierte Enzyminaktivierung bewirkt außerdem eine verbesserte Lagerstabilität von Aromastoffen [Lambert et al.: 1999, 7-16; Knorr et al.: 2002, 311-318].

Vor fünf Jahren begannen an der Technischen Universität München (Lehrstuhl für Energie- und Umwelttechnik der Lebensmittelindustrie und Klinik für Orthopädie) erstmals Untersuchungen zur möglichen Nutzung der HHD-Technologie im medizinischen und pharmazeutischen Bereich.

Für die erfolgreiche Etablierung der Hochdrucktechnologie in der Medizin ist es zwingend notwendig, neben biomechanischen Veränderungen auch biologische und biochemische Auswirkungen von hydrostatischem Hochdruck zu kennen.

Vorangegangene Untersuchungen haben gezeigt, dass die biomechanischen Eigenschaften von Knochen und Sehnen nach HHD-Therapie weitgehend unverändert sind. Sehnen zeigten bei 200 und 400 MPa keine signifikanten Veränderungen [Diehl et al.: 2004, eingereicht]. Auch spongioser Knochen blieb in seinen biomechanischen Eigenschaften unverändert, ebenso kortikaler Knochen bei 300 MPa. Erst bei 600 MPa zeigte kortikaler Knochen ein um lediglich 15% vermindertes E-Modul [Steinhauser et al.: 2004, eingereicht].

Untersuchungen der HHD-Behandlung von Zellen haben deutliche destruktive Auswirkungen des Drucks gezeigt, wobei eukaryontische Zellen empfindlicher sind als prokaryontische [Hoover et al.: 1989, 99-107]. Sämtliche untersuchte eukaryontische Zelllinien bzw. Tumorzelllinien ließen sich bei Druckstufen zwischen 150 und maximal 350 MPa zerstören bzw. inaktivieren [Yamaguchi et al.: 1997, 257-261; Diehl et al.: 2003, 1851-1855; Diehl et al.: 2004, 369-373]. Dabei scheinen Tumorzellen resistenter zu sein als die zugehörigen nicht entarteten Zellen [Dibb et al.: 1981, 169-176; Diehl et al.: 2003, 1851-1855].

Mikroorganismen zeigen bzgl. ihrer Druckresistenz eine große Variationsbreite. Während die große Mehrheit schon bei niedrigen Druckstufen (30-300 MPa) zerstört bzw. inaktiviert wird, sind Prokaryonten und Sporen

beschrieben, die Drücken bis 800 MPa standhalten [Hauben et al.: 1997, 945-950; Seki et al.: 1998, 853-854]. HHD bewirkt eine Inaktivierung bzw. Zerstörung von Mikroorganismen durch Membranmodifikationen, Inaktivierung von Schlüsselenzymen und Inhibition der Proteinbiosynthese [Abe et al.: 1999, 447-453]. Viren reagieren größtenteils schon auf niedrige Druckstufen von 100-300 MPa sehr sensibel [Silva et al.: 1996, 166-175]. So konnten zahlreiche Viren wie z.B. Herpes Virus oder HIV durch Druck inaktiviert werden, was große Bedeutung für die Knochensterilisierung sowie Impfstoffherstellung haben könnte [Nakagami et al.: 1992, 255-261; Jurkiewicz et al.: 1995, 6935-6937; Nakagami et al.: 1996, 475-476; Meyer-Pittroff: 2003, 295-305]. Bei Bakterien kann die Drucksensibilität über Veränderung der Behandlungsparameter, wie z.B. Temperatursenkung oder pH-Verschiebung, beeinflusst werden [Bartlett: 1992, 479-496]. Bei mehrmalig wiederholtem Druckaufbau konnten Bakterien abgetötet werden, die gegenüber einer einmaligen Druckbehandlung mit der gleichen Druckstufe resistent sind [Vachon et al.: 2002, 345-352; Gollwitzer et al.: 2004, eingereicht].

Nachdem bisher keine Verschlechterung der biomechanischen Eigenschaften durch HHD-Behandlung festgestellt werden konnte, wurden weiterführend die biologischen Auswirkungen von HHD untersucht.

Aufgrund der wichtigen Bedeutung für den physiologischen und pathologischen Knochenstoffwechsel wurde in der vorliegenden Arbeit das Verhalten der Matrixmetalloproteinase-9 nach hydrostatischer Hochdruckbehandlung untersucht.

4.4 Matrixmetalloproteinasen

4.4.1 Matrixmetalloproteinasen allgemein

Matrixmetalloproteinasen (MMP) sind eine Gruppe proteolytischer Enzyme mit großer Variationsbreite, die alle ein Zinkion als aktives Zentrum besitzen. Vor 40 Jahren wurden MMP erstmals beschrieben [Gross et al.: 1962, 1014-1022], mittlerweile sind 25 verschiedene MMP bekannt (siehe Tab. 4) und sehr gut in ihrer biologischen Funktion und biochemischen Struktur untersucht. MMP sind an fast allen proteolytischen Abbauvorgängen der Extrazellulärmatrix beteiligt [Parsons et al.: 1997, 160-166].

Bis vor einigen Jahren wurden die 25 bekannten MMP nach ihrer Spezifität bzgl. Extrazellulärmatrixbestandteilen in Kollagenasen, Gelatinasen, Stromolysine und Matrilysine eingeteilt [McCawley et al.: 2001, 534-540].

Name	Strukturklasse*	gebräuchliche Bezeichnungen
MMP-1	einfache Hemopexindomäne	Kollagenase-1, Gewebskollagenase, Fibroblastenkollagenase
MMP-2	gelatinbindend	Gelatinase A, 72-kDa-Typ-IV-Kollagenase, neutrophile Gelatinase
MMP-3	einfache Hemopexindomäne	Stromelysin-1, Transin-1
MMP-4**	-	-
MMP-5**	-	-
MMP-6**	-	-
MMP-7	minimale Domäne	Matrilysin, Matrin
MMP-8	einfache Hemopexindomäne	Kollagenase-2, neutrophile Kollagenase, Granulozytenkollagenase
MMP-9	gelatinbindend	Gelatinase B, 92-kDa-Typ-IV-Kollagenase
MMP-10	einfache Hemopexindomäne	Stromelysin-2, Transin-2
MMP-11	furinaktiviert sezerniert	Stromelysin-3
MMP-12	einfache Hemopexindomäne	Metalloelastase, Makrophagenelastase
MMP-13	einfache Hemopexindomäne	Kollagenase-3
MMP-14	membranständig	MT1-MMP
MMP-15	membranständig	MT2-MMP
MMP-16	membranständig	MT3-MMP
MMP-17	GPI-gebunden	MT4-MMP
MMP-18*	einfache Hemopexindomäne	Kollagenase-4
MMP-19	einfache Hemopexindomäne	RASI-1
MMP-20	einfache Hemopexindomäne	Enamelysin
MMP-21	vitronektinhaltig	-
MMP-22*	einfache Hemopexindomäne	Hühner-MMP
MMP-23	Typ-2-membranständig	Femalysin, Cysteinangeordnete MMP
MMP-24	membranständig	MT5-MMP
MMP-25	GPI-gebunden	MT6-MMP
MMP-26	minimale Domäne	Endometase, Matrilysin-2
MMP-27	einfache Hemopexindomäne	-
MMP-28	furinaktiviert sezerniert	Epilysin

Tab. 4: Familie der Matrixmetalloproteinasen

*zur Einteilung der Strukturklassen siehe Abb. 34, **MMP-4, MMP-5 und MMP-6 wurden anfangs als neue MMP beschrieben und haben sich später als identisch mit MMP-2 bzw. MMP-3 herausgestellt, *von MMP-18 und MMP-22 sind bisher keine humanen Homologe bekannt

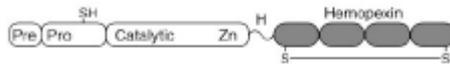
Heute ist eine Einteilung in acht Gruppen mit unterschiedlicher biochemischer Struktur üblich. Fünf Gruppen beinhalten frei sezernierte MMP, während es sich bei den übrigen drei Gruppen um membrangebundene MMP handelt (siehe Abb. 34) [Sternlicht et al.: 2001, 463-516].

A) Minimal Domain MMPs (MMP7/matrilysin, MMP26/endomtease)



B) Simple Hemopexin Domain-Containing MMPs

(MMP1/collagenase-1, MMP8/collagenase-2, MMP13/collagenase-3, MMP18/collagenase-4, MMP3/stromelysin-1, MMP10/stromelysin-2, MMP27, MMP12/metalloelastase, MMP19/RASI-1, MMP20/enamelysin, MMP22/CMP)



C) Gelatin-binding MMPs (MMP2/gelatinase A, MMP9/gelatinase B)

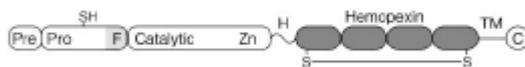


D) Furin-activated Secreted MMPs (MMP11/stromelysin-3, MMP28/epilysin)

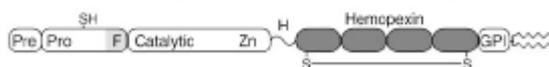


E) Transmembrane MMPs

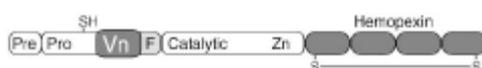
(MMP14/MT1-MMP, MMP15/MT2-MMP, MMP16/MT3-MMP, MMP24/MT5-MMP)



F) GPI-linked MMPs (MMP17/MT4-MMP, MMP25/MT6-MMP)



G) Vitronectin-like Insert Linker-less MMPs (MMP21/XMMP)



H) Cysteine/Proline-Rich IL-1 Receptor-like Domain MMPs (MMP23)



Abb. 34: Proteinstruktur der Matrixmetalloproteinasen [Sternlicht et al.: 2001, 463-516]

MMP bestehen alle aus der gleichen Grundstruktur. Eine Prä-Domäne dient als Signalfrequenz und ist verbunden mit der Pro-Domäne. Die Pro-Domäne besitzt eine freie SH-Gruppe als Liganden für das Zinkion des katalytischen Zentrums. Weitere Domänen, wie Hemopexin-, Vitronectin-, Fibronectin-, Transmembran-, Glycophosphatidyl-Inositol- oder Cystein-Prolin-Domäne sind charakteristisch bei einigen MMP-Untergruppen vorhanden [Woessner et al.: 2000, 50-63; Sternlicht et al.: 2001, 463-516]. MMP werden als inaktive Zymogene (pro-MMP) synthetisiert. Durch Interaktion der Pro-Peptiddomäne mit dem Zinkion im katalytischen Zentrum wird die Inaktivität aufrechterhalten, weshalb eine Aktivierung der MMP die Abspaltung der Pro-Peptiddomäne erfordert [Sternlicht et al.: 2001, 463-516].

MMP werden physiologisch bei zahlreichen mit Abbau von Extrazellulärmatrix verbundenen Stoffwechselfvorgängen wie Embryogenese bzw. Organentwicklung [Brenner et al.: 1989, 848-859], Schwangerschaft [Weeks et

al.: 1976, 205-214], Knochenaufbau und -abbau [Delaisse et al.: 1988, 264-276] sowie Wundheilung [Armstrong et al.: 2002, 12-18] exprimiert.

Eine Überexpression bzw. Aktivitätssteigerung findet sich bei zahlreichen pathologischen Prozessen wie Arthritiden [Masuhara et al.: 2000, 92-96] bzw. rheumatoider Arthritis [Itoh et al.: 2002, 2643-2647], Peridontitis [Birkedal-Hansen: 1993, 474-484], neuroinflammatorische Erkrankungen wie Multiple Sklerose oder Guillain-Barré-Syndrom [Rosenberg: 2002, 586-595], Keratokonjunktivitis [Abu El-Asrar et al.: 2001, 1505-1511] sowie Intimahyperplasie, Artherosklerose und Aneurysmabildung [Luttun et al.: 2001, 124-132]. Besonders bedeutsam – auch für die vorliegende Arbeit – ist die Beteiligung von MMP an Tumorerkrankungen [Stetler-Stevenson et al.: 1993, 1434-1441; Duffy et al.: 1998, 1343-1348]. MMP ermöglichen zum einen direkt, über den Abbau von Extrazellulärmatrix, Tumordinvasion, Tumorneoangiogenese und Metastasierung [Deryugina et al.: 1997, 3201-3210; John et al.: 2001, 14-23], wirken aber zum anderen auch indirekt bei Tumorstadium (z.B. durch Spaltung von IGF-BP), Tumordinvasion (z.B. durch Aktivierung von TGF-beta) und Tumorneoangiogenese (durch Erhöhung des proangiogenetischen Faktors VEGF) mit [Martin et al.: 1999, 881-892; Bergers et al.: 2000, 737-744; Yu et al.: 2000, 163-176].

Die Auflösung der Extrazellulärmatrix ermöglicht ein Einwandern von Endothelzellen, physiologisch im Rahmen der Angiogenese und pathologisch bei der Tumorneoangiogenese [Seandel et al.: 2001, 2323-2332].

Wie bereits erwähnt sind für MMP neben der Wirkung auf die Extrazellulärmatrix auch wichtige Funktionen bzgl. der Zell-Zell-Interaktion und ein Einfluss auf Wachstumsfaktoren und andere Signalmoleküle beschrieben. Da Zellen Rezeptoren für Komponenten der Extrazellulärmatrix (z.B. Integrine) besitzen, führt eine Auflösung der Matrix auch zu Signal- und Funktionsveränderungen in der Zelle [Streuli: 1999, 634-640], weshalb MMP indirekt die Zellfunktion beeinflussen. MMP sind an der Freisetzung von Vorstufen zahlreicher Wachstumsfaktoren wie FGF, TGF-alpha und -beta beteiligt, entweder durch direkte Interaktion mit dem Wachstumsfaktor oder indirekt über durch MMP freigesetzte Matrixbestandteile [Levi et al.: 1996, 7069-7074; Peschon et al.: 1998, 1281-1284; Bergers et al.: 2000, 737-744].

Es sind verschiedene Mechanismen zur Regulation der MMP-Aktivität bekannt. Möglichkeiten sind die Beeinflussung von Transkription, proteolytischer Aktivität oder die Ausschüttung aus Speichervesikeln.

Bei der transkriptionellen Regulation von MMP spielen verschiedene Faktoren wie Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone sowie die Interaktion mit Extrazellulärmatrix oder Tumorzellen eine wichtige Rolle. Die Enzymsekretion oder Enzymintegration in die Zellmembran erfolgt nur auf adäquate Reize bzw. zytokingesteuerte Regulation der Transkription hin und dann fast immer als inaktive Proform, die extrazellulär aktiviert werden muss [Birkedal-Hansen: 1993, 500-510; Uchida et al.: 2000, 207-214].

Die extrazelluläre Aktivierung erfolgt durch Serinproteasen [Okumura et al.: 1997, 181-184], Wachstumsfaktoren und Zytokine wie z.B. Interleukin-6 [Kossakowska et al.: 1999, 2080-2089]. Weiterhin sind einige aktive MMP in der Lage, MMP-Proformen proteolytisch zu aktivieren [Murphy et al.: 1999, 38-44]. Beispielsweise wird pro-MMP-9 proteolytisch durch aktives MMP-13 aktiviert [Knauper et al.: 1997, 369-373].

Membrangebundene MMP können auch intrazellulär durch spezielle Serinproteasen aktiviert werden, bevor sie die Zelloberfläche erreichen [Sternlicht et al.: 2001, 463-516]. Zahlreiche Proteine der Zelloberfläche können über Integrine auch freie MMP an die Zellmembran binden und so die Enzymaktivität beeinflussen.

Es existieren mehrere vornehmlich endogene Inhibitoren für MMP. Alpha-2-Makroglobulin komplexiert mit MMP, woraufhin der Komplex durch Endozytose irreversibel zerstört wird [Sottrup-Jensen: 1989, 11539-11542]. Spezifische Inhibitoren, sogenannte Tissue Inhibitors of Matrixmetalloproteinases (TIMP), blockieren reversibel das katalytische Zentrum der MMP durch nicht-kovalente Bindung im Verhältnis 1:1 [Gomez et al.: 1997, 111-122]. Meist produziert die gleiche Zelle, die MMP ausschüttet auch den dazugehörigen Inhibitor [Russell et al.: 2002, 602-609].

Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmals die HHD-induzierten Veränderungen der Matrixmetalloproteinase-9 als komplexes und für den physiologischen und pathologischen Knochenstoffwechsel elementares Enzym.

4.4.2 Matrixmetalloproteinase-9

Die Erstbeschreibung einer später als Gelatinase B bzw. MMP-9 bekannten Gelatinase, die aus menschlichen Leukozyten gewonnen wurde, stammt aus dem Jahre 1974 [Sopata et al.: 1974, 510-523]. 1983 erfolgte die Isolierung und Charakterisierung von MMP-9 [Rantala-Ryhanen et al.: 1983, 129-137] und 1989 bzw. 1991 die DNA-Sequenzierung und Strukturbeschreibung [Wilhelm et al.: 1989, 17213-17221; Huhtala et al.: 1991, 16485-16490].

<u>Substrat</u>	<u>Produkt</u>	<u>Quelle</u>
1. Proteine der Extrazellulärmatrix:		
Aggrecan	Spaltprodukt	[Fosang et al.: 1992, 19470-19474]
Elastin	Spaltprodukt	[Katsuda et al.: 1994, 1208-1218]
Fibrillin	Spaltprodukt	[Ashworth et al.: 1999, 171-181]
Gelatin I	Spaltprodukt	[Davis et al.: 1990, 1113-1120]
Kollagen III	Spaltprodukt	[Murphy et al.: 1995, 470-484]
Kollagen IV	Spaltprodukt	[Allan et al.: 1995, 299-306]
Kollagen V	Spaltprodukt	[Mainardi et al.: 1980, 1108-1115]
Kollagen XI	Spaltprodukt	[Murphy: 1995, 55-60]
Kollagen XIV	Spaltprodukt	[Sires et al.: 1995, 1062-1067]
Laminin	Spaltprodukt	[Allan et al.: 1995, 299-306]
Myelin Basisprotein	Spaltprodukt	[Proost et al.: 1993, 1175-1181]
Osteonektin	Spaltprodukt	[Sternlicht et al.: 2001, 463-516]
Vitronektin	Spaltprodukt	[Imai et al.: 1995, 249-251]
2. Enzyme:		
alpha-1-Proteinaseinhibitor	inaktives Spaltprodukt	[Liu et al.: 2000, 647-655]
alpha-2-Makroglobulin	Komplex zur Endozytose	[Arbelaez et al.: 1997, 62-68]
C1-Esteraseinhibitor	inaktives Enzym	[Knauper et al.: 1991, 99-102]
Fibrinogen	Spaltprodukt	[Sternlicht et al.: 2001, 463-516]
Plasminogen	Angiostatin	[Patterson et al.: 1997, 28823-28825]
pro-MMP-9	MMP-9	[Triebel et al.: 1992, 280-284]
Substanz P	inaktives Spaltprodukt	[Backstrom et al.: 1995, 1312-1318]
3. Zytokine und Wachstumsfaktoren:		
pro-Interleukin-1-beta	Interleukin-1-beta	[Schonbeck et al.: 1998, 3340-3346]
Interleukin-2	Abspaltung von Zelle	[Sheu et al.: 2001, 237-242]
TGF-beta-binding protein-1	Freisetzung von TGF-beta	[Dallas et al.: 2002, 21352-21360]
pro-TNF-alpha	TNF-alpha	[Gearing et al.: 1995, 774-777]
VEGF	Freisetzung	[Bergers et al.: 2000, 737-744]

Tab. 5: Substrate der Matrixmetalloproteinase-9

MMP-9 ist mit einem Molekulargewicht von 92 kDa die größte Matrixmetalloproteinase und beinhaltet drei Fibronectin-Domänen sowie eine Kollagen-Typ-V-Domäne [Collier et al.: 1992, 6776-6781]. Bezüglich Vorkommen und Anzahl unterschiedlicher Substrate (siehe Tab. 5) kann MMP-9 als die wichtigste Metalloproteinase bezeichnet werden.

MMP-9 wird vor allem in Zellen des Knochenstoffwechsels wie Osteoklasten [Reponen et al.: 1994, 1091-1102; Tezuka et al.: 1994, 15006-15009] und Osteoblasten [Meikle et al.: 1992, 1093-1099; Rifas et al.: 1994, 213-221] exprimiert, ist aber auch in Makrophagen, Trophoblasten sowie an Wundrändern in Keratinozyten nachweisbar. MMP-9 gilt als Schlüsselenzym bei Knochensynthese bzw. –remodeling [Wucherpfennig et al.: 1994, 549-556; Engsig et al.: 2000, 879-889; Ortega et al.: 2003, 109-116]. Beispielsweise zeigen Mäuse mit fehlendem MMP-9-Gen ein abnormales Skelettwachstum sowie eine deutlich verzögerte Angiogenese, Ossifikation und Apoptose [Vu et al.: 1998, 411-422].

MMP-9 ist in zahlreichen Osteosarkomzelllinien [Himmelstein et al.: 1998, 471-474] und Osteoklastomen [Rao et al.: 1997, 400-409] überexprimiert. Bei Riesenzelltumoren wird vermehrt MMP-9 aus Osteoklasten freigesetzt, wodurch es zu lokalen Osteolysen kommt [Ueda et al.: 1996, 611-622]. Weiterhin findet sich bei Chondrosarkomen eine erhöhte MMP-9-Expression [Kawashima et al.: 1997, 129-137]. MMP-9 ist bei metastasierenden Prozessen maßgeblich an der Auflösung von Extrazellulärmatrix beteiligt [Kawashima et al.: 1994, 547-552; Kido et al.: 1999, 209-216]. MMP-9 bindet über CD44 an die Zelloberfläche, und ermöglicht so Tumorinvasion und Angiogenese [Yu et al.: 1999, 35-48]. Aufgrund der beschriebenen pathologischen Prozesse, die allesamt mit einer deutlichen Erhöhung der MMP-9-Konzentration einhergehen, ist es wichtig, das Verhalten von MMP-9 nach HHD-Behandlung von Knochentumorsegmenten zu kennen.

Die Regulation der MMP-9-Konzentration bzw. –aktivität ist sehr komplex. Die inaktive Proform von MMP-9 wird aktiviert durch MMP-2 [Fridman et al.: 1995, 2548-2555] und MMP-3 [Ogata et al.: 1992, 3581-3584], MMP-13 [Knauper et al.: 1997, 369-373], membranständige MMP (besonders MMP-14), Plasmin, Kallikrein, Kathepsin G, Trypsin und alpha-Chymotrypsin [Okada et al.: 1992, 21712-21719; Murphy et al.: 1995, 470-484] sowie durch Zell-Zell-Kontakt

[Lacraz et al.: 1994, 22027-22033]. Interleukin-1 und Interleukin-6 (IL 1 > IL 6) steigern die MMP-9-Konzentration während ossären Resorptionsvorgängen [Kusano et al.: 1998, 1338-1345]. Thrombin führt zu einer gesteigerten MMP-9-Sekretion [Vliagoftis: 2002, 4551-4558]. Auch eine Autoaktivierung von pro-MMP-9 durch aktives MMP-9 findet unter bestimmten Bedingungen statt [Triebel et al.: 1992, 280-284]. Die wichtigsten Zytokine zur Aktivierung des MMP-9-gesteuerten Abbaus von Extrazellulärmatrix sind TNF-alpha und Interleukin-1 [Saren et al.: 1996, 4159-4165; Rao et al.: 1999, 1207-1217; Rao et al.: 1999, 291-300].

Aktives MMP-9 wird inhibiert durch unspezifische MMP-Inhibitoren wie alpha-2-Makroglobulin, durch Bisphosphonate [Teronen et al.: 1999, 453-465], Interleukin-4 und Interleukin-10 sowie bestimmte Interferone [Wahl et al.: 1993, 467-473; Van den Steen et al.: 2002, 375-536] durch sämtliche Tissue Inhibitors of Matrixmetalloproteinases, aber besonders TIMP-1. TIMP-1 bindet im Verhältnis 1:1 an MMP-9 und reguliert über eine Blockade des aktiven Zentrums die proteolytische Aktivität [Goldberg et al.: 1992, 4583-4591]. Weiterhin ist aus der pharmakologischen Forschung ein selektiver Gelatinaseinhibitor (MMP-2 und MMP-9) bekannt [Koivunen et al.: 1999, 768-774].

MMP-9 ist neben MMP-8 die einzige intrazellulär gespeicherte MMP [Takagi: 1996, 3-29]. Schon während der Zellentwicklung von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten wird MMP-9 in größerer Menge synthetisiert und in intrazellulären Granula gespeichert [Woessner, Jr.: 1991, 2145-2154; Birkedal-Hansen et al.: 1993, 197-250]. Die Freisetzung findet auf granulaspezifische Reize hin durch Degranulation, Membranfusion und Exozytose in den extrazellulären Raum statt [Bainton et al.: 1971, 907-934]. So kann die MMP-9-Sekretion im Vergleich zur konstanten Basissekretion innerhalb von nur einer Stunde 100fach gesteigert werden. Sollte die MMP-9-Freisetzung aufgrund der HHD-Behandlung von reseziertem Knochenmaterial zunehmen, könnte dies nach der Reimplantation zur autolytischen Knochenresorption führen und so ein Einwachsen des Implantats behindern.

4.5 Diskussion der Ergebnisse

Nach ersten Untersuchungen der verwendeten isolierten und rekombinanten Matrixmetalloproteinase-9 zeigten sich im Vergleich zur Standardkurve des Activity-Assays sehr niedrige Aktivitätswerte. Daher musste zunächst ein geeigneter Enzympuffer gefunden werden, der eine zuverlässige und vollständige MMP-9-Bestimmung ermöglicht. In Kooperation mit dem Hersteller des Activity-Assays (Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg, Deutschland) wurden verschiedene Puffer untersucht (siehe Abb. 8 und 9) und schließlich eine Zusammensetzung gewählt, die Dimerbildung, Autoaktivierung bzw. Proteolyse und eine Adhäsion des Enzyms an die Probengefäße minimiert.

Durch die in der vorliegenden Arbeit unterschiedlich behandelte MMP-9 konnten im Activity-Assay drei verschiedene Untersuchungsergebnisse erzielt werden. Es wurden jeweils drei Enzymproben HHD-behandelt, wobei eine Probe gar nicht artifiziell mit p-Aminophenylmercuric acid (APMA) aktiviert worden ist (1.), eine Probe nach HHD-Behandlung (2.) und eine Probe vor HHD-Behandlung artifiziell mit APMA aktiviert worden ist (3.). Das bedeutet, dass es sich zum Zeitpunkt der Druckbehandlung bei den jeweiligen Proben der Gruppe 1 und 2 um die Enzym-Proform, und bei Gruppe 3 um die aktive Form gehandelt hat.

1. Die im Activity-Assay gemessene Aktivität von HHD-behandelter und nicht artifiziell aktivierter Proform der MMP-9 entspricht dem Anteil des Enzyms, das sich während der Versuchsdurchführung autoaktiviert hat. Die Werte können somit als Maß für die Druckstabilität von pro-MMP-9 interpretiert werden. Für isolierte pro-MMP-9 war bei HHD-behandeltem Enzym eine Abnahme der Autoaktivierung gegenüber der Kontrolle zu erkennen, die bei 200 MPa statistisch signifikant war (siehe Abb. 17). Für rekombinante pro-MMP-9 war sowohl bei 200 MPa als auch bei 400 MPa eine statistisch signifikante Erhöhung der Autoaktivierung gegenüber der Kontrolle zu sehen (siehe Abb. 25). Daraus lässt sich schließen, dass es infolge der Druckbehandlung zu einer Veränderung der rekombinanten pro-MMP-9 kommt, die mit einer leicht erhöhten Proteolyse und damit Zunahme des Anteils an aktivem Enzym einhergeht. Zu beachten sind die sehr niedrigen Aktivitätswerte der Kontrollgruppen, die bei ebenfalls nur diskret erhöhten

absoluten Aktivitätswerten der HHD-behandelten Proben bereits zu einer deutlichen prozentualen Zunahme führen.

2. Die im Activity-Assay gemessene Aktivität von HHD-behandelter und nach HHD aktivierter MMP-9 entspricht der Aktivierbarkeit der Enzym-Proform. Die Werte können somit ebenfalls als Maß für die Druckstabilität von pro-MMP-9 interpretiert werden. Sowohl für isolierte als auch für rekombinante MMP-9 zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle eine Zunahme der Aktivierbarkeit der HHD-behandelten Proben, die bei beiden Druckstufen statistisch signifikant und bei rekombinanter MMP-9 wesentlich ausgeprägter war (siehe Abb. 18 und 26). Es kann angenommen werden, dass die verbesserte Aktivierbarkeit in einer HHD-induzierten strukturellen Veränderung des aktiven Zentrums von MMP-9 begründet ist. Veränderungen der Molekülkonformation mit veränderter enzymatischer Wirkung werden in der Literatur beschrieben [Mozhaev et al.: 1996, 320-331; Kornblatt et al.: 1999, 120-126; Kitahara et al.: 2000, 12789-12795], worauf später noch näher eingegangen wird. Die in den vorliegenden Ergebnissen gezeigte Steigerung der Aktivierbarkeit bezieht sich nur auf den im Activity-Assay verwendeten Antikörper gegen MMP-9. In wie weit auch *in vivo* Substrate verstärkt an das aktive Zentrum von druckbehandelter MMP-9 binden können, kann nicht gesagt werden.
3. Die im Activity-Assay gemessene Aktivität von HHD-behandelter und vor HHD aktivierter MMP-9 kann als Maß für die Druckstabilität von aktiver MMP-9 interpretiert werden. Für isolierte MMP-9 zeigte sich bei beiden Druckstufen eine statistisch signifikante Aktivitätsverminderung (siehe Abb. 19). Bei rekombinanter MMP-9 war eine Aktivitätszunahme zu erkennen, die bei beiden Druckstufen nicht statistisch signifikant war (siehe Abb. 27). Die Dauer des Activity-Assay von ca. 18 h, bedingt durch die erforderliche Übernachtinkubation zur Bindung des Antikörpers, ist für die zu Beginn des Versuchs aktivierte Gruppe 3 möglicherweise von Nachteil. Sofern aktives MMP-9 instabiler ist als pro-MMP-9 kommt es über einen solch langen Zeitraum bei aktivem Enzym zu einer natürlichen Aktivitätsverminderung. Da sowohl die HHD-behandelten Untersuchungsproben als auch die Kontrollproben bzgl. Inkubationszeiten und Versuchsdauer gleich behandelt wurden, erklärt die natürliche

Aktivitätsverminderung jedoch nicht die Unterschiede zwischen Kontrolle und druckbehandelten Untersuchungsproben.

Eine wichtige Eigenschaft des verwendeten Activity-Assays zur quantitativen MMP-9-Messung ist, dass nur aktives Enzym gemessen wird. Daher können direkt lediglich Aussagen über die Enzymaktivität gemacht werden, während Angaben zur Proteinmenge nur indirekt möglich sind.

Mit den vorliegenden Ergebnissen kann eine Aussage über die HHD-induzierte Veränderung der Enzymaktivität infolge direkter Beeinflussung von MMP-9 gemacht werden, da bei allen Untersuchungen stets die gleiche Enzymmenge bzw. -konzentration verwendet wurde. Eine Veränderung der Aktivität infolge einer Veränderung der freigesetzten Enzymmenge, wie es *in vivo* möglich wäre, kann nicht beurteilt werden.

Insgesamt wiesen fast alle Ergebnisse des Activity-Assay starke Schwankungen bei HHD-behandelten Proben auf. Die bei jedem durchgeführten Activity-Assay lineare und schwankungsarme Standardkurve sowie die geringe Schwankungsbreite der Kontrollgruppen sprechen dafür, dass die Schwankungen bei der MMP-9-Bestimmung im untersuchten Enzym selbst bzw. in der Bindung an den Antikörper des Assays begründet sind. Die erhöhten Aktivitätswerte könnten auf einer Abspaltung der Pro-Peptidomäne von pro-MMP-9 beruhen [Sternlicht et al.: 2001, 463-516].

Proteine erfahren unter HHD Konformationsänderungen. Da der verwendete Assay auf einer Antikörperbindung von MMP-9 an einer bestimmten Stelle des Moleküls basiert, könnte eine druckinduzierte Konformationsänderung zu einer Veränderung der Bindungsstelle führen und so die zur Detektion erforderliche Antikörperbindung verändern.

Druckeinwirkung kann zahlreiche biochemische Vorgänge beschleunigen. Dazu zählen nicht nur chemische Reaktionen, sondern auch makromolekulare Konformationsänderungen, Veränderungen der Membranstruktur, der Kristallform und des Schmelzpunktes, die allesamt mit einer Volumenveränderung des Ausgangsmoleküls einhergehen [Gross et al.: 1994, 617-630; Heremans et al.: 1998, 353-370].

Proteine bestehen aus unterschiedlichen Organisationsebenen: Die Primärstruktur wird von der Aminosäuresequenz gebildet, die

Sekundärstruktur durch Wasserstoffbrückenbindungen, die Tertiärstruktur vornehmlich durch hydrophobe Wechselwirkungen und Disulfidbrücken. Die Quartärstruktur beschreibt die oberflächenbedingte Anordnung mehrerer Proteinmoleküle zu großen Gebilden; d.h. mehrere Untereinheiten mit eigenen Primär-, Sekundär- und Tertiärstrukturen werden zu einer Funktionseinheit zusammengefasst [Löffler et al.: 2002, 57-58].

Mit zunehmendem Druck ändern sich durch Beeinflussung der nicht-kovalenten Bindungen die Quartär-, Tertiär- und zuletzt auch die Sekundärstruktur, und zwar je nach Druckhöhe, Druckhaltezeit, Temperatur und pH-Wert irreversibel, metastabil oder reversibel [Meyer-Pittroff: 2003, 295-305]. Diese druckinduzierten Veränderungen basieren auf der Auftrennung von Disulfid- und Wasserstoffbrückenbindungen, Ionenbindungen sowie Bindungen infolge von van der Waalschen Kräften oder hydrophoben bzw. elektrostatischen Wechselwirkungen [Boonyaratanakornkit et al.: 2002, 235-249]. HHD bis zu 1000 MPa hat keine Wirkung auf kovalente Bindungen bzw. die Primärstruktur von Proteinen [Mozhaev et al.: 1996, 320-331; Masson et al.: 2001, 85-88]. Die Hydratation von Biomolekülen scheint für die Druckresistenz von großer Bedeutung zu sein. Komplexe Moleküle mit vielen intramolekularen Hohlräumen sind anfällig für die Einlagerung von Wassermolekülen und eine daraus resultierende Dissoziation. Die Dehydratation eines Proteins steigert dagegen die Widerstandsfähigkeit gegenüber HHD [Oliveira et al.: 1994, 184-187]. Eine entscheidende Wirkung von HHD auf Proteine ist die Veränderung der Proteinstruktur mit dem Ergebnis eines kleineren Molekülvolumens analog dem Prinzip von Le Chatelier (siehe Kap. 2.1) [Balny et al.: 2002, 3-10; Meschede: 2004, 266]. HHD bewirkt eine Denaturierung von Proteinen, weil sie im denaturierten Zustand ein kleineres Volumen besitzen als im nativen Zustand [Perrett et al.: 2002, 210-223]. Wasserstoffbrückenbindungen wie sie hauptsächlich in der Sekundärstruktur von Proteinen, Nukleinsäuren und Polysacchariden vorkommen, bedingen ein geringes Molekülvolumen mit nur geringen intramolekularen Hohlräumen und sind daher sehr druckstabil [Chalikian et al.: 1994, 89-109; Mozhaev et al.: 1996, 320-331]. Sekundärstrukturen denaturieren daher im Allgemeinen nicht unter 400 MPa [Gross et al.: 1994, 617-630; Tauc et al.: 2002, 103-115]. Höhere Proteinstrukturen sind dagegen

durch das Vorhandensein von zahlreichen intramolekularen Hohlräumen charakterisiert und werden hauptsächlich durch hydrophobe bzw. elektrostatische Wechselwirkungen stabilisiert. Die Einlagerung von Wassermolekülen in diese Hohlräume verringert das Molekülvolumen und erfolgt somit bevorzugt unter HHD [Mozhaev et al.: 1996, 320-331]. Sehr große Proteine mit komplexer Tertiär- und Quartärstruktur werden schon bei niedrigen Druckstufen aufgetrennt und gelten deshalb als drucksensibelste Biomoleküle [Mozhaev et al.: 1996, 81-91].

Ob ein Protein unter HHD denaturiert, hängt neben der Proteinstruktur von der maximalen Temperatur, Druckdauer, Geschwindigkeit des Druckaufbaus und natürlich von der Druckhöhe ab.

Enzyme, Proteine mit biokatalytischer Funktion, zeigen bzgl. ihrer Aktivität kein einheitliches Verhalten gegenüber HHD. Auch Substratbindungsfähigkeit und Substratspezifität können durch HHD verändert werden [Michels et al.: 1996, 341-376]. Deshalb ist es notwendig, sämtliche für ein bestimmtes druckzubehandelndes Gewebe relevanten Enzyme bzw. Enzymgruppen separat zu untersuchen. Zwar wurden schon andere Metalloproteinasen wie Thermolysin und Vemelysin untersucht [Kunugi et al.: 1999, 187-190], bisher finden sich jedoch keine Ergebnisse über das Verhalten der Matrixmetalloproteinasen und speziell der MMP-9 nach hydrostatischer Hochdruckbehandlung.

Die Veränderung der Enzymaktivität durch HHD ist neben Membranveränderungen ein wichtiger Grund für das Absterben von Mikroorganismen und Tumorzellen, da es zu einer Störung von Zell-Metabolismus und Replikation kommt [Meyer-Pittroff: 2003, 295-305].

Enzymatische Reaktionen können gehemmt werden, beschleunigt werden oder unverändert bleiben [Morild: 1981, 93-166]. Außerdem kann sich das Reaktionsgleichgewicht verschieben oder die Substratspezifität verändern [Kunugi: 1993, 805-838]. Beispielsweise werden Trypsin und Aminopeptidase durch HHD stark in ihrer Aktivität gehemmt, während Saure Phosphatase unverändert bleibt und durch Thermolysin katalysierte Reaktionen sogar verstärkt werden [Kunugi et al.: 1982, 107-113; Fukuda et al.: 1984, 565-570; Ohmori et al.: 1991, 357-361]. Wichtig ist, bei der Bewertung HHD-induzierter Aktivitätsveränderungen zwischen echten molekularen Veränderungen bei

gleicher Enzymmenge und verminderter bzw. vermehrter Enzymfreisetzung zu unterscheiden.

Es ist möglich, dass ein Enzym bis zu einer bestimmten Druckstufe in seiner Aktivität gesteigert und bei höheren Drücken inhibiert wird. Die katalytische Aktivität von Chymotrypsin wird beispielsweise bis 300 MPa um das siebenfache gesteigert und fällt oberhalb von 300 MPa deutlich ab [Mozhaev et al.: 1996, 320-331]. Bei Untersuchungen von druckbehandeltem Fleisch wurde für einige Proteasen (Kathepsin B, D und L) ein Aktivitätsanstieg infolge vermehrter Freisetzung bis 400 MPa und bei höherem Druck ein Abfall der Aktivität festgestellt, während andere Proteasen (Kathepsin H und Aminopeptidase) von niedrigen Druckstufen an in ihrer Aktivität vermindert waren [Homma et al.: 1994, 219-228]. Analoge Untersuchungen mit den Metalloproteinasen Thermolysin und Vemelysin zeigten bis 250 bzw. 150 MPa einen deutlichen Aktivitätsanstieg (bis zu 100-fach bei Thermolysin) mit einem Aktivitätsabfall bei höheren Druckstufen [Kunugi et al.: 1999, 187-190].

Andere Enzyme werden schon bei niedrigen Druckstufen inhibiert. Diese Hemmung der katalytischen Aktivität ist bis zu einer bestimmten Druckhöhe reversibel. Die Aktivität der Natrium-Kalium-ATPase wird durch HHD zunehmend, bei Druckstufen bis 200 MPa reversibel und oberhalb von 200 MPa irreversibel, inhibiert [Janosch et al.: 2003, 215-219]. Kreatinkinase ist bis 150 MPa reversibel und ab 200 MPa irreversibel gehemmt [Zhou et al.: 2000, 1247-1253]. Wieder andere Enzyme wie z.B. Peroxidase sind auch gegenüber hohen Druckstufen resistent und in ihrer Aktivität kaum beeinflussbar [Cheftel et al.: 2003, 327-340].

Für die Druckempfindlichkeit von Enzymen ist es relevant, ob sie in gebundener oder freier Form vorliegen. Zum Beispiel wird ATP-Synthase schon bei niedrigen Druckstufen inaktiviert, gebunden an Membran- oder Mitochondrienbestandteile ist die Inaktivierung jedoch reversibel, während sie bei freiem Enzym irreversibel ist [Dreyfus et al.: 1988, 6704-6710].

Die durchgeführten zymographischen Untersuchungen dienen zum einen als Nachweis, dass es sich bei den verwendeten MMP-9 um Matrixmetalloproteinasen gehandelt hat, zum anderen als alternatives Messverfahren zum Activity-Assay. Quantitative Aussagen über die Enzymmenge sind mit der MMP-Zymographie nicht hinreichend möglich.

Zunächst wurden HHD-behandelte pro-MMP-9 zymographisch untersucht (siehe Abb. 28 und 29). Bei allen Untersuchungsproben zeigten sich deutliche Banden im Bereich von pro-MMP-9 (92 kDa) und aktiver MMP-9 (84 kDa). Der im Vergleich zu pro-MMP-9 geringe Anteil aktiver MMP-9 resultiert aus einer Autoaktivierung, die sich auch mit dem verwendeten Enzympuffer nicht vollständig vermeiden ließ. Weiterhin fanden sich schwächere Banden im Bereich von 70 kDa, die bei zunehmender Druckhöhe stärker ausgeprägt waren. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um ein bestimmtes Spaltfragment von MMP-9. Bei mit 400 MPa behandeltem pro-MMP-9 fanden sich im gesamten Bereich zwischen 92 und ca. 70 kDa schwach hellere Bereiche, die enzymatisch zersetzter Gelatine entsprachen. Es ist wahrscheinlich, dass HHD in Höhe von 400 MPa bei pro-MMP-9 diffuse Konformationsänderungen mit Spaltfragmenten unterschiedlichen Molekulargewichts verursacht. Eindeutige Unterschiede zwischen isolierter und rekombinanter MMP-9 ließen sich bei den HHD-behandelten Untersuchungsproben nicht nachweisen.

Die Ergebnisse der Nachweiszymographien zeigen, wie auch die zuvor beschriebenen Zymographien, deutliche Banden im Bereich der bekannten Molekulargewichte von pro-MMP-9 bei 92 kDa und aktiver MMP-9 bei 84 kDa (siehe Abb. 30 und 31). Die Enzymaktivität der untersuchten Enzyme ließ sich wie erwartet durch EDTA komplett hemmen (siehe Abb. 32). EDTA bildet Chelatkomplexe mit Metallionen, wodurch Matrixmetalloproteinasen, wie auch sämtliche andere Enzyme, die Metallionen für ihre Funktion benötigen, gehemmt werden [Woessner et al.: 2000, 109; Brooks et al.: 2004, 611-622]. PMSF hingegen hemmt humane Acetylcholinesterase und sämtliche Serinproteasen (wie z.B. Urokinase, Trypsin, Thrombin und uPA) [Turini et al.: 1969, 98-104; Zucker et al.: 1985, 223-232], nicht aber MMP [Yao et al.: 1996, 15580-15589; Eagleton et al.: 2002, 15-21]. Das in der vorliegenden Zymographie verwendete PMSF hemmt laut Hersteller auch reversibel Cysteinproteinasen (wie z.B. Kathepsine, siehe <http://www.sigma-aldrich.com>, Product-No. P7626). Einen Einfluss von PMSF bei der zymographischen Darstellung des verwendeten Enzyms konnte wie erwartet nicht festgestellt werden (siehe Abb. 33). Somit kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei allen untersuchten MMP-9-Enzymen um Matrixmetalloproteinasen

gehandelt hat. Analoge Nachweiszymographien für MMP-9 mit gleichem Ergebnis finden sich bei Yao et al. [Yao et al.: 1996, 15580-15589].

Ein Grund für zum einen größere Ergebnisschwankungen und zum anderen Unterschiede zwischen isolierter und rekombinanter MMP-9 könnten Kreuzreaktionen mit endogenen MMP-Inhibitoren sein, besonders mit Tissue Inhibitor of Matrixmetalloproteinases 1. Liegt MMP-9 als Komplex mit TIMP-1 vor, kann es nicht mittels APMA aktiviert werden und wird folglich im verwendeten Activity-Assay, der nur aktives MMP-9 misst, nicht erkannt [Verheijen et al.: 1997, 603-609]. Die in den Nachweiszymographien bei isolierter MMP-9 dargestellte zusätzliche Bande bei 120 kDa (siehe Abb. 30, 31 und 33) ist ein weiterer deutlicher Hinweis auf eine Verunreinigung der Proteinlösung mit TIMP. Eine solche zusätzliche Bande in der Zymographie bei 116 kDa wird von Pucci-Minafra et al. als MMP-9-TIMP-Komplex beschrieben [Pucci-Minafra et al.: 2001, 419-427]. Ein weiterer Grund könnte das Vorliegen von MMP-9 in Form von Dimeren sein, die ebenfalls im Activity-Assay nicht erkannt werden und in der Zymographie von isolierter MMP-9 teilweise als Bande an der Oberkante des Trenngels erkennbar waren (siehe Abb. 31).

4.6 Ausblick

Weitere Untersuchungen mit MMP-9 müssen klären, welchen Einfluss eine Veränderung der variablen Parameter (Temperatur, Druckdauer, wiederholte Druckapplikation) auf die Aktivität von MMP-9 hat. Sollte sich eine HHD-induzierte Aktivitätssteigerung bestätigen, kann die Aktivität möglicherweise durch Zugabe von Inhibitoren, wie sie derzeit zahlreich erforscht werden, reduziert werden [Belotti et al.: 1999, 232-238; John et al.: 2001, 14-23]. Dabei ist es wichtig, genaue Kenntnisse über den Einfluss von MMP-9 auf die Knochenentwicklung und Homöostase zu haben, um Nebenwirkungen von MMP-9-Inhibition bzw. Veränderungen infolge klinischer Intervention abschätzen zu können.

Auch andere für den Knochenstoffwechsel relevante Proteasen wie MMP-2 und MMP-13 sowie Cystein-Proteinasen, besonders Kathepsin K, und Serin-Proteinasen sind maßgeblich an der Regulation des Knochenstoffwechsels beteiligt [Delaisse et al.: 2000, 223-234; Tumber et al.: 2003, 437-447]. Die

genannten Enzyme müssen analog zu MMP-9 in Bezug auf Veränderungen nach HHD-Applikation untersucht werden. Nach Untersuchung der einzelnen Enzyme ist es sinnvoll, die Auswirkungen von HHD auf das Zusammenspiel von Stoffwechsellenzymen bzw. einzelne Enzymkaskaden zu analysieren.

Notwendig sind auch Untersuchungen über die Auswirkungen von HHD auf extrazelluläre Matrixproteine wie Kollagen I, Fibronectin und Vitronectin, die für die osteoinduktiven Eigenschaften des Knochengewebes bedeutsam sind [Moursi et al.: 1997, 2187-2196; Salaszyk et al.: 2004, 24-34].

Immunologische Untersuchungen müssen zeigen, ob Konformationsänderungen von MMP-9 oder anderen Proteinen zur Veränderung der Antigenität führen.

Schließlich müssen *in vivo* Untersuchungen am Tiermodell zeigen, ob die *in vitro* festgestellten Aktivitätsveränderungen, besonders die Aktivitätserhöhung bzw. verstärkte Aktivierbarkeit, bei der Reimplantation von HHD-behandeltem Knochen relevant sind und möglicherweise zu osteolytischen Veränderungen am reimplantierten Knochen und einer Behinderung der Osteointegration führen.

5. Zusammenfassung

Die Rekonstruktion großer segmentaler Knochendefekte infolge maligner Tumoren stellt eine große Herausforderung dar. Bisher existieren zwei Methoden, extrakorporale Bestrahlung oder Autoklavierung, zur Devitalisierung von reseziertem tumorbefallenem Knochengewebe und anschließenden orthotopen Reimplantation. Beide Verfahren verschlechtern massgeblich die biomechanischen und biologischen Eigenschaften des Knochens. Um eine alternative Methode zu entwickeln, wird derzeit hydrostatischer Hochdruck (HHD) zur Devitalisierung von Knochentumoren untersucht. Nachdem bisher keine negativen biomechanischen Veränderungen infolge HHD-Behandlung festgestellt werden konnten, wurden weiterführende Untersuchungen zu biologischen bzw. biochemischen Auswirkungen von HHD durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmalig die Auswirkungen von hydrostatischem Hochdruck auf die Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9) als eines der bedeutendsten Knochenstoffwechsellzyme untersucht. Entscheidend sind die Beteiligung von MMP-9 an osteolytischen Prozessen sowie die starke Erhöhung der MMP-9-Konzentration in Knochentumoren. Wie die Ergebnisse zeigen, gab es signifikante Veränderungen der MMP-9-Aktivität nach Behandlung mit HHD. Es wurde gezeigt, dass sich isolierte und rekombinante MMP-9 teilweise unterschiedlich gegenüber HHD verhalten und sich die Druckempfindlichkeit von pro-MMP-9 und aktiver MMP-9 unterscheidet. Eine Konsequenz für die medizinische Anwendbarkeit der Hochdrucktechnologie lässt sich daraus noch nicht ausreichend ableiten. Weitere Untersuchungen mit MMP-9 und anderen für den Knochenstoffwechsel relevanten Proteasen sowie tierexperimentelle *in vivo* Beobachtungen sind notwendig.

Zusammengefasst könnte hydrostatischer Hochdruck für die orthopädische Chirurgie eine neue viel versprechende Option zur Tumordevitalisierung von Knochengewebe darstellen, mit dem großen Vorteil der Behandlung von menschlichem Gewebe bei Körpertemperatur und der weitgehenden Erhaltung der biologischen und biomechanischen Eigenschaften.

6. Literaturverzeichnis

1. Abe, F.; Kato, C.; Horikoshi, K.: "Pressure-regulated metabolism in microorganisms" *Trends Microbiol.* 7 (1999): 447-453
2. Abu El-Asrar, A.M.; Van, A., I; Al Mansouri, S.; Missotten, L.; Opdenakker, G.; Geboes, K.: "Gelatinase B in vernal keratoconjunctivitis" *Arch. Ophthalmol.* 119 (2001): 1505-1511
3. Albrektsson, T. and Johansson, C.: "Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration" *Eur. Spine J.* 10 Suppl 2 (2001): 96-101
4. Allan, J.A.; Docherty, A.J.; Barker, P.J.; Huskisson, N.S.; Reynolds, J.J.; Murphy, G.: "Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components" *Biochem. J.* 309 (1995): 299-306
5. Araki, N.; Myoui, A.; Kuratsu, S.; Hashimoto, N.; Inoue, T.; Kudawara, I.; Ueda, T.; Yoshikawa, H.; Masaki, N.; Uchida, A.: "Intraoperative extracorporeal autogenous irradiated bone grafts in tumor surgery" *Clin. Orthop.* (1999): 196-206
6. Arbelaez, L.F.; Bergmann, U.; Tuuttila, A.; Shanbhag, V.P.; Stigbrand, T.: "Interaction of matrix metalloproteinases-2 and -9 with pregnancy zone protein and alpha2-macroglobulin" *Arch. Biochem. Biophys.* 347 (1997): 62-68
7. Armstrong, D.G. and Jude, E.B.: "The role of matrix metalloproteinases in wound healing" *J. Am. Podiatr. Med. Assoc.* 92 (2002): 12-18
8. Asada, N.; Tsuchiya, H.; Kitaoka, K.; Mori, Y.; Tomita, K.: "Massive autoclaved allografts and autografts for limb salvage surgery. A 1-8 year follow-up of 23 patients" *Acta Orthop. Scand.* 68 (1997): 392-395
9. Ashworth, J.L.; Murphy, G.; Rock, M.J.; Sherratt, M.J.; Shapiro, S.D.; Shuttleworth, C.A.; Kielty, C.M.: "Fibrillin degradation by matrix metalloproteinases: implications for connective tissue remodelling" *Biochem. J.* 340 (1999): 171-181
10. Backstrom, J.R. and Tokes, Z.A.: "The 84-kDa form of human matrix metalloproteinase-9 degrades substance P and gelatin" *J. Neurochem.* 64 (1995): 1312-1318
11. Bainton, D.F.; Ulliyot, J.L.; Farquhar, M.G.: "The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow" *J. Exp. Med.* 134 (1971): 907-934
12. Balny, C.; Masson, P.; Heremans, K.: "High pressure effects on biological macromolecules: from structural changes to alteration of cellular processes" *Biochim. Biophys. Acta* 1595 (2002): 3-10

13. Banwart, J.C.; Asher, M.A.; Hassanein, R.S.: "Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation" *Spine* 20 (1995): 1055-1060
14. Bartlett, D.H.: "Microbial life at high pressures" *Sci. Prog.* 76 (1992): 479-496
15. Belotti, D.; Paganoni, P.; Giavazzi, R.: "MMP inhibitors: experimental and clinical studies" *Int. J Biol Markers* 14 (1999): 232-238
16. Bergers, G.; Brekken, R.; McMahon, G.; Vu, T.H.; Itoh, T.; Tamaki, K.; Tanzawa, K.; Thorpe, P.; Itohara, S.; Werb, Z.; Hanahan, D.: "Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis" *Nat. Cell Biol* 2 (2000): 737-744
17. Birkedal-Hansen, H.: "Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction" *J. Periodontal Res.* 28 (1993): 500-510
18. Birkedal-Hansen, H.: "Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases" *J. Periodontol.* 64 (1993): 474-484
19. Birkedal-Hansen, H.; Moore, W.G.; Bodden, M.K.; Windsor, L.J.; Birkedal-Hansen, B.; DeCarlo, A.; Engler, J.A.: "Matrix metalloproteinases: a review" *Crit Rev. Oral Biol Med.* 4 (1993): 197-250
20. Bohm, P.; Fritz, J.; Thiede, S.; Budach, W.: "Reimplantation of extracorporeal irradiated bone segments in musculoskeletal tumor surgery: clinical experience in eight patients and review of the literature" *Langenbecks Arch. Surg.* 387 (2003): 355-365
21. Bohm, P.; Springfield, R.; Springer, H.: "Re-implantation of autoclaved bone segments in musculoskeletal tumor surgery. Clinical experience in 9 patients followed for 1.1-8.4 years and review of the literature" *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 118 (1998): 57-65
22. Boonyaratanakornkit, B.B.; Park, C.B.; Clark, D.S.: "Pressure effects on intra- and intermolecular interactions within proteins" *Biochim. Biophys. Acta* 1595 (2002): 235-249
23. Braunhut, S.J. and Moses, M.A.: "Retinoids modulate endothelial cell production of matrix-degrading proteases and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP)" *J Biol Chem.* 269 (1994): 13472-13479
24. Brenner, C.A.; Adler, R.R.; Rappolee, D.A.; Pedersen, R.A.; Werb, Z.: "Genes for extracellular-matrix-degrading metalloproteinases and their inhibitor, TIMP, are expressed during early mammalian development" *Genes Dev.* 3 (1989): 848-859
25. Bridgman, P.W.: "Water, in the liquid and five solid forms, under pressure" *Proc. Amer. Acad. Art. Sci.* 47 (1912): 441-558
26. Brinckerhoff, C.E. and Matrisian, L.M.: "Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince" *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 3 (2002): 207-214

27. Brooks, D.E. and Ollivier, F.J.: "Matrix metalloproteinase inhibition in corneal ulceration" *Vet. Clin. North Am. Small Anim Pract.* 34 (2004): 611-622
28. Butz, P.; Garcia, A.F.; Lindauer, R.; Dieterich, S.; Bogner, A.; Tauscher, B.: "Influence of ultra high pressure processing on fruit and vegetable products" *Journal of Food Engineering* 56 (2003): 233-236
29. Capper, S.; Evans, R.; Hanemaaijer, R.; Sully, M.; Visser, H.; Verheijen, J.H.: "A novel assay for MMP-9 activity - correlation with ELISA and application to biological fluid measurements" *Life Science News* 10 (1999): 8-9
30. Chalikian, T.V.; Sarvazyan, A.P.; Breslauer, K.J.: "Hydration and Partial Compressibility of Biological Compounds" *Biophysical Chemistry* 51 (1994): 89-109
31. Cheftel, J.C.: "Review: High-pressure, microbial inactivation and food preservation" *Food Science and Technology International* 1 (1995): 75-90
32. Cheftel, J.C.; Thiebaud, M.; Dumay, E.: "High Pressure - Low Temperature Processing of Foods" in *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology II*, Hsg. Winter, R., Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York (2003): 327-340
33. Collier, I.E.; Krasnov, P.A.; Strongin, A.Y.; Birkedal-Hansen, H.; Goldberg, G.I.: "Alanine scanning mutagenesis and functional analysis of the fibronectin-like collagen-binding domain from human 92-kDa type IV collagenase" *J. Biol Chem.* 267 (1992): 6776-6781
34. Dallas, S.L.; Rosser, J.L.; Mundy, G.R.; Bonewald, L.F.: "Proteolysis of latent transforming growth factor-beta (TGF-beta)-binding protein-1 by osteoclasts. A cellular mechanism for release of TGF-beta from bone matrix" *J. Biol Chem.* 277 (2002): 21352-21360
35. Davis, G.E. and Martin, B.M.: "A latent Mr 94,000 gelatin-degrading metalloprotease induced during differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells: a member of the collagenase family of enzymes" *Cancer Res.* 50 (1990): 1113-1120
36. Delaisse, J.M.; Eeckhout, Y.; Vaes, G.: "Bone-resorbing agents affect the production and distribution of procollagenase as well as the activity of collagenase in bone tissue" *Endocrinology* 123 (1988): 264-276
37. Delaisse, J.M.; Engsig, M.T.; Everts, V.; del Carmen, O.M.; Ferreras, M.; Lund, L.; Vu, T.H.; Werb, Z.; Winding, B.; Lochter, A.; Karsdal, M.A.; Troen, T.; Kirkegaard, T.; Lenhard, T.; Heegaard, A.M.; Neff, L.; Baron, R.; Foged, N.T.: "Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles" *Clin. Chim. Acta* 291 (2000): 223-234
38. Deryugina, E.I.; Luo, G.X.; Reisfeld, R.A.; Bourdon, M.A.; Strongin, A.: "Tumor invasion through matrigel is regulated by activated matrix metalloproteinase-2" *Anticancer Res.* 17 (1997): 3201-3210

39. Deutscher, M.P.: "Maintaining protein stability" *Methods Enzymol.* 182 (1990): 83-89
40. Dibb, W.; Morild, E.; Laerum, O.D.: "Effects of high hydrostatic pressure on normal and neoplastic rat cells in culture" *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 38 (1981): 169-176
41. Diehl, P.; Hantke, B.; Hennig, M.; Tschesche, H.; Mittelmeier, W.; Schmitt, M.; Muehlenweg, B.: "Protein expression of MMP-13, uPA, and PAI-1 in pseudocapsular and interface tissue around implants of loose artificial hip joints and in osteoarthritis" *Int. J Mol. Med.* 13 (2004): 711-715
42. Diehl, P.; Reuning, U.; Gollwitzer, H.; Magdolen, U.; Gerdesmeyer, L.; Schauwecker, J.; Tuebel, J.; Gradinger, R.; Mittelmeier, W.; Schmitt, M.: "Effect of extracorporeal high hydrostatic pressure on tumor cell adherence and viability" *Oncol. Rep.* 12 (2004): 369-373
43. Diehl, P.; Schmitt, M.; Blumelhuber, G.; Frey, B.; Van Laak, S.; Fischer, S.; Muehlenweg, B.; Meyer-Pittroff, R.; Gollwitzer, H.; Mittelmeier, W.: "Induction of tumor cell death by high hydrostatic pressure as a novel supporting technique in orthopedic surgery" *Oncol. Rep.* 10 (2003): 1851-1855
44. Diehl, P.; Schmitt, M.; Heister, C.; Lehner, S.; Steinhauser, E.; Milz, S.; Link, T.M.; Bluemelhuber, G.; Gollwitzer, H.; Mittelmeier, W.: "Biomechanical analysis of Achilles' tendons after high hydrostatic pressure treatment as a novel supporting technique in orthopedic surgery" *J. Biomed. Mat. Res.* (2004): eingereicht
45. Dreyfus, G.; Guimaraes-Motta, H.; Silva, J.L.: "Effect of hydrostatic pressure on the mitochondrial ATP synthase" *Biochemistry* 27 (1988): 6704-6710
46. Duffy, M.J. and McCarthy, K.: "Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and targets for therapy (review)" *Int. J Oncol.* 12 (1998): 1343-1348
47. Eagleton, M.J.; Peterson, D.A.; Sullivan, V.V.; Roelofs, K.J.; Ford, J.A.; Stanley, J.C.; Upchurch, G.R., Jr.: "Nitric oxide inhibition increases aortic wall matrix metalloproteinase-9 expression" *J Surg Res* 104 (2002): 15-21
48. Engsig, M.T.; Chen, Q.J.; Vu, T.H.; Pedersen, A.C.; Therkidsen, B.; Lund, L.R.; Henriksen, K.; Lenhard, T.; Foged, N.T.; Werb, Z.; Delaisse, J.M.: "Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones" *J. Cell Biol* 151 (2000): 879-889
49. Faber, F.W.; Keessen, W.; van Roermund, P.M.: "Complications of leg lengthening. 46 procedures in 28 patients" *Acta Orthop. Scand.* 62 (1991): 327-332

50. Fosang, A.J.; Neame, P.J.; Last, K.; Hardingham, T.E.; Murphy, G.; Hamilton, J.A.: "The interglobular domain of cartilage aggrecan is cleaved by PUMP, gelatinases, and cathepsin B" *J. Biol Chem.* 267 (1992): 19470-19474
51. Fridman, R.; Toth, M.; Pena, D.; Mobashery, S.: "Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP-2)" *Cancer Res.* 55 (1995): 2548-2555
52. Fujimoto, N.; Hosokawa, N.; Iwata, K.; Shinya, T.; Okada, Y.; Hayakawa, T.: "A one-step sandwich enzyme immunoassay for inactive precursor and complexed forms of human matrix metalloproteinase 9 (92 kDa gelatinase/type IV collagenase, gelatinase B) using monoclonal antibodies" *Clin. Chim. Acta* 231 (1994): 79-88
53. Fukuda, M. and Kunugi, S.: "Pressure-Dependence of Thermolysin Catalysis" *European Journal of Biochemistry* 142 (1984): 565-570
54. Gearing, A.J.; Beckett, P.; Christodoulou, M.; Churchill, M.; Clements, J.M.; Crimmin, M.; Davidson, A.H.; Drummond, A.H.; Galloway, W.A.; Gilbert, R.; ..: "Matrix metalloproteinases and processing of pro-TNF-alpha" *J. Leukoc. Biol* 57 (1995): 774-777
55. Goldberg, G.I.; Strongin, A.; Collier, I.E.; Genrich, L.T.; Marmer, B.L.: "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 (1992): 4583-4591
56. Gollwitzer, H.; Brendle, M.; Weber, P.; Miethke, T.; Hofmann, G.O.; Schauwecker, J.; Diehl, P.; Gerdesmeyer, L.; Bluemelhuber, G.; Mittelmeier, W.: "High hydrostatic pressure treatment reduces bacterial growth in bone and organic constituents" *J. Orthop. Res.* (2004): eingereicht
57. Gomez, D.E.; Alonso, D.F.; Yoshiji, H.; Thorgeirsson, U.P.: "Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions" *Eur. J. Cell Biol* 74 (1997): 111-122
58. Gross, J. and Lapiere, C.M.: "Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 48 (1962): 1014-1022
59. Gross, M. and Jaenicke, R.: "Proteins under pressure. The influence of high hydrostatic pressure on structure, function and assembly of proteins and protein complexes" *Eur. J. Biochem.* 221 (1994): 617-630
60. Hallfeldt, K.K.; Kessler, S.; Puhlmann, M.; Mandelkow, H.; Schweiberer, L.: "[The effect of various sterilization procedures on the osteoinductive properties of demineralized bone matrix]" *Unfallchirurg* 95 (1992): 313-318
61. Hauben, K.J.A.; Bartlett, D.H.; Soontjens, C.C.F.; Cornelis, K.; Wuytack, E.Y.; Michiels, C.W.: "Escherichia coli mutants resistant to inactivation

- by high hydrostatic pressure" *Applied and Environmental Microbiology* 63 (1997): 945-950
62. Hawkes, S.P.; Li, H.; Taniguchi, G.T.: "Zymography and reverse zymography for detecting MMPs, and TIMPs" *Methods Mol. Biol* 151 (2001): 399-410
 63. Heremans, K. and Smeller, L.: "Protein structure and dynamics at high pressure" *Biochim. Biophys. Acta* 1386 (1998): 353-370
 64. Hertfelder, H.J.; Suwer, V.; Popov-Cenic, S.; Tschesche, H.; Hanfland, P.: "Leukocyte proteinase release during storage of red cell concentrates" *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 32 (1994): 441-447
 65. Himelstein, B.P.; Asada, N.; Carlton, M.R.; Collins, M.H.: "Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in childhood osseous osteosarcoma" *Med. Pediatr. Oncol.* 31 (1998): 471-474
 66. Hite, B.H.: "The effect of pressure in the preservation of milk" *West Virginia Agricultural Experimental Station Bulletin* 58 (1899): 15-17
 67. Hofmann, C.; von Garrel, T.; Gotzen, L.: "[Bone bank management using a thermal disinfection system (Lobator SD-1). A critical analysis]" *Unfallchirurg* 99 (1996): 498-508
 68. Holmbeck, K.; Bianco, P.; Caterina, J.; Yamada, S.; Kromer, M.; Kuznetsov, S.A.; Mankani, M.; Robey, P.G.; Poole, A.R.; Pidoux, I.; Ward, J.M.; Birkedal-Hansen, H.: "MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover" *Cell* 99 (1999): 81-92
 69. Homma, N.; Ikeuchi, Y.; Suzuki, A.: "Effects of High-Pressure Treatment on the Proteolytic-Enzymes in Meat" *Meat Science* 38 (1994): 219-228
 70. Hoover, D.G.; Metrick, C.; Papineau, A.M.; Farkas, D.F.; Knorr, D.: "Biological Effects of High Hydrostatic-Pressure on Food Microorganisms" *Food Technology* 43 (1989): 99-107
 71. Horowitz, S.M.; Glasser, D.B.; Lane, J.M.; Healey, J.H.: "Prosthetic and extremity survivorship after limb salvage for sarcoma. How long do the reconstructions last?" *Clin. Orthop.* (1993): 280-286
 72. Hosny, G. and Fadel, M.: "Ilizarov external fixator for open fractures of the tibial shaft" *Int. Orthop.* 27 (2003): 303-306
 73. Huhtala, P.; Tuuttila, A.; Chow, L.T.; Lohi, J.; Keski-Oja, J.; Tryggvason, K.: "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 (1991): 16485-16490
 74. Imai, K.; Shikata, H.; Okada, Y.: "Degradation of vitronectin by matrix metalloproteinases-1, -2, -3, -7 and -9" *FEBS Lett.* 369 (1995): 249-251

75. Itoh, T.; Matsuda, H.; Tanioka, M.; Kuwabara, K.; Itohara, S.; Suzuki, R.: "The role of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in antibody-induced arthritis" *J. Immunol.* 169 (2002): 2643-2647
76. Janosch, S.; Kinne-Saffran, E.; Kinne, R.K.H.; inter, R.: "Inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase by Hydrostatic Pressure" in *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology II*, Hsg. Winter, R., Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York (2003): 215-219
77. John, A. and Tuszynski, G.: "The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis" *Pathol. Oncol. Res.* 7 (2001): 14-23
78. Jurkiewicz, E.; Villas-Boas, M.; Silva, J.L.; Weber, G.; Hunsmann, G.; Clegg, R.M.: "Inactivation of simian immunodeficiency virus by hydrostatic pressure" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92 (1995): 6935-6937
79. Katsuda, S.; Okada, Y.; Okada, Y.; Imai, K.; Nakanishi, I.: "Matrix metalloproteinase-9 (92-kd gelatinase/type IV collagenase equals gelatinase B) can degrade arterial elastin" *Am. J. Pathol.* 145 (1994): 1208-1218
80. Kawashima, A.; Nakanishi, I.; Tsuchiya, H.; Roessner, A.; Obata, K.; Okada, Y.: "Expression of matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/type IV collagenase) induced by tumour necrosis factor alpha correlates with metastatic ability in a human osteosarcoma cell line" *Virchows Arch.* 424 (1994): 547-552
81. Kawashima, A.; Okada, Y.; Nakanishi, I.; Ueda, Y.; Iwata, K.; Roessner, A.: "Immunolocalization of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human chondrosarcomas" *Gen. Diagn. Pathol.* 142 (1997): 129-137
82. Kido, A.; Tsutsumi, M.; Iki, K.; Takahama, M.; Tsujiuchi, T.; Morishita, T.; Tamai, S.; Konishi, Y.: "Overexpression of matrix metalloproteinase (MMP)-9 correlates with metastatic potency of spontaneous and 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide (4-HAQO)-induced transplantable osteosarcomas in rats" *Cancer Lett.* 137 (1999): 209-216
83. Kitahara, R.; Sareth, S.; Yamada, H.; Ohmae, E.; Gekko, K.; Akasaka, K.: "High pressure NMR reveals active-site hinge motion of folate-bound *Escherichia coli* dihydrofolate reductase" *Biochemistry* 39 (2000): 12789-12795
84. Kleiner, D.E. and Stetler-Stevenson, W.G.: "Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases" *Anal. Biochem.* 218 (1994): 325-329
85. Knaepler, H.; Haas, H.; Puschel, H.U.: "Biomechanische Eigenschaften thermisch und radioaktiv behandelte Spongiosa" *Unfallchirurgie* 17 (1991): 194-199

86. Knaepler, H.; von Garrel, T.; Gotzen, L.: Untersuchungen zur Desinfektion und STerilisation allogener Knochentransplantate , Hsg. Knaepler, H., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (1994) : 44-49
87. Knaepler, H.; von Garrel, T.; Gotzen, L.: Untersuchungen zur Desinfektion und Sterilisation allogener Knochentransplantate , Hsg. Knaepler, H., Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York (1994) : 72-73
88. Knaepler, H.; von Garrel, T.; Gürtler, L.: "Die allogene Knochentransplantation - eine aktuelle Standortbestimmung" Deutsches Ärzteblatt 91 (1994): 1052-1057
89. Knaepler, H.; von Garrel, T.; Seipp, H.M.; Ascherl, R.: "Experimentelle Untersuchungen zur thermischen Desinfektion und Sterilisation allogener Konchentransplantate und deren Auswirkungen auf die biologische Wertigkeit" Unfallchirurg 95 (1992): 477-484
90. Knauper, V.; Smith, B.; Lopez-Otin, C.; Murphy, G.: "Activation of progelatinase B (proMMP-9) by active collagenase-3 (MMP-13)" Eur. J. Biochem. 248 (1997): 369-373
91. Knauper, V.; Triebel, S.; Reinke, H.; Tschesche, H.: "Inactivation of Human Plasma CI-Inhibitor by Human-Pmn Leukocyte Matrix Metalloproteinases" Febs Letters 290 (1991): 99-102
92. Knorr, D.: "Novel approaches in food-processing technology: new technologies for preserving foods and modifying function" Curr Opin Biotechnol. 10 (1999): 485-491
93. Knorr, D.; Ade-Omowaye, B.I.; Heinz, V.: "Nutritional improvement of plant foods by non-thermal processing" Proc. Nutr. Soc. 61 (2002): 311-318
94. Koivunen, E.; Arap, W.; Valtanen, H.; Rainisalo, A.; Medina, O.P.; Heikkila, P.; Kantor, C.; Gahmberg, C.G.; Salo, T.; Konttinen, Y.T.; Sorsa, T.; Ruoslahti, E.; Pasqualini, R.: "Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor" Nat. Biotechnol. 17 (1999): 768-774
95. Kornblatt, J.A.; Kornblatt, M.J.; Clery, C.; Balny, C.: "The effects of hydrostatic pressure on the conformation of plasminogen" Eur. J Biochem. 265 (1999): 120-126
96. Kossakowska, A.E.; Edwards, D.R.; Prusinkiewicz, C.; Zhang, M.C.; Guo, D.; Urbanski, S.J.; Grogan, T.; Marquez, L.A.; Janowska-Wieczorek, A.: "Interleukin-6 regulation of matrix metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) expression in malignant non-Hodgkin's lymphomas" Blood 94 (1999): 2080-2089
97. Kunugi, S.: "Modification of Biopolymer Functions by High-Pressure" Progress in Polymer Science 18 (1993): 805-838

98. Kunugi, S.; Fukuda, M.; Ise, N.: "Pressure-Dependence of Trypsin-Catalyzed Hydrolyses of Specific Substrates" *Biochimica et Biophysica Acta* 704 (1982): 107-113
99. Kunugi, S.; Ikeuchi, H.; Oda, K.: "Comparison of the Pressure-Temperature Behavior of Neutral Proteases from Thermophilic and Psychrophilic Bacteria" in *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology*, Hsg. Ludwig, H., Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York (1999): 187-190
100. Kusano, K.; Miyaura, C.; Inada, M.; Tamura, T.; Ito, A.; Nagase, H.; Kamoi, K.; Suda, T.: "Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, and -13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption" *Endocrinology* 139 (1998): 1338-1345
101. Lacraz, S.; Isler, P.; Vey, E.; Welgus, H.G.; Dayer, J.M.: "Direct contact between T lymphocytes and monocytes is a major pathway for induction of metalloproteinase expression" *J. Biol Chem.* 269 (1994): 22027-22033
102. Lambert, Y.; Demazeau, G.; Largeteau, A.; Bouvier, J.M.: "Changes in aromatic volatile composition of strawberry after high pressure treatment" *Food Chemistry* 67 (1999): 7-16
103. Levi, E.; Fridman, R.; Miao, H.Q.; Ma, Y.S.; Yayon, A.; Vlodavsky, I.: "Matrix metalloproteinase 2 releases active soluble ectodomain of fibroblast growth factor receptor 1" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93 (1996): 7069-7074
104. Liu, Z.; Zhou, X.; Shapiro, S.D.; Shipley, J.M.; Twining, S.S.; Diaz, L.A.; Senior, R.M.; Werb, Z.: "The serpin alpha1-proteinase inhibitor is a critical substrate for gelatinase B/MMP-9 in vivo" *Cell* 102 (2000): 647-655
105. Löffler, G. and Petrides, P.E.: *Biochemie und Pathobiochemie*, Hsg. Löffler, G. and Petrides, P. E., Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York (2002) 7. Auflage: 57-58
106. Lutun, A. and Carmeliet, P.: "Genetic studies on the role of proteinases and growth factors in atherosclerosis and aneurysm formation" *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 947 (2001): 124-132
107. Mainardi, C.L.; Seyer, J.M.; Kang, A.H.: "Type-specific collagenolysis: a type V collagen-degrading enzyme from macrophages" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97 (1980): 1108-1115
108. Makita, T.: "Application of High-Pressure and Thermophysical Properties of Water to Biotechnology" *Fluid Phase Equilibria* 76 (1992): 87-95
109. Martin, D.C.; Fowlkes, J.L.; Babic, B.; Khokha, R.: "Insulin-like growth factor II signaling in neoplastic proliferation is blocked by transgenic

- expression of the metalloproteinase inhibitor TIMP-1" *J. Cell Biol* 146 (1999): 881-892
110. Masson, P.; Tonello, C.; Balny, C.: "High-Pressure Biotechnology in Medicine and Pharmaceutical Science" *J. Biomed. Biotechnol.* 1 (2001): 85-88
111. Masuhara, K.; Bak, L.S.; Nakai, T.; Sugano, N.; Ochi, T.; Sasaguri, Y.: "Matrix metalloproteinases in patients with osteoarthritis of the hip" *Int. Orthop.* 24 (2000): 92-96
112. McCawley, L.J. and Matrisian, L.M.: "Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore!" *Curr Opin Cell Biol* 13 (2001): 534-540
113. Meikle, M.C.; Bord, S.; Hembry, R.M.; Compston, J.; Croucher, P.I.; Reynolds, J.J.: "Human osteoblasts in culture synthesize collagenase and other matrix metalloproteinases in response to osteotropic hormones and cytokines" *J. Cell Sci.* 103 (Pt 4) (1992): 1093-1099
114. Mertens, B.: "Developments in High Pressure Food Processing" *Zeitschrift für Lebensmittel Technologie* 44 (1993): 100-104
115. Meschede, D.: *Gerthsen Physik*, Hsg. Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York (2004) 22. Auflage: 266
116. Meyer-Pittroff, R.: "High Pressure Applications in Medicine" in *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology II*, Hsg. Winter, R., Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York (2003): 295-305
117. Michels, P.C.; Hei, D.; Clark, D.S.: "Pressure effects on enzyme activity and stability at high temperatures" *Adv. Protein Chem.* 48 (1996): 341-376
118. Mittelmeier, H.; Mittelmeier, W.; Gleitz, M.: "Xenogenic deproteinized bone substitute Pyrost. Experimental basics and 13 years of clinical experience in more than 1000 cases" *Orthopaede* 27 (1998): 126-135
119. Mittelmeier, W.; Braun, C.; Gradinger, R.: "Fractures of the lower leg with bony defects - Various methods of bone reconstruction" *Chirurg* 67 (1996): 1087-1092
120. Mittermayer, F.; Krepler, P.; Dominkus, M.; Schwameis, E.; Sluga, M.; Heinzl, H.; Kotz, R.: "Long-term followup of uncemented tumor endoprostheses for the lower extremity" *Clin. Orthop.* (2001): 167-177
121. Morild, E.: "The theory of pressure effects on enzymes" *Adv. Protein Chem.* 34 (1981): 93-166
122. Moursi, A.M.; Globus, R.K.; Damsky, C.H.: "Interactions between integrin receptors and fibronectin are required for calvarial osteoblast differentiation in vitro" *J Cell Sci.* 110 (Pt 18) (1997): 2187-2196
123. Mozhaev, V.V.; Heremans, K.; Frank, J.; Masson, P.; Balny, C.: "High pressure effects on protein structure and function" *Proteins* 24 (1996): 81-91

124. Mozhaev, V.V.; Lange, R.; Kudryashova, E.V.; Balny, C.: "Application of high hydrostatic pressure for increasing activity and stability of enzymes" *Biotechnology and Bioengineering* 52 (1996): 320-331
125. Muhs, B.E.; Plitas, G.; Delgado, Y.; Ianus, I.; Shaw, J.P.; Adelman, M.A.; Lamparello, P.; Shamamian, P.; Gagne, P.: "Temporal expression and activation of matrix metalloproteinases-2, -9, and membrane type 1-matrix metalloproteinase following acute hindlimb ischemia" *J. Surg. Res.* 111 (2003): 8-15
126. Murphy, G.: "Matrix metalloproteinases and their inhibitors" *Acta Orthop. Scand. Suppl* 266 (1995): 55-60
127. Murphy, G. and Crabbe, T.: "Gelatinases A and B" *Methods Enzymol.* 248 (1995): 470-484
128. Murphy, G.; Stanton, H.; Cowell, S.; Butler, G.; Knauper, V.; Atkinson, S.; Gavrilovic, J.: "Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation" *APMIS* 107 (1999): 38-44
129. Nagase, H.: "Activation mechanisms of matrix metalloproteinases" *Biol Chem.* 378 (1997): 151-160
130. Nakagami, T.; Ohno, H.; Shigehisa, T.; Otake, T.; Mori, H.; Kawahata, T.; Morimoto, M.; Ueba, N.: "Inactivation of human immunodeficiency virus by high hydrostatic pressure" *Transfusion* 36 (1996): 475-476
131. Nakagami, T.; Shigehisa, T.; Ohmori, T.; Taji, S.; Hase, A.; Kimura, T.; Yamanishi, K.: "Inactivation of herpes viruses by high hydrostatic pressure" *J Virol. Methods* 38 (1992): 255-261
132. Nakashima, Y.; Sun, D.H.; Maloney, W.J.; Goodman, S.B.; Schurman, D.J.; Smith, R.L.: "Induction of matrix metalloproteinase expression in human macrophages by orthopaedic particulate debris in vitro" *J. Bone Joint Surg. Br.* 80 (1998): 694-700
133. Natarajan, M.V.; Sivaseelam, A.; Rajkumar, G.; Hussain, S.H.: "Custom megaprosthesis replacement for proximal tibial tumours" *Int. Orthop.* 27 (2003): 334-337
134. Nitsch, M.; Gabrijelcic, D.; Tschesche, H.: "Separation of granule subpopulations in human polymorphonuclear leukocytes" *Biol Chem. Hoppe Seyler* 371 (1990): 611-615
135. Ogata, Y.; Enghild, J.J.; Nagase, H.: "Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9" *J. Biol Chem.* 267 (1992): 3581-3584
136. Ohmori, T.; Shigehisa, T.; Taji, S.; Hayashi, R.: "Effect of High-Pressure on the Protease Activities in Meat" *Agricultural and Biological Chemistry* 55 (1991): 357-361
137. Okada, Y.; Gonoji, Y.; Naka, K.; Tomita, K.; Nakanishi, I.; Iwata, K.; Yamashita, K.; Hayakawa, T.: "Matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/type IV collagenase) from HT 1080 human fibrosarcoma

- cells. Purification and activation of the precursor and enzymic properties" *J. Biol Chem.* 267 (1992): 21712-21719
138. Okada, Y.; Naka, K.; Kawamura, K.; Matsumoto, T.; Nakanishi, I.; Fujimoto, N.; Sato, H.; Seiki, M.: "Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenase = gelatinase B) in osteoclasts: implications for bone resorption" *Lab Invest* 72 (1995): 311-322
139. Okumura, Y.; Sato, H.; Seiki, M.; Kido, H.: "Proteolytic activation of the precursor of membrane type 1 matrix metalloproteinase by human plasmin. A possible cell surface activator" *FEBS Lett.* 402 (1997): 181-184
140. Oliveira, A.C.; Gaspar, L.P.; Da Poian, A.T.; Silva, J.L.: "Arc repressor will not denature under pressure in the absence of water" *J Mol. Biol* 240 (1994): 184-187
141. Ortega, N.; Behonick, D.; Stickens, D.; Werb, Z.: "How proteases regulate bone morphogenesis" *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 995 (2003): 109-116
142. Palmer, S.H.; Gibbons, C.L.; Athanasou, N.A.: "The pathology of bone allograft" *J. Bone Joint Surg. Br.* 81 (1999): 333-335
143. Parikh, S.N.: "Bone graft substitutes: past, present, future" *J. Postgrad. Med.* 48 (2002): 142-148
144. Parsons, S.L.; Watson, S.A.; Brown, P.D.; Collins, H.M.; Steele, R.J.: "Matrix metalloproteinases" *Br. J. Surg.* 84 (1997): 160-166
145. Patterson, B.C. and Sang, Q.A.: "Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9)" *J. Biol Chem.* 272 (1997): 28823-28825
146. Peng, T.S.; Qiu, J.S.; Wu, H.X.; Liang, H.Z.; Luo, C.Q.: "[Expressions of CD44s, MMP-9, and Ki-67: possible association with invasion, metastasis, and recurrence of osteosarcoma]" *Ai. Zheng.* 21 (2002): 745-750
147. Perrett, S. and Zhou, J.M.: "Expanding the pressure technique: insights into protein folding from combined use of pressure and chemical denaturants" *Biochim. Biophys. Acta* 1595 (2002): 210-223
148. Peschon, J.J.; Slack, J.L.; Reddy, P.; Stocking, K.L.; Sunnarborg, S.W.; Lee, D.C.; Russell, W.E.; Castner, B.J.; Johnson, R.S.; Fitzner, J.N.; Boyce, R.W.; Nelson, N.; Kozlosky, C.J.; Wolfson, M.F.; Rauch, C.T.; Cerretti, D.P.; Paxton, R.J.; March, C.J.; Black, R.A.: "An essential role for ectodomain shedding in mammalian development" *Science* 282 (1998): 1281-1284
149. Proost, P.; Van Damme, J.; Opdenakker, G.: "Leukocyte gelatinase B cleavage releases encephalitogens from human myelin basic protein" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192 (1993): 1175-1181

150. Pucci-Minafra, I.; Minafra, S.; La Rocca, G.; Barranca, M.; Fontana, S.; Alaimo, G.; Okada, Y.: "Zymographic analysis of circulating and tissue forms of colon carcinoma gelatinase A (MMP-2) and B (MMP-9) separated by mono- and two-dimensional electrophoresis" *Matrix Biol* 20 (2001): 419-427
151. Rantala-Ryhanen, S.; Ryhanen, L.; Nowak, F.V.; Uitto, J.: "Proteinases in human polymorphonuclear leukocytes. Purification and characterization of an enzyme which cleaves denatured collagen and a synthetic peptide with a Gly-Ile sequence" *Eur. J. Biochem.* 134 (1983): 129-137
152. Rao, V.H.; Singh, R.K.; Bridge, J.A.; Neff, J.R.; Schaefer, G.B.; Delimont, D.C.; Dunn, C.M.; Sanger, W.G.; Buehler, B.A.; Sawaya, R.; Nicolson, G.L.; Rao, J.S.: "Regulation of MMP-9 (92 kDa type IV collagenase/gelatinase B) expression in stromal cells of human giant cell tumor of bone" *Clin. Exp. Metastasis* 15 (1997): 400-409
153. Rao, V.H.; Singh, R.K.; Delimont, D.C.; Finnell, R.H.; Bridge, J.A.; Neff, J.R.; Garvin, B.P.; Pickering, D.L.; Sanger, W.G.; Buehler, B.A.; Schaefer, G.B.: "Transcriptional regulation of MMP-9 expression in stromal cells of human giant cell tumor of bone by tumor necrosis factor- α " *Int. J. Oncol.* 14 (1999): 291-300
154. Rao, V.H.; Singh, R.K.; Delimont, D.C.; Schaefer, G.B.; Bridge, J.A.; Neff, J.R.; Sanger, W.G.; Sappenfield, J.W.; Buehler, B.A.; Finnell, R.H.: "Interleukin-1 β upregulates MMP-9 expression in stromal cells of human giant cell tumor of bone" *J. Interferon Cytokine Res.* 19 (1999): 1207-1217
155. Reddi, A.H.; Wientroub, S.; Muthukumaran, N.: "Biologic principles of bone induction" *Orthop. Clin. North Am.* 18 (1987): 207-212
156. Reponen, P.; Sahlberg, C.; Munaut, C.; Thesleff, I.; Tryggvason, K.: "High expression of 92-kD type IV collagenase (gelatinase B) in the osteoclast lineage during mouse development" *J. Cell Biol* 124 (1994): 1091-1102
157. Rice, D.P.; Kim, H.J.; Thesleff, I.: "Detection of gelatinase B expression reveals osteoclastic bone resorption as a feature of early calvarial bone development" *Bone* 21 (1997): 479-486
158. Rifas, L.; Fausto, A.; Scott, M.J.; Avioli, L.V.; Welgus, H.G.: "Expression of metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human osteoblast-like cells: differentiation is associated with repression of metalloproteinase biosynthesis" *Endocrinology* 134 (1994): 213-221
159. Rosenberg, G.A.: "Matrix metalloproteinases and neuroinflammation in multiple sclerosis" *Neuroscientist.* 8 (2002): 586-595
160. Rueger, J.M.: "[Bone substitution materials. Current status and prospects]" *Orthopade* 27 (1998): 72-79

161. Russell, R.E.; Culpitt, S.V.; DeMatos, C.; Donnelly, L.; Smith, M.; Wiggins, J.; Barnes, P.J.: "Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease" *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* 26 (2002): 602-609
162. Salaszyk, R.M.; Williams, W.A.; Boskey, A.; Batorsky, A.; Plopper, G.E.: "Adhesion to Vitronectin and Collagen I Promotes Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells" *J Biomed. Biotechnol.* 2004 (2004): 24-34
163. San Martin, M.F.; Barbosa-Canovas, G.V.; Swanson, B.G.: "Food processing by high hydrostatic pressure" *Crit Rev. Food Sci. Nutr.* 42 (2002): 627-645
164. Sanjay, B.K.; Moreau, P.G.; Younge, D.A.: "Reimplantation of autoclaved tumour bone in limb salvage surgery" *Int. Orthop.* 21 (1997): 291-297
165. Saren, P.; Welgus, H.G.; Kovanen, P.T.: "TNF-alpha and IL-1beta selectively induce expression of 92-kDa gelatinase by human macrophages" *J. Immunol.* 157 (1996): 4159-4165
166. Schonbeck, U.; Mach, F.; Libby, P.: "Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing" *J. Immunol.* 161 (1998): 3340-3346
167. Seandel, M.; Noack-Kunmann, K.; Zhu, D.; Aimes, R.T.; Quigley, J.P.: "Growth factor-induced angiogenesis in vivo requires specific cleavage of fibrillar type I collagen" *Blood* 97 (2001): 2323-2332
168. Seki, K. and Toyoshima, M.: "Preserving tardigrades under pressure" *Nature* 395 (1998): 853-854
169. Selman, J.: "New Technologies for the Food Industry" *Food Science Technology Today* 6 (1992): 205-209
170. Sheu, B.C.; Hsu, S.M.; Ho, H.N.; Lien, H.C.; Huang, S.C.; Lin, R.H.: "A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression" *Cancer Res.* 61 (2001): 237-242
171. Silva, J.L.; Foguel, D.; Da Poian, A.T.; Prevelige, P.E.: "The use of hydrostatic pressure as a tool to study viruses and other macromolecular assemblages" *Curr Opin Struct. Biol* 6 (1996): 166-175
172. Simonds, R.J.; Holmberg, S.D.; Hurwitz, R.L.; Coleman, T.R.; Bottenfield, S.; Conley, L.J.; Kohlenberg, S.H.; Castro, K.G.; Dahan, B.A.; Schable, C.A.; .: "Transmission of human immunodeficiency virus type 1 from a seronegative organ and tissue donor" *N. Engl. J. Med.* 326 (1992): 726-732
173. Sires, U.I.; Dublet, B.; Aubert-Foucher, E.; van der, R.M.; Welgus, H.G.: "Degradation of the COL1 domain of type XIV collagen by 92-kDa gelatinase" *J. Biol Chem.* 270 (1995): 1062-1067

174. Sopata, I. and Danczewicz, A.M.: "Presence of a gelatin-specific proteinase and its latent form in human leucocytes" *Biochim. Biophys. Acta* 370 (1974): 510-523
175. Sorger, J.I.; Hornicek, F.J.; Zavatta, M.; Menzner, J.P.; Gebhardt, M.C.; Tomford, W.W.; Mankin, H.J.: "Allograft fractures revisited" *Clin. Orthop.* (2001): 66-74
176. Sottrup-Jensen, L.: "Alpha-macroglobulins: structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation" *J. Biol Chem.* 264 (1989): 11539-11542
177. Steinhauser, E.; Hadaller, M.; Diehl, P.; Bluemelhuber, G.; Busch, R.; Mittelmeier, W.: "Effect of High Hydrostatic Pressure Treatment on the Mechanical Properties of Human Bone: A Biomechanical Investigation" *J. Bone Miner. Res.* (2004): eingereicht
178. Sternlicht, M.D. and Werb, Z.: "How matrix metalloproteinases regulate cell behavior" *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* 17 (2001): 463-516
179. Stetler-Stevenson, W.G.; Liotta, L.A.; Kleiner, D.E., Jr.: "Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis" *FASEB J.* 7 (1993): 1434-1441
180. Streuli, C.: "Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation" *Curr Opin Cell Biol* 11 (1999): 634-640
181. Sugimoto, M.; Takahashi, S.; Toguchida, J.; Kotoura, Y.; Shibamoto, Y.; Yamamuro, T.: "Changes in bone after high-dose irradiation. Biomechanics and histomorphology" *J. Bone Joint Surg. Br.* 73 (1991): 492-497
182. Summers, B.N. and Eisenstein, S.M.: "Donor site pain from the ilium. A complication of lumbar spine fusion" *J. Bone Joint Surg. Br.* 71 (1989): 677-680
183. Sutherland, A.G.; Raafat, A.; Yates, P.; Hutchison, J.D.: "Infection associated with the use of allograft bone from the north east Scotland Bone Bank" *J. Hosp. Infect.* 35 (1997): 215-222
184. Sys, G.; Uyttendaele, D.; Poffyn, B.; Verdonk, R.; Verstraete, L.: "Extracorporeally irradiated autografts in pelvic reconstruction after malignant tumour resection" *Int. Orthop.* 26 (2002): 174-178
185. Takagi, M.: "Neutral proteinases and their inhibitors in the loosening of total hip prostheses" *Acta Orthop. Scand. Suppl* 271 (1996): 3-29
186. Tauc, P.; Mateo, C.R.; Brochon, J.C.: "Investigation of the effect of high hydrostatic pressure on proteins and lipidic membranes by dynamic fluorescence spectroscopy" *Biochim. Biophys. Acta* 1595 (2002): 103-115
187. Tauscher, B.: "Pasteurization of Food by Hydrostatic High-Pressure - Chemical Aspects" *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung* 200 (1995): 3-13

188. Teronen, O.; Heikkila, P.; Konttinen, Y.T.; Laitinen, M.; Salo, T.; Hanemaaijer, R.; Teronen, A.; Maisi, P.; Sorsa, T.: "MMP inhibition and downregulation by bisphosphonates" *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 878 (1999): 453-465
189. Tezuka, K.; Nemoto, K.; Tezuka, Y.; Sato, T.; Ikeda, Y.; Kobori, M.; Kawashima, H.; Eguchi, H.; Hakeda, Y.; Kumegawa, M.: "Identification of matrix metalloproteinase 9 in rabbit osteoclasts" *J. Biol Chem.* 269 (1994): 15006-15009
190. Tipler, P.A.: *Physik (deutsche Ausgabe)*, Hsg. Gerlik, D. and Jerke, G., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg - Berlin - Oxford (1994) 1. Auflage: 347
191. Triebel, S.; Blaser, J.; Reinke, H.; Knauper, V.; Tschesche, H.: "Mercurial activation of human PMN leucocyte type IV procollagenase (gelatinase)" *FEBS Lett.* 298 (1992): 280-284
192. Tschesche, H.; Fedrowitz, J.; Kohnert, U.; Michaelis, J.; Macartney, H.W.: "Matrix degrading proteinases from human granulocytes: type I, II, III collagenase, gelatinase and type IV, V-collagenase. A survey of recent findings and inhibition by gamma-anticollagenase" *Folia Histochem. Cytobiol.* 24 (1986): 125-131
193. Tschesche, H.; Knauper, V.; Kramer, S.; Michaelis, J.; Oberhoff, R.; Reinke, H.: "Latent collagenase and gelatinase from human neutrophils and their activation" *Matrix Suppl* 1 (1992): 245-255
194. Tumber, A.; Papaioannou, S.; Breckon, J.; Meikle, M.C.; Reynolds, J.J.; Hill, P.A.: "The effects of serine proteinase inhibitors on bone resorption in vitro" *J Endocrinol.* 178 (2003): 437-447
195. Turini, P.; Kurooka, S.; Steer, M.; Corbascio, A.N.; Singer, T.P.: "The action of phenylmethylsulfonyl fluoride on human acetylcholinesterase, chymotrypsin and trypsin" *J Pharmacol. Exp. Ther.* 167 (1969): 98-104
196. Uchida, M.; Shima, M.; Shimoaka, T.; Fujieda, A.; Obara, K.; Suzuki, H.; Nagai, Y.; Ikeda, T.; Yamato, H.; Kawaguchi, H.: "Regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) by bone resorptive factors in osteoblastic cells" *J. Cell Physiol* 185 (2000): 207-214
197. Ueda, Y.; Imai, K.; Tsuchiya, H.; Fujimoto, N.; Nakanishi, I.; Katsuda, S.; Seiki, M.; Okada, Y.: "Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B) is expressed in multinucleated giant cells of human giant cell tumor of bone and is associated with vascular invasion" *Am. J Pathol.* 148 (1996): 611-622
198. Urist, M.R. and Hernandez, A.: "Excitation transfer in bone. Deleterious effects of cobalt 60 radiation-sterilization of bank bone" *Arch. Surg.* 109 (1974): 586-593

199. Vachon, J.F.; Kheadr, E.E.; Giasson, J.; Paquin, P.; Fliss, I.: "Inactivation of foodborne pathogens in milk using dynamic high pressure" *Journal of Food Protection* 65 (2002): 345-352
200. Van den Steen, P.E.; Dubois, B.; Nelissen, I.; Rudd, P.M.; Dwek, R.A.; Opdenakker, G.: "Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)" *Crit Rev. Biochem. Mol. Biol* 37 (2002): 375-536
201. Verheijen, J.H.; Nieuwenbroek, N.M.; Beekman, B.; Hanemaaijer, R.; Verspaget, H.W.; Ronday, H.K.; Bakker, A.H.: "Modified proenzymes as artificial substrates for proteolytic enzymes: colorimetric assay of bacterial collagenase and matrix metalloproteinase activity using modified pro-urokinase" *Biochem. J* 323 (Pt 3) (1997): 603-609
202. Viceconti, M.; Toni, A.; Brizio, L.; Rubbini, L.; Borrelli, A.: "The effect of autoclaving on the mechanical properties of bank bovine bone" *Chir Organi Mov* 81 (1996): 63-68
203. Vliagoftis, H.: "Thrombin induces mast cell adhesion to fibronectin: evidence for involvement of protease-activated receptor-1" *J. Immunol.* 169 (2002): 4551-4558
204. Voggenreiter, G.; Ascherl, R.; Blumel, G.; Schmit-Neuerburg, K.P.: "Extracorporeal irradiation and incorporation of bone grafts. Autogeneic cortical grafts studied in rats" *Acta Orthop. Scand.* 67 (1996): 583-588
205. Vu, T.H.; Shipley, J.M.; Bergers, G.; Berger, J.E.; Helms, J.A.; Hanahan, D.; Shapiro, S.D.; Senior, R.M.; Werb, Z.: "MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes" *Cell* 93 (1998): 411-422
206. Vu, T.H. and Werb, Z.: "Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology" *Genes Dev.* 14 (2000): 2123-2133
207. Wagner, W.: "International Equations for the Pressure Along the Melting and Along the Sublimation Curve of Ordinary Water Substance" *Journal of Physical and Chemical Reference Data* 23 (1994): 515-525
208. Wahl, L.M. and Corcoran, M.L.: "Regulation of monocyte/macrophage metalloproteinase production by cytokines" *J. Periodontol.* 64 (1993): 467-473
209. Watanabe, M.; Arai, E.; Kumeno, K.; Honma, K.: "A New Method for Producing A Non-Heated Jam Sample - the Use of Freeze Concentration and High-Pressure Sterilization" *Agricultural and Biological Chemistry* 55 (1991): 2175-2176
210. Weeks, J.G.; Halme, J.; Woessner, J.F., Jr.: "Extraction of collagenase from the involuting rat uterus" *Biochim. Biophys. Acta* 445 (1976): 205-214
211. Wilhelm, S.M.; Collier, I.E.; Marmer, B.L.; Eisen, A.Z.; Grant, G.A.; Goldberg, G.I.: "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 (1989): 17213-17221
212. Woessner, J.F., Jr.: "Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling" *FASEB J.* 5 (1991): 2145-2154
213. Woessner, J.F. and Nagase, H.: *Matrix Metalloproteinases and TIMPs*, Hsg. Woessner, J. F., Oxford University Press, Oxford (2000) : 2, 50-63, 109
214. Wucherpfennig, A.L.; Li, Y.P.; Stetler-Stevenson, W.G.; Rosenberg, A.E.; Stashenko, P.: "Expression of 92 kD type IV collagenase/gelatinase B in human osteoclasts" *J. Bone Miner. Res.* 9 (1994): 549-556
215. Yamaguchi, T.; Kuranoshita, K.; Fujii, M.; Yokokawa, Y.; Kimoto, E.: "Inhibition of the proliferation of Ehrlich ascites tumor cells by hydrostatic pressure" *Cancer Biochemistry Biophysics* 15 (1997): 257-261
216. Yao, P.M.; Buhler, J.M.; d'Ortho, M.P.; Lebargy, F.; Delclaux, C.; Harf, A.; Lafuma, C.: "Expression of matrix metalloproteinase gelatinases A and B by cultured epithelial cells from human bronchial explants" *J Biol Chem.* 271 (1996): 15580-15589
217. Yu, Q. and Stamenkovic, I.: "Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion" *Genes Dev.* 13 (1999): 35-48
218. Yu, Q. and Stamenkovic, I.: "Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis" *Genes Dev.* 14 (2000): 163-176
219. Zhou, J.M.; Zhu, L.; Balny, C.: "Inactivation of creatine kinase by high pressure may precede dimer dissociation" *Eur. J. Biochem.* 267 (2000): 1247-1253
220. Zoricic, S.; Bobinac, D.; Lah, B.; Maric, I.; Cvijanovic, O.; Bajek, S.; Golubovic, V.; Mihelic, R.: "Study of the healing process after transplantation of pasteurized bone grafts in rabbits" *Acta Med. Okayama* 56 (2002): 121-128
221. Zucker, S.; Beck, G.; DiStefano, J.F.; Lysik, R.M.: "Role for different cell proteinases in cancer invasion and cytolysis" *Br. J Cancer* 52 (1985): 223-232
222. Zucker, S.; Lysik, R.M.; Zarrabi, M.H.; Greenwald, R.A.; Gruber, B.; Tickle, S.P.; Baker, T.S.; Docherty, A.J.: "Elevated plasma stromelysin levels in arthritis" *J. Rheumatol.* 21 (1994): 2329-2333

Anhang

Ergebnisdaten

Verdünnungsreihe humane MMP-9 - Activity-Assay									
<u>Standardkurve</u>									
MMP-9 (ng/ml)	2	4	8	16	32				
Absorbance 1 t0-Wert	0,101	0,077	0,074	0,091	0,089				
Absorbance 2 t0-Wert	0,1	0,075	0,08	0,09	0,069				
Absorbance 1 Messwert	0,145	0,167	0,28	0,434	0,698				
Absorbance 2 Messwert	0,163	0,173	0,257	0,431	0,625				
Messwert 1 - t0-Wert 1	0,044	0,09	0,206	0,343	0,609				
Messwert 2 - t0-Wert 2	0,063	0,098	0,177	0,341	0,556				
Mean Absorbance	0,054	0,094	0,192	0,342	0,583				
Mean δ Absorbance ₄₀₅ x 1000	53,5	94	191,5	342	582,5				
<u>MMP in PBS</u>									
MMP-9 (ng/ml)	2	4	8	16	32	64	128	256	
Absorbance 1 t0-Wert	0,1	0,077	0,083	0,076	0,071	0,115	0,09	0,074	
Absorbance 2 t0-Wert	0,108	0,074	0,085	0,071	0,084	0,096	0,085	0,072	
Absorbance 1 Messwert	0,131	0,111	0,103	0,099	0,111	0,203	0,276	0,551	
Absorbance 2 Messwert	0,105	0,095	0,109	0,102	0,125	0,178	0,275	0,54	
Messwert 1 - t0-Wert 1	0,031	0,034	0,02	0,023	0,04	0,088	0,186	0,477	
Messwert 2 - t0-Wert 2	-0,003	0,021	0,024	0,031	0,041	0,082	0,19	0,468	
Mean Absorbance	0,014	0,028	0,022	0,027	0,041	0,085	0,188	0,473	
Mean δ Absorbance ₄₀₅ x 1000	14	27,5	22	27	40,5	85	188	472,5	
<u>MMP in PBS/BSA</u>									
MMP-9 (ng/ml)	2	4	8	16	32	64	128	256	
Absorbance 1 t0-Wert	0,074	0,088	0,081	0,106	0,081	0,085	0,083	0,084	
Absorbance 2 t0-Wert	0,072	0,087	0,083	0,086	0,074	0,069	0,075	0,083	
Absorbance 1 Messwert	0,098	0,12	0,125	0,195	0,235	0,341	0,501	0,793	
Absorbance 2 Messwert	0,107	0,123	0,158	0,187	0,213	0,314	0,487	0,772	
Messwert 1 - t0-Wert 1	0,024	0,032	0,044	0,089	0,154	0,256	0,418	0,709	
Messwert 2 - t0-Wert 2	0,035	0,036	0,075	0,101	0,139	0,245	0,412	0,689	
Mean Absorbance	0,03	0,034	0,06	0,095	0,147	0,251	0,415	0,699	
Mean δ Absorbance ₄₀₅ x 1000	29,5	34	59,5	95	146,5	250,5	415	699	
<u>MMP in Enzympuffer</u>									
MMP-9 (ng/ml)	2	4	8	16	32	64	128	256	
Absorbance 1 t0-Wert	0,071	0,067	0,066	0,071	0,079	0,081	0,081	0,065	
Absorbance 2 t0-Wert	0,076	0,081	0,067	0,079	0,071	0,071	0,069	0,067	
Absorbance 1 Messwert	0,098	0,12	0,138	0,198	0,249	0,351	0,499	0,817	
Absorbance 2 Messwert	0,107	0,123	0,162	0,188	0,252	0,323	0,481	0,812	
Messwert 1 - t0-Wert 1	0,027	0,053	0,072	0,127	0,17	0,27	0,418	0,752	
Messwert 2 - t0-Wert 2	0,031	0,042	0,095	0,109	0,181	0,252	0,412	0,745	
Mean Absorbance	0,029	0,048	0,084	0,118	0,176	0,261	0,415	0,749	
Mean δ Absorbance ₄₀₅ x 1000	29	47,5	83,5	118	175,5	261	415	748,5	

Verdünnungsreihe rekombinante MMP-9 - Activity-Assay								
<u>Standardkurve</u>								
MMP-9 (ng/ml)	2	4	8	16	32			
Absorbance 1 t0-Wert	0,059	0,063	0,057	0,067	0,059			
Absorbance 2 t0-Wert	0,06	0,081	0,059	0,059	0,058			
Absorbance 1 Messwert	0,095	0,153	0,241	0,469	0,729			
Absorbance 2 Messwert	0,131	0,174	0,306	0,573	0,85			
Messwert 1 - t0-Wert 1	0,036	0,09	0,184	0,402	0,67			
Messwert 2 - t0-Wert 2	0,071	0,093	0,247	0,514	0,792			
Mean Absorbance	0,054	0,092	0,216	0,458	0,731			
Mean Δ Absorbance ₄₀₅ x 1000	53,5	91,5	215,5	458	731			
<u>MMP in PBS</u>								
MMP-9 (ng/ml)	2	4	8	16	32	64	128	256
Absorbance 1 t0-Wert	0,059	0,059	0,062	0,06	0,061	0,06	0,056	0,064
Absorbance 2 t0-Wert	0,058	0,059	0,057	0,062	0,059	0,061	0,058	0,059
Absorbance 1 Messwert	0,071	0,085	0,09	0,138	0,198	0,268	0,362	0,608
Absorbance 2 Messwert	0,074	0,082	0,081	0,14	0,187	0,27	0,376	0,58
Messwert 1 - t0-Wert 1	0,012	0,026	0,028	0,078	0,137	0,208	0,306	0,544
Messwert 2 - t0-Wert 2	0,016	0,023	0,024	0,078	0,128	0,209	0,318	0,501
Mean Absorbance	0,014	0,025	0,026	0,078	0,133	0,209	0,312	0,523
Mean Δ Absorbance ₄₀₅ x 1000	14	24,5	26	78	132,5	208,5	312	522,5
<u>MMP in PBS/BSA</u>								
MMP-9 (ng/ml)	2	4	8	16	32	64	128	256
Absorbance 1 t0-Wert	0,068	0,062	0,07	0,064	0,059	0,066	0,064	0,064
Absorbance 2 t0-Wert	0,063	0,062	0,064	0,065	0,066	0,059	0,061	0,068
Absorbance 1 Messwert	0,084	0,088	0,147	0,191	0,267	0,4	0,635	0,791
Absorbance 2 Messwert	0,079	0,095	0,135	0,202	0,289	0,389	0,614	0,769
Messwert 1 - t0-Wert 1	0,016	0,026	0,077	0,127	0,208	0,334	0,571	0,727
Messwert 2 - t0-Wert 2	0,016	0,033	0,071	0,137	0,223	0,33	0,553	0,701
Mean Absorbance	0,016	0,03	0,074	0,132	0,216	0,332	0,562	0,714
Mean Δ Absorbance ₄₀₅ x 1000	16	29,5	74	132	215,5	332	562	714
<u>MMP in Enzympuffer</u>								
MMP-9 (ng/ml)	2	4	8	16	32	64	128	256
Absorbance 1 t0-Wert	0,061	0,059	0,059	0,061	0,06	0,066	0,066	0,063
Absorbance 2 t0-Wert	0,058	0,059	0,062	0,06	0,061	0,062	0,058	0,058
Absorbance 1 Messwert	0,075	0,085	0,157	0,264	0,369	0,62	0,813	1,011
Absorbance 2 Messwert	0,07	0,085	0,155	0,232	0,416	0,678	0,772	0,96
Messwert 1 - t0-Wert 1	0,014	0,026	0,098	0,203	0,309	0,554	0,747	0,948
Messwert 2 - t0-Wert 2	0,012	0,026	0,093	0,172	0,355	0,616	0,714	0,902
Mean Absorbance	0,013	0,026	0,096	0,188	0,332	0,585	0,731	0,925
Mean Δ Absorbance ₄₀₅ x 1000	13	26	95,5	187,5	332	585	730,5	925

Herstellerangaben für MMP-9 Activity-Assay							
MMP-9 (ng/ml)	0	0,5	1	2	4	8	16
Absorbance 1 10-Wert	0,098	0,098	0,098	0,098	0,098	0,098	0,098
Absorbance 2 10-Wert	0,098	0,098	0,098	0,098	0,098	0,098	0,098
Absorbance 1 Messwert	0,098	0,107	0,13	0,145	0,205	0,317	0,575
Absorbance 2 Messwert	0,098	0,1	0,129	0,148	0,2	0,324	0,603
Messwert 1 - 10-Wert 1	0	0,009	0,032	0,047	0,107	0,219	0,477
Messwert 2 - 10-Wert 2	0	0,002	0,031	0,05	0,102	0,226	0,505
Mean Absorbance	0	0,006	0,032	0,049	0,105	0,223	0,491
Mean Δ Absorbance ₄₀₅ x 1000	0	5,5	31,5	48,5	104,5	222,5	491
Standardkurve MMP-9 Activity-Assay							
MMP-9 (ng/ml)	0	1	2	4	8	16	32
Absorbance 1 10-Wert	0,056	0,057	0,066	0,059	0,057	0,058	0,057
Absorbance 2 10-Wert	0,058	0,057	0,057	0,057	0,057	0,058	0,057
Absorbance 1 Messwert	0,085	0,093	0,117	0,146	0,254	0,419	0,656
Absorbance 2 Messwert	0,088	0,1	0,12	0,168	0,256	0,476	0,811
Messwert 1 - 10-Wert 1	0,029	0,036	0,051	0,087	0,197	0,361	0,599
Messwert 2 - 10-Wert 2	0,03	0,043	0,063	0,111	0,199	0,418	0,754
Mean Absorbance	0,03	0,04	0,057	0,099	0,198	0,39	0,677
Mean Δ Absorbance ₄₀₅ x 1000	29,5	39,5	57	99	198	389,5	676,5

Humane MMP-9 nach HHD - Activity-Assay									
<u>1. Messung</u>									
	keine Aktivierung			Aktivierung nach HHD			Aktivierung vor HHD		
Druck (MPa)	0	200	400	0	200	400	0	200	400
Absorbance 1 10-Wert	0,088	0,072	0,108	0,075	0,082	0,087	0,069	0,099	0,077
Absorbance 2 10-Wert	0,08	0,071	0,103	0,073	0,08	0,074	0,071	0,087	0,073
Absorbance 1 Messwert	0,182	0,147	0,165	0,288	0,304	0,316	0,352	0,328	0,275
Absorbance 2 Messwert	0,182	0,147	0,175	0,254	0,301	0,313	0,375	0,323	0,256
Messwert 1 - 10-Wert 1	0,094	0,075	0,057	0,213	0,222	0,229	0,283	0,229	0,198
Messwert 2 - 10-Wert 2	0,102	0,078	0,072	0,181	0,221	0,239	0,304	0,236	0,183
Mean Absorbance	0,098	0,0755	0,0645	0,197	0,2215	0,234	0,2935	0,2325	0,1905
Mean δ Absorbance ₄₀₅ x 1000	98	75,5	64,5	197	221,5	234	293,5	232,5	190,5
<u>2. Messung</u>									
	keine Aktivierung			Aktivierung nach HHD			Aktivierung vor HHD		
Druck (MPa)	0	200	400	0	200	400	0	200	400
Absorbance 1 10-Wert	0,07	0,107	0,072	0,07	0,094	0,064	0,108	0,075	0,068
Absorbance 2 10-Wert	0,068	0,083	0,069	0,082	0,064	0,078	0,072	0,069	0,083
Absorbance 1 Messwert	0,112	0,145	0,103	0,18	0,188	0,195	0,188	0,133	0,131
Absorbance 2 Messwert	0,096	0,116	0,097	0,18	0,188	0,186	0,168	0,14	0,133
Messwert 1 - 10-Wert 1	0,042	0,038	0,031	0,11	0,094	0,131	0,08	0,058	0,063
Messwert 2 - 10-Wert 2	0,028	0,033	0,028	0,098	0,124	0,108	0,096	0,071	0,05
Mean Absorbance	0,035	0,0355	0,0295	0,104	0,109	0,1195	0,088	0,0645	0,0585
Mean δ Absorbance ₄₀₅ x 1000	35	35,5	29,5	104	109	119,5	88	64,5	56,5
<u>3. Messung</u>									
	keine Aktivierung			Aktivierung nach HHD			Aktivierung vor HHD		
Druck (MPa)	0	200	400	0	200	400	0	200	400
Absorbance 1 10-Wert	0,071	0,061	0,061	0,065	0,074	0,066	0,06	0,061	0,061
Absorbance 2 10-Wert	0,06	0,058	0,063	0,059	0,058	0,062	0,07	0,06	0,06
Absorbance 1 Messwert	0,174	0,169	0,154	0,091	0,092	0,1	0,208	0,152	0,172
Absorbance 2 Messwert	0,162	0,148	0,145	0,088	0,108	0,097	0,216	0,175	0,153
Messwert 1 - 10-Wert 1	0,103	0,108	0,093	0,026	0,018	0,034	0,148	0,091	0,111
Messwert 2 - 10-Wert 2	0,102	0,09	0,082	0,029	0,05	0,035	0,146	0,115	0,093
Mean Absorbance	0,1025	0,099	0,0875	0,0275	0,034	0,0345	0,147	0,103	0,102
Mean δ Absorbance ₄₀₅ x 1000	102,5	99	87,5	27,5	34	34,5	147	103	102
<u>4. Messung</u>									
	keine Aktivierung			Aktivierung nach HHD			Aktivierung vor HHD		
Druck (MPa)	0	200	400	0	200	400	0	200	400
Absorbance 1 10-Wert	0,058	0,057	0,057	0,059	0,056	0,058	0,064	0,056	0,057
Absorbance 2 10-Wert	0,062	0,058	0,06	0,057	0,072	0,059	0,067	0,063	0,056
Absorbance 1 Messwert	0,094	0,085	0,084	0,164	0,171	0,178	0,146	0,127	0,109
Absorbance 2 Messwert	0,091	0,09	0,093	0,157	0,188	0,185	0,148	0,134	0,101
Messwert 1 - 10-Wert 1	0,036	0,028	0,027	0,105	0,115	0,118	0,082	0,071	0,052
Messwert 2 - 10-Wert 2	0,029	0,032	0,033	0,1	0,116	0,126	0,081	0,071	0,045
Mean Absorbance	0,0325	0,03	0,03	0,1025	0,1155	0,122	0,0815	0,071	0,0485
Mean δ Absorbance ₄₀₅ x 1000	32,5	30	30	102,5	115,5	122	81,5	71	48,5
<u>5. Messung</u>									
	keine Aktivierung			Aktivierung nach HHD			Aktivierung vor HHD		
Druck (MPa)	0	200	400	0	200	400	0	200	400
Absorbance 1 10-Wert	0,056	0,055	0,056	0,055	0,057	0,056	0,059	0,057	0,075
Absorbance 2 10-Wert	0,057	0,057	0,06	0,064	0,055	0,058	0,061	0,058	0,061
Absorbance 1 Messwert	0,124	0,087	0,086	0,159	0,171	0,179	0,135	0,105	0,124
Absorbance 2 Messwert	0,088	0,09	0,086	0,167	0,178	0,183	0,13	0,115	0,115
Messwert 1 - 10-Wert 1	0,068	0,032	0,03	0,104	0,114	0,123	0,076	0,048	0,049
Messwert 2 - 10-Wert 2	0,031	0,033	0,026	0,103	0,123	0,125	0,069	0,057	0,054
Mean Absorbance	0,0495	0,0325	0,028	0,1035	0,1185	0,124	0,0725	0,0525	0,0515
Mean δ Absorbance ₄₀₅ x 1000	49,5	32,5	28	103,5	118,5	124	72,5	52,5	51,5

Rekombinante MMP-9 nach HHD - Activity-Assay									
1. Messung									
	keine Aktivierung			Aktivierung nach HHD			Aktivierung vor HHD		
Druck (MPa)	0	200	400	0	200	400	0	200	400
Absorbance 1 10-Wert	0,067	0,064	0,095	0,059	0,064	0,073	0,064	0,061	0,064
Absorbance 2 10-Wert	0,059	0,063	0,06	0,069	0,059	0,061	0,059	0,058	0,065
Absorbance 1 Messwert	0,084	0,168	0,208	0,553	1,19	1,207	0,242	0,387	0,628
Absorbance 2 Messwert	0,078	0,268	0,217	0,542	1,08	1,179	0,2	0,294	0,537
Messwert 1 - 10-Wert 1	0,017	0,104	0,113	0,494	1,126	1,134	0,178	0,326	0,584
Messwert 2 - 10-Wert 2	0,019	0,203	0,157	0,473	1,021	1,118	0,141	0,236	0,472
Mean Absorbance	0,018	0,1535	0,135	0,4835	1,0735	1,126	0,1595	0,281	0,518
Mean Δ Absorbance ₄₀₅ x 1000	18	153,5	135	483,5	1074	1126	159,5	281	518
2. Messung									
	keine Aktivierung			Aktivierung nach HHD			Aktivierung vor HHD		
Druck (MPa)	0	200	400	0	200	400	0	200	400
Absorbance 1 10-Wert	0,062	0,06	0,059	0,058	0,06	0,065	0,06	0,062	0,066
Absorbance 2 10-Wert	0,064	0,061	0,059	0,062	0,063	0,063	0,059	0,059	0,06
Absorbance 1 Messwert	0,086	0,241	0,259	0,542	1,249	1,206	0,276	0,462	0,63
Absorbance 2 Messwert	0,087	0,215	0,183	0,61	1,217	1,259	0,235	0,399	0,562
Messwert 1 - 10-Wert 1	0,024	0,181	0,2	0,484	1,189	1,141	0,216	0,4	0,564
Messwert 2 - 10-Wert 2	0,023	0,154	0,124	0,548	1,154	1,196	0,176	0,34	0,502
Mean Absorbance	0,0235	0,1675	0,162	0,516	1,1715	1,1685	0,196	0,37	0,533
Mean Δ Absorbance ₄₀₅ x 1000	23,5	167,5	162	516	1172	1169	196	370	533
3. Messung									
	keine Aktivierung			Aktivierung nach HHD			Aktivierung vor HHD		
Druck (MPa)	0	200	400	0	200	400	0	200	400
Absorbance 1 10-Wert	0,058	0,06	0,058	0,06	0,059	0,059	0,059	0,063	0,061
Absorbance 2 10-Wert	0,068	0,058	0,066	0,105	0,065	0,066	0,063	0,062	0,059
Absorbance 1 Messwert	0,066	0,072	0,083	0,359	0,795	1,131	0,513	0,638	0,654
Absorbance 2 Messwert	0,072	0,07	0,08	0,491	0,682	1,063	0,432	0,609	0,612
Messwert 1 - 10-Wert 1	0,008	0,012	0,025	0,299	0,736	1,072	0,454	0,575	0,593
Messwert 2 - 10-Wert 2	0,004	0,012	0,014	0,386	0,617	0,997	0,369	0,547	0,553
Mean Absorbance	0,006	0,012	0,0195	0,3425	0,6765	1,0345	0,4115	0,561	0,573
Mean Δ Absorbance ₄₀₅ x 1000	6	12	19,5	342,5	676,5	1035	411,5	561	573
4. Messung									
	keine Aktivierung			Aktivierung nach HHD			Aktivierung vor HHD		
Druck (MPa)	0	200	400	0	200	400	0	200	400
Absorbance 1 10-Wert	0,060	0,064	0,059	0,059	0,058	0,059	0,059	0,059	0,058
Absorbance 2 10-Wert	0,059	0,059	0,064	0,059	0,065	0,058	0,058	0,058	0,062
Absorbance 1 Messwert	0,075	0,099	0,135	0,478	0,99	1,25	0,172	0,189	0,21
Absorbance 2 Messwert	0,074	0,112	0,118	0,446	0,655	1,21	0,162	0,166	0,229
Messwert 1 - 10-Wert 1	0,015	0,035	0,076	0,417	0,932	1,191	0,113	0,13	0,152
Messwert 2 - 10-Wert 2	0,015	0,053	0,054	0,387	0,59	1,152	0,104	0,108	0,167
Mean Absorbance	0,015	0,044	0,065	0,402	0,761	1,1715	0,1085	0,119	0,1595
Mean Δ Absorbance ₄₀₅ x 1000	15	44	65	402	761	1172	108,5	119	159,5
5. Messung									
	keine Aktivierung			Aktivierung nach HHD			Aktivierung vor HHD		
Druck (MPa)	0	200	400	0	200	400	0	200	400
Absorbance 1 10-Wert	0,061	0,065	0,057	0,059	0,058	0,065	0,057	0,062	0,06
Absorbance 2 10-Wert	0,057	0,056	0,057	0,059	0,06	0,06	0,061	0,06	0,059
Absorbance 1 Messwert	0,072	0,102	0,116	0,405	0,944	1,29	0,207	0,228	0,278
Absorbance 2 Messwert	0,066	0,114	0,129	0,35	0,641	1,249	0,192	0,199	0,202
Messwert 1 - 10-Wert 1	0,011	0,037	0,059	0,346	0,866	1,225	0,15	0,166	0,218
Messwert 2 - 10-Wert 2	0,009	0,058	0,072	0,291	0,581	1,189	0,131	0,139	0,143
Mean Absorbance	0,01	0,0475	0,0655	0,3185	0,7335	1,207	0,1405	0,1525	0,1805
Mean Δ Absorbance ₄₀₅ x 1000	10	47,5	65,5	318,5	733,5	1207	140,5	152,5	180,5

Danksagung

Für die Entstehung dieser Arbeit danke ich

Herrn Prof. Dr. Wolfram Mittelmeier und Herrn Prof. Dr. Manfred Schmitt für die Überlassung des Themas, die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die zahlreichen konstruktiven Besprechungen,

Herrn Prof. Dr. Reiner Gradinger für die hervorragenden Arbeitsbedingungen in den orthopädischen Laborräumen

sowie der Bayerischen Forschungstiftung für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit im Rahmen des bayerischen Forschungsverbundes für Tissue Engineering und Rapid Prototyping (FORTEPRO).

Weiterhin danke ich besonders

Herrn Dr. Peter Diehl für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und die intensive Betreuung bei Planung, Durchführung und Niederschrift der Arbeit,

Frau Jutta Tübel für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und die immer freundliche Unterstützung bei der praktischen Durchführung der Untersuchungen,

Herrn Dr.-Ing. Gerrit Blümelhuber für die technische Unterstützung an der Hochdruckanlage,

Frau Dipl.-Biol. Charlotte Kopitz für die Unterstützung bei den zymographischen Untersuchungen

sowie Herrn Dr. Michael Hennig für die Beratung in statistischen Fragen.

Lebenslauf

Johannes Schauwecker

Geboren am 8. Februar 1976 in Koblenz

Familienstand: ledig

Schulabschluß

Jun. 1995 Abitur, ev. Gymnasium zum Grauen Kloster, Berlin, Note: 2,0

Wehrdienst

Okt. 1995 – Sep. 1996 Gebirgsjägerbataillon 233, Mittenwald

Studium

Apr. 1997 – Sep. 1999 Medizinische Fakultät der Freien Universität Berlin

Okt. 1999 – Mai 2003 Medizinische Fakultät der Technischen Universität München

Gesamtnote der Ärztlichen Prüfung: gut (2,33)

Praktisches Jahr:

Innere Medizin: Krankenhaus Barmherzige Brüder, München

Chirurgie: Klinikum rechts der Isar der TU München

Orthopädie: Klinikum rechts der Isar der TU München

Promotion

Seit Apr. 2001 Doktorand in der Experimentellen Forschung der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie der TU München, Univ.-Prof. Dr. R. Gradinger

Arzt im Praktikum

Sep. 2003 – Sep. 2004 Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie, Klinikum rechts der Isar der TU München, Univ.-Prof. Dr. R. Gradinger

Assistenzarzt

Seit Okt. 2004 Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie, Klinikum rechts der Isar der TU München, Univ.-Prof. Dr. R. Gradinger

Veröffentlichungen:

Diehl, P.; Reuning, U.; Gollwitzer, H.; Magdolen, U.; Gerdemeyer, L.; Schauwecker, J.; Tuebel, J.; Gradinger, R.; Mittelmeier, W.; Schmitt, M.: "Effect of extracorporeal high hydrostatic pressure on tumor cell adherence and viability" *Oncol. Rep.* 12, 2004: 369-373

Naal, F.D.; Steinhäuser, E.; Schauwecker, J.; Diehl, P.; Mittelmeier, W.: „Tissue Engineering von Knorpel und Knochengewebe: Die Bedeutung von Sauerstoff und Hypoxie.“ *Biomaterialien* 5 (1) 2004: 34-37

Schauwecker, J.; Diehl, P.; Bluemelhuber, G.; Meyer-Pittroff, R.; Gollwitzer, H.; Schmitt, M.; Mittelmeier, W.: „Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on matrix metalloproteinase 9 (MMP-9)“ Poster: Chirurgische Forschungstage, Köln, 2002