

**Die Expression und Aktivität von
Matrix Metalloproteinase-1 wird durch
Stickstoffmonoxid, reduzierte Thiole und
Zytokine reguliert**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Sabine Koch
aus Essen

Düsseldorf 2006

Aus dem Institut für Molekulare Medizin, Forschungsgruppe Immunbiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Referent: PD Dr. Christoph V. Suschek

Koreferent: Prof. Dr. Heinz Mehlhorn

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Januar 2007

Danksagungen

Bei Frau Prof. Kolb-Bachofen, der Leiterin der Arbeitsgruppe für Immunbiologie, möchte ich mich dafür, dass ich die Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe anfertigen konnte, für die viele hilfreichen Tips und Tricks und für viele Anregungen bedanken.

Insbesondere danke ich Herrn Dr. Christoph Suschek für die Überlassung des interessanten Themas, die Betreuung meiner Arbeit, für die Unterstützung während dieser Zeit und seine Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Mehlhorn danke ich sehr für die Übernahme der Betreuung meiner Arbeit an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine Universität.

Dank gebührt auch den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, für die gute Zusammenarbeit, die Unterstützung im Labor und die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Zu Schluss möchte ich allen Freunden danken, die mich auf ganz unterschiedliche Art und Weise unterstützt und begleitet haben, und die so zur Entstehung dieser Dissertation beigetragen haben. Ein ganz besonders großes Dankeschön geht an meine Eltern, die mich immer unterstützt und mit Rat und Tat begleitet haben.

Teile dieser Dissertation wurden veröffentlicht:

Publikationen

Koch S, Suschek CV, Kolb-Bachofen V
"Mechanisms of S-nitrosation-dependent regulation of MMP-1 activity"
Eur J Cell Biol, Vol. 85: S1, Suppl. 56 (Meeting Abstract)

Kongresse, Workshops, etc:

2006

- 2. Französisch-deutsches NO. Treffen/ 11. NO-Forum, Hamburg
„S-Nitrosation-dependent regulation of MMP-1 activity: Impact of UVA-induced decomposition of Nitrite“ (Vortrag)
- 29. Treffen der deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, Braunschweig
„Mechanisms of S-nitrosation-dependent regulation of MMP-1 activity“ (Poster)

2005

- Workshop Xanten
„Reversible Glutathionylierung als ein neues Prinzip in der Regulation der MMP-1-Aktivität“ (Vortrag)
- 10. NO-Forum 2005; Köln
„Der Einfluss von Thiolen und Stickstoffmonoxid auf die Regulation der MMP-1-Aktivität nach UVA-Bestrahlung“ (Vortrag)
- 13. Atherosklerose-Symposium, Erfurt
„Mechanisms of S-nitrosation-dependent regulation of MMP-1 activity“ (Poster)
- Tag der Wissenschaft, Düsseldorf
„Der Einfluss von intra- und extrazellulären Molekülen auf die Regulation der MMP-1-Aktivität nach UVA-Bestrahlung“ (Poster)

2004

- 9. NO-Forum, Mainz
"Influence of Nitrite on the UVA – induced apoptosis and MMP-1 expression"
(Poster)

Andere Form der Veröffentlichung

- Victoria Kolb-Bachofen, Miriam Cortese, Jörg Liebmann, Sabine Koch und Nicole Fitzner
Regulation der Entzündungsreaktion: Eine wichtige Rolle für Stickstoffmonoxid
Jahrbuch der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 2006

Inhaltsverzeichnis

<u>1</u>	<u>EINLEITUNG</u>	<u>1</u>
1.1	DIE FAMILIE DER MATRIX METALLOPROTEINASEN	1
1.1.1	STRUKTUR VON MMP-1	3
1.1.2	AKTIVIERUNG VON PROMMPs	5
1.1.3	REGULATION VON MMP-1	7
1.1.4	MMPs IN PHYSIOLOGISCHEN UND PATHOLOGISCHEN PROZESSEN	11
1.2	STICKSTOFFMONOXID: BILDUNG UND FUNKTION	14
1.3	GLUTATHION	17
1.4	ZIEL DER ARBEIT	19
<u>2</u>	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	<u>20</u>
2.1	MATERIAL	20
2.1.1	CHEMIKALIEN	20
2.1.2	KITS	21
2.1.3	VERBRAUCHSMATERIALIEN	21
2.1.4	GERÄTE	22
2.1.5	LÖSUNGEN UND PUFFER	23
2.1.6	ZELLKULTURMEDIEN UND ZUSÄTZE	24
2.1.7	ANTIKÖRPER	24
2.1.8	ZYTOKINE	24
2.1.9	NO-DONOREN	25
2.1.10	OLIGONUKLEOTIDE	25
2.2	METHODEN	26
2.2.1	VORBEREITUNG UND AKTIVIERUNG VON MMP-1	26
2.2.2	VORBEREITUNG DES FLUORESCENZSUBSTRATS	26
2.2.3	AKTIVITÄTSBESTIMMUNG VON MMP-1	26
2.2.4	GELATIN ZYMOGRAMM-GEL	27
2.2.5	KINETIK DER INHIBITION	27
2.2.6	HERSTELLUNG VON S-NITROSOGLUTATHION	27
2.2.7	GSSG-MESSUNG	27
2.2.8	ISOLATION UND KULTIVIERUNG DER FIBROBLASTEN	28
2.2.9	EINFRIEREN DER HVF	28
2.2.10	AUFTAUEN DER HVF	28

2.2.11	MYKOPLASMEN – PCR	28
2.2.12	IMMUNZYTOCHEMIE	29
2.2.13	NEUTRALROT-FÄRBUNG ZUR BESTIMMUNG DER ZELLVITALITÄT	29
2.2.14	TRYPsinIEREN DER HVF	29
2.2.15	BESTRAHLUNG DER HVF	30
2.2.16	BEHANDLUNG DER HVF MIT GSH UND DETA/NO	30
2.2.17	ZYTOKINBEHANDLUNG	30
2.2.18	RNA-PRÄPARATION	30
2.2.19	REVERSE TRANSKRIPTASE-PCR	31
2.2.20	QUANTITATIVE REAL-TIME PCR	31
2.2.21	NITRIT-BESTIMMUNG MIT EINEM GRIESS-TEST	32
2.2.22	AKTIVITÄTSBESTIMMUNG VON MMP-1 IM ÜBERSTAND	32
2.3	STATISTISCHE ANALYSEN	33
3	<u>ERGEBNISSE</u>	<u>34</u>
3.1	UNTERSUCHUNG DIVERSEER EINFLÜSSE AUF DIE AKTIVITÄT VON REKOMBINANTEM MMP-1	34
3.1.1	EINFLUSS VON THIOLN AUF DIE MMP-1-AKTIVITÄT	34
3.1.2	KINETIK DER INHIBITION DURCH GLUTATHION	38
3.1.3	AUFHEBUNG DER INHIBITION DURCH NITRIT UND TROLOX NACH UVA-BESTRAHLUNG	40
3.1.4	EINFLUSS VON ANTIOXIDANTIEN UND RADIKALFÄNGERN AUF DIE REAKTIVIERUNG	41
3.1.5	EINFLUSS VON ANDEREN RADIKALEN AUF DIE INHIBITION VON MMP-1 DURCH GLUTATHION	42
3.1.6	GSSG BILDUNG DURCH NITRIT UND TROLOX NACH UVA BESTRAHLUNG	45
3.2	UNTERSUCHUNG VON MMP-1 AUS ZELLKULTURÜBERSTÄNDEN VON HUMANEN VORHAUTFIBROBLASTEN	48
3.2.1	ISOLATION DER HUMANEN VORHAUTFIBROBLASTEN	48
3.2.2	BESTIMMUNG DER ZELLZAHL MIT NEUTRALROT	49
3.2.3	VERHÄLTNISS AKTIVES ZU GESAMT MMP-1 IN HUMANEN VORHAUTFIBROBLASTEN	49
3.2.4	EINFLUSS VON UVA AUF DIE MMP-1-EXPRESSION	50
3.2.5	EINFLUSS VON GSH AUF DIE AKTIVITÄT UND EXPRESSION VON MMP-1 IM ÜBERSTAND VON HUMANE VORHAUTFIBROBLASTEN	52
3.2.6	EINFLUSS VON DETA/NO AUF DIE MMP-1-EXPRESSION UND AKTIVITÄT IN HUMANEN VORHAUTFIBROBLASTEN	54

3.2.7	EINFLUSS VON TH1 ZYTOKINEN AUF DIE iNOS UND MMP-1 mRNA EXPRESSION	56
3.2.8	BILDUNG VON NITRIT NACH BEHANDLUNG VON HVF MIT ZYTOKINEN	59
3.2.9	EINFLUSS VON TH1 - ZYTOKINEN AUF DIE PROTEINEXPRESSION VON MMP-1	60
<u>4</u>	<u>DISKUSSION</u>	<u>65</u>
4.1	INHIBITION DER AKTIVITÄT VON MMP-1 DURCH THIOLE	65
4.2	REAKTIVIERUNG VON MMP-1 DURCH EINEN RADIKALISCHEN MECHANISMUS	67
4.3	EINFLUSS VON GSH AUF DIE AKTIVITÄT VON MMP-1 IN HUMANEN VORHAUTFIBROBLASTEN	72
4.4	MMP-1 SIGNALWEGE	74
<u>5</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>81</u>
<u>6</u>	<u>ABSTRACT</u>	<u>82</u>
<u>7</u>	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>83</u>
<u>8</u>	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>92</u>
<u>9</u>	<u>LEBENS LAUF:</u>	<u>95</u>

1 Einleitung

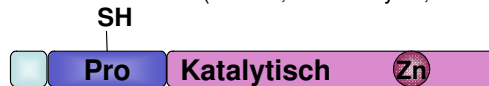
1.1 Die Familie der Matrix Metalloproteinasen

Matrix Metalloproteinasen (MMPs) sind eine Familie zinkabhängiger Endopeptidasen, die eine wichtige Funktion im Abbau von Komponenten aus der extrazellulären Matrix (ECM) haben. Somit spielen sie eine wichtige Rolle in allen Prozessen die eine Neustrukturierung der ECM erfordern. So nehmen sie zum Beispiel eine zentrale Rolle ein in der Wundheilung, in der Embryogenese, während des Wachstum und in der Entwicklung sowie in der Gebärmutter, insbesondere beim Auf- und Abbau der Gebärmutter Schleimhaut während des weiblichen Zyklus (Birkedal-Hansen, Moore *et al.* 1993; Nagase und Woessner 1999).

Die Wechselwirkung von Zellen mit der ECM ist entscheidend für die normale Entwicklung und Funktion eines Organismus. Die richtige Zusammensetzung sowie der Aufbau der ECM sind bedeutend in der Kontrolle von Signalen, die durch ECM-Moleküle vermittelt werden. Diese Moleküle sind essentiell in der Regulation von Zellproliferation, Differenzierung und Zelltod. Demzufolge muss sowohl der Auf- als auch der Abbau streng reguliert werden, da eine unkontrollierte Proteolyse zu einem exzessiven Abbau von Matrixmolekülen führt. Solch ein Abbau kann die Schädigung von Geweben bewirken, wie es bei vielen Erkrankungen, die mit einer Fehlregulation von MMPs in Verbindung gebracht werden, beschrieben wird (Chakraborti, Mandal *et al.* 2003). So wird eine Fehlregulation von MMPs unter anderem in Verbindung mit Krebs, Metastasierung, Fibrosen, Arteriosklerose, Arthritis, sowie vorzeitiger Hautalterung gebracht.

Es wurden bisher insgesamt 24 Gene die für MMPs kodieren im Menschen gefunden, wobei das Gen für MMP-23 zweimal vorkommt. Daher existieren effektiv 23 Gene für MMPs im Menschen. Die Familie der MMPs wird in Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Matrisine, *membrane-type* MMPs (MT-MMPs) und einige weitere nicht klassifizierte MMPs unterteilt (Nagase und Woessner 1999; Visse und Nagase 2003; Nagase, Visse *et al.* 2006).

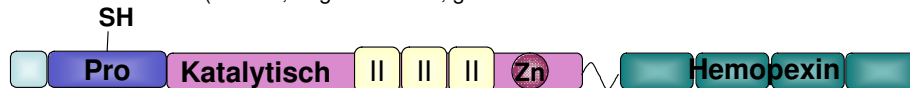
A: Minimal-Domänen MMPs (MMP-7,-26/ Matrilysin, Endomtase)



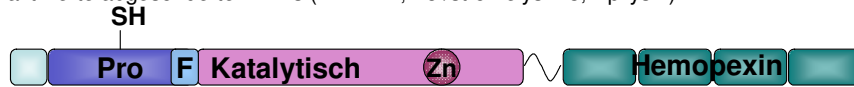
B: Einfache Hemopexin Domäne-enhaltende MMPs (MMP-1,-8,-13,-18,-3,-10,-27,-18,-3,-10,-27,-12,-19,-20,-22/ Collagenase-1,-2,-3,-4, Stromolysin-1,-2, Metalloelastase, RASI-1, Enamelysin, GMMP)



C: Gelatine-bindende MMPs (MMP-2,-9/ gelatinase A, gelatinase B)



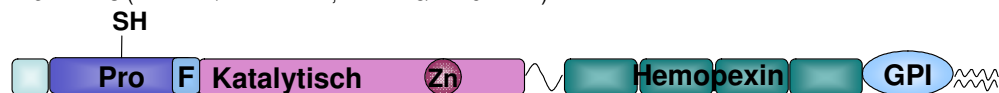
D: Furin-aktivierte abgesonderte MMPs (MMP-11,-28 /stromelysin-3, Epilysin)



E: Transmembran MMPs (MMP-14/ MT1-MMP, MMP-15/ MT2-MMP, MMP-6/ MT3-MMP, MMP-24/ MT5-MMP)



F: GPI-Linker MMPs (MMP-17/ MT4-MMP, MMP-25/ MT6-MMP)



G: Vitronectin-ähnliche Insert Linker-lose MMPs (MMP-21/XMMP)



H: Cystein/Prolin-Reiche IL-1 Rezeptor ähnliche Domänen MMPs (MMP-23)



Abb. 1-1: Diagramme der unterschiedlichen Domänenstruktur von MMPs

Alle MMPs haben ein Signalsequenz (hellblau), eine Pro-Domäne (dunkelblau) mit dem Cystein-Switch Motiv und die katalytische Domäne (pink), mit dem katalytischen Zink (Zn), gemeinsam. Die Struktur von MMP-7 und MMP-26 entspricht der in **A** dargestellten, und sie enthalten damit die minimalen Strukturelemente. Die weitaus meisten MMPs enthalten zusätzlich noch die Hpx-Domäne und das zwischen katalytischer und Hpx-Domäne verbindende Hinge-Element. Diese in **B** gezeigte Struktur haben die MMPs MMP-1, -3, -8, -10, -12, -13, -18, -19, -20 und -22 gemeinsam. **C** MMP-2 und -9 enthalten zusätzlich noch drei Kollagen bindende Typ 2 Inserts (II). **D** Die MMPs -11 und -28 enthalten zusätzlich zur Grundstruktur eine Furin-bindende Domäne und die in **E** und **F** dargestellten Transmembran-MMPs (MMP-14, -15, -16, -24) haben außerdem noch eine Transmembrandomäne (TM) und eine Zytoplasmatische Domäne (C) (**E**), oder eine Glucophosphatidyl Inositol-Anker Domäne (MMP-17, MMP-25) (**F**). **G** MMP-21 enthält vor der Furin-Domäne noch eine Vitronectin-ähnliche Domäne. **H** In MMP-23 ist keine Hpx-Domäne dafür eine Cystein und Proline reiche IL-1 Rezeptor ähnliche Domäne vorhanden.

Charakterisiert wird die Proteinfamilie der MMPs durch eine Sequenzhomologie. Die Grundstruktur besteht aus einem so genannten Cystein-Switch-Motiv in der Propeptid-Domäne und dem Zink-Bindungsmotiv in der katalytischen Domäne (Abb. 1-1). Charakteristischerweise bestehen sie aus einer ca. 80 Aminosäuren großen Pro-Domäne, einer katalytischen Domäne von ca. 170 Aminosäuren, einer variablen Prolinreichen Linker-Region (Hinge-Region) und einer C-terminalen Hemopexin (Hpx)-Domäne, die ca. 200 Aminosäuren enthält (Clark und Cawston 1989; Chung, Dinakarandian *et al.* 2004), dazu kommen je nach Protein unterschiedliche repräsentative Domänen. Ausnahmen davon sind MMP-7, MMP-26 und MMP-23, die kein Linker-Peptid und keine Hpx-Domäne enthalten (Sternlicht und Werb 2001; Nagase, Visse *et al.* 2006).

1.1.1 Struktur von MMP-1

MMP-1, auch interstitielle Kollagenase genannt, war die erste als Protein isolierte und als cDNA klonierte MMP (Bauer, Eisen *et al.* 1970; Goldberg, Wilhelm *et al.* 1986) und gilt daher als Prototyp für alle interstitiellen Kollagenasen.

ProMMP-1 besteht aus einer Propeptid-Domäne, aus drei α -Helices, den verbindenden „Schleifen“ L1 und L2 und dem so genannten Cystein-Switch-Motiv. Die Cystein-Switch-Sequenz ist hoch konserviert und besteht aus der Aminosäurenabfolge PRCGVPD. Das Cystein (Cys⁷³) aus der Cystein-Switch Region interagiert mit dem Zn²⁺ im aktiven Zentrum und verschließt dieses so (Jozic, Bourenkov *et al.* 2005; Iyer, Visse *et al.* 2006; Nagase, Visse *et al.* 2006). Außerdem enthält MMP-1 die katalytische Domäne mit dem katalytischen Zink, das über drei Histidine koordiniert ist, einem weiteren strukturellen Zink sowie drei Calciumionen. Die katalytische Domäne ist durch eine Linker-Region mit einer Hpx-Domäne verbunden, die im Zentrum ein Calcium-, ein Chlorid- und ein Natriumion enthält. Die ellipsoid geformte Pro-Domäne bindet sowohl an das aktive Zentrum als auch an die Hpx-Domäne und trägt zur kompakten Struktur von proMMP-1 bei. Die Struktur der Metalloproteinase-Domäne ist ähnlich wie die anderer MMPs und weist darauf hin, dass das aktive Zentrum sich in einer Spalte befindet, die die größere „obere Subdomäne“ von der kleineren „unteren Subdomäne“ teilt. Die Spalte führt horizontal durch das Molekül und würde ein Peptid-Substrat von links nach rechts binden. Die obere Subdomäne enthält ein charakteristisches, stark gedrehtes 5-strangiges β -Faltblatt, eingerahmt von zwei α -

Helices. Außerdem enthält die katalytische Domäne die beiden Zinkionen und drei Calciumionen, wobei eins der Zinkionen und die drei Calciumionen zur Stabilisierung der Struktur dienen (Iyer, Visse *et al.* 2006; Nagase, Visse *et al.* 2006).

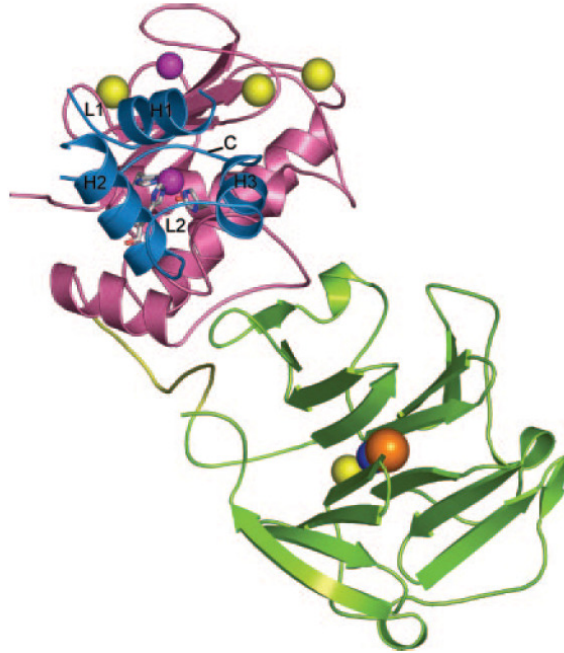


Abb. 1-2: Strukturbild von proMMP-1:

Die Abbildung zeigt die Struktur von proMMP-1. Die Pro-Domäne ist in blau dargestellt. Sie besteht aus drei Helices (H1, H2, H3), den Verbindungsschlaufen L1 und L2 und der Cystein-Switch-Struktur. Die katalytische Domäne ist in pink dargestellt. Das katalytische bzw. das strukturgebende Zink sind ebenfalls in pink dargestellt. Die Koordination des katalytischen Zinks erfolgt über drei Histidine. Außerdem enthält die katalytische Domäne drei Calciumionen (gelb). Die katalytische Domäne wird über eine Linker-Region (gelb) mit der Hpx-Domäne (grün) verbunden. Im Zentrum der Hpx-Domäne befinden sich ein weiteres Calciumion, ein Chloridion (blau) und ein Natriumion (orange) (Jozic, Bourenkov *et al.* 2005).

Die C-terminale Hpx-Domäne ist über einen Linker an die katalytische Metalloproteinase-Domäne gebunden. Sie zeigt eine symmetrische Struktur aus vier mal vier antiparallelen β -Faltblättern, die über kleine Peptid-Schlaufen verbunden sind. Im Zentrum dieser Struktur befinden sich ein Calcium-, ein Natrium- und ein Chloridion, die diese Struktur stabilisieren (Abb. 1-2). Die Hpx-Domäne interagiert wie schon erwähnt mit der Pro-Domäne. Dieser Kontakt ist hauptsächlich auf hydrophobische Kräfte zurück zu führen und kommt durch die drei Aminosäuren Phe²⁸⁹-Tyr²⁹⁰-Pro²⁹¹ in der Hpx-Domäne und den Aminosäuren Gly⁵³-Leu⁵⁴-Lys⁵⁵ aus der Pro-Domäne

zustande. Außerdem werden mehrere Wasserstoffbrücken zwischen Aminosäuren aus der Hpx- und der Pro-Domäne ausgebildet (Jozic, Bourenkov *et al.* 2005).

Durch die Abspaltung der Pro-Domäne kommt es zu einer beträchtlichen Strukturverschiebung im N-terminalen Bereich, die wichtig für die volle Aktivierung von MMP-1 ist. Anstelle des Cys⁷³ aus der Pro-Domäne nimmt ein Wassermolekül die Stelle des vierten Liganden vom katalytischen Zink im aktiven Zentrum ein (Iyer, Visse *et al.* 2006). Die Anwesenheit der Hpx-Domäne im aktiven Enzym ist essentiell für die Aktivität von MMP-1 und durch Abwesenheit der Hpx-Domäne verliert das Enzym seine Aktivität. In der aktiven Form nimmt die Hpx-Domäne unterschiedliche Formationen ein. Die Interaktion der Hpx-Domäne mit nativem tripel-helikalen Kollagen führt zu einer Konformationsänderung der Hpx-Domäne, die eine lokale Aufwindung der Kollagen-Helix bewirkt (Jozic, Bourenkov *et al.* 2005).

1.1.2 Aktivierung von proMMPs

Die Aktivierung von MMPs erfolgt durch die Abspaltung der Pro-Domäne, die in der Pro-Form das aktive Zentrum verschließt. In dieser Form ist das Cys⁷³ an das katalytische Zink im aktiven Zentrum koordiniert. Über diverse Mechanismen, die häufig eine oxidative Veränderung des Cys⁷³ bewirken, wird diese Koordination aufgebrochen, anstelle des Cysteins besetzt ein H₂O-Molekül die vierte Koordinationsstelle des Zinks. In der Folge wird zur vollständigen Aktivierung das Pro-Peptid abgespalten (Springman, Angleton *et al.* 1990; Van Wart und Birkedal-Hansen 1990; Kroncke 2001a). Physiologisch geschieht diese Abspaltung proteolytisch durch andere Proteinasen. Der so genannte Cystein-Switch, also das Aufbrechen der Koordination zum Zink und damit der eigentliche Aktivierungsschritt, kann auch durch andere Substanzen bewirkt werden. Zu diesen Substanzen gehören alkylierende Reagenzien, Disulfide, Oxidantien und Quecksilber- oder Gold-Ionen enthaltende Substanzen sowie das im Allgemeinen zur Aktivierung verwendete 4-Aminophenylquecksilber Acetat (APMA). Gemeinsam ist allen diesen Substanzen, dass sie die Thiolgruppe des Cysteins modifizieren (Springman, Angleton *et al.* 1990). Aber auch Proteasen wie Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin und Cathepsin G können durch die Abspaltung der Propeptid-Domäne zu einer Aktivierung von MMPs führen (Springman, Angleton *et al.* 1990; Van Wart und Birkedal-Hansen 1990; Frears, Zhang *et al.* 1996; Kroncke 2001a).

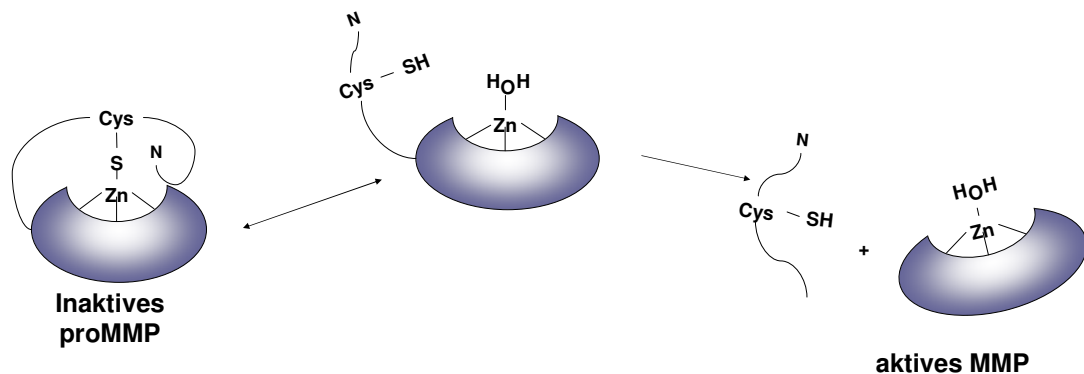


Abb. 1-3: Aktivierung von proMMP:

MMPs werden als inaktive Zymogene die erst aktiviert werden müssen synthetisiert. Im inaktiven Zustand wird das Zink im aktiven Zentrum von dem Thiolrest eines Cysteins aus der Pro-Domäne koordiniert und das aktive Zentrum so „verschlossen“. Zur Aktivierung kommt es wenn sich das Thiol von Zink löst und an dessen Stelle ein Wassermolekül tritt. Anschließend wird die Pro-Domäne autokatalytisch oder durch andere Proteinasen abgespalten und das Enzym so vollständig aktiviert.

Zudem konnte gezeigt werden, dass einige Stickstoff-Derivate, die physiologisch in Zellen entstehen das Potential haben proMMPs zu aktivieren oder an der Aktivierung beteiligt sein können. Peroxynitrit führt in Anwesenheit von Glutathion (GSH) zu einer Aktivierung von proMMP-1, -8 und -9. Die Anwesenheit von GSH und Peroxynitrit führt vermutlich zur S-Glutathionylierung und zur Bildung von stabilen S-Oxiden am Cys⁷³, wodurch die Aktivierung der MMPs resultiert (Okamoto, Akaike *et al.* 2001). Des Weiteren konnte ein Einfluss von NO und seinen reaktiven Intermediaten wie Stickstoffdioxid (NO₂) auf die Aktivierung von proMMP-8 gezeigt werden. NO alleine zeigte nur ein schwaches Potential zur Aktivierung von proMMP-8, nur bei unphysiologisch hohen NO-Konzentrationen von 10 mM kam es zur Aktivierung. Dagegen konnten sowohl NO₂ als auch Peroxynitrit die Prokollagenase aktivieren (Okamoto, Akaike *et al.* 1997; Okamoto, Akaike *et al.* 2001).

Gerade während Entzündungsreaktionen werden große Mengen NO durch die induzierbare NO-Synthase gebildet. Dieses wird neben wichtigen Funktionen als Mediator und Signal-Molekül u. a. mit der Bildung von reaktiven Stickoxidspezies in Verbindung gebracht, was unter gewissen pathologischen Bedingungen in einem erhöhten nitrosativen Stress resultiert. Reaktive Sauerstoffspezies wie Hypochlorige Säure (HOCl), Wasserstoffperoxid (H₂O₂) oder Hydroxylradikale (\cdot OH), die während Entzündungsprozessen gebildet werden, können ebenfalls zur Aktivierung von

proMMPs beitragen (Saari, Suomalainen *et al.* 1990; Saari, Sorsa *et al.* 1992; Fu, Kassim *et al.* 2001). Im Fall von Infektionen können zusätzlich bakterielle Proteinasen über die Abspaltung der Propeptid-Domäne zur Aktivierung von MMPs und so zur direkten Schädigung der extrazellulären Matrix des infizierten Organismus führen (Okamoto, Akuta *et al.* 2004).

1.1.3 Regulation von MMP-1

MMPs werden sowohl auf transkriptioneller als auch auf posttranskriptioneller Ebene reguliert. Die Genexpression von MMPs wird hauptsächlich durch den Transkriptionsfaktor *Activator Protein-1* (AP-1) initiiert. Viele Wachstumsfaktoren und Zytokin-medierte Signalwege werden durch AP-1 mediiert. Die Signalwege, die zur Induktion der Expression von MMPs führen, sind komplex und noch nicht vollständig verstanden. Die DNA-Bindungs- und *trans*-Aktivierungskapazität der Transkriptionsfaktoren AP-1 und Ets werden beide durch Phosphorylierung von Mitogen-Aktivierende Protein Kinasen (MAPK) und durch Serin/Threonin Kinasen initiiert (Abb. 1-4) (Reunanen, Foschi *et al.* 2000; Westermarck, Li *et al.* 2000; Westermarck, Li *et al.* 2001). Diese mediiern Signale, die durch die Bindung von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Hormonen an Rezeptoren der Zelloberfläche vermittelt und durch Phosphorylierungs-Kaskaden weitergeleitet werden (Vincenti und Brinckerhoff 2002; Nelson und Melendez 2004; Nelson, Subbaram *et al.* 2006).

Ausgelöst wird diese Kaskade u.a. durch die Bindung von u. a. Wachstumsfaktoren und Zytokinen an Oberflächen-Rezeptoren (Abb. 1-4) (Dasu, Barrow *et al.* 2003). Diese wirken allerdings sehr spezifisch und welche Faktoren die Expression letztendlich auslösen können ist zum einen für jedes MMP unterschiedlich und variiert zum anderen auch stark von Zelltyp zu Zelltyp. So können z. B. in Bindegewebszellen die Zytokine TPA, IL-1 und TNF- α eine MMP-1 Genexpression induzieren, TGF- β hingegen nicht. IFN- γ jedoch führt zur MMP-1-Expression in Monozyten aber nicht in Makrophagen. IFN- γ wird sogar teilweise mit einem eher inhibitorischen Effekt auf die MMP-Expression in Verbindung gebracht (Zhou, Zhang *et al.* 2003). Die Genexpression von MMP-9 dagegen kann in Bindegewebszellen durch alle vier Faktoren induziert werden (Mauviel 1993).

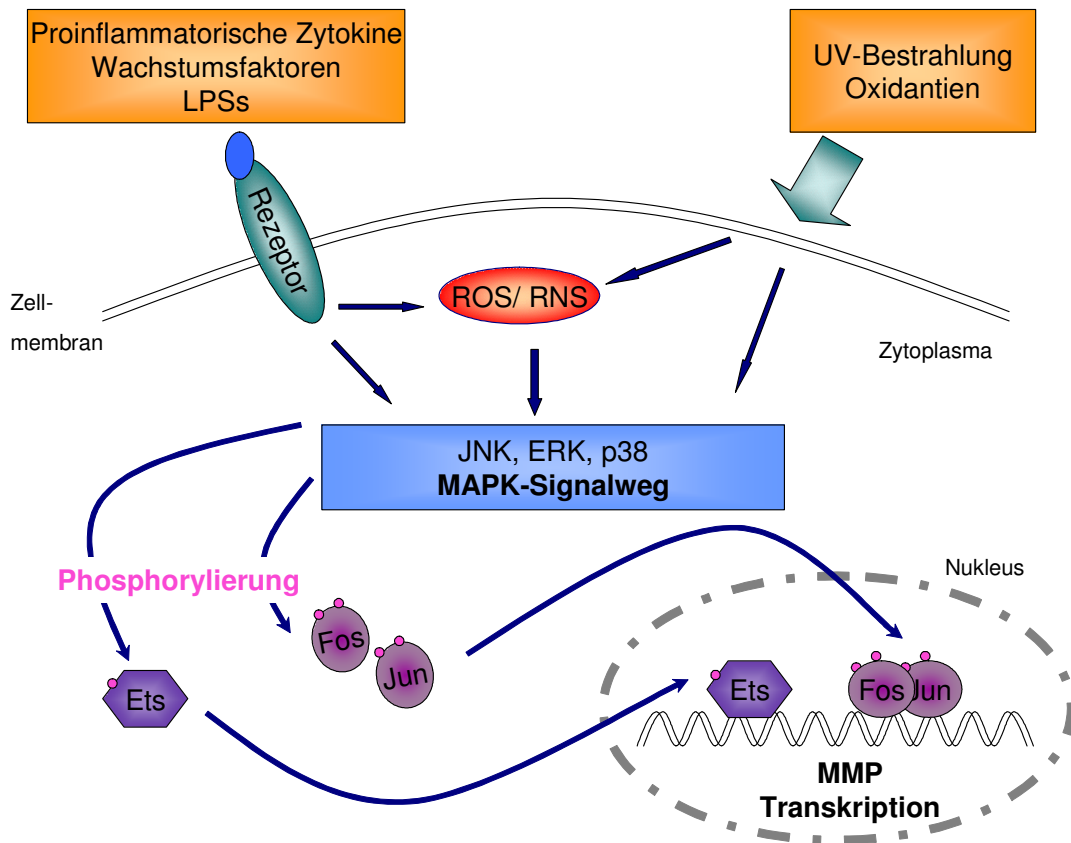


Abb. 1-4: Regulation der MMP Expression:

Proinflammatorische Zytokine (z. B. IL-1, IL6, TNF- α), Wachstumsfaktoren, Lipopolysaccharide (LPS) und auch Strahlung und Oxidantien können die Expression von MMPs auslösen. Zum einen können sie durch Bindung an ihre Membranrezeptoren die entsprechenden Signalkaskaden auslösen, zum anderen können alle eine Veränderung des Redoxstatus der Zelle bewirken. Durch eine erhöhte Produktion von ROS und RNS kommt es zur Phosphorylierung und Aktivierung von MAP-Kinasen, inklusive Erk 1/2 und JNK, wodurch wiederum cJun, cFos und Ets phosphoryliert werden, diese in den Nukleus wandern, cJun und cFos zu AP-1 dimerisieren und dort die Transkription von MMPs medieren.

Der AP-1 Komplex ist ein Heterodimer aus den zwei Protoonkogenen *jun* und *fos* und bindet bei ca. -70 bp in der Promotorregion von allen induzierbaren MMP-Genen (Vincenti, White *et al.* 1996; Benbow und Brinckerhoff 1997). Außerdem können Ets-Transkriptionsfaktoren, die Homologe des *v-ets erythroblastosis virus E26 Onkogens* sind, in der Regulation der MMP-Expression eine Rolle spielen (Rutter, Mitchell *et al.* 1998; Sharrocks 2001). Die meisten MMPs, so auch MMP-1, haben ein konserviertes Polyoma Enhancer A Bindungsprotein-3 (PEA3) Element, welches Mitglieder der Ets-Transkriptionsfaktoren bindet. Dieses Bindungselement befindet sich in der Nähe von

mindestens einem AP-1 Element. Die Transkriptionsfaktoren AP-1 und Ets können simultan induziert werden. Insbesondere nach gleichzeitiger Induktion beeinflusst das Zusammenwirken beider die MMP-Promotorantwort. Das Zusammenspiel von AP-1 und Ets-Transkriptionsfaktoren hat damit eine wichtige Funktion in der Regulation der MMP-Genexpression (Matrisian 1994; Westermarck, Holmstrom *et al.* 1998; Chakraborti, Mandal *et al.* 2003).

Viele Kinasen, die im MAPK-Signalweg involviert sind, sind Redox-sensitiv und spielen möglicherweise eine Rolle in der Regulation verschiedener MMPs (Nelson und Melendez 2004). So kann H_2O_2 direkt zu einer Aktivierung von Ras und damit des MAPK-Signalwegs führen (Lander, Hajjar *et al.* 1997; Lander, Tauras *et al.* 1997). H_2O_2 und HOCl können außerdem in einer Reihe verschiedener Zelltypen über Tyrosin-Phosphorylierung oder kleine G-Proteine eine Aktivierung der extrazellulär-regulierten Kinase (ERK) bewirken (Frank, Eguchi *et al.* 2000; Nishida, Maruyama *et al.* 2000; Brand, Gil *et al.* 2001; Midwinter, Vissers *et al.* 2001; Kelicen, Cantuti-Castelvetri *et al.* 2002; Kuruganti, Wurster *et al.* 2002). H_2O_2 kann die MMP-Genexpression auch indirekt durch die Aktivierung der MAPK-Familienmitglieder ERK 1/2, JNK und p38 beeinflussen (Banno, Wang *et al.* 2001; Cuda, Paterno *et al.* 2002; Ding, Li *et al.* 2002). JNK Phosphorylierung führt zur Aktivierung der AP-1-Komponenten cJun und JunB. cJun, cFos, FosB, Fra-1 und Ets-1 werden alle durch ERK 1/2 phosphoryliert, was zur anschließenden MMP-Transkription führen kann (Reddy und Mossman 2002; Yang, Sharrocks *et al.* 2003)(Abb. 1-4). Der Redoxstatus einer Zelle ist also ohne Zweifel wichtig bei der Regulation der Genexpression von MMPs (Nelson und Melendez 2004; Nelson, Subbaram *et al.* 2006). Umgekehrt konnte aber auch gezeigt werden, dass eine Erniedrigung des oxidativen Stresses in Lungenkrebszellen durch eine erhöhte Expression der γ -Glutamylcystein Synthetase (γ -GCSH), ein Schlüsselenzym in der Biosynthese des effektiven Antioxidans GSH, in einer verringerten Expression von MMP-3 und MMP-10 resultiert (Savaraj, Wei *et al.* 2005). Auch andere Antioxidantien wie z. B. N-Acetylcystein, ein Precursor von Glutathion, können die MMP-1-Expression effektiv inhibieren (Kheradmand, Werner *et al.* 1998; Wenk, Brenneisen *et al.* 1999).

Viele MMPs werden in der Haut durch UV-Strahlung hoch reguliert und werden so mit einem pathologischen Abbau des Hautkollagens und anderer Bindegewebskomponenten in Verbindung gebracht (Sudel, Venzke *et al.* 2003). Auch die MMP-1 Transkription wird durch UV-Strahlung gesteigert. Durch UV-Strahlung werden in der Haut eine Reihe von Zytokinen wie IL-1 und TNF- α gebildet und diese

wiederum können die Expression von MMPs induzieren (Bender, Blattner et al. 1997; Watanabe, Shimizu et al. 2004). UV-Strahlung führt nicht nur zur Ausschüttung von Zytokinen, sondern verändert auch durch eine gesteigerte H₂O₂-Produktion den Redoxstatus der Zellen und resultiert in oxidativem Stress (Brennan, Bhatti et al. 2003). Eine erhöhte MMP-1-Expression wird zusätzlich mit einer erniedrigten antioxidativen Kapazität von Zellen korreliert (Yin, Yamauchi et al. 2003).

Neben reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) können auch reaktive Stickoxidspezies (RNS) die MMP-Expression beeinflussen. Für Stickstoffmonoxid (NO) konnte gezeigt werden, dass es sowohl positiv als auch negativ die MMP-Expression beeinflussen kann. NO-Donoren und auch eine erhöhte Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) können die mRNA-Level von MMP-1, -9, -3, -10 und -13 in humanen Melanomen, in Kopf- und Nacken-Karzinomen, in Osteoblasten, Trophoblasten und Plazentagewebe erhöhen (Novaro, Colman-Lerner et al. 2001; Franchi, Santucci et al. 2002; Harmey, Bucana et al. 2002; Zaragoza, Soria et al. 2002; Ishii, Ogura et al. 2003; Lin, Kok et al. 2003). Der NO-Donor S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP) erhöht außerdem die MMP-1-Promotoraktivität in Melanom-Zellen über ERK 1/2 und den AP-1 und Ets-Bindungsstellen innerhalb des Promotors (Ishii, Ogura et al. 2003). Umgekehrt können NO-Donoren, aber auch konstitutiv sowie durch die iNOS gebildetes NO, die Expression von MMP-9 in humanen glatten Muskelzellen, humanem Herzgewebe und Rattenmesangialzellen inhibieren (Eberhardt, Beeg et al. 2000; Galis und Khatri 2002; Gao, Sawicki et al. 2003).

Auf posttranskriptioneller Ebene werden MMPs zum einen durch die Aktivierung der proMMPs und zum anderen durch spezifische endogene Inhibitoren, den *Tissue Inhibitors of MMPs* (TIMPs), in ihrer Aktivität reguliert. Aktiviert werden die MMPs über den im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Mechanismus. Wie bereits erwähnt, konnte in vielen Studien gezeigt werden, dass ROS und RNS auch an der Regulation der MMP-Aktivität beteiligt sein können. Die aktivierten MMPs können wiederum durch TIMPs inhibiert werden. Es gibt vier TIMPs, die spezifisch alle aktiven MMPs inhibieren können. Die TIMPs bilden einen Komplex mit den aktiven MMPs und bewirken eine Inhibition durch eine Interaktion mit dem aktiven Zentrum und mit einer Region in der Hpx-Domäne (Visse und Nagase 2003; Nagase, Visse et al. 2006).

1.1.4 MMPs in physiologischen und pathologischen Prozessen

MMP-1, auch Kollagenase-1 genannt, ist verantwortlich für den Abbau von nativem Kollagen, welches eine essentielle Strukturkomponente in allen Bindegeweben wie Knorpel, Knochen, Haut, Sehnen und Bänder darstellt. Die Kollagenase spaltet die drei α -Ketten von nativem Kollagen I, II und III nach dem Glycin in der spezifischen Spaltungs-Sequenz (Gln/Leu)-Gly-(Ile/Leu)-(Ala/Leu). Die Spaltungsstelle liegt ca. $\frac{3}{4}$ vom N-Terminus des Kollagens entfernt und spaltet es in zwei Längenfragmente. Das so aufgespaltene Kollagen ist instabil, wird unter physiologischen Bedingungen denaturiert und durch andere Proteinasen weiter abgebaut. Um Kollagen zu spalten bindet MMP-1 an das Kollagen und windet lokal die tripel-helikale Struktur auf (Chung, Dinakarandian *et al.* 2004).

Diese Prozesse sind essentiell in allen Vorgängen die einen Abbau und/oder eine Neustrukturierung der ECM erfordern, wie z. B. bei der Wundheilung, aber auch während des Wachstums oder während der Embryogenese. Während der Wundheilung kommt es ca. fünf bis sieben Tage nach der Verletzung zu einer Synthese von MMPs und zum Abbau von Bindegewebe. Zunächst wird Kollagen III abgebaut, dann kommt es zur Migration von Fibroblasten in die Wunde, die neues Kollagen I und III bilden, wodurch es zum Verschließen der Wunde sowie Narbenbildung kommt. Ein kontrollierter Abbau der ECM ist für die Prozesse Zellmigration, Angiogenese, Reepithelialisierung, Abbau von vorläufiger Matrix und der Neustrukturierung von neu gebildeten Granulationen wichtig (Xue, Le *et al.* 2006).

Es hat sich gezeigt, dass Nicht-ECM-Molekülen ebenfalls potentielle Substrate von MMPs sind, die wichtige Prozesse wie Migration, Differenzierung, Wachstum, entzündliche Vorgänge, Neovaskularisierung und Apoptose beeinflussen. Die ECM dient zusätzlich zur strukturgebenden Funktion noch als Speicher für verschiedene Signalmoleküle wie Wachstumsfaktoren und Zytokine, die durch den Abbau der ECM freigesetzt werden (McCawley und Matrisian 2001; Sternlicht und Werb 2001). Aber auch die Abbau-Produkte von ECM-Molekülen können verschiedene Prozesse regulieren. So bewirkt der Abbau von fibrillären Kollagen durch MMPs die Exposition von RGD-Sequenzen (Arginin-Glycin-Aspartat). An die RGD-Gruppen bindet $\alpha_v\beta_3$ -Integrin. Diese Interaktion fördert das Wachstum und Überleben von Melanom-Zellen (Petitclerc, Stromblad *et al.* 1999). Integrine sind Rezeptoren, die für die Zelladhäsion von großer Bedeutung sind.

Ein wichtiges Beispiel für die Modulation des Zellwachstums durch MMPs stellt die Freisetzung des Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) dar. Dieser wird durch die Spaltung des Proteoglykans Perlecan durch MMP-1 oder MMP-3 freigesetzt (Whitelock, Murdoch et al. 1996). Auch das Zytokin TGF- β kann über einen durch MMPs mediierten Prozess freigesetzt werden, nämlich mittels der Spaltung von Decorin durch MMP-2, -3 oder -7 (Imai, Hiramatsu et al. 1997). Zusätzlich kann auch die direkte Spaltung von Nicht-Matrix-Molekülen, die mit Wachstumsfaktoren assoziiert sind, das Zellwachstum beeinflussen. So wird das *Insulin-like growth factor-binding Protein* (IGF-BP3) durch MMPs proteolysiert und ein aktiver IGF-Ligand gebildet (Fowlkes, Enghild et al. 1994; Fowlkes, Suzuki et al. 1994; Fowlkes, Thrailkill et al. 1995; Thrailkill, Quarles et al. 1995). Viele weitere Nicht-Matrix Wachstumsfaktoren werden als Transmembran-Proteine synthetisiert und werden durch eine „*shedase*“-Aktivität in eine lösliche Form gespalten. Ein Beispiel dafür ist der *Heparin-binding epidermal growth factor* (HB-EGF) (Suzuki, Raab et al. 1997). Außerdem können MMPs auch Wachstumsfaktoren direkt spalten und aktivieren. So spalten und aktivieren MMP-2 und MMP-9 direkt TGF- β (Yu und Stamenkovic 2000) und auch die Vorläuferform von IL-1 β kann durch MMP-2, -3 und -9 in das aktive IL-1 β gespalten werden (Schonbeck, Mach et al. 1998).

Es gibt weitere Beispiele für die Beeinflussung des Zellverhaltens durch die Spaltung von Nicht-ECM-Molekülen. So führt die Spaltung des IL-2 Rezeptors in T-Lymphozyten zu einer verringerten Proliferation. Die Spaltung des Fas-Liganden durch MMP-7 resultiert in einer Induktion der Apoptose bei der krankhaften Atrophy der Prostata. Die Entfernung des Fas-Liganden von der Zelloberfläche wird zusätzlich mit der zytotoxischen Wirkung von verschiedenen Chemotherapeutika in Verbindung gebracht (Kayagaki, Kawasaki et al. 1995; Powell, Fingleton et al. 1999). Ferner kann die Spaltung von Laminin-5 durch MMP-2 und MT-MMP die Zellbeweglichkeit von Epithelzellen induzieren (Giannelli, Falk-Marzillier et al. 1997).

MMPs können vielfältig auf die Balance zwischen Zellwachstum und Apoptose durch die Spaltung von Nicht-Matrix- und Zell-Oberflächen-Substraten Einfluss nehmen. Neben Apoptose und Zellwachstum können MMPs auch die Zellmigration und -kommunikation beeinflussen. Für die Zellmigration ist die koordinierte Regulation von Zell-Zell-Verbindungen, Zell-Matrix-Verbindungen und Matrix-Umstrukturierungen wichtig (Sternlicht und Werb 2001).

Mit diversen pathologischen Prozessen wird eine Fehlregulation von MMPs in Verbindung gebracht. In der Haut zählen dazu Dermatosen, Fibrosierungsprozesse

(Sklerodermie, hypotrophen Narben, Kolloiden), UV-bedingte Hautalterung und auch die Tumorprogression. In Fibrosierungsprozessen kommt es zu bindegeweblichen Verhärtungen und es konnte eine verringerte Expression von MMP-1 in der Haut von Sklerodermiepatienten nachgewiesen werden (Takeda, Hatamochi *et al.* 1994). Zusätzlich kommt es zu einer erhöhten Bildung von Kollagen und einer erhöhten Expression der endogenen MMP-Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2. Ähnliche Expressionsmuster findet man auch in hypertrophen Narben und in Kolloiden (Arakawa, Hatamochi *et al.* 1996). In Dermatosen kommt es dagegen zu Zerstörung von desmosomalen oder Basalmembranstrukturen. Dies geht mit einem verstärkten Abbau von Matrixproteinen und einer erhöhten Expression von MMPs einher (Stahl-Backdahl, Inoue *et al.* 1994; Saarialho-Kere, Vaalamo *et al.* 1995; Liu, Shipley *et al.* 1998). Damit vergleichbar ist auch eine durch UV-Strahlung ausgelöste Schädigung der Haut, die mit einer erhöhten Expression von MMPs in Verbindung gebracht wird. Durch den Verlust von strukturerhaltenden Matrixkomponenten verliert die Haut an Elastizität, ein Charakteristikum für UV-geschädigte Haut (Bender, Blattner *et al.* 1997; Brenneisen, Sies *et al.* 2002; Sudel, Venzke *et al.* 2003; Watanabe, Shimizu *et al.* 2004). In der Tumorprogression erlauben MMPs die Tumor-induzierte Angiogenese, zerstören lokal Gewebestrukturen und Basalmembranen und erlauben so die Tumorerkrankung und Metastasierung (Kerkela und Saarialho-Kere 2003).

Aber auch eine Vielzahl weiterer Krankheiten, die mit einer Störung des Kollagengleichgewichts einhergehen, sind mit einer Fehlregulation von MMPs assoziiert. In Arthritis-Patienten wurde z. B. eine erhöhte MMP-1-Expression und damit einhergehend ein verstärkter Kollagenabbau beobachtet (Vincenti und Brinckerhoff 2002). Ein weiteres Beispiel ist die Plaqueruptur bei der Arteriosklerose, die ebenfalls durch einen verstärkten Kollagenabbau ausgelöst wird. Man geht davon aus, dass es durch eine vermehrte Produktion von MMPs zu einer Destabilisierung der Plaque und dadurch letztendlich zur Plaqueruptur kommt (Watanabe und Ikeda 2004).

1.2 Stickstoffmonoxid: Bildung und Funktion

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein anorganisches Gas, welches im Organismus vielfältige Aufgaben übernimmt und aufgrund seiner Fähigkeit zur Diffusion Signale von Zelle zu Zelle überträgt. So ist NO an der Blutdruckkontrolle beteiligt, spielt eine wichtige Rolle im Gehirn und der Gedächtnisbildung und auch an der Abwehr von Krankheitserregern und Tumorzellen ist NO beteiligt. Die Reaktivität von NO ist, obwohl es ein Radikal ist, in biologischen Systemen relativ gering. Durch seine geringe Größe und seine lipophilen Eigenschaften kann es durch Membranen und Gewebe diffundieren und an Orten relativ fern vom Entstehungsort wirken. Gebildet wird NO durch die NO-Synthasen. Es gibt drei NO-Synthasen (NOS), die neuronale NOS (nNOS), die induzierbare NOS (iNOS) und die endotheliale NOS (eNOS) (Nathan 1992). Alle drei Isoformen katalysieren die Reaktion von L-Arginin unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff zu N^o-hydroxy-L-Arginin und weiter zu Citrullin und NO (Leone, Francis *et al.* 1991; Leone, Palmer *et al.* 1991; Feldman, Griffith *et al.* 1993; Bogdan 2001).

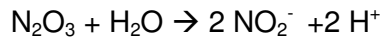
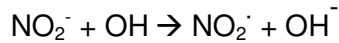
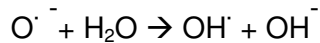
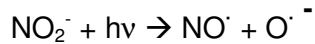
nNOS und eNOS werden beide konstitutiv exprimiert und bilden abhängig vom intrazellulären Ca²⁺-Gehalt geringe NO-Mengen. Die iNOS dagegen wird nicht konstitutiv exprimiert, sondern kann durch proinflammatorische Stimuli wie Zytokine, bakterielle Endotoxine und UV-Strahlung in fast allen bekannten Zelltypen induziert werden. Die iNOS ist aufgrund der hohen Affinität zum Ca²⁺/Calmodulin-Komplex weitgehend Ca²⁺ unabhängig. Die Aktivität der iNOS resultiert im Gegensatz zu den konstitutiven NOS in hohen lokalen NO-Konzentrationen (Forstermann, Closs *et al.* 1994; Kroncke, Suschek *et al.* 2000).

Zur Transkription des iNOS-Gens kommt es erst nach Aktivierung durch z. B. pathogene Strukturen, wie LPS, oder durch proinflammatorische Zytokine. Etwas vereinfacht kann man sagen, dass Zytokine die während einer Th1-Reaktion produziert werden (IL-1 β , TNF- α und IFN- γ) die iNOS-Transkription induzieren und Zytokine die durch Th2-Zellen abgegeben werden zu einer verringerten Transkription der iNOS führen. Durch die Bindung von Th1-Zytokinen an Zelloberflächen-Rezeptoren werden über Signaltransduktionkaskaden verschiedene Transkriptionsfaktoren im Zytosol aktiviert. Nach Translokation in den Kern binden diese an ihre Konsensus-Sequenzen im iNOS-Promotor. Kinasen die über verschiedene Phosphorylierungsschritte zur iNOS Expression führen sind die Janus-Kinasen (JAK), p38-Mitogen-Aktivierte Protein

Kinasen (MAPK) und Protein-Tyrosin-Kinasen. Diese aktivieren die Transkriptionsfaktoren *nuklear faktor κ B* (NF κ B), Interferon regulierender Faktor (IRF) und *signal transducer and activator of transcription 1 α* (Stat 1 α) (Kroncke, Fehsel *et al.* 1997; Kroncke, Fehsel *et al.* 1998; Kroncke, Suschek *et al.* 2000).

An der enzymatischen Synthese von NO sind die Kofaktoren NADPH, Ca²⁺ und Tetrahydrobiopterin (BH₄) beteiligt. Ein weiterer Faktor der auf die Aktivität der iNOS einwirkt, ist die Verfügbarkeit des Substrats L-Arginin. Kleine Unterschiede der extrazellulären L-Arginin-Konzentration können die NO-Produktion stark beeinflussen. Die Verfügbarkeit von L-Arginin hängt von der *de novo* L-Arginin Synthese, den exogenen Spiegeln, dem zellulären L-Arginin-Transport und von einem um das Substrat konkurrierenden Enzym, der Arginase, ab. Die Arginase bildet aus L-Arginin Harnstoff und Ornithin (Mori und Gotoh 2000; Bruch-Gerharz, Schnorr *et al.* 2003). Eine verringerte Verfügbarkeit von L-Arginin resultiert in einer verringerten NO-Synthese. Außerdem kann die iNOS durch endogene NOS-Inhibitoren, wie z. B. das asymmetrische Dimethylarginin (ADMA) reguliert werden (Boger, Vallance *et al.* 2003). Neben der enzymatischen Synthese kann NO in der Haut auch nicht-enzymatisch aus Nitrit oder aus nitrosierten Thiolen generiert werden. Erste Anzeichen dafür, dass der photoinduzierte Zerfall von Nitrit eine wichtige Rolle spielt, wurden schon sehr früh beobachtet. So wurde eine Relaxation der glatten Gefäßmuskeln in Anwesenheit von Tageslicht festgestellt (Furchgott 1955). Durch indirekte Erhöhung des cyclischen Guanosinmonophosphat (cGMP)-Spiegels induziert NO bekanntermaßen über die Relaxation der glatten Gefäßmuskeln eine Vasodilatation und eine Blutdruck-Senkung. Da auch die Photorelaxation mit einer Erhöhung des cGMP-Spiegels assoziiert ist, aber nicht durch NOS-Inhibitoren beeinflusst wird, wurde die Freisetzung von NO durch einen lichtempfindlichen NO-Speicher vermutet (Matsunaga und Furchgott 1989).

Gerade in der humanen Haut bzw. im Schweiß können signifikante Mengen Nitrit und RS-NO gemessen werden und es konnte gezeigt werden, dass die Bestrahlung von humaner Haut in der Freisetzung von bioaktiven NO aus Nitrit und RS-NO resultiert (Weller, Pattullo *et al.* 1996; Suschek, Schroeder *et al.* 2003; Paunel, Dejam *et al.* 2005). Durch die Photodekomposition von Nitrit entstehen im aeroben Milieu wiederum weiter Stickoxid-Radikale. Der Mechanismus nachdem Nitrit in wässriger Lösung zerfällt sieht wie folgt aus (Zafiriou und Bonneau 1987; Fischer und Warneck 1996):



Im Gegensatz zur klassischen Übermittlung von Signalen über einen Rezeptor geht NO kovalente Bindungen mit einem Ziel-Substrat ein. Die daraus resultierende Wirkung von NO hängt von der Menge und der Kinetik der NO-Freisetzung ab.

Im Gegensatz zu den durch die konstitutiven NOS geringen und pulsatil freigesetzten Mengen an NO werden nach inflammatorischer Stimulation durch die iNOS hohe Konzentrationen an NO über einen längeren Zeitraum gebildet. Diese hohen NO-Konzentrationen können FeS-Gruppen zerstören und die Aktivität von Enzymen durch Nitrosierung von Tyrosinresten oder durch Nitrosierung von Cysteinresten modifizieren (Kroncke, Fehsel *et al.* 1997; Kroncke, Suschek *et al.* 2000; Bogdan 2001).

NO kann als Signalmolekül auf verschiedene Signalkaskaden einwirken, indem es durch Nitrosierung die Aktivität verschiedener Phosphatasen beeinflusst. So kann NO die MAPK-Kaskade durch die Modulation von Faktoren, die sich *upstream* von der Kaskade befinden, wie G-Proteine oder dem kleinem GTP-Bindungsprotein p21^{ras}, aktivieren (Lander, Ogiste *et al.* 1995). Umgekehrt wird die Phosphotyrosin-Protein-Phosphatase-Aktivität durch S-Nitrosierung inhibiert (Caselli, Camici *et al.* 1994). Ferner kann NO auch direkt die Aktivität von Transkriptionsfaktoren wie AP-1 beeinflussen, welcher essentiell für die Transkription von MMPs ist. So wurde gezeigt, dass durch NO die Bindungsaktivität von AP-1 in einer humanen Melanon-Zelllinie erhöht wird und so eine verstärkte Expression von MMP-1 über den MAPK-Signalweg stattfindet (Ishii, Ogura *et al.* 2003). Durch S-Nitrosierung der DNA-Bindungsstelle kann AP-1 aber auch, analog zu anderen Transkriptionsfaktoren, die Zinkfinger-Motive enthalten, inhibiert werden (Nikitovic, Holmgren *et al.* 1998; Kroncke 2001b). Durch indirektes Einwirken auf Signalwege, aber auch durch direkte Interaktion mit Transkriptionfaktoren, beeinflusst NO die Genexpression diverser Gene. Zytotoxische Effekte, die mit NO in Verbindung gebracht werden, sind oft Konsequenzen der Interaktion von NO mit Enzymen des Energiemetabolismus, speziell in der respiratorischen Kette der Mitochondrien und durch die Aktivierung von Energieverbrauchenden DNA-Reparatur Signalwegen. NO kann aber vielfach auch protektiv

wirken. Unter anderem kann es auf die Transkriptionsregulation von schützenden Proteinen einwirken, so z. B. auf die Expression von *Heat Shock*-Proteinen oder der Heme-Oxygenase-1. Außerdem kann NO durch die Inhibition der Lipidperoxidase Zellen vor dem durch UVA induzierten Zelltod schützen (Kroncke, Fehsel *et al.* 1997; Kroncke, Suschek *et al.* 2000).

NO hat immunmodulatorische Effekte und beeinflusst vielfältig Prozesse des Immunsystems und auch an autoimmunen Vorgängen ist NO beteiligt. So konnte gezeigt werden, dass psoriatische Hautläsionen spezifische iNOS exprimieren während in atopischer Dermatitis oder in gesunder Haut keine iNOS-Expression nachweisbar ist. Während Psoriasis, in der eine iNOS Expression gefunden wird, eher Th1-vermittelt, ist die atopische Dermatitis Th2-vermittelt. (Bruch-Gerharz, Fehsel *et al.* 1996; Bruch-Gerharz, Schnorr *et al.* 2003; Suschek, Schnorr *et al.* 2004). Die Abwehr von Viren, Bakterien, Proteozoen und Pilzen ist eine weitere Rolle von NO im Immunsystem. Auf unterschiedliche pathogene Keime wirkt NO antiproliferativ oder zytotoxisch und eine Inhibition der iNOS wirkt sich bei einigen Infektionen negativ auf die Heilung aus (Croen 1993; Blank, Bogdan *et al.* 1996; Weller, Pattullo *et al.* 1996; Weller, Price *et al.* 2001).

Intrazellulär fungiert NO nicht nur als Botenstoff, sondern hat auch einen Einfluss auf den Redoxstatus. Eine unregulierte iNOS-Aktivität führt lokal zu hohen NO-Konzentrationen. Diese hohen NO-Konzentrationen können zu reaktiven Stickoxidintermediaten wie NO₂, N₂O₃ und N₂O₄ reagieren. Durch Reaktion mit Superoxid Anion-Radikalen kann NO zur Bildung von Peroxynitrit führen. Unter aeroben Bedingungen kann NO, vermutlich über N₂O₃, GSH nitrosieren und so GS-NO gebildet werden. Dieses kann entweder mit einem weiteren GSH zu oxidiertem GSH (GSSG) und NO abreagieren, oder zur Glutathionylierung eines Proteins führen (Kroncke, Suschek *et al.* 2000; Bogdan 2001).

1.3 Glutathion

Glutathion (GSH) ist ein Tripeptid (γ -Glutamyl-Cysteinglycine), dass sowohl für die intra- als auch für die extrazelluläre Redox-Balance wichtig ist. Synthetisiert wird es mit Hilfe der Schlüsselenzyme γ -Glutamylcystein Synthetase (GCS) und die GSH-Synthetase aus Glutamat, Cystein und Glycin. GSH ist, mit Konzentrationen bis zu 10

mM, das intrazellulär am häufigsten vorkommende Thiol und liegt in Zellen hauptsächlich in der reduzierten Form (GSH) vor. Unter Bedingungen von oxidativem oder nitrosativem Stress wird GSH oxidiert (GSSG) und das Verhältnis von GSH/GSSG ist ein wichtiger Indikator für den Redoxstatus einer Zelle (Wu, Fang *et al.* 2004). Wie bereits beschrieben spielt oxidativer Stress und ROS-medierte Signaltransduktion eine wichtige Rolle in Zellen und beeinflusst zelluläre Prozesse vielfältig (Finkel und Holbrook 2000; Finkel 2001; Anselmo und Cobb 2004; Giustarini, Rossi *et al.* 2004; Ghezzi 2005).

GSH hat viele wichtige zelluläre Funktionen. Es fängt effektiv freie Radikale und andere reaktive Sauerstoffspezies ab, sowohl direkt als auch indirekt als Co-Faktor für protektive Enzyme. Bei diesen Reaktionen wird GSH oxidiert. Die oxidierte Form kann mit Hilfe der NADPH-abhängigen Glutathion-Reduktase wieder reduziert werden. Zusätzlich kann GSH mit Hilfe der Glutathion-S-Transferase aus verschiedenen elektrophilen, physiologischen Metaboliten und Xenobiotika Konjugate von N-Acetyl-L-Cystein, sogenannte Mercapturate, bilden (Fang, Yang *et al.* 2002). Eine weitere wichtige Entgiftungsreaktion an der GSH beteiligt ist, ist die Bildung von S-Formyl-Glutathion aus Formaldehyd und GSH. Diese Reaktion wird durch die Formaldehyd Dehydrogenase katalysiert. Im Prostaglandin-Metabolismus spielt es eine wichtige Rolle in der Umformung von Prostaglandin H₂ in Prostaglandin D₂ und Prostaglandin E₂ durch die Endoperoxid Isomerase. Ferner spielt GSH im Glyoxylase System, in dem Methylglyoxal zu D-Laktat umgebaut wird, eine wichtige Rolle (Townsend, Tew *et al.* 2003). Durch Nitrosierung von GSH entsteht GS-NO welches durch Thioredoxin gespalten werden und so als NO-Donor fungieren kann. (Fang, Yang *et al.* 2002). Damit dient GS-NO als ein Speicher für NO im Plasma und in der Haut (Xu, Vita *et al.* 2000).

Außerdem kann GSH direkt mit Thiolresten in Proteinen, wie z.B. Thioredoxin, Cytochrome C Oxidase, reagieren und diese glutathionylieren. Durch Glutathionylierung von Thiol-Gruppen in einem Protein können diese zum einen vor irreversibler Oxidation und damit vor einer irreversiblen Schädigung des Proteins geschützt werden, zum anderen kann dadurch direkt auf die Aktivität von Proteinen eingewirkt werden. Die Glutathionylierung eines Enzyms kann abhängig vom Enzym sowohl eine Aktivierung, aber auch eine Inhibition bewirken. Damit spielt GSH auch eine wichtige Rolle in der Redox-Regulation von Proteinen. Einige Beispiele für Proteine die durch S-Glutathionylierung modifiziert werden sind die Gluceraldehyd-3-

Phosphat Dehydrogenase (GAPDH), Thioredoxin und Glutaredoxin (Anselmo und Cobb 2004; Giustarini, Rossi *et al.* 2004).

Der unterschiedliche oxidative Status der Zellen hat auch einen Einfluss auf die Induzierbarkeit der MMP-Expression, was in Hautfibroblasten von Patienten mit Systemischer Sklerose (SSc) gezeigt werden konnte. Bei der SSc handelt es sich um eine Erkrankung die sich unter anderem oft durch Entzündungen und Fibrosen der Haut äußert. UVA-Strahlung wird bei Patienten mit SSc zur effektiven Therapie eingesetzt. Der GSH-Gehalt der Fibroblasten von SSc Patienten ist gegenüber den Kontrollzellen aus gesunden Probanden reduziert, wird aber durch UV-Strahlung auf das gleiche Niveau der Kontrollzellen angehoben. Der niedrigere GSH-Gehalt in den Fibroblasten der SSc-Patienten bewirkt, dass es nach UVA-Strahlung zu einer deutlich höheren Induktion der MMP-1-Expression relativ zu den Kontrollzellen kommt (Yin, Yamauchi *et al.* 2003).

1.4 Ziel der Arbeit

Die MMP-1 medierte Degradierung von extrazellulären Matrix-Komponenten wie Kollagen spielt in der Hautphysiologie eine wichtige Rolle. Insbesondere in Prozessen wie der Wundheilung, aber auch in immun-medierten Prozessen, wie z.B. nach UV-Strahlung, kommt es zu einer erhöhten Expression von MMP-1. Alle MMPs, so auch MMP-1, werden, wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, äußerst komplex reguliert. Zum einen unterscheidet sich die Regulation je nach Zelltyp, zum anderen wird jedes MMP spezifisch reguliert. In dieser Arbeit war es von besonderem Interesse, inwiefern verschiedene in der Haut relevante Komponenten wie GSH, Nitrit und NO, aber auch UVA-Strahlung oder Zytokine, einen Einfluss auf die Aktivität von MMP-1 und auf die Regulation der Expression von MMP-1 in humanen Vorhautfibroblasten haben. Hierfür wurde zunächst an rekombinanten MMP-1 der Einfluss der unterschiedlichen Substanzen auf die Aktivität untersucht. Anschließend wurde der Einfluss auf die Aktivität, aber auch auf die MMP-1-Expression in primären humanen Vorhautfibroblasten untersucht. Fibroblasten sind Bindegewebszellen, die essentiell für die Bildung, Degradation und Reparatur der extrazellulären Matrix sind. Zu den Hauptprodukten gehört auch Kollagen und daher repräsentieren Fibroblasten ein gutes Model zur Untersuchen von MMPs.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Aceton (Merck, Darmstadt, Deutschland); Agarose (Sigma, Deisenhofen, Deutschland); Albumin aus Rinderserum (Biomol, Hamburg, Deutschland); 4-Aminoquecksilberacetat (APMA) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland); L-Ascorbat (Sigma, Deisenhofen, Deutschland); Brij 35 (Sigma, Deisenhofen, Deutschland); Calcium Chlorid (Merck, Darmstadt, Deutschland); 2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid Natriumsalz (cPTIO) (Alexis, Grünberg, Deutschland); Coomassie Brilliantblau R 250 (Merck, Darmstadt, Deutschland); Cystein (Sigma, Deisenhofen, Deutschland); Cystin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland); Dimethylsulfoxid (DMSO) (Merck, Darmstadt, Deutschland); Essigsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland); Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland); Ethidiumbromid (Serva, Heidelberg, Deutschland); fluoreszierendes Peptidsubstrat (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland); Glutathion, reduziert und oxidiert (Sigma, Deisenhofen, Deutschland); Glutathion-Reduktase (Sigma, Deisenhofen, Deutschland); Hepes Buffer Solution (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland); Homocystein (Fluka, Neu-Ulm, Deutschland); (\pm)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure (Trolox) (Fluka, Neu-Ulm, Deutschland); L-N-(α -Aminoethyl)-ornithin-dihydrochlorid (L-NIO) (Alexis, Grünberg, Deutschland); Mannitol (Sigma, Deisenhofen, Deutschland); Neutralrot Lösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland); Methanol (Merck, Darmstadt, Deutschland); 2-Mercaptoethanol (Sigma, Deisenhofen, Deutschland); Methionin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland); N-Acetylcystein (Sigma, Deisenhofen, Deutschland); Nicotinsäureamid-Adenosin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland); Natriumchlorid (Merck, Darmstadt, Deutschland); Natrium Hydroxid (Merck, Darmstadt, Deutschland); Natriumnitrit (Merck, Darmstadt, Deutschland); Phosphorsäure (Fluka, Neu-Ulm, Deutschland); rekombinante humane proMatrix Metalloproteinase-1 (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland); RNase-Inhibitor (Promega, Mannheim, Deutschland); Schwefelsäure (Fluka, Neu-Ulm, Deutschland); Streptavidin-HRP (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland); Substrat Reagenz (AB-Lösung) (R&D System, Wiesbaden, Deutschland); Polyoxyethylensorbitan Monolaurat (Tween 20) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland); Salzsäure (HCl) (Merck, Darmstadt, Deutschland); Thermoklar (Bio Med, München, Deutschland); Triethanolamin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland); Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (Roth, Karlsruhe, Deutschland); Triton X-100 (Serva, Heidelberg, Deutschland); Tween (Fluka, Neu-Ulm, Deutschland); Vinylpyridin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland); Wasser: Molekulare Biology Grade (Eppendorf, Hamburg, Deutschland); Wasserstoffperoxid (Merck, Darmstadt, Deutschland)

2.1.2 Kits

- Omniskript Reverse Transkriptase Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, U.S.A)
- RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- Venor[®] Gem (Minerva Biolabs, Berlin, Deutschland)
- DAKO[®] Liquid DAB + Substrate-Chromogen System (DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland)
- Universal DAKO LSAB[®]2 System, Peroxidase (DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland)
- RNase-Free DNase Set (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- QIAshredder (Qiagen, Hilden, Deutschland)

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

- Pipetten:
 - Pipetten-Spitzen Tip One (Star Lab GmbH, Ahrensburg, Deutschland)
 - Pipetten-Spitzen 10 µl DNase RNase frei (Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland)
 - Pipetten Costar[®] 5 ml, 10 ml, 25 ml (Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande)
 - Absaugpipetten 5 ml (BD Falcon, Heidelberg, Deutschland)
- Präzisions-Dispenser Tips:
 - 1,25 ml, 2,5 ml, 5 ml (Brand, Wertheim, Deutschland)
 - 0,5 ml (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- 96 well Platten für ELISA:
 - 96 F Maxisorp Black Microwell SH (Nunc, Roskilde, Dänemark)
 - FIA-Platte, Schwarz 96 K-F-Form, Mittlere Bindung (Greiner Bio-One, Essen, Deutschland)
 - Greiner 96-well, PS-Microplate 96 K (Greiner Bio-One, Essen, Deutschland)
 - 96-well Reaktionsplatten (Real Time PCR): 96-well Optical Reaction Plate with Barcode (128) ABI Prism (Applied Biosystem, Foster City, U.S.A.)
 - Optical Adhesive Covers (Applied Biosystem, Foster City, U.S.A.)
 - Glas Chamber Slide 2 well (Nunc, Roskilde, Dänemark)
 - Gewebekulturschalen: 6-well, 6cm, 10 cm (Greiner Bio-One, Essen, Deutschland)
 - PP-Röhrchen: 15 ml, 50 ml (Greiner Bio-One, Essen, Deutschland)
 - Reaktionsgefäße: Save Lock Tubes: 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
 - Parafilm[®] (American National Can[™], Chicago, U.S.A)
 - pH-Indikatorstreifen nicht blutend pH 0-14 (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Spritzen:
 - Omnifix[®]-F Luer 1ml (Braun, Melsungen, Deutschland)
 - Injekt 10 ml Luer Solo (Braun, Melsungen, Deutschland)

- Omnifix[®] 50 ml (Braun, Melsungen, Deutschland)
- Injektionsnadel: 20 G x 1 1/2 (Terumo, Leuven, Belgien)
- Zellspatel: Einweg Zellschaber (BD Falcon, Heidelberg, Deutschland)
- Sterilfilter, Minisart[®] (0,20 µM) (Sartorius, Göttingen, Deutschland)

2.1.4 Geräte

- ABI Prism 7900 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA)
- Autoclav GLA 40 (Fritz Gössner Medizin und Labortechnik, Hamburg, Deutschland)
- Brutschränke:
 - Hera Cell[®] Heraeus[®] (Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland)
 - IG 150 (Jouan, Saint Nazaire, Frankreich)
- Bunsenbrenner:
 - Flammy L (Schütt, Göttingen, Deutschland)
 - Fireboy (Tecnomara AG, Wallisellen, Schweiz)
- Eppendorf Multipette[®] 4780 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- FluoStar Optima Microplatten-Leser (BMG Labtech, Offenburg, Deutschland)
Softwareversion 1,30-0
- Gelkammern für Elektrophorese (Bio Rad, München, Deutschland)
- Glasgeräte: Bechergläser, Glasflaschen, Messzylinder, Erlmeyer Kolben (Brand, Wertheim, Deutschland) (Schott-Duran[®], Wertheim, Deutschland)
- Heizblock (Biometra, Göttingen, Deutschland)
- Heizplatte Ceran[®] (Schott, Wertheim, Deutschland)
- Kameras:
 - RT-Monochrome (Diagnostic Instruments Inc., Sterling Heights, U.S.A)
 - Software: Spot Advance
 - RT-Color (Diagnostic Instruments Inc., Sterling Heights, U.S.A)
Software: Spot Advance 3.50
 - Power Supply: RT-Powersupply (Diagnostic Instruments Inc., Sterling Heights, U.S.A)
- Mikroskope:
 - Axiovert 200 (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland)
 - Axioplan (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland)
- Neubauer Zählkammer (Brand, Wertheim, Deutschland)
- pH-Meter Digital (Knick, Berlin, Deutschland)
- Pipettierhilfen:
 - Eppendorf Reference[®] 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
 - Mehrkanalpipette (12 Kanal) Costar[®] (Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande)
 - Pipettus[®] (Hirschmann[®] Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland)
- PCR-Block: Gene Amp PCR-System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, U.S.A)
- Photometer: Ultraspec 2000 UV/Visible Spectrometer (Pharmacia Biotech, Cambridge, U.K.)
Software: SWIFT – Multiple Wavelength Version 1.05
- Pumpen: Laboport[®] (KNF-Neuberger Inc., Trenton, U.S.A.)

- UVA Quelle: Sellas 4000 W Quecksilber-Lampe (Sellas Medizinische Geräte, Gevelsberg, Deutschland)
- UV-Licht Platte (254 nm): Fluo-unk (Bachofer, Reutlingen, Deutschland)
- Schüttler, MS1 Minishake (IKA[®], Staufen, Deutschland)
- Schüttler, Lab-Shaker Modell Kühner (Braun, Melsungen, Deutschland)
- Spannungsgeber: Power pac Basic (Bio Rad, München, Deutschland)
- Sterilbänke :
 - Banktyp EF5EC (Clean Air Techniek bv, Woerden, Niederlande)
 - Banktyp Euroflow (Clean Air Techniek bv, Woerden, Niederlande)
- Waagen:
 - Feinwaage AG 285 (Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz)
 - Waage E 200 (Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz)
- Wasserbad: Thermomix[®] RU (Braun, Melsungen, Deutschland)
- Zentrifugen:
 - Glaxy Mini (VWR, Batavia, U.S.A)
 - Eppendorf E 5412 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
 - Eppendorf 5415 D (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
 - Allegra[™] –gkr KR (Fa. Beckman Coulter Inc., Fullerton, U.S.A)
 - Kühlzentrifuge: Universal 30RF (Hettich, Tuttlingen, Deutschland)

2.1.5 Lösungen und Puffer

Carbonatpuffer	150 mM CaCO ₃ pH 9,6
Griess I	1 % Sulfanilamid 2,5 % Phosphorsäure
Griess II	1 % N-Naphthylendiamin-dihydrochlorid 2,5 % Phosphorsäure
PBS:	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O 1,5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
PBS / EDTA:	0,02 % EDTA in PBS
TBS:	20 mM Tris 150 mM NaCl pH 7,8
TBS-T:	0,05 % Tween 100 in TBS
TCNB:	50 mM Tris 10 mM CaCl ₂ 150 mM NaCl 0,05 % Brij pH 7,5
TAE-Puffer (1x)	40 mM Tris 20 mM Essigsäure 2,6 mM EDTA pH 8
Blocking-Puffer für Immunzytochemie	5 % BSA 0,1 mM DTPA 0,3 % Triton X-100 in PBS

2.1.6 Zellkulturmedien und Zusätze

1. Einfriermedium: RPMI 1640 (1 ×) (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland) + 20 % DMSO
2. Fötale Kälber Serum FCS (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland)
3. GlutaMAX™ (100 ×) (Gibco, Paisley, U.K.)
4. Hepes Puffer (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland)
- 5° MEM Non Essential Amino Acids (100 ×) (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland)
6. Penicillin/Streptomycin (100 ×) (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland)
7. RPMI 1640 (1 ×) (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland) ohne L-Glutamine
8. Trypsin/ EDTA (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland)
9. Fibroblasten Kulturmedium:
 - RPMI
 - GlutaMAX (1x)
 - Hepes
 - MEM
 - Penicillin/ Streptomycin (1x)
 - 10 % oder 20 % FCS

2.1.7 Antikörper

Für Immunhistochemie gegen humane Vorhautfibroblasten

- Maus anti human Fibroblast (Clone 5B5) (DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland)
- Monoklonaler anti-human Pro/aktiv MMP-1 Antikörper (Clone: 36665) (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland)
- Biotinylierter anti-human MMP-1 Antikörper (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland)
- Maus IgG1 Negativkontrolle (DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland)

2.1.8 Zytokine

- rekombinantes humanes IL-1 β ,
- humaner Tumornekrosefaktor (TNF)- α
- humanes Interferon (IFN)- γ

(Strathmann Biotec, Hannover, Deutschland)

2.1.9 NO-Donoren

(Z)-1-[N-(2-aminoethyl)-N-(2-ammoniomethyl)amino]diazon-1-ium-1,2diolat (DETA/NO)
Eine 50 mM DETA/NO Lösung in Medium wurde unmittelbar vor dem Versuch angesetzt und mit 1 M HCl neutralisiert.

DETA/NO wurde freundlicherweise von Prof. Dr. rer. nat. Klaus-Dietrich Kröncke (Institut für Biochemie und Molekularbiologie I, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

2.1.10 Oligonukleotide

Die Primer und Proben für die Real-Time PCR wurden mit der Primer Express® Software v2.0 bestimmt.

Tabelle 1: Sequenz der in der Real-Time PCR verwendeten Oligonukleotide

Gen	Sequenz	Länge PCR-Produkt
iNOS	sense: 5'-GGT GGA AGC GGT AAC AAA GG-3', antisense: 5'-TGC TTG GTG GCG AAG ATG A-3'	81 bp
MMP-1	sense: 5'-AAT GTG CTA CAC GGA TAC CC-3' antisense: 5'-CTT TGT GGC CAA TTC CAG GA-3'	213 bp
18 S	sense: 5'-CAT GGT GAC CAC GGG TGA C-3' antisense: 5'-TTC CTT GGA TGT GGT AGC-CG-3'	79 bp

2.2 Methoden

2.2.1 Vorbereitung und Aktivierung von MMP-1

Zur Bestimmung verschiedener Einflüsse auf die Aktivität von MMP-1 wurde rekombinantes humanes MMP-1 verwendet.

Zu 100 ng/μl proMMP-1 in TCNB-Puffer wurde für die Aktivierung eine 5 mM APMA-Lösung in DMSO dazugegeben, sodass die Endkonzentration 1 mM APMA betrug. Die Aktivierung erfolgte für 2 h bei 37 °C. Anschließend wurde das MMP-1 aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.2.2 Vorbereitung des Fluoreszenzsubstrats

Zur Aktivitätsbestimmung des MMP-1 wurde ein Fluoreszenz Peptid Substrat verwendet, welches aus dem Fluoreszenzfarbstoff (7-Methoycoumarin-4-yl)acetyl (MCA), einer Peptidkette und dem Quencher N-3-(2, 4-Dinitrophenyl)-L-2,3-diaminopropionyl (Dpa) besteht und wie folgt aufgebaut ist: MCA - Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg - NH₂ (Neumann, Kubota *et al.* 2004). Das Substrat wurde in einer Konzentration von 6,2 mM in DMSO geliefert. Es wurde zunächst auf 1 mM verdünnt und Aliquots bei -20°C im dunkel gelagert.

2.2.3 Aktivitätsbestimmung von MMP-1

Zur Bestimmung der Aktivität von MMP-1 wurde die Fluoreszenz gemessen, die nach der proteolytischen Spaltung des Substrats durch MMP-1 entsteht. Hierzu wurden jeweils 1 ng MMP-1 und 1 μM Fluoreszenzsubstrat verwendet. Die Reaktion fand in TCNB-Puffer und einem Gesamtvolumen von 100 μl statt und wurde in schwarzen 96-well Platten (FIA-Platte, schwarz 96K – F-Form Mittlere Bindung) durchgeführt. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C wurde die entstandene Fluoreszenz bei den Wellenlängen 320 nm (Exikation) und 405 nm (Absorption) gemessen. Zur Untersuchung des Einflusses diverser Substanzen auf die MMP-1-Aktivität wurden diese zunächst im Probenpuffer gelöst, so dass im Endvolumen die gewünschte Konzentration der Substanzen vorlag. Untersucht wurde der Einfluss von den Thiolen: Glutathion, Cystein, Homocystein und N-Acetylcystein sowie den derivatisierten Thiolen: S-Nitroso-GSH (GS-NO), GSSG, Cystin und Methionin. Außerdem wurde der Einfluss von Nitrit, Mannitol, Trolox, cPTIO, Natriumascorbat und H₂O₂ sowie der Einfluss von UVA-Strahlung untersucht. Nitrit, GSH und Natriumascorbat wurden als eine Stocklösung mit einer Konzentration von 100 mM in TCNB angesetzt, wenn nötig der pH neutralisiert, und dann so verdünnt, dass die gewünschte Endkonzentration im Ansatz erreicht wurde. Von cPTIO wurde eine Stocklösung von 10 mM, von Trolox 25 mM, von Mannitol 1 M und von H₂O₂ eine 50 mM Stocklösung angesetzt. Bei den Thiolen wurde eine Konzentrationsreihe von 100 μM bis 1 mM verwendet. Die eingesetzten Konzentrationen der derivatisierten Thiole, von Ascorbat und von Trolox betragen 1 mM, von Nitrit 5 mM, von Mannitol 250 mM, von cPTIO 100 μM und von H₂O₂ 500 μM. Bei einer Bestrahlung betrug die UVA-Dosis 50 J/cm²; die Bestrahlung wurde auf Eis ausgeführt. Um die Zeitabhängigkeit mancher Behandlungen festzustellen, wurde im FLUOStar OTIMA bei 37 °C inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten die Fluoreszenz gemessen. Um den Einfluss von

UVA nach Vorinkubation mit verschiedenen Behandlungen zu bestimmen wurde die Messung unterbrochen, die Proben mit 50 J/cm² bestrahlt und nach der Bestrahlung die Messung fortgesetzt.

2.2.4 Gelatin Zymogramm-Gel

Zur Bestimmung der Aktivität von MMP-1 mit Hilfe eines natürlichen Substrats wurde eine abgewandelte Zymographie durchgeführt. Dafür wurde ein Acrylamidgel gegossen, welches das Substrat enthält. Das Prinzip der Zymographie beruht darauf, dass Stellen an denen das Substrat verdaut sich nicht durch Coomassie Blau anfärben lassen.

Ein 7,5-%iges Acrylamidgel mit 0,2 mg/ml Gelatin wurde mit einer Dicke von 1 mm gegossen. Nach dem Auspolymerisieren, wurden Löcher mit 5 mm Durchmesser eingestanz und das Gel für 1 h in TCNB Puffer equilibriert. In die Löcher wurde je 500 ng MMP-1 alleine, bzw. zusammen mit 500 mM GSH oder 500 mM GS-NO gegeben und zusammen für 24 h bei 37 °C in einer Feuchtkammer inkubiert. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie Blue R-250 gefärbt. Für die Färbung wurde eine 0,5-%ige Coomassie-Lösung in 10 % Eisessig, 50 % Methanol in Wasser verwendet und für 30 Minuten in dieser gefärbt. Für die Entfärbung wurde eine Entfärbelösung bestehend aus 30 % Methanol, 10 % Essigsäure in Wasser verwendet. In den Arealen, in denen die Proteinase aktiv ist, entstehen nach der Entfärbung helle Bereiche, während der Rest des Gels blau gefärbt bleibt.

2.2.5 Kinetik der Inhibition

Zur Bestimmung der Kinetik von MMP-1 wurde 1 ng MMP-1 in An- und Abwesenheit von 1 mM GSH mit Konzentrationen des Fluoreszenz-Substrats von 0,8 bis 50 µM bei 30 °C inkubiert und die entstehende Fluoreszenz über einen Zeitraum von 18 h gemessen. Das Probenvolumen betrug 100 µl. Zur Bestimmung maximalen Geschwindigkeit (v_{max}) und der Michaelis-Konstante (K_m) wurden die Daten mit Hilfe eine Lineweaver-Burk Diagramms analysiert.

2.2.6 Herstellung von S-Nitrosoglutathion

Zur Herstellung einer 100 mM GS-NO Lösung wurden 40 µl einer eisgekühlten 250 mM GSH Lösung mit 40 µl einer 250 mM Natriumnitrit Lösung, beides in TCNB-Puffer, versetzt und mit 10 µl 1 M HCl angesäuert. Die entstandene tiefrote Lösung wurde nach 10 Minuten auf Eis und mehrfachem mischen mit 10 µl 1 M NaOH neutralisiert. Bis zur Verwendung wurde die Lösung auf Eis gehalten. Die GS-NO-Lösung wurde vor jedem Versuch unmittelbar frisch angesetzt.

2.2.7 GSSG-Messung

Eine 1 mM Lösung von GSH wurde in Anwesenheit von Nitrit (5 mM), Trolox (1 mM), Nitrit (5 mM) + Natriumascorbat (1 mM) oder Trolox (1 mM) + Natriumascorbat (1 mM) mit 50 J/cm² UVA bestrahlt und der GSSG-Gehalt enzymatisch nach Anderson et al

bestimmt (Anderson 1985). Nach der Bestrahlung wurden freie Thiole mit 2-Vinylpyridin blockiert und der GSSG-Gehalt mit 5,5'-Dithionitrobenzoe Säure in der Anwesenheit von NADPH und Glutathion Reduktase bestimmt. Anschließend wurden die Verhältnisse des GSSG-Gehalts der bestrahlten zu den unbestrahlten Proben berechnet.

2.2.8 Isolation und Kultivierung der Fibroblasten

Die verwendeten humanen Vorhautfibroblasten (HVF) wurden aus humaner Vorhaut isoliert. Hierfür wurden die 5 bis 10 Stücke der Haut mit ca. 1 mm Durchmesser auf einer Zellkulturplatte mit 6 cm Durchmesser fixiert und anschließend mit Fibroblasten-Kulturmedium (20 % FCS) überschichtet. So präpariert wurden sie in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % FCS möglichst erschütterungsfrei für 7-10 Tage belassen. Anschließend wurden die Hautstücke abgesaugt, das Medium gewechselt und die Fibroblasten bis zur Konfluenz auf der Platte belassen. Die Zellen wurden in Fibroblasten-Kulturmedium auf Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser bei 37 °C und 5 % CO₂ weiterkultiviert. Für die folgenden Versuche wurden Fibroblasten in den Passagen 5-15 verwendet. Die Vorhaut wurde freundlicherweise von Dr. Mirko Müller (Urologische Klinik, Universitätsklinikum Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

2.2.9 Einfrieren der HVF

Zur längeren Lagerung wurden die HVF bei -80 °C eingefroren. Hierzu wurden die abgelösten Zellen nach dem Sedimentieren in FCS resuspendiert und dann im gleichen Verhältnis mit Einfriermedium (RPMI, 20 % DMSO) versetzt. In jedes Einfriergefäß wurden 1-3 x 10⁶ Zellen gegeben und in einem Nalgene-*Cryo Freezing Container* auf -80 °C langsam heruntergekühlt.

2.2.10 Auftauen der HVF

Die bei -80 °C eingefrorenen Zellen wurden zur weiteren Kultivierung möglichst schnell auf 37 °C erwärmt, in Fibroblasten-Kulturmedium (20 % FCS) überführt und abzentrifugiert (5 min, RT, 1000 rpm). Das Zellpellet wurde anschließend in frischem Fibroblasten-Kulturmedium aufgenommen und auf neue Zellkulturschalen ausgesät. Auf jeder 10 cm Platte wurden 1-3 x 10⁶ Zellen ausgesät.

Für Versuche wurden 3 x 10⁵ pro well einer 6-well Platte ausgesät und bis zur Konfluenz in RPMI + 20 % FCS kultiviert. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.2.11 Mykoplasmen – PCR

Um eine Kontamination mit Mykoplasmen auszuschließen wurden Überstände der isolierten Zellen mit Hilfe des Venor[®] GeM Mycoplasma Detection Kit (Minerva Biolabs, Berlin, Deutschland) untersucht. Die PCR wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt und Aliquots der PCR-Produkte anschließend in einem Agarosegel (2 %) elektrophoretisch aufgetrennt. Die HVF wurden sowohl in der ersten

Passage nach der Isolation, als auch regelmäßig während der weiteren Kultivierung auf Mycoplasmen untersucht. Für die Versuche wurden nur Zellen verwendet die eindeutig negativ waren.

2.2.12 Immunzytochemie

Der spezifische Antigenphänotyp der isolierten HVFs wurde mit Hilfe der Immunzytochemie und einem monoklonalen Antikörper gegen 4-Prolyl-Hydroxylase (Clone 5B5) (Dako Cytomation GmbH, Hamburg, Deutschland) charakterisiert. Der Antikörper gegen 4-Prolyl-Hydroxylase gilt als Fibroblastenmarker (Janin, Konttinen et al. 1990). Für die Immunzytochemie wurden 1×10^5 HVF auf 2-Chamber-Slides aus Glas ausgesät und für 24 h im Brutschrank kultiviert. Nachdem das Medium abgenommen wurde, wurden die Zellen luftgetrocknet und für 10 Minuten mit Aceton fixiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden unspezifische Bindungsstellen abgedeckt. Hierfür wurde mit dem Blocking-Puffer für 1 h bei RT in einer Feuchtkammer inkubiert. Die anschließende Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte für 1 h bei RT. Der Antikörper wurde in einer 1:50 Verdünnung im Blocking-Puffer eingesetzt.

Für eine Negativkontrolle wurden die Proben mit einem monoklonalen IgG1 Antikörper gegen die Glukoseoxidase aus *Aspergillus niger* (DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland) überschichtet, der auf dieselbe Konzentration wie der Erstantikörper verdünnt wurde. Der Antikörper gegen *Aspergillus niger* gilt als Negativkontrolle, da dieses Enzym in keinem Säugergewebe vorkommt.

Zur Inhibition der endogenen Peroxidaseaktivität wurden die Objektträger mit 0,3 % Wasserstoffperoxid für 15 min inkubiert und anschließend die Objektträger dreimal mit dem Waschpuffer gewaschen. Die Bindung eines sekundären Antikörpers erfolgte nach den Angaben des Universal DAKO LSAB2-Kits (DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland), die Detektion mit dem DAB-Reagenz (DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland). Nach einer Gegenfärbung mit Hämotoxylin und Entwässerung mittels aufsteigender Alkoholreihe wurden die Proben mit Roti[®]-Histokitt (Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckelt.

2.2.13 Neutralrotfärbung zur Bestimmung der Zellvitalität

Zur Bestimmung der Zellvitalität wurden die Zellen mit Neutralrot, ein Farbstoff, den nur vitale Zellen verstoffwechseln, gefärbt. Nach Abnahme der Überstände wurden die Zellen für 1 h mit Neutralrotlösung, 1:100 in Fibroblasten-Kulturmedium verdünnt, im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) für 1 h inkubiert. Anschließend wurde die Neutralrotlösung abgesaugt, 2-mal mit PBS gewaschen und die Zellen getrocknet. Für die Messung wurden die Zellen mit 1 ml Isopropanol/ 1 % HCl gelöst, je 100 µl in eine klare 96 Well-Platte überführt und bei einer Absorptionswellenlänge von 540 nm gemessen. Anhand der Stärke der Färbung konnte auf die Anzahl der vitalen Zellen zurück geschlossen werden.

2.2.14 Trypsinieren der HVF

Zum Passagieren der Zellen wurden die Zellen zunächst mit PBS/EDTA gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA von der Zellkulturschale abgelöst. Nach 5 Minuten

wurde die Trypsinierung mit RPMI (20 % FCS) abgestoppt und nicht abgelöste Zellen mit einem Zellspatel von der Zellkulturschale gelöst. Die abgelösten Zellen wurden abzentrifugiert (5 min, RT, 1000 rpm) und erneut in RPMI (20 % FCS) aufgenommen. Für die weitere Kultivierung der Zellen, wurden sie 1:3 verdünnt auf neue Kulturschalen ausgesät.

2.2.15 Bestrahlung der HVF

Zur Untersuchung des Einflusses von UVA-Strahlung wurden HVF in 6-well Zellkulturplatten mit der nicht toxischen Dosis von 15 J/cm UVA in PBS bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen in RPMI (10 % FCS) weiter kultiviert. Zur Kontrolle wurden zusätzlich Ansätze ohne Bestrahlung aber mit ansonst gleicher Behandlung durchgeführt.

2.2.16 Behandlung der HVF mit GSH und DETA/NO

Um den Einfluss von GSH und NO auf die MMP-1 mRNA- und Protein-Expression bzw. die Aktivität von MMP-1 zu untersuchen wurden HVF mit GSH (300-10 000 μ M) und/oder DETA/NO (1 mM) untersucht. Als Kontrolle diente die Muttersubstanz DETA. Zusätzlich zum Einfluss von GSH auf HVF nach Bestrahlung mit UVA untersucht. Hierzu wurden die Zellen zunächst wie in 2.2.15 beschrieben bestrahlt und anschließend mit den GSH-Konzentrationen behandelt. DETA/NO hat im Zellkulturmedium bei 37 °C eine Halbwertszeit von ca. 8 h. Die Stocklösungen von 50 mM DETA/NO und DETA wurden unmittelbar vor der Verwendung auf Eis und in Medium als eine neutrale Lösung hergestellt. Die HVF wurden sowohl für die Behandlung mit DETA/NO als auch für die mit GSH für 24 h in RPMI inkubiert (37 °C, 5 % CO₂).

2.2.17 Zytokinbehandlung

Zur Untersuchung des Einflusses von Zytokinen auf HVF wurden die Zellen mit jeweils 500 U/ml der Th1-Zytokine IL-1 β , TNF- α und IFN- γ und allen möglichen Kombinationen der Zytokine aktiviert. Die Zytokine wurden in entsprechender Konzentration in RPMI-Medium (10 % FCS) verdünnt und die Zellen anschließend für 6-48 h mit den Zytokinen behandelt.

2.2.18 RNA-Präparation

Die Gesamt-RNA aus Zellen wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Während der Isolation wurden DNA-Verunreinigungen mit dem RNase-free DNase Set (Qiagen, Hilden) entfernt. Beides wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt. Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit der isolierten RNA erfolgte photometrisch bei 260 nm und 280 nm (Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland).

2.2.19 Reverse Transkriptase-PCR

0,8 µg der Gesamt-RNA wurden mit Hilfe des Omniskript RT Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) in cDNA umgewandelt. Hierzu wurden sowohl Random Primer als auch Oligo dT-Primer gemeinsam verwendet, um einen möglichst großen Anteil der RNA in cDNA umzuwandeln.

2.2.20 quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real Time PCR wurde mit dem Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, U.S.A.) im ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystem, Foster City, U.S.A.) durchgeführt. Es wurde zur Amplifikation der 18S RNA 100 nM Primer und zur genspezifischen Amplifikation von MMP-1 und iNOS 300 nM Primer und der Master Mix entsprechend den Angaben des Herstellers eingesetzt. Als Template wurden die in der Tabelle 2 angegebenen cDNA eingesetzt, entsprechend des zu amplifizierenden Gens.

Tabelle 2: Übersicht der eingesetzten Mengen an cDNA die für die quantitative Real-Time PCR

Amplifiziertes Gen	Menge cDNA
MMP-1	20 ng
iNOS	100 ng
18S	0,16 ng

Das Reaktionsvolumen betrug 25 µM; es wurden von jeder Probe Triplets angesetzt. Für jeden Primer wurde eine Negativkontrolle mit RNase-DNase-freiem H₂O anstelle des Templates untersucht. Die PCR wurde in optischen 96-well Reaktions-Platten der Firma Applied Biosystem durchgeführt.

Das Temperaturprotokoll der PCR wurde wie folgt ausgeführt:

Schritt 1	95 °C	5 min	Aktivierung der Taq-Polymerase und Denaturierung von DNA und DNasen
Schritt 2 – 4	95 °C	15 sec	Denaturierung der DNA
	69 °C	30 sec	Annealing der Primer
	72 °C	30 sec	Elongation
<u>Erstellung einer Schmelzkurve:</u>			
Schritt 5 – 6	95 °C	15 sec	
	60 °C	15 sec	
	95 °C	15 sec	

Die Schritte 2 – 4 wurden 40-mal wiederholt.

2.2.21 Nitrit-Bestimmung mit einem Griess-Test

Die Nitritkonzentration in den Überständen von HVF wurde mit Hilfe einer Diazotierungs-Reaktion kolorimetrisch bestimmt. Die Nachweismethode beruht auf einer von Griess (1879) beschriebenen Reaktion. Dabei wird Sulfanilamid mit HNO_2 diazotiert. Das entstandene Diazoniumsalz reagiert anschließend mit N-(1-Naphthyl)ethyldiamin zu einer gefärbten Azoverbindung, die bei 540 nm ihr Absorptionsmaximum hat.

Für die Nitritbestimmung wurden je 100 μl der Zellkulturüberstände mit 50 μl Griess Reagenz I für 15 min bei RT inkubiert. Nach anschließender Zugabe von 50 μl Griess II Reagenz und Übersichtung mit 20 μl Methanol wurde der Farbumschlag durch Messung der Extinktion bei 540 nm im ELISA-Reader quantifiziert. Eine Konzentrationsreihe mit Natriumnitrit diente als Standard und zur Kontrolle der Reaktion.

2.2.22 Aktivitätsbestimmung von MMP-1 im Überstand

Zur Bestimmung der Aktivität und des MMP-1-Gehalts im Überstand wurde ein Festphasen-Assay benutzt. Der Methode beruht darauf, dass MMP-1 über einen spezifischen Antikörper an eine feste Phase gekoppelt wird und die Aktivität dann mit Hilfe des Fluoreszenzsubstrats bestimmt wird (Lauer-Fields, Nagase et al. 2004).

Hierfür wurde eine schwarze 96 well Platte (96 F Maxisorp Black Mircowell) mit 100 μl Primärantikörper (Monoclonaler anti pro/aktiv MMP-1: 2 ng/ μl in Carbonatpuffer, pH 9,6) über Nacht bei 4 °C beschichtet. Anschließend wurden mit 1 % BSA in TBS für 1 h bei RT die überzähligen Bindungsstellen blockiert.

Die Zellkulturüberstände wurden 1:5 mit TBS verdünnt und dann jeweils 100 μl der Probe oder des Standards in die Wells der schwarzen Platten überführt. Die Messung erfolgte in Duplikaten. Es wurde der Gesamt-MMP-Gehalt und der Anteil des aktiven MMPs bestimmt. Für die Standardreihe wurde rhMMP-1 in Konzentrationen zwischen 0,78125 und 50 ng/ml eingesetzt. Die Proben wurden für 3 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde das gebundene MMP-1 aktiviert. Hierzu wurde zum Standard und zu den Proben, in denen die Gesamtmenge des MMP-1 bestimmt werden sollte, pro well 200 μl einer 3 mM APMA Lösung in TCNB zugegeben. Die Wells, in denen die Menge des im Überstand aktiv vorliegende MMP-1 bestimmt werden sollte, wurden mit 200 μl TCNB inkubiert. Insgesamt wurde über 3 h bei 37 °C in einer Feuchtkammer aktiviert. Nach der Aktivierung wurde zu jedem well 200 μl des Substrats (1:500 in TCNB) zugegeben und über Nacht bei 37 °C die entstanden Fluoreszenz bei den Wellenlängen 320 nm (Exikation) und 405 (Absorption) gemessen, wobei alle 30 Minuten ein Messpunkt genommen wurde.

Zusätzlich zur Aktivitätsbestimmung kann mit einem Sekundärantikörper ein Sandwich-ELISA durchgeführt werden. Nach Beendigung der Fluorezenz-Messung, wurde dafür mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (Biotinylierter-anti-human MMP-1: 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in TBS mit 0,1 % BSA) für 2 h inkubiert. Anschließend wurde für 20 Minuten mit 100 μl einer Streptavidin-HRP (horseraddish Peroxidase) Lösung inkubiert, um die HRP an den Antikörper zu koppeln. Streptavidin (*Streptomyces avidinii*) hat durch seine jeweils 4 Bindungsstellen für Biotin eine hohe Affinität zu diesem und bindet spezifisch daran. Nach jedem Schritt wurde jeweils 3 x mit 400 μl TBS-T gewaschen.

Zur Detektion wurde eine Substratlösung, bestehend aus einer 1:1 Mischung der Farbreagenzien A (stabilisiertes H_2O_2) und B (stabilisiertes Tetramethylbenzidin) zugegeben. Die Farbreaktion wurde nach 10 Minuten mit 50 μl 1 M H_2SO_4 abgestoppt. Von dieser Lösung wurden jeweils 100 μl in die Wells einer klaren 96 Well-Platte

(Greiner 96-well; PS- Microplate 96K Flat Bottom) überführt und anschließend die Absorption bei 450 nm gemessen.

2.3 Statistische Analysen

Die Daten sind als arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Die Signifikanzen der Werte wurden mit dem *Student's t-test* (zweiseitig für unabhängige Probe) berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 *Untersuchung diverser Einflüsse auf die Aktivität von rekombinatem MMP-1*

3.1.1 Einfluss von Thiolen auf die MMP-1-Aktivität

Die Aktivität des rekombinanten MMP-1 wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzsubstrats bestimmt. Das Substrat besteht aus einer Peptidkette, einem Fluoreszenzfarbstoff und einem Quencher. Erst bei der Hydrolyse des Substrats kommt es durch Abtrennung des Quenchers zur Fluoreszenz.

Um den Einfluss von Thiolen auf die Aktivität von MMP-1 zu messen wurde MMP-1 mit Konzentrationen von 30 μM bis 1000 μM Glutathion (GSH), Cystein (Cys), Homocystein (HC) oder N-Acetylcystein (NAC) behandelt und gemeinsam mit dem Substrat in dem Reaktionspuffer TCNB für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die durch die Hydrolyse des Substrats entstehende Fluoreszenz stellt ein Maß für die MMP-1-Aktivität dar.

Alle Thiole inhibieren die MMP-1-Aktivität abhängig von der Dosis, wobei die Thiole ein unterschiedlich starkes Inhibitionspotential haben (Abb. 3-1). GSH und Cystein inhibieren die MMP-1-Aktivität ab einer Konzentration von 100 μM , während bei Homocystein und NAC die Inhibition erst ab einer Konzentration von 1000 μM signifikant wird. Die Effizienz der Inhibition nimmt in der Reihenfolge Cystein > GSH > Homocystein > NAC ab. Bei einer Konzentration von 1000 μM der Thiole wird im Fall von GSH und Cystein die Aktivität auf 33 % \pm 3 % bzw. 34 % \pm 20 % der Ausgangsaktivität herabgesetzt, bei Homocystein auf 48 % \pm 11 % und bei NAC auf 82 % \pm 6 %. Die Aktivität des MMP-1 ohne Zusätze wurde gleich 100 % gesetzt (Abb. 3-2).

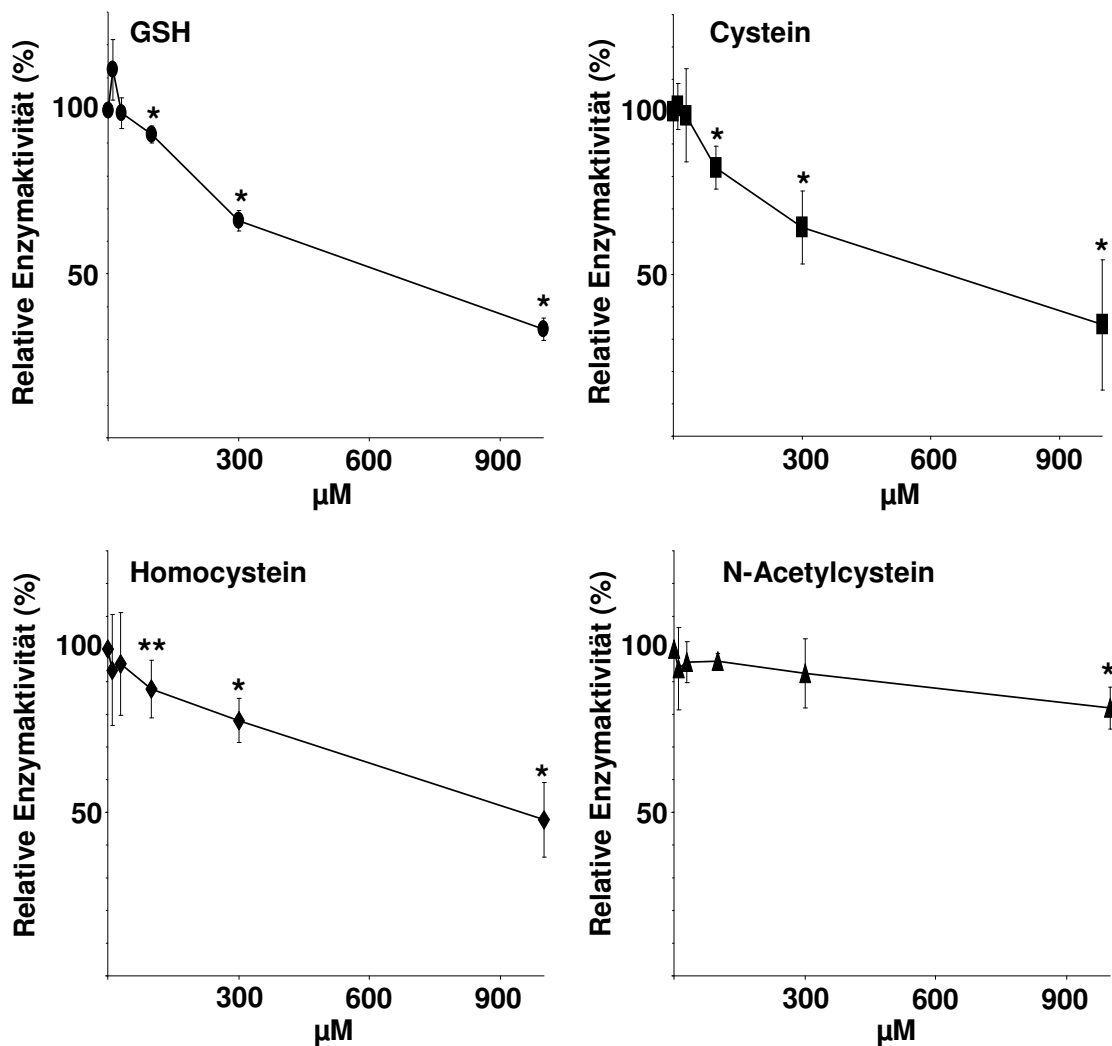


Abb. 3-1: Einfluss von reduzierten Thiolen auf die MMP-1-Aktivität.

MMP-1 wurde mit Konzentrationen von 10 - 1000 µM der Thiole GSH, Cystein, Homocystein oder NAC inkubiert. Die durch Spaltung des Fluoreszenzsubstrats entstehende Fluoreszenz wurde gemessen und die Aktivität relativ zum unbehandelten MMP-1 bestimmt. Alle Thiole inhibieren MMP-1 konzentrationsabhängig, wobei GSH und Cystein die stärkste Inhibition aufweisen, gefolgt von HC und NAC. Bei GSH, Cystein und HC ist die Inhibition ab 100 µM signifikant, bei NAC erst ab 1000 µM.

* $p \leq 0,0006$; $p \leq ** P 0,02$; $n = 4$

Im Gegensatz zu reduzierten Thiolen zeigen oxidierte bzw. derivatisierte Thiole wie Cystin, GSSG, Methionin (Met) oder GS-NO, welches unter sauren Bedingungen aus

GSH und Nitrit gebildet wurde, keine inhibitorischen Eigenschaften in Bezug auf die MMP-1-Aktivität (Abb. 3-2).

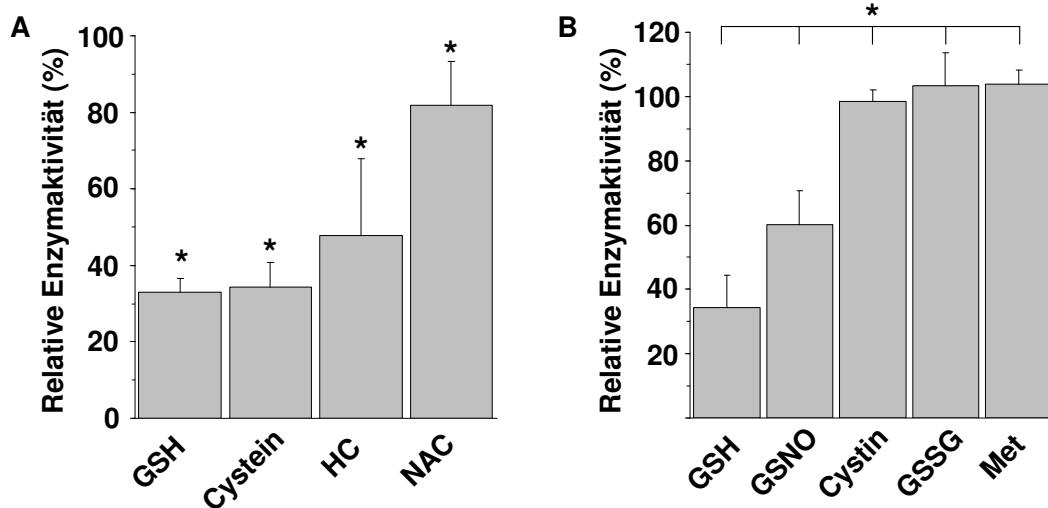


Abb. 3-2: Messung der MMP-1-Aktivität nach Behandlung reduzierten und oxidierten Thiolen.

Sowohl die reduzierten als auch die oxidierten Thiole wurden in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt.- **A** GSH und Cystein zeigen ein gleich starkes Potential bezüglich der Inhibition der MMP-1-Aktivität. Auch HC und NAC inhibieren MMP-1, allerdings schwächer. **B** Oxidierte Thiole bewirken im Gegensatz dazu eine signifikant geringere oder gar keine Inhibition von MMP-1.

* $p \leq 0,0006$; $n = 5$

Die Inhibition durch die Thiole kann zu jedem Zeitpunkt der Messung induziert werden. In Abb. 3-3 ist deutlich zu sehen, dass der Fluoreszenzanstieg nach Zugabe von Thiolen wesentlich weniger steil verläuft, also die Geschwindigkeit der Substrathydrolyse abgenommen hat. Die Fluoreszenz wurde 60 Minuten nach Start der Messung und unmittelbar vor Zugabe des GSH wurde gleich 100 % gesetzt.

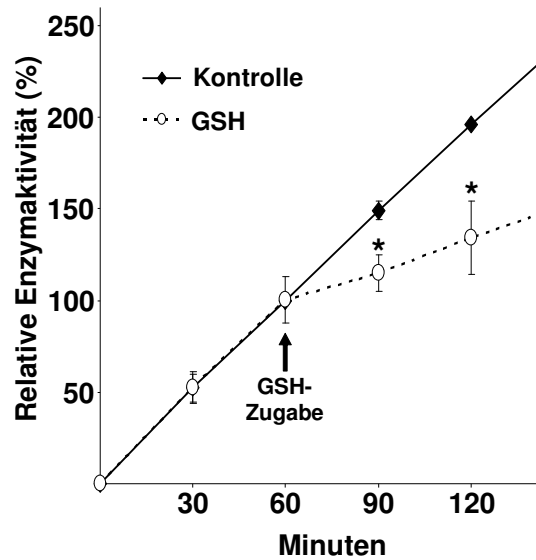


Abb. 3-3: Zeitabhängigkeit der Inhibition von MMP-1.

MMP-1 wurde zusammen mit dem Fluoreszenzsubstrat im Reaktionspuffer (TCNB) inkubiert und die durch die Hydrolyse des Substrats entstehende Fluoreszenz wurde gemessen. 60 Minuten nach Beginn der Reaktion wurde GSH injiziert (Endkonzentration: 1 mM). Nach Zugabe des GSH steigt die Fluoreszenz deutlich weniger an, d.h. die MMP-1-Aktivität wird inhibiert und weniger Substrat wird hydrolysiert.

* $p \leq 0,03$; $n = 3$

Mit Hilfe der Zymographie konnte das Ergebnis der Thiol-induzierten Inhibition der MMP-1-Aktivität unter der Verwendung eines natürlichen Substrats bestätigt werden (Abb. 3-4). Hierzu wurde ein 7,5-%iges Acrylamidgel, welches 0,2 ml/mg Gelatine enthielt, hergestellt und Löcher von 5 mm Durchmesser in dieses ausgestanzt. In diese Löcher wurde 500 ng MMP-1 alleine bzw. zusammen mit GSH oder GSNOGS-NO für 24 h bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend mit Coomassie Blue R-250 gefärbt. Das Gel färbt sich durch die enthaltene Gelatine blau, aber bleibt dort wo die Gelatine verdaut wurde ungefärbt. Probe **A** enthält die negative Kontrolle, ohne Enzym. Probe **B** enthält 500 ng MMP-1 in TCNB, Probe **C** enthält 500 mM GSH und Probe **D** 500 mM GS-NO. Um **B** und **D** ist der ungefärbte Bereich, in dem die Gelatine verdaut ist, deutlich ausgeprägter, als in Probe **C**, die GSH enthält. Die Leerkontrolle zeigt keinen entfärbten Ring und ist eindeutig negativ.

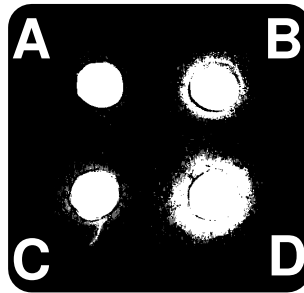


Abb. 3-4: Messung des Einflusses von GSH und GS-NO auf die Aktivität von MMP-1 durch Verdauung von Gelatine in einem Acrylamidgel.

MMP-1 wurde mit GSH und GS-NO in Reaktionspuffer (TCNB) in einem Acrylamidgel mit 0,2 mg/ ml Gelatine für 24 h inkubiert und das Gel anschließend mit Coomassie Blue R250 angefärbt. An den Stellen, an denen das MMP-1 das Gelatin verdaut wurde, bleibt das Gel ungefärbt. **A:** Leerkontrolle (TCNB); **B:** MMP-1; **C:** MMP-1 + GSH; **D:** MMP-1 + GS-NO

Durch MMP-1 wird die Gelatine im Acrylamid verdaut und ein ungefärbter Ring entsteht an der Stelle wo das MMP-1 die Gelatine verdaut hat. In der Probe **C** mit GSH ist dieser Ring deutlich verkleinert. Dagegen wird in Anwesenheit von GS-NO (**D**) der Ring eher vergrößert, was darauf hin deutet das mehr Gelatine verdaut wurde. Das Photo ist repräsentativ für mehrere äquivalent durchgeführte Versuche.

3.1.2 Kinetik der Inhibition durch Glutathion

Die enzymkinetischen Parameter K_M (Michaeliskonstante) und v_{max} (maximale Reaktionsgeschwindigkeit) der MMP-1-Hydrolyse des Fluoreszenzsubstrats in An- und Abwesenheit von GSH wurden durch die Zugabe unterschiedlicher Substratkonzentrationen und Erstellung eines Lineweaver-Burk-Diagramms berechnet. Es wurden Substratmengen von 0,8 μM bis 50 μM verwendet. In der grafischen Darstellung des Lineweaver-Burk-Diagramms erfolgt die Auftragung der reziproken Umsatzgeschwindigkeit $1/v$ gegen die reziproke Substratkonzentration $1/[S]$. Dabei entsteht eine Gerade mit der Steigung K_M/v_{max} , die die Abszisse bei $1/K_M$ schneidet.

Für das Lineweaver-Burk Diagramm ohne GSH ergibt sich eine Steigung von 316,14 und für das mit GSH eine Steigung von 441,87. Die Steigungen beider Geraden zeigen also einen signifikanten Unterschied, wobei das Lineweaver-Burk-Diagramm des unbehandelten MMP-1 eine flachere Steigerung als das des mit GSH inhibierten aufweist (Abb. 3-5). Das Lineweaver-Burk-Diagramm der Substrathydrolyse des unbehandelten MMP-1 schneidet die y-Achse bei 6,5812 und das des durch GSH inhibierten MMPs bei 2,0308.

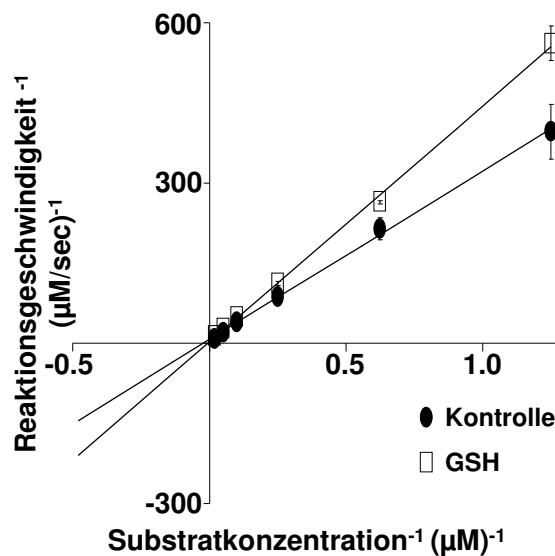


Abb. 3-5: Analyse der enzymkinetischen Parameter der Hydrolyse des Fluoreszenzsubstrats mit und ohne GSH.

Zur Bestimmung von K_m und v_{max} wurde MMP-1 mit Substratkonzentrationen von 0,8 – 50 μM mit und ohne GSH bei 30 °C über Nacht inkubiert, die anfängliche Reaktionsgeschwindigkeit v^0 bestimmt und ein Lineweaver-Burk Diagramm erstellt. Die Korrelationskoeffizienten für die Regressionsgeraden betragen $R^2 = 0,9986$ (ohne GSH) und $R^2 = 0,9988$ (mit GSH). Die resultierende Geradengleichung des Lineweaver-Burk Diagramms der Substrathydrolyse ohne GSH lautet $y = 316,14x + 6,5812$ und die für die mit GSH $y = 441,87x + 2,0308$. Daraus resultiert ein K_m für das unbehandelte MMP-1 von 48,03 μM und $v_{max} = 0,152 \mu\text{M}/\text{sec}$. Für das mit GSH inhibierte MMP-1 ergibt sich ein K_m von 217,58 μM und $v_{max} = 0,1669 \mu\text{M}/\text{sec}$. Der Unterschied zwischen den K_m Werten des unbehandelten MMP-1 und des inhibierten MMP-1 ist signifikant.

$p \leq 0,05$; $n = 4$

Die daraus ermittelten kinetischen Parameter ergeben für das nicht inhibierte MMP-1 ein $K_m = 48,03 \mu\text{M}$ und $v_{max} = 0,152 \mu\text{M}/\text{sec}$. Für das inhibierte MMP ergibt sich: $K_m = 217,58 \mu\text{M}$ und $v_{max} = 0,1669 \mu\text{M}/\text{sec}$ (Tabelle 3-1). Die Michaeliskonstante beider Reaktionen unterscheidet sich im Gegensatz zu den maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten signifikant. Die Michaeliskonstante der Substrathydrolyse ist durch die Inhibition 4,5-fach höher. Die Substrataffinität wird durch GSH um einen Faktor von ca. 4 erniedrigt, während die Umsatzrate nicht verändert wird.

Tabelle 3-1: Ergebnis der Kinetik resultierend aus den Lineweaver-Burk Diagrammen

	Substrathydrolyse ohne GSH	Substrathydrolyse mit GSH
Geradengleichung des Lineweaver-Burk-Diagramms	316.14x + 6.5812	441.87x + 2.0308
R²	0,9986	0,9988
K_M (µM)	48,03	217,58
v_{max} (µM/sec)	0,152	0,1669

3.1.3 Aufhebung der Inhibition durch Nitrit und Trolox nach UVA-Bestrahlung

Der Einfluss von UVA und der durch Bestrahlung von Nitrit entstehenden Zerfallsprodukte auf die MMP-1-Aktivität sowie die Thiol-medierte Inhibition der Aktivität wurde untersucht indem die Proben mit 50 J/cm² UVA bestrahlt wurden. Anschließend wurde das Substrat zugegeben, wiederum 1 h bei 37 °C inkubiert und die entstandene Fluoreszenz gemessen. Zu MMP-1 wurde vor der Bestrahlung 1 mM GSH und/oder mit 5 mM Nitrit zugegeben.

Weder UVA noch Nitrit alleine mit oder ohne Bestrahlung zeigen einen Einfluss auf die Aktivität von MMP-1. Auch die Inhibition der Aktivität durch GSH wird durch UVA-Bestrahlung nicht beeinflusst. Allerdings wird nach Bestrahlung von GSH und Nitrit gemeinsam das MMP-1 reaktiviert. In der unbestrahlten Vergleichsprobe dagegen zeigt das Nitrit keinen Effekt auf die Inhibition (Abb. 3-6).

Mit GSH inhibiertes MMP-1 wird in Anwesenheit von Nitrit auch dann vollständig reaktiviert, wenn die Bestrahlung zu einem späteren Zeitpunkt erfolgt. Die vollständige Reaktivierung von MMP-1 tritt unmittelbar nach der Bestrahlung auf und ist zu jedem Zeitpunkt induzierbar. In Abb. 3-6 B erfolgte die Bestrahlung 45 Minuten nach Beginn der Inkubation von MMP-1 mit GSH, Nitrit und dem Fluoreszenzsubstrat. Die Inhibition durch GSH ist demzufolge reversibel.

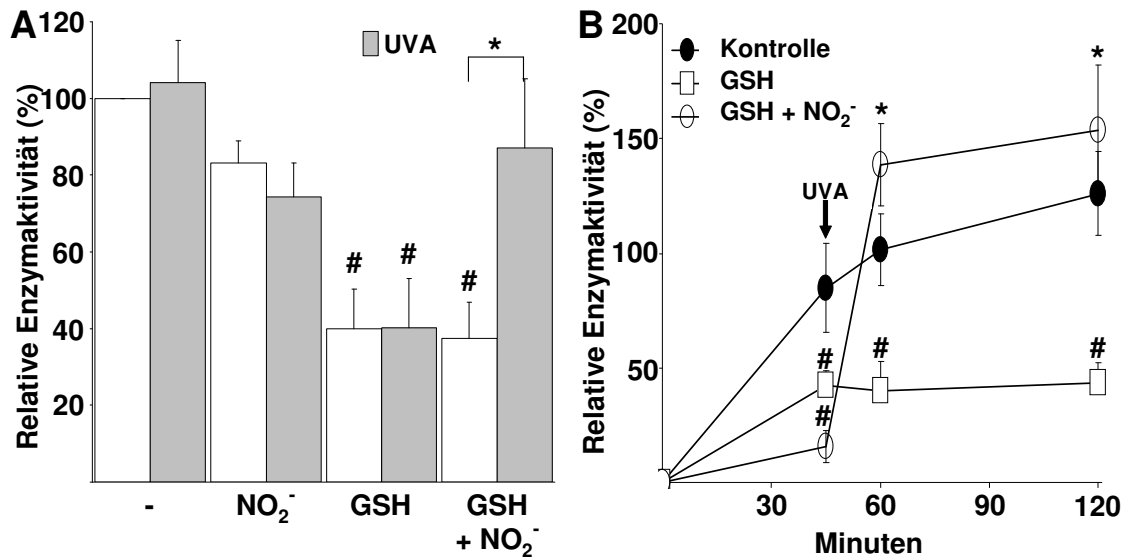


Abb. 3-6: Einfluss von Nitrit und UVA auf die GSH-bedingte Inhibition der Aktivität von MMP-1.

A MMP-1 wird zusammen mit GSH und Nitrit inkubiert und die Fähigkeit untersucht das Fluoreszenzsubstrat zu spalten. Vor Zugabe des Substrats wurde MMP-1 auf Eis mit einer UVA-Dosis von 50 J/cm² bestrahlt. Weder UVA, noch Nitrit alleine Nitrit plus Bestrahlung beeinflussen die Aktivität von MMP-1, auch auf die Inhibition durch GSH zeigt die Bestrahlung keinen Einfluss. Allerdings wird die Inhibition von MMP-1 durch GSH in Anwesenheit von Nitrit nach Bestrahlung aufgehoben. Die weißen Balken in dem Diagramm stellen die MMP-1-Aktivität der unbestrahlten Proben dar und die grauen, die der mit 50 J/cm² bestrahlten Proben. **B** Auch wenn MMP-1 mit GSH und Nitrit vorinkubiert und die Bestrahlung zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt wurde, kommt es zu einer sofortigen Reaktivierung von MMP-1 nach Bestrahlung mit 50 J/cm² UVA.

*p < 0.002; n = 3

3.1.4 Einfluss von Antioxidantien und Radikalfängern auf die Reaktivierung

Während der Bestrahlung von Nitrit entstehen diverse Radikale, die für die Reaktivierung des MMP-1 verantwortlich sein könnten. Um zu charakterisieren welche Radikalspezies an der UVA-medierte Reaktivierung von MMP-1 durch Nitrit beteiligt sind, wurden zu dem Ansatz mit GSH und Nitrit unterschiedliche Antioxidantien bzw. Radikalfänger zugegeben und der Einfluss auf die Aktivität und Reaktivierung untersucht. Hierzu wurde entweder 1 mM Natriumascorbat, 100 µM cPTIO oder 250 mM Mannitol zugegeben. Bei Natriumascorbat handelt es sich um einen effektiven NO₂-Radikalfänger, bei cPTIO um einen NO-Radikalfänger und bei Mannitol um einen

Hydroxylradikalfänger. Natriumascorbat ist hierbei als einzige der drei Substanzen in der Lage die Reaktivierung durch Nitrit nach UVA-Bestrahlung zu unterdrücken. Die anderen Substanzen zeigen keinen Einfluss auf die Reaktivierung (Abb. 3-7).

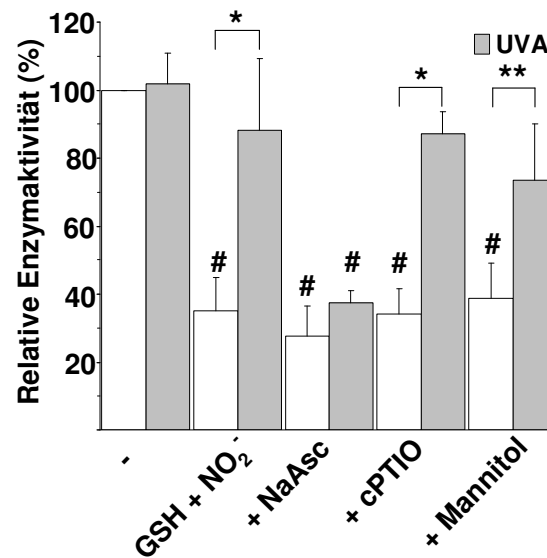


Abb. 3-7: Einfluss von Antioxidantien und Radikalfängern auf die Reaktivierung von MMP-1.

MMP-1 wurde gemeinsam mit GSH, Nitrit und den Antioxidantien, bzw. den Radikalfängern Natriumascorbat (NaAsc), cPTIO oder Mannitol inkubiert und der Einfluss von UVA-Bestrahlung (50 J/cm²) untersucht. Die durch die Hydrolyse des Substrats entstandene Fluoreszenz wurde gemessen. Die weißen Balken stellen die Enzymaktivität der unbestrahlten, die grauen, die der bestrahlten Proben dar. NaAsc verhindert die in Anwesenheit von Nitrit auftretende Reaktivierung von MMP-1; cPTIO und Mannitol hingegen beeinflussen die Reaktivierung nicht.

$p \leq 0,00001$; * $p \leq 0,0001$; ** $p \leq 0,02$; n = 3-10

3.1.5 Einfluss von anderen Radikalen auf die Inhibition von MMP-1 durch Glutathion

Um festzustellen ob auch andere Radikale eine Reaktivierung von MMP-1 nach Inhibition durch GSH bewirken können wurde analog zur Messung mit Nitrit der Einfluss von Trolox nach UVA-Bestrahlung untersucht. Trolox ist ein Vitamin E-Derivat, welches durch UVA-Bestrahlung Radikale bildet. Zusätzlich wurde der Einfluss von H₂O₂ untersucht. H₂O₂ ist ein starkes Oxidans und bildet Hydroxyl-Radikale ($\cdot\text{OH}$).

MMP-1 wurde daher in Anwesenheit von GSH und Trolox mit 50 J/cm² bestrahlt. Zusätzlich wurde auch der Einfluss von 1 mM NaAsc untersucht. Ähnlich wie Nitrit ist auch Trolox nach Bestrahlung in der Lage die Inhibition von MMP-1 vollständig aufzuheben. Die Reaktivierung von MMP-1 kann hier, genau wie bei der Reaktivierung durch Nitrit, durch Natriumascorbat verhindert werden (Abb. 3-8).

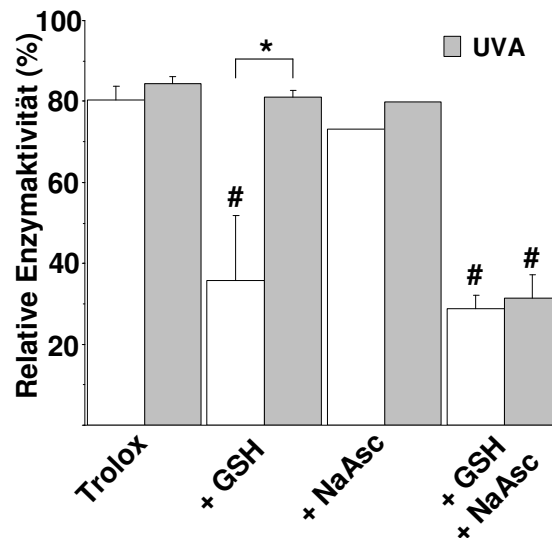


Abb. 3-8: Einfluss von Trolox auf die Inhibition der MMP-1-Aktivität durch GSH.

Analog zu Nitrit wurde auch Trolox gemeinsam mit GSH und MMP-1 bestrahlt (50 J/cm² UVA) und der Einfluss auf die Enzymaktivität mit Hilfe des Fluoreszenzsubstrats bestimmt. Analog zu Nitrit kann auch Trolox nach UVA-Bestrahlung MMP-1 reaktivieren und auch hier verhindert NaAsc die Reaktivierung. # $p \leq 0,00001$; * $p \leq 0,0001$; n = 3-10;

Um den Einfluss von 500 μM H₂O₂ auf die Inhibition zu untersuchen wurde MMP-1 mit GSH für 30 Minuten vorinkubiert. 30 Minuten nach Zugabe des H₂O₂ wurde die Aktivität des MMP-1 bestimmt. Die Zugabe von 500 μM H₂O₂ resultiert in einer teilweisen Reaktivierung von MMP-1. Die Aktivität nach Zugabe von H₂O₂ ist 30 Minuten nach Zugabe signifikant von $47,6 \pm 6,5$ % auf $66,2 \pm 5,7$ % gesteigert. Verglichen mit dem durch GSH inhibierten MMP-1 ist nach H₂O₂-Zugabe die Aktivität um 18,6 % höher. Auf die Aktivität von unbehandeltem MMP-1 hat die H₂O₂-Zugabe keinen Einfluss (Abb. 3-9).

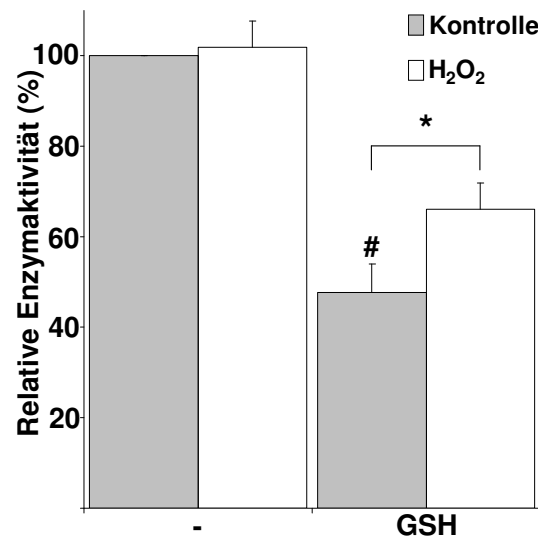


Abb. 3-9: Einfluss von H₂O₂ auf die GSH-medierte Inhibition der MMP-1-Aktivität.

MMP-1 wurde sowohl mit, als auch ohne GSH für 30 Minuten inkubiert bevor 500 µM H₂O₂ zugegeben wurde. Die Aktivität von MMP-1, bzw. die entstandene Fluoreszenz wurde sowohl unmittelbar vor Zugabe von H₂O₂ gemessen als auch 30 Minuten danach. 500 µM H₂O₂ an sich zeigen keinen Einfluss auf die Aktivität von MMP-1, allerdings ist 30 Minuten nach Zugabe von H₂O₂ die Aktivität um 18,6 % verglichen mit dem durch GSH inhibierten MMP-1 erhöht.

*p ≤ 0.005. n = 4

Zu den aus Nitrit gebildeten Radikalen nach UVA-Bestrahlung gehört auch NO. Daher wurde untersucht, ob eine Reaktivierung einer durch GSH induzierten Inhibition der MMP-1-Aktivität durch exogen zugesetztes NO erreicht werden kann. Dafür wurde MMP-1 mit 1 mM GSH und zusätzlich mit 1 mM DETA/NO und als Kontrolle mit 1 mM DETA inkubiert. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C wurde die Aktivität mit Hilfe des Fluoreszenzsubstrats bestimmt. GSH inhibiert die MMP-1-Aktivität wie zuvor gezeigt (Abb. 3-1), aber weder in Anwesenheit des NO-Donors DETA/NO, noch in dessen Abwesenheit kommt es zu einer signifikanten Veränderung der basalen MMP-1-Aktivität (Abb. 3-10). Auch auf die GSH-medierte Inhibition der MMP-1-Aktivität zeigen weder DETA/NO noch DETA einen Einfluss.

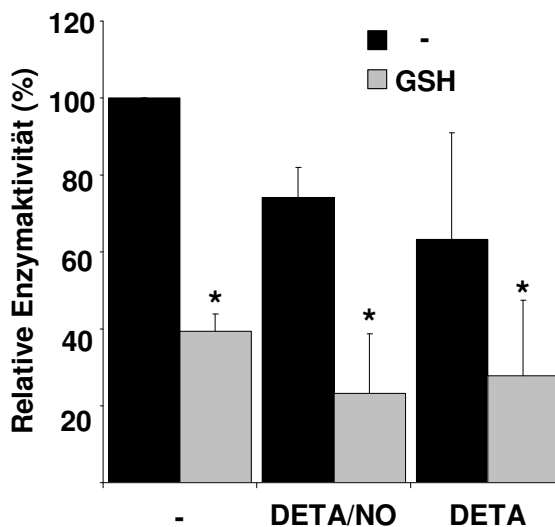


Abb. 3-10: Einfluss von NO auf die Aktivität und Inhibition der MMP-1-Aktivität.

Die MMP-1-Aktivität wurde mit 1 mM GSH inhibiert und zusätzlich mit 1 mM DETA/NO bzw. 1 mM DETA für 1 h bei 37 °C mit dem Fluoreszenzsubstrat inkubiert. Anschließend wurde die durch die Hydrolyse des Substrats entstandene Fluoreszenz gemessen. GSH inhibiert wie in vorigen Versuchen gezeigt die MMP-1-Aktivität. DETA/NO und DETA haben keinen signifikanten Effekt auf die MMP-1-Aktivität, allerdings auch keinen signifikanten Effekt auf die Inhibition von MMP-1 mit GSH.

* $p \leq 0,01$, $n = 3-4$

3.1.6 GSSG Bildung durch Nitrit und Trolox nach UVA Bestrahlung

Die Bestrahlung von Nitrit führt unter anderem zur Bildung von NO-Radikalen, die mit dem GSH zu GS-NO reagieren können. GS-NO kann wiederum das NO-Radikal abspalten und die so entstandenen Glutathionyl-Radikale (GS[•]) können zu GSSG reagieren. Das GSH/GSSG-Verhältnis in Zellen ist ein wichtiger Indikator für den Redoxstatus einer Zelle. In der Folge von oxidativen und nitrosativen Stress kommt es durch Radikale zu einer verstärkten Oxidation von GSH. Die Substanzen die zu einer Reaktivierung von MMP-1 führen bilden UVA-mediiert Radikale. Daher wurde gemessen, ob nach UVA Bestrahlung in Anwesenheit der Substanzen, die eine Reaktivierung von MMP-1 beeinflussen, verstärkt GSH oxidiert wird und die Reaktivierung möglicherweise auf eine Oxidation des GSH zurück zu führen ist. Hierzu wurde GSH, Nitrit, Natriumascorbat und Trolox unter den gleichen Bedingungen und

mit den gleichen Konzentrationen wie bei den Aktivitätsversuchen vermischt, mit 50 J/cm² UVA bestrahlt und die GSSG-Bildung gemessen.

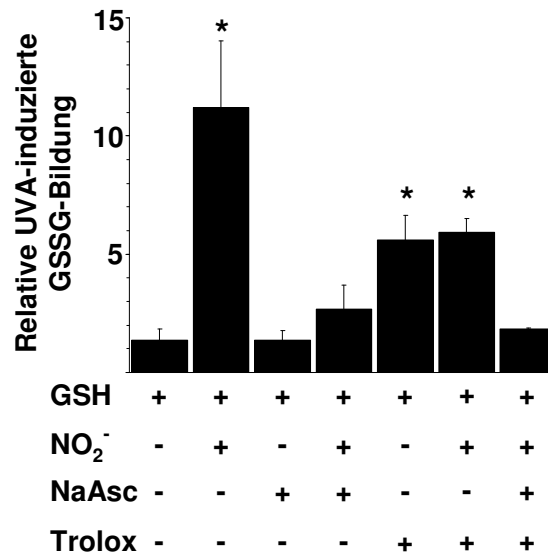


Abb. 3-11 Bildung von GSSG aus GSH durch Bestrahlung von GSH in Anwesenheit von Nitrit, NaAsc und Trolox.

GSH wurde mit Nitrit, NaAsc und Trolox versetzt und mit 50 J/cm² bestrahlt. GSSG wurde nach der Methode von Anderson et al (Anderson 1985) und die GSSG Bildung in den bestrahlten Proben wurden ins Verhältnis zu der GSSG-Bildung in den unbestrahlten Proben gesetzt. In Anwesenheit von Nitrit und Trolox, sowie bei der Kombination von beiden, wird durch Bestrahlung deutlich mehr GSH oxidiert als bei Bestrahlung von GSH alleine. Nitrit erhöht die Menge an GSSG um das $11,2 \pm 2,8$ -fache, Trolox um das $5,6 \pm 1,0$ -fache und die Kombination von beiden auf das $5,92 \pm 0,6$ -fache. In Anwesenheit von NaAsc kommt es weder durch Nitrit noch durch Trolox oder einer Kombination von beiden zu einer vermehrten Oxidation von GSH.

* $p \leq 0.0002$, $n = 4$

Es wurde ermittelt wie viel mehr GSH in den bestrahlten Proben im Vergleich mit den unbestrahlten Proben zu GSSG oxidiert wird. Hierzu wurde das Verhältnis der GSSG-Mengen aus den bestrahlten und den unbestrahlten Proben gebildet. Die Bestrahlung alleine bewirkt keine verstärkte Oxidation von GSH. Es zeigt sich, dass es in allen Fällen, die auch zu einer Reaktivierung des MMP-1 führen, es verstärkt zur Bildung von GSSG kommt. Die Bestrahlung von GSH zusammen mit Nitrit erhöht dagegen den GSSG-Gehalt um das $11,2 \pm 2,8$ -fache. In Anwesenheit von Trolox steigt der Anteil an oxidiertem GSH auf das $5,6 \pm 1,1$ -fache. In Gegenwart der Kombination von Trolox und

Nitrit ist der Anteil an oxidiertem GSH um das $5,9 \pm 0,6$ -fache erhöht. In den Proben, die gleichzeitig Natriumascorbat enthalten, wird die Oxidation des GSHs unterbunden (Abb. 3-11).

3.2 Untersuchung von MMP-1 aus Zellkulturüberständen von Humanen Vorhautfibroblasten

3.2.1 Isolation der Humanen Vorhautfibroblasten

Humane Vorhautfibroblasten (HVF) wurden aus Hautstücken isoliert, die aus Zirkumzisionen stammten. Die Zirkumzisionen wurden in der Urologischen Klinik des Universitätsklinikums Düsseldorf durchgeführt. Die phänotypische Charakterisierung der isolierten Fibroblasten erfolgte mittels Immunzytochemie und einem Fibroblasten-spezifischen monoklonalen Antikörper gegen 4-Prolyl-Hydroxylase. In allen Zellen ist eine spezifische Färbung des Zytoplasmas zu erkennen. In den Kulturen befanden sich, wie an der Färbung zu erkennen, keine anderen Zellen. Es handelt sich also um reine Fibroblastenkulturen und während der Isolation sind keine anderen Hautzellen ausgewachsen (Abb. 3-12 A, B). In der Negativkontrolle mit dem IgG1 Antikörper gegen *Aspergillus niger* Glukoseoxidase ist dagegen keine Färbung zu erkennen (Abb. 3-12 C).

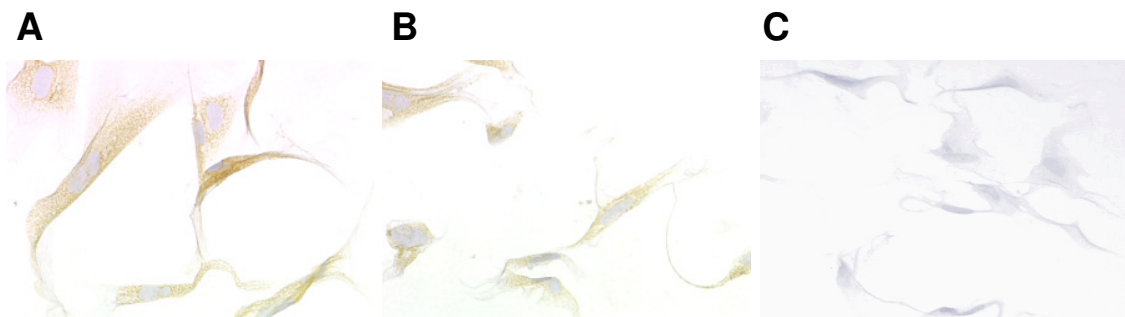


Abb. 3-12: Immunzytochemische Charakterisierung der aus Vorhaut gewonnenen Fibroblasten.

In Bild **A** und **B** sind Aufnahmen der immunzytochemischen Färbung mit dem Fibroblasten-spezifischen Antikörper gegen 4-Prolyl-Hydroxylase dargestellt. Die bräunliche Färbung des Zytoplasmas zeigt die Bindung des Antikörpers und damit, dass es sich bei den Zellen um Fibroblasten handelt. Bei Aufnahme **C** handelt es sich um die Negativkontrolle.

3.2.2 Bestimmung der Zellzahl mit Neutralrot

Es wurden in allen Versuchen ausschließlich nicht toxische Dosen der Substanzen bzw. von UVA verwendet. Dies wurde zum einen optisch anhand des Aussehens der Zellen vor Probenentnahme bestimmt, zum anderen wurden die Zellen nach gleicher Behandlung mit dem Vitalfarbstoff Neutralrot gefärbt. Keine der Behandlungen führte zu einer Veränderung der Zellzahl zum Zeitpunkt der Probenentnahme. Die Bestimmung der Zellzahl diente zur Normierung. Die ermittelten MMP-1 Proteinmengen wurden jeweils auf die Anzahl der Zellen normiert.

3.2.3 Verhältnis aktives zu gesamt MMP-1 in Humanen Vorhautfibroblasten

Um den Anteil des aktiven MMP-1 am Gesamt-MMP-1 (proMMP-1 plus aktives MMP-1) zu bestimmen wurde das im Zellkulturüberstand enthaltene MMP-1, also sowohl proMMP-1 als auch aktives MMP-1, über einen Antikörper an eine ELISA-Platte gebunden. Von jeder Probe wurde sowohl das ursprünglich aktive als auch der gesamte MMP-1-Gehalt nach einer zusätzlichen APMA-Aktivierung bestimmt. Die ermittelten MMP-1 Mengen wurden auf die mit Neutralrot bestimmte Zellzahl normiert. Die Überstände unbehandelter HVF enthalten durchschnittliche $3,93 \pm 0,85$ ng/ml aktives MMP-1 und eine Gesamtkonzentration von $15,45 \pm 3,45$ ng/ml MMP-1. Die daraus resultierende Konzentration an proMMP-1 ergibt sich aus der Differenz und beträgt 11,52 ng/ml. 25,4 % der Gesamtmenge des MMP-1 liegen daher in der aktiven Form vor (Abb. 3-13).

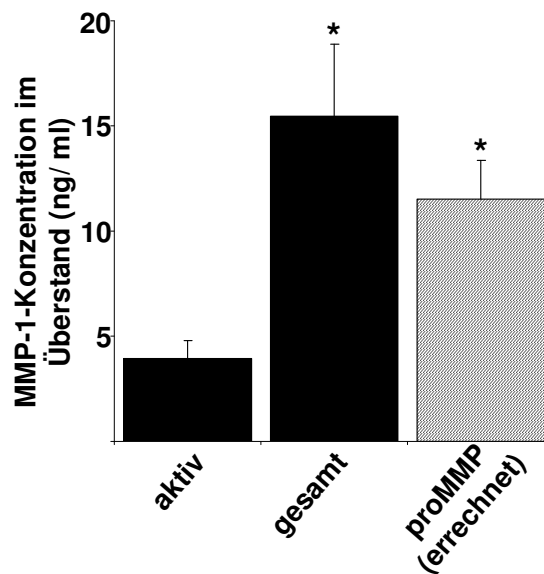


Abb. 3-13: Menge von aktivem MMP-1 und Gesamtmenge an MMP-1 in HVF.

Es wurde nach Bindung über einen Antikörper die Menge von MMP-1 in Überständen von HVF mit Hilfe des Fluoreszenzsubstrats bestimmt. 3,93 ng/ml aktives MMP-1, 15,45 ng/ml Gesamtmenge MMP-1 wurden gemessen (schwarze Balken); daraus errechnet sich eine Differenzmenge von 11,52 ng/ml und damit die Menge an proMMP-1 im Zellkulturüberstand (grauer Balken).

* $p \leq 0,006$; $n = 18$

3.2.4 Einfluss von UVA auf die MMP-1-Expression

HVF wurden mit 15 J/cm^2 UVA in PBS bestrahlt und für 24 h in RPMI mit einem FCS-Gehalt von 10 % inkubiert. Anschließend wurden die Überstände genommen bzw. die RNA isoliert. Aus den Überständen wurde die Aktivität und die Konzentration an enthaltenen MMP-1-Protein bestimmt; die RNA wurde in cDNA umgewandelt und mittels quantitativer Real-time PCR analysiert.

24 h nach der UVA Bestrahlung der humanen Vorhautfibroblasten ist mit der quantitativen Real-time PCR eine gegenüber den unbestrahlten Vergleichszellen um das $10,70 \pm 6,06$ -fache erhöhte MMP-mRNA Menge in den Zellen zu messen (Abb. 3-14 A). Die mit der Real-time PCR ermittelte Transkription wurde auf 18S-RNA normiert.

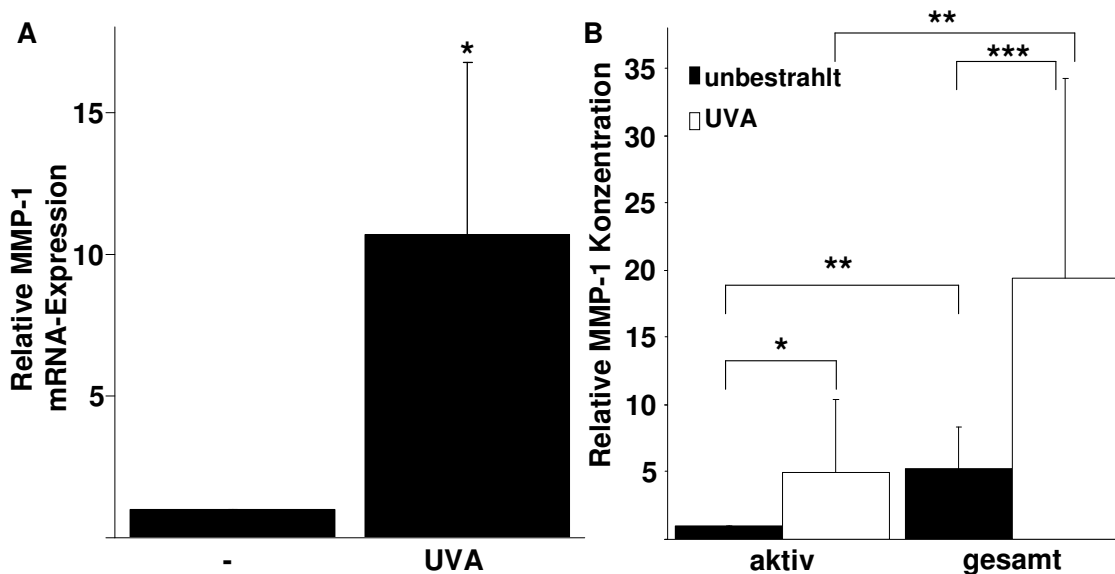


Abb. 3-14: Einfluss von UVA auf die MMP-1-Protein- und mRNA- Expression.

A MMP-1-Transkription nach UVA Bestrahlung mittels quantitativer Real-time PCR. Die Transkription ist nach Bestrahlung mit 15 J/cm² UVA um das 10,70-fache gegenüber den unbestrahlten Zellen erhöht.

B: MMP-1-Proteinexpression und Aktivität nach Bestrahlung von HVF mit 15 J/cm². Die Menge an aktiven MMP-1 im Überstand der HVF ist nach Bestrahlung um das 4,96-fache erhöht, die Gesamtmenge um das 3,72-fache. Das Verhältnis von aktivem MMP-1 zur Gesamtmenge des MMP-1 ändert sich durch die Bestrahlung nicht. Die schwarzen Balken im Diagramm repräsentieren die Werte der MMP-1-Konzentrationen in den unbehandelten HVF, die weißen Balken der nach Bestrahlung der HVF mit 15 J/cm².

A: * $p \leq 0,002$; $n = 7$

B: * $p \leq 0,04$; ** $p \leq 0,0004$, *** $p \leq 0,03$; $n = 8$

Die gemessene Proteinkonzentration im Überstand ist ebenfalls signifikant höher. Sowohl die Konzentration an aktivem, als auch die Gesamtkonzentration von MMP nach Bestrahlung mit 15 J/cm² MMP-1 nimmt deutlich zu. Die Konzentration an aktivem MMP-1 steigt nach Bestrahlung um das $4,96 \pm 3,1$ -fache relativ zur Konzentration an aktivem MMP-1 in unbehandelten Zellen. Die Gesamtkonzentration steigt gegenüber der Konzentration an MMP-1 in unbehandelten Zellen um das $4,05 \pm 1,43$ -fache (Abb. 3-14 B). Das Verhältnis von aktivem zum Gesamt-MMP-1 liegt nach Bestrahlung bei 26,88 % und bleibt damit unverändert.

3.2.5 Einfluss von GSH auf die Aktivität und Expression von MMP-1 im Überstand von Humane Vorhautfibroblasten

Durch die Messungen der MMP-1-Konzentrationen im Überstand mit Hilfe des Fluoreszenzsubstrats kann grundsätzlich nur aktives bzw. durch APMA aktiviertes MMP-1 erfasst werden. MMP-1 welches unter Umständen inhibiert ist, und nicht durch APMA aktiviert werden kann, wird bei diesen Messungen nicht erfasst. Um nun aber nicht nur die Menge an aktivem MMP und aktivierbarem MMP-1 zu bestimmen wurde zusätzlich mit einem zweiten Antikörper die Gesamtmenge von MMP-1 bestimmt. Der Sekundärantikörper erfasst MMP-1 im Überstand vollständig, unabhängig von der Aktivität. Um die relative Aktivität des MMPs im Überstand der HVF zu ermitteln, wurden die Ergebnisse der Aktivitätsmessung mit dem Fluoreszenzsubstrat, auf die mit dem zweiten Antikörper bestimmte Gesamtmenge von MMP-1 normiert.

Unbestrahlte und mit 15 J/cm² bestrahlte HVF wurden für 24 h in RPMI mit GSH-Konzentrationen von 0,3 mM - 10 mM kultiviert. Die MMP-1-Aktivität in den Überständen wurde erneut mit Hilfe des Fluoreszenzsubstrats ermittelt. Als Referenz wird nach der Bestimmung der Aktivität zusätzlich der Gesamt-MMP-1-Gehalt durch den Sekundärantikörper bestimmt. Die Quantifizierung des Sekundärantikörpers erfolgt mittels einer enzymatisch bedingten Farbreaktion mit Hilfe der Meerrettich Peroxidase (HRP).

Ab einer Konzentration von 1 mM GSH wird MMP-1 in den Überständen der unbestrahlten Zellen signifikante und wie auch das rekombinante MMP-1 konzentrationsabhängig inhibiert. Nach Zugabe von 1 mM GSH reduziert sich die Aktivität auf $72 \pm 16 \%$, 3 mM GSH reduzieren die MMP-1-Aktivität auf $31 \pm 20 \%$ und 10 mM GSH auf 18 % der ursprünglichen Aktivität (Abb. 3-15 A).

Dagegen ist das MMP-1 aus den Überständen der bestrahlten HVF nach Behandlung mit GSH nicht signifikant inhibiert. Allerdings zeigt nach UVA Bestrahlung von 15 J/cm² das MMP-1 aus dem Überstand ohne Behandlung mit GSH eine signifikant erniedrigte Aktivität von MMP-1 auf $60 \pm 31 \%$ der ursprünglichen Aktivität (Abb. 3-15 B, C).

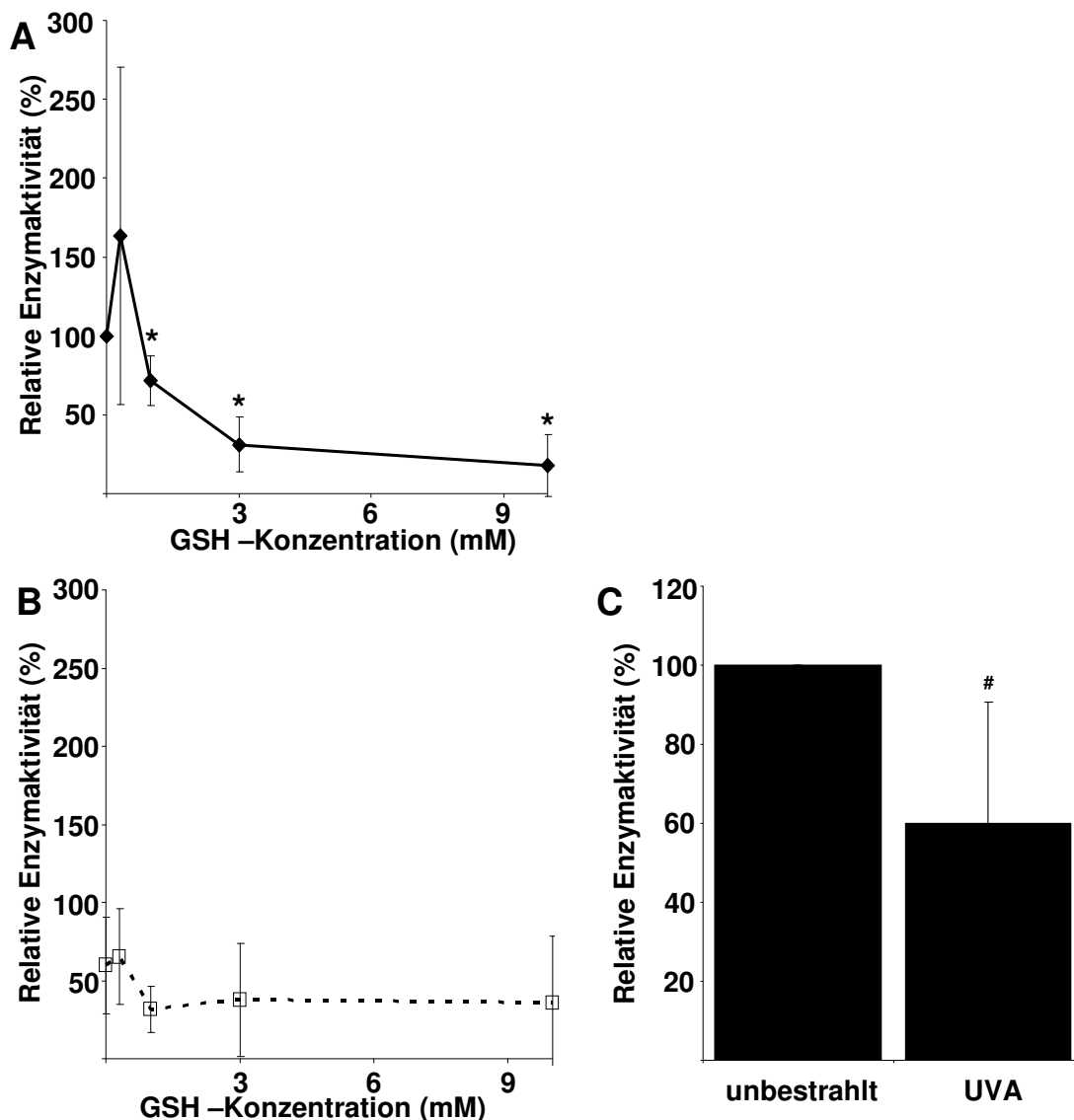


Abb. 3-15: Messung der relativen Aktivität von MMP-1 aus dem Überstand von HVF nach Behandlung mit GSH.

HVF wurden für 24 h mit steigenden GSH Konzentrationen (0,3 mM - 10 mM) im Medium inkubiert. Anschließend wurden die Überstände der Zellen genommen und die Enzymaktivität von MMP-1 untersucht. Die mit Hilfe des Fluoreszenzsubstrats bestimmten Konzentrationen an aktiven MMP-1 wurden auf die Gesamtkonzentration, die mit einem Sekundärantikörper bestimmt wurde, normiert.

A Behandlungen mit den Konzentrationen von 0,3 mM bis 10 mM GSH zeigen eine konzentrationsabhängige Inhibition der Aktivität des aktiven MMP-1 aus dem Überstand von HVF. **B** Nach Bestrahlung mit UVA ist die Aktivität von MMP-1 aus den Überständen von HVF auf 60 % reduziert. GSH hat allerdings nach UVA-Bestrahlung keinen zusätzlichen Einfluss auf die Aktivität. **C** Einfluss von UVA-Strahlung (50 J/cm²) auf die Aktivität von MMP-1 aus Überständen von HVF. Die Aktivität ist wie auch schon in **B** zu sehen auf 60 ± 30 % reduziert.

* $p \leq 0,01$; # $p \leq 0,04$; n = 4

3.2.6 Einfluss von DETA/NO auf die MMP-1-Expression und Aktivität in humanen Vorhautfibroblasten

Um den Einfluss von NO auf die Transkription von MMP-1 zu untersuchen wurden HVF mit dem NO-Donor DETA/NO behandelt. Als Kontrolle wurden zum Vergleich Zellen mit der Basis-Substanz DETA behandelt. Mittels der quantitativen Real-time PCR wurde die MMP-1 mRNA-Menge bestimmt in den HVF bestimmt und auf 18S-mRNA normiert.

Nach Behandlung mit 1 mM DETA/NO zeigen die HVF eine signifikant erhöhte MMP-1-Transkription auf das $6,62 \pm 2,83$ -fache der unbehandelten Zellen. 1 mM DETA alleine führt dagegen zu einer schwachen, wenn auch signifikanten Erhöhung auf das $1,93 \pm 0,51$ -fache (Abb. 3-16). Der Unterschied in der MMP-1-Transkription nach der Behandlung von HVF mit DETA/NO und DETA ist ebenfalls signifikant.

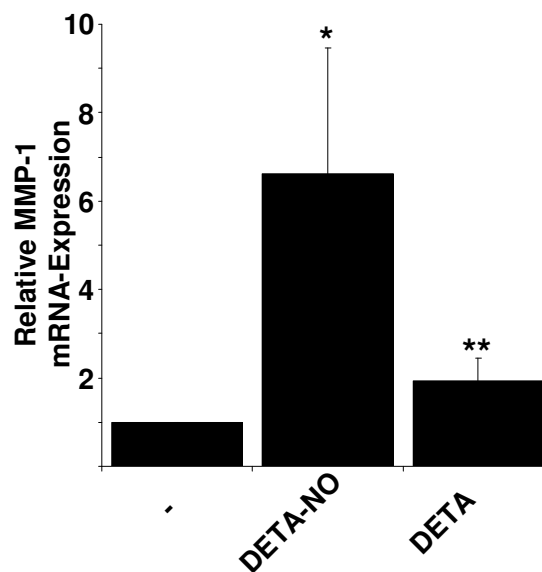


Abb. 3-16: Einfluss von Stickstoffmonoxid auf die MMP-1-Transkription.

Die HVF wurden für 24 h mit 1 mM DETA/NO bzw. als Kontrolle mit 1 mM DETA inkubiert und anschließend die RNA isoliert. Nach der cDNA Synthese wurde eine quantitative Real-time PCR durchgeführt. Verglichen zu den unbehandelten Zellen erhöht DETA/NO die Transkription auf das $6,62 \pm 2,83$ -fache und DETA um das $1,93 \pm 0,51$ -fache.

* $p \leq 0,008$; ** $p \leq 0,01$; $n = 4$

Analog zu der Untersuchung der MMP-1-Transkription wurde nach gleicher Behandlung der Einfluss von exogen zugegebenem NO auf die Proteinexpression untersucht. Es wurde sowohl der Anteil an aktivem MMP-1 im Überstand untersucht, als auch nach APMA-Aktivierung der Gesamt-MMP-1-Gehalt.

Das durch den NO-Donor DETA/NO zugegebene NO erhöht die Konzentration an aktivem MMP-1-Protein signifikant auf das $2,43 \pm 0,17$ -fache verglichen zur MMP-1 Menge in unbehandelten Zellen. DETA dagegen führt zu einer verringerten Konzentration an aktivem MMP-1 auf das $0,66 \pm 0,20$ -fache. Ähnliche Tendenzen sind auch bei der Gesamtmenge zu beobachten, allerdings sind diese Konzentrationsveränderung des Gesamt-MMPs nicht signifikant (Abb. 3-17).

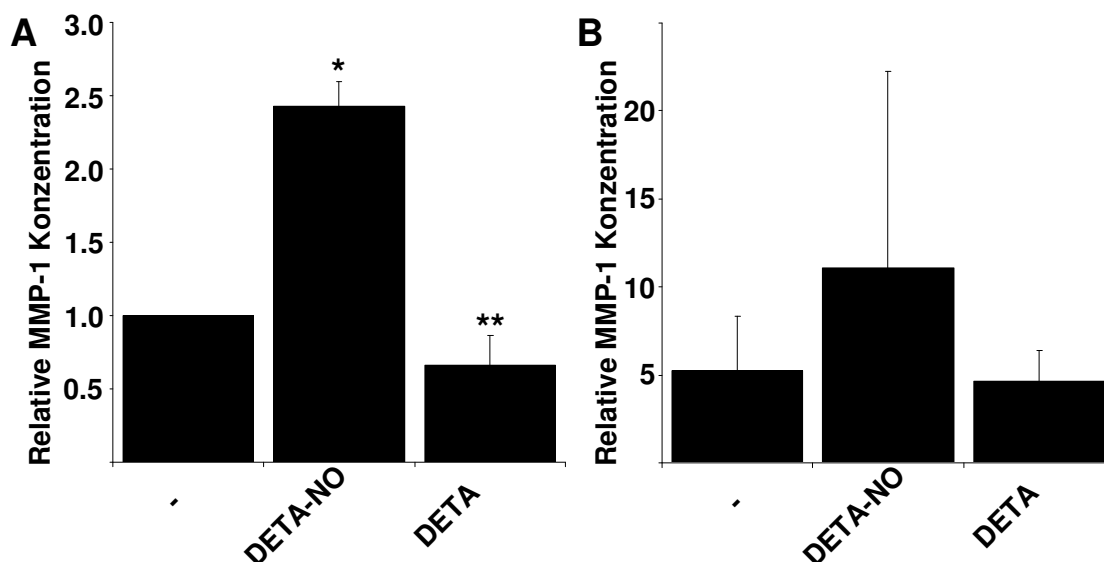


Abb. 3-17: Einfluss von DETA/NO auf die Menge an aktiven und die Gesamtmenge an MMP-1.

Die Menge von MMP-1 im Überstand wurde bestimmt, nachdem die Zellen 24 h mit 1 mM DETA/NO bzw. DETA inkubiert wurden. **A** DETA/NO führt zu einer signifikanten Steigerung der Konzentration von aktivem MMP-1, DETA hingegen reguliert die Konzentration an aktivem MMP-1 herab. **B** Dagegen beeinflussen, auch wenn die gleichen Tendenzen erkennbar sind, weder DETA noch DETA/NO die Gesamtmenge signifikant.

* $p \leq 0,0002$; ** $p \leq 0,04$; $n = 3$

Inwiefern DETA/NO in Kombination mit GSH die Aktivität von aktivem MMP-1 beeinflusst, wurde mit Hilfe des Sekundärantikörpers bestimmt. Hierzu wurde nach der

Substrathydrolyse mit dem zweiten Antikörper die MMP-1-Menge über eine enzymatisch bedingte Farbreaktion mit Hilfe der HRP bestimmt. GSH verringert die Aktivität des von den HVF in den Überstand sezernierten MMP-1 auf 73 ± 16 %. In Anwesenheit von DETA führt GSH zur Inhibition der Aktivität des aktiven MMP-1, die Aktivität nimmt deutlich stärker auf 14 ± 19 % ab. DETA/NO plus GSH führt dagegen zu keiner signifikanten Inhibition; gegenüber dem MMP-1 aus den Überständen der Zellen, die mit DETA plus GSH inkubiert wurden, ist die Aktivität signifikant erhöht.

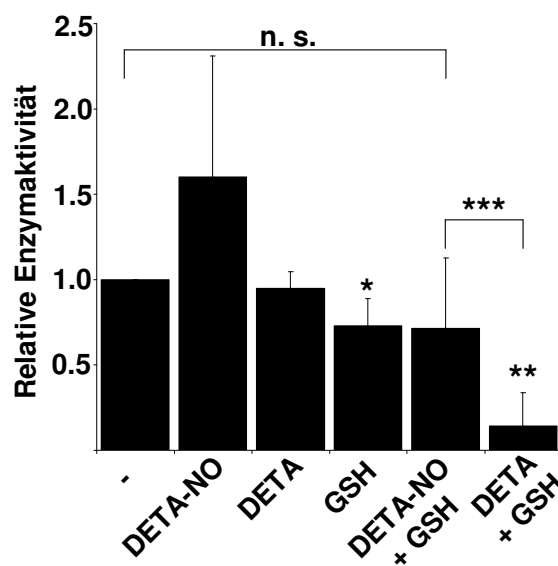


Abb. 3-18: Aktivität von MMP-1 nach Behandlung mit DETA/NO in Kombination mit GSH.

Die Ergebnisse der Hydrolyse des Fluoreszenzsubstrats wurden mit Hilfe des Sekundärantikörpers normiert. GSH und DETA-GSH inhibieren beide MMP-1 signifikant. DETA/NO und GSH gemeinsam haben keinen signifikanten Einfluss auf die Enzymaktivität. Die Inhibition ist in Anwesenheit von DETA/NO aufgehoben.

* $p \leq 0,02$; ** $p \leq 0,002$; *** $p \leq 0,05$; n. s. = nicht signifikant; $n \geq 3$

3.2.7 Einfluss von Th1 Zytokinen auf die iNOS und MMP-1 mRNA Expression

Um den Einfluss von Th1-Zytokinen auf HVF zu untersuchen, wurden HVF für unterschiedliche Zeiträume mit je 500 Units Interleukin-1 β (IL-1 β) und Interferon γ

(IFN- γ) inkubiert. Die Transkription von MMP-1 und iNOS wurde mittels quantitativer Real Time PCR ermittelt.

IL-1 β regulierte die Expression von MMP-1-mRNA bereits nach 6 h auf das $5,40 \pm 1,61$ -fache und nach 12 h auf das $11,82 \pm 3,91$ -fache hoch. Nach insgesamt 24 h ist die MMP-1-Transkription niedriger als nach 12 h, aber immer noch auf das $5,34 \pm 2,89$ -fache hochreguliert. IFN- γ dagegen beeinflusst zu keinem dieser Zeitpunkte die MMP-1-Transkription (Abb. 3-19 A).

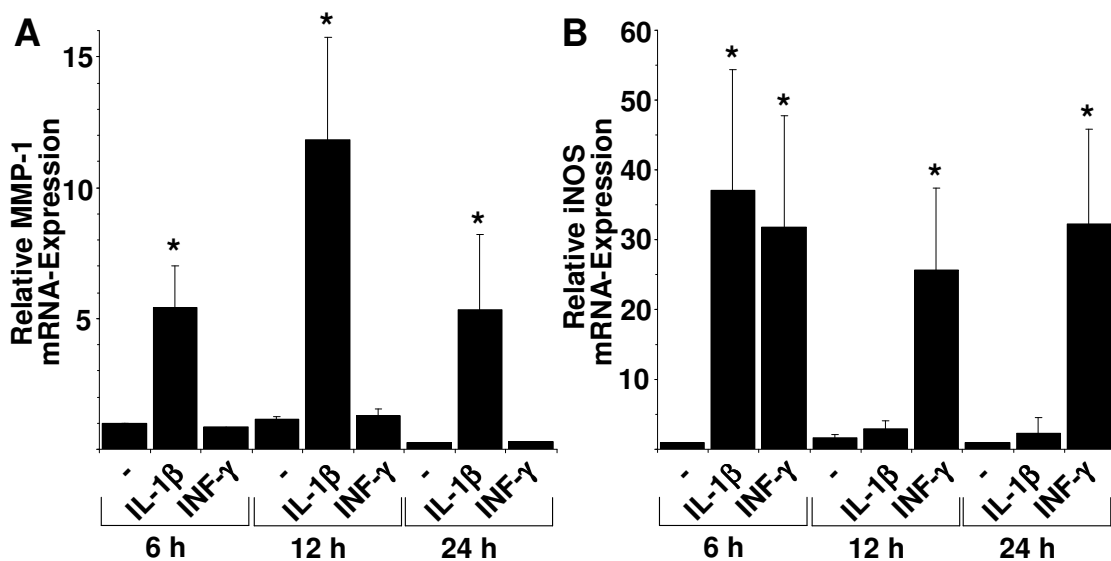


Abb. 3-19: Relative MMP-1- und iNOS- Transkription nach Behandlung mit Th1-Zytokinen.

HVF wurden für 6, 12 und 24 h mit je 500 Units IL-1 β oder IFN- γ inkubiert und anschließend die RNA aus den Zellen isoliert. Mit Hilfe der quantitativen Real-time PCR wurde die Transkription von iNOS und MMP-1 ermittelt. **A** IL-1 β erhöht zu allen Zeitpunkten die MMP-1-Transkription, wogegen IFN- γ keinen Einfluss auf die Transkription von MMP-1 hat. **B** Die iNOS Transkription wird nach 6 h sowohl durch IL-1 β als auch durch IFN- γ erhöht. 12 h und 24 h nach der Aktivierung mit den Zytokinen ist nur noch die iNOS-Transkription nach Behandlung mit IFN- γ erhöht.

* $p \leq 0,0001$, $n = 3$

Die iNOS-Transkription wird nach 6 h sowohl durch IL-1 β als auch durch IFN- γ hochreguliert. 6 h nach Behandlung mit 500 Units IL-1 β ist die Transkription auf das $37,12 \pm 17,21$ -fache und nach Behandlung mit 500 Units IFN- γ um das $31,81 \pm 15,99$ -

fache gesteigert. 12 h und 24 h nach Behandlung mit IL-1 β ist die iNOS-Transkription wieder auf das Grundniveau zurückgegangen, während die Transkription nach Behandlung mit IFN- γ immer noch erhöht ist. Nach 12 h ist die iNOS-Transkription um das $25,58 \pm 11,87$ -fache und nach 24 h um das $32,20 \pm 13,56$ -fache erhöht (Abb. 3-19 B).

Physiologisch wirken in Entzündungsprozessen verschiedene Zytokine gemeinsam. Daher wurde die Transkription nach Behandlung von HVF mit den Th-1 Zytokinen IL-1 β , IFN- γ und TNF- α und deren unterschiedlichen Kombinationen untersucht. Es wurden jeweils 500 Units der Zytokine eingesetzt und die Zellen für 48 h inkubiert. Die Menge an MMP-1- und iNOS-mRNA wurde mittels quantitativer Real-time PCR bestimmt. IL-1 β erhöht auch 48 h nach Aktivierung die MMP-1-Transkription um das $3,24 \pm 0,89$ -fache, IFN- γ erniedrigt die MMP-1-Transkription auf das $0,21 \pm 0,17$ -fache. Auch TNF- α erhöht die MMP-1-Transkription auf das $9,09 \pm 1,36$ -fache. In allen Kombinationen, die IFN- γ enthalten, wird dagegen die Steigerung der Transkription unterdrückt. Die Kombinationen von IL-1 β mit IFN- γ und die von TNF- α mit IFN- γ , führen sogar zu einer verringerten MMP-1-Transkription. Bei der Kombination mit IL-1 β ist die Transkription auf das $0,58 \pm 0,08$ -fache und bei der Kombination mit TNF- α auf das $0,68 \pm 0,06$ -fache verringert. Die Kombination von IL-1 β und TNF- α dagegen erhöht die Expression der MMP-1 mRNA auf das $7,17 \pm 1,83$ -fache gegenüber den unbehandelten Zellen. Bei der Kombination aller drei Zytokine kommt es zu keiner signifikanten Änderung der MMP-1-Transkription (Abb. 3-20 A).

Die Expression der iNOS mRNA dagegen wird durch die Aktivierung mit IFN- γ erhöht. IFN- γ alleine führt 48 h nach Aktivierung zu einer Erhöhung um das $20,83 \pm 13,63$ -fache, während IL-1 β und TNF- α einzeln zu keiner Erhöhung der iNOS-Transkription führen. Allerdings wird die Menge an iNOS-mRNA durch die Kombination von sowohl IL-1 β mit IFN- γ also auch durch die Kombination von TNF- α mit IFN- γ um ein Vielfaches erhöht. Die Aktivierung mit IL-1 β und IFN- γ gemeinsam bewirkt eine Erhöhung um das $647,05 \pm 580,50$ -fache und die Aktivierung mit IFN- γ und TNF- α führt zu einer Erhöhung um das $534,29 \pm 355,22$ -fache. Die stärkste Erhöhung der iNOS-Transkription wird allerdings durch die Aktivierung der HVF mit einer Kombination aller drei Th-1 Zytokine bewirkt. Die Kombination steigert die Menge an iNOS-mRNA um das $2019,25 \pm 792,91$ fache. IL-1 β und die Kombination von IL-1 β und TNF α dagegen führen zu einer verringerten iNOS-Transkription auf das $0,50 \pm 0,07$ -fache bzw. auf das $0,66 \pm 0,08$ -fache (Abb. 3-20 B).

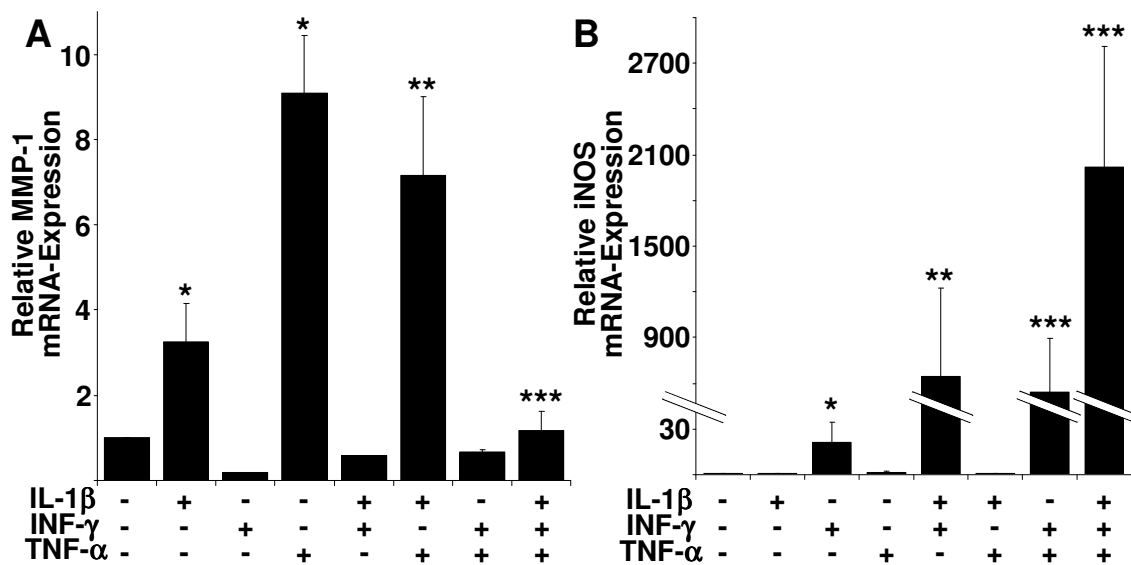


Abb. 3-20: MMP-1- und iNOS- Transkription nach Aktivierung mit den Th1-Zytokinen IL-1β, INF-γ, TNF-α und deren möglichen Kombinationen.

HVF wurden mit 500 Units der Zytokine aktiviert; 48 h nach Aktivierung wurde die RNA isoliert. Die Menge an MMP-1 und iNOS mRNA wurde mit quantitativer Real-time PCR ermittelt. **A** Die mRNA-Menge von MMP-1 wird durch IL-1β und TNF-α und auch einer Kombination beider Zytokine erhöht. INF-γ dagegen verringert die Menge an MMP-1 mRNA in den HVF. Auch in allen Kombinationen, in den INF-γ anwesend ist, kommt es zu keiner signifikanten Erhöhung der MMP-1 mRNA. **B** Dagegen erhöht INF-γ die Transkription der iNOS. In den Kombinationen mit INF-γ kommt es zu einer weiteren Erhöhung der iNOS mRNA-Menge. Insbesondere die Kombination aller drei Zytokine führt zu einer Steigerung auf das mehr als 2000-fache verglichen iNOS mRNA-Menge in ruhenden Zellen.

A * $p \leq 0,0001$; ** $p \leq 0,0003$; *** $p \leq 0,02$, $n = 3$

B * $p \leq 0,0002$; ** $p \leq 0,04$; *** $p \leq 0,007$; $n = 3$

3.2.8 Bildung von Nitrit nach Behandlung von HVF mit Zytokinen

Um zu ermitteln, ob die gesteigerte iNOS-Transkription auch in einer erhöhten NO-Konzentration in den Zellen resultiert, wurde die Nitritkonzentration in den Überständen der mit den Zytokinen aktivierten Zellen mit Hilfe des Griess-Tests bestimmt. Es handelt sich dabei um die gleichen Zellen, in denen auch die iNOS- und MMP-1-Transkription mittels quantitativer Real-time PCR bestimmt wurde. Es zeigt sich, dass in den Zellen, die mit INF-γ aktiviert wurden, und auch in denen, die mit den Kombination mit INF-γ aktiviert wurden, es zu einer signifikant erhöhten Konzentration

an Nitrit in den Überständen kommt. IFN- γ erhöht die Nitritkonzentration gegenüber den Überstand aus ruhenden Zellen um das $1,5 \pm 0,32$ -fache, die Kombination aus IL-1 β und IFN- γ um das $2,27 \pm 0,47$ -fache, die Kombination mit IFN- γ und TNF- α um das $1,66 \pm 0,24$ -fache und die Kombination aller drei Zytokine um das $2,83 \pm 0,15$ -fache (Abb. 3-21). TNF- α alleine dagegen reduziert die Nitritkonzentration auf das $0,65 \pm 0,12$ fache.

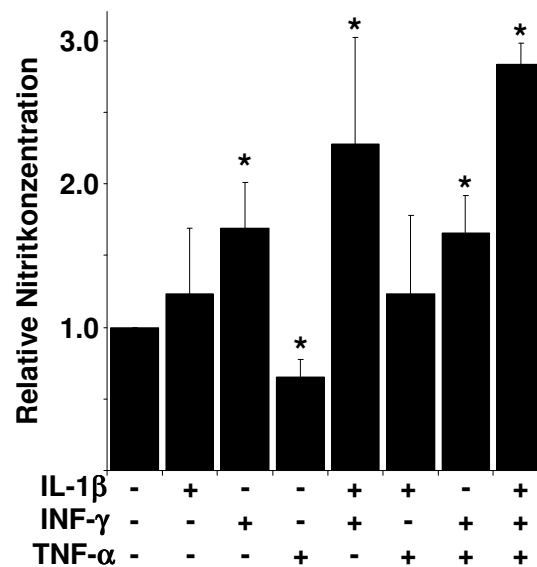


Abb. 3-21: Relative Nitritkonzentration in den Überständen von mit Zytokinen behandelten HVF.

HVF wurden für 48 h mit 500 Units der Zytokine und deren Kombination inkubiert und der Nitrit-Gehalt in den Überständen anschließend mit Hilfe des Griess-Tests bestimmt. In allen Kombination die IFN- γ enthalten kommt es verglichen zu den nicht aktivierten Zellen zu einer erhöhten Nitrit-Konzentration in den Überständen der HVF. TNF- α dagegen verringert die Nitrit-Konzentration in den Überständen der HVF.

* $p \leq 0,05$; $n=3$

3.2.9 Einfluss von Th1 - Zytokinen auf die Proteinexpression von MMP-1

HVF wurden für 48 h mit je 500 Units der Th1- Zytokine IL-1 β , IFN- γ und TNF- α einzeln und mit allen möglichen Kombinationen inkubiert und anschließend wie zuvor die Überstände abgenommen und die RNA isoliert. Die Menge an aktiven sowie an

Gesamt-MMP-1 wurde aus den Überständen bestimmt. Es zeigt sich, dass sowohl IL-1 β als auch TNF- α sowohl die Gesamtmenge, als auch die Menge an aktivem MMP-1 steigern. Die Menge an aktivem MMP-1 wird durch IL-1 β um das $8,94 \pm 3,33$ -fache und durch TNF- α um das $9,92 \pm 4,92$ -fache erhöht; die Kombination von beiden Zytokinen zeigt noch eine weitere Steigerung auf das $18,96 \pm 2,41$ fache. IFN- γ dagegen zeigt einen deutlich geringeren Effekt auf die Menge an aktivem MMP-1 und erhöht diese nur um das $1,64 \pm 0,30$ -fache. In Kombination mit TNF- α , IL-1 β sowie in Kombination mit beiden gemeinsam hebt IFN- γ teilweise die Erhöhung der Menge an aktivem MMP-1 auf.

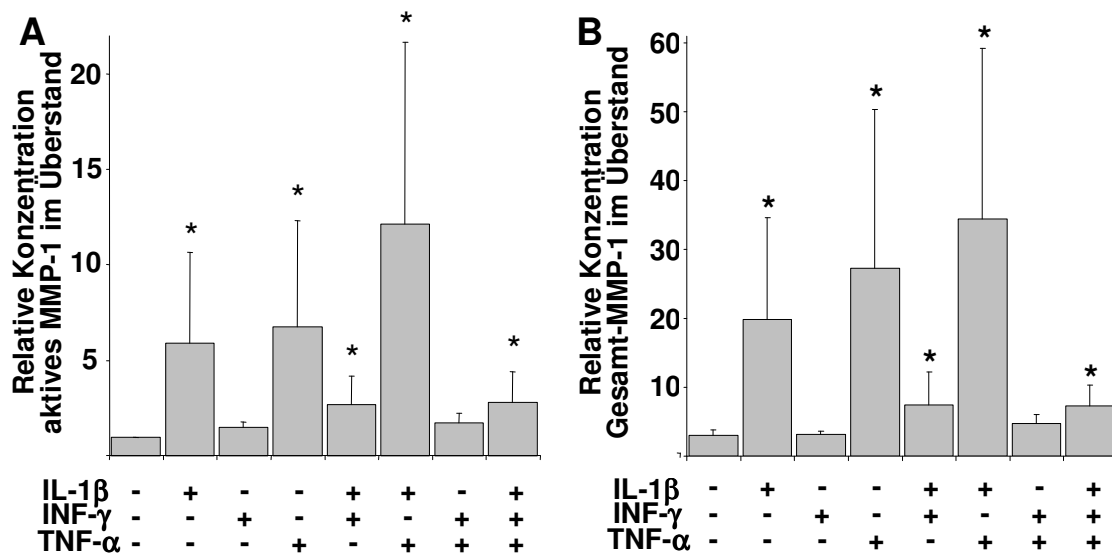


Abb. 3-22: Relative Konzentration von MMP-1-Protein im Überstand nach Aktivierung mit den Zytokinen.

A Die relative Konzentration an aktivem MMP-1, sowie **B** relative Menge an Gesamt-MMP-1 wurde mit Hilfe des Fluoreszenzsubstrats, 48 h nach Aktivierung von HVF mit Th-1 Zytokinen, bestimmt. Die Gesamtmenge von MMP-1 und die Menge an aktivem MMP-1 im Überstand von HVF wurde 48 h nach Aktivierung der Zellen mit den Th-1 Zytokinen IL-1 β , IFN- γ und TNF- α , sowie deren Kombinationen bestimmt. Sowohl die Menge an aktivem MMP-1 als auch die Gesamtmenge vom MMP-1 wird nach der Aktivierung mit IL-1 β und TNF- α und auch der Kombination beider erhöht. IFN- γ hat dagegen keinen Einfluss, auf die Gesamtmenge von MMP-1. Allerdings führt die Kombination von IL-1 β bzw. TNF- α mit IFN- γ zu einer leichten Erhöhung der Menge an aktivem MMP-1 und auch die Kombination der drei Zytokine führt zu einer leichten Erhöhung der MMP-1 Gesamtmenge und auch der Menge an aktiven MMP-1.

* $p \leq 0,04$; $n = 5$

Es kommt bei der Aktivierung mit IL-1 β zusammen mit IFN- γ nur noch zu einer Erhöhung um das $3,50 \pm 1,38$ - und bei der Kombination von IFN- γ mit TNF- α zu einer Erhöhung auf $1,99 \pm 0,24$ -fache. Die Kombination aller drei Zytokine führt zur Erhöhung um das $3,88 \pm 0,96$ -fache (Abb. 3-22 A).

Auch die Gesamtmenge an MMP-1 ist nach Behandlung mit IL-1 β und TNF- α signifikant erhöht. IL-1 β erhöht die Gesamtmenge um das $9,30 \pm 1,30$ -fache und TNF- α um das $13,96 \pm 9,54$ -fache relativ zu unbehandelten Zellen. Die Kombination beider erhöht die Gesamtmenge um das $17,41 \pm 7,13$ -fache. IFN- γ dagegen zeigt keinen Einfluss auf die Menge an MMP-1 und auch in allen Kombinationen mit IFN- γ kommt es zu keiner signifikanten Änderung der MMP-1 Gesamtmenge (Abb. 3-22 B).

Die aktivitätsunabhängige Ermittlung der Gesamt-MMP-1 Menge durch den Sekundärantikörper zeigt die gleichen Tendenzen. Die Zytokine haben also keinen Einfluss auf die relative Aktivität von MMP-1 an sich.

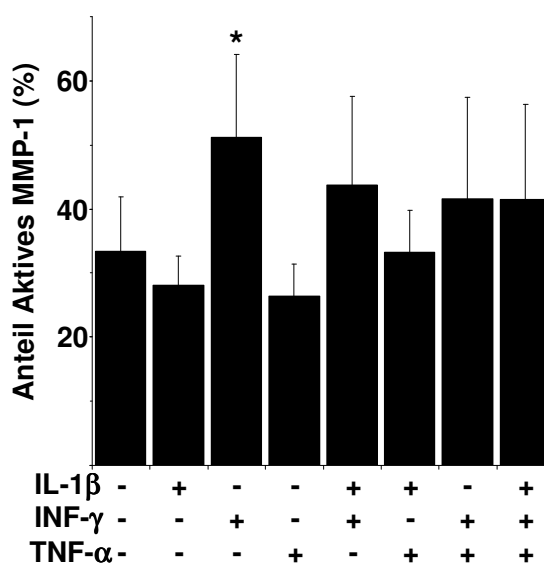


Abb. 3-23: Anteil von aktivem MMP-1.

Nur nach der Aktivierung der Zellen mit IFN- γ (500 u) kommt es zu einer signifikant erhöhten Menge an aktivem MMP-1. Der Anteil von aktivem MMP-1 steigt auf 53 ± 5 % der Gesamtmenge.

$p < 0,03$; $n=5$

Auch der Anteil an aktivem MMP-1 verändert sich durch die meisten Zytokinkombinationen nicht. Nur IFN- γ führt, obwohl es zu keiner Erhöhung der

Gesamt-Proteinmengen führt, zu einer Verschiebung des Anteils an aktivem MMP-1. Der Anteil von aktivem MMP-1 steigt auf $53 \% \pm 5 \%$ der Gesamtmenge (Abb. 3-23). Auch durch die Kombinationen, die IFN- γ enthalten, kommt es zu einer Erhöhung der Menge an aktivem MMP-1, allerdings ist die Erhöhung nicht signifikant. In allen Zellen, die mit IL-1 β oder TNF- α einzeln oder mit deren Kombination aktiviert wurden, steigt die Menge an aktivem MMP-1 relativ zur Gesamtmenge nicht.

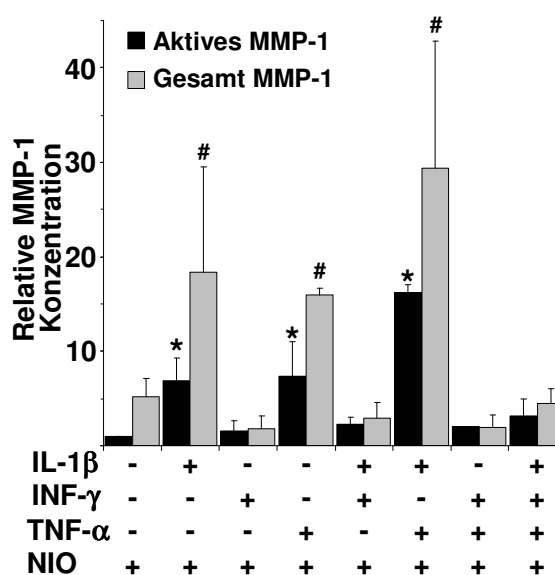


Abb. 3-24: Proteinexpression von MMP-1 in HVF nach Zytokinaktivierung in Anwesenheit des iNOS-Inhibitors L-NIO.

HVF wurden mit je 500 Units der Zytokine und 500 μ M des iNOS-Inhibitors L-NIO für 48 h inkubiert und die MMP-1-Proteinmenge im Überstand der Zellen bestimmt. Auch in Anwesenheit von L-NIO führen IL-1 β , TNF- α und die Kombination beider zu einer erhöhten MMP-1-Expression.

* $p < 0,02$; # $p < 0,03$; $n=4$

Um zu verifizieren, ob das durch die iNOS gebildete NO einen Einfluss auf die Expression von MMP-1 hat, wurden die Zellen zusätzlich zur Aktivierung mit den Zytokinen mit einem spezifischen iNOS-Inhibitor, L-NIO, inkubiert. Die Aktivierung mit den Zytokinen wurde analog wie in den Versuchen zuvor mit 500 Units pro Zytokin durchgeführt. Zusätzliche wurden 500 μ M des iNOS- Inhibitors L-NIO ins Medium gegeben und die Zellen für 48 h kultiviert. Nach 48 h wurden die Überstände abgenommen und sowohl die Menge an aktivem als auch die Gesamtmenge an MMP-1 im Überstand bestimmt. Demnach haben 500 μ M L-NIO keinen Einfluss auf die durch die Zytokine medierte MMP-1 Proteinexpression. Sowohl IL-1 β , als auch TNF- α

und die Kombination beider führen auch in Anwesenheit von L-NIO zu einer erhöhten MMP-1-Expression. Die Menge an aktivem MMP-1 (schwarze Balken) und auch die Gesamtmenge (graue Balken) steigt im gleichen Maß wie in den Zellen, die nur mit Zytokinen ohne die Inhibition der iNOS aktiviert wurden. IFN- γ dagegen zeigt auch in Anwesenheit von L-NIO keinen Einfluss auf die MMP-1-Expression; auch in allen Zytokinkombinationen mit IFN- γ kommt es zu keiner Erhöhung der MMP-1-Expression (Abb. 3-24).

4 Diskussion

4.1 Inhibition der Aktivität von MMP-1 durch Thiole

Da gerade oxidativer und nitrosativer Stress oft in Verbindung mit einer Fehlregulation von MMPs gebracht wird, sollte hier untersucht werden, inwiefern Thiole einen Einfluss auf MMPs haben. Thiole haben unter anderem eine wichtige Funktion bei der Abwehr von oxidativem und nitrosativem Stress. Sie spielen als Antioxidantien und in der Entgiftung eine wichtige Rolle in der Hautphysiologie sowie in allen Säugtierzellen. Von den Thiolen ist das GSH das am häufigsten in Zellen vorkommende und wichtigste, niedrigmolekulare Thiol. Intrazellulär kommt GSH in Konzentration von 0,1 bis 10 mM vor und tritt hauptsächlich in der reduzierten Form auf. Es kann aber auch in den extrazellulären Raum sezerniert werden (Sies 1999; Persson, Andersson *et al.* 2002; Wu, Fang *et al.* 2004). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Thiole MMP-1 inhibieren können. Diese Inhibition der Aktivität ist zum einen konzentrationsabhängig, zum anderen variiert auch die Stärke der Inhibition je nach Thiol. Die Thiole, deren Einfluss auf MMP-1 untersucht wurde, waren GSH, Cystein, Homocystein und N-Acetylcystein. Die Fähigkeit zur Inhibition der Aktivität des MMP-1 nimmt in der Reihenfolge Cystein > GSH > Homocystein > N-Acetylcystein ab. Bei einer Konzentration von 1 mM der Thiole inhibieren GSH und Cystein die Aktivität von MMP-1 auf ca. 30 % der ursprünglichen Aktivität, Homocystein auf ca. 50 % und N-Acetylcystein auf ca. 80 %.

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass Zink-chelatierende Reagenzien, wie Thiole, MMPs inhibieren können (Gray, Saneii *et al.* 1981; Woessner 1999; Ikejiri, Bernardo *et al.* 2005). Auch GSH hat in einer Leber-Preservations-Lösung der Universität Wisconsin zu einer Verringerung der MMP-2- und MMP-9-Aktivität geführt (Upadhyya und Strasberg 2000). Zusätzlich konnte schon früher gezeigt werden, dass Homocystein in niedrigen Dosen proMMP-2 aktiviert, in hohen Dosen aber zu einer Inhibition der Aktivität von aktivem MMP-2 führt. GSH und Cystein haben aber weder einen Einfluss auf die Aktivierung von proMMP-2 noch auf die Aktivität von aktivem MMP-2. Eine direkte Aktivierung durch Homocystein könnte im Zusammenhang mit der Schädigung der ECM in der durch Hyperhomocysteinämie bedingten Arteriosklerose stehen (Bescond, Augier *et al.* 1999).

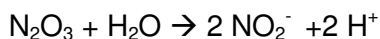
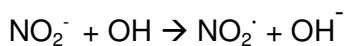
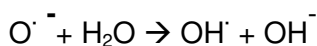
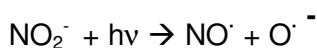
Von besonderem Interesse in dieser Arbeit war der mögliche Mechanismus, auf den eine Inhibition der MMP-1-Aktivität mit Thiolen zurückzuführen sein kann. Es konnte anhand der Kinetik gezeigt werden, dass es sich um eine kompetitive Hemmung handelt. Da sich die mit Hilfe des Lineweaver-Burk-Diagramms berechneten K_m -Werte mit und ohne GSH unterscheiden, aber die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten gleich bleiben. Dies bedeutet, dass es zu einer Konkurrenz von Substrat und GSH kommt und hohe Substratmengen das GSH verdrängen. Eine kompetitive Hemmung bedeutet, dass der Inhibitor (GSH) und das Substrat um die gleiche Bindungsstelle im Enzym konkurrieren. Generell können Thiole sowohl als metalchelatisierende Reagenzien fungieren, aber auch Thiolreste glutathionylieren und so auf die Funktion von Enzymen einwirken. In der Sequenz von proMMP-1 befinden sich insgesamt drei Cysteine, wobei zwei zu einer Disulfid-Gruppe zusammengelagert sind und damit nicht glutathionyliert werden können. Das dritte Cystein befindet sich in der Pro-Domäne und ist im inaktiven Zustand an das Zink im aktiven Zentrum koordiniert. Da die Pro-Domäne bei der Aktivierung aber abgespalten wird ist dieses Cystein für die Inhibition der aktiven MMPs irrelevant. Wie erwähnt können Thiol-Gruppen auch mit Zinkionen interagieren. In der Struktur des MMP-1 befinden sich insgesamt zwei Zinkionen. Zum einen das Zinkion im aktiven Zentrum mit dem das Cystein aus der Pro-Domäne im inaktiven Zustand interagiert, zum anderen das zweite, strukturgebende Zink. Eine mögliche Interaktion von Thiolen mit dem strukturgebenden Zink ist allerdings nicht bekannt. Am naheliegendsten, wenn man sowohl die Struktur der inaktiven Proform als auch die Struktur des aktiven MMPs betrachtet, ist, dass die Thiole ähnliche wie der Cystein-Rest in der Propeptid-Domäne agieren und so die Inhibition der Aktivität von MMP-1 bewirken.

In der Nähe des katalytischen Zink-Atoms befindet sich die so genannte S1-Tasche, in der die Substrate der MMPs binden. Diese Tasche, in der das Substrat gebunden wird, ist hydrophob und variiert bei den einzelnen MMPs in ihrer Tiefe. Sie ist somit vermutlich für die Substratspezifität verantwortlich (Iyer, Visse *et al.* 2006; Nagase, Visse *et al.* 2006). In der inaktiven Form ist ein Cystein aus der Pro-Domäne an das Zink im aktiven Zentrum koordiniert. Bei der Inhibition durch Thiole wird vermutlich diese Bindungsstelle durch das Thiol besetzt, somit kann das Substrat nicht mehr binden. Da sich der Aufbau des aktiven Zentrums bei allen MMPs gleicht und auch die Aktivierung der proMMPs auf den gleichen Mechanismen beruht, ist die Möglichkeit der Inhibition der Aktivität durch Thiole vermutlich ein allgemeines Prinzip. Die Inhibition der MMP-1-Aktivität bekommt eine besondere Bedeutung, wenn man die Vielzahl an

Krankheiten betrachtet, in denen Fehlregulationen von MMPs auftreten (Woessner 1999).

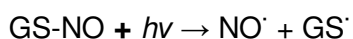
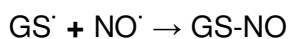
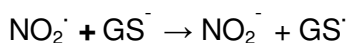
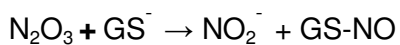
4.2 Reaktivierung von MMP-1 durch einen radikalischen Mechanismus

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die GSH-medierte Inhibition der MMP-1-Aktivität mit Hilfe von Radikalen aufgehoben werden kann. Sowohl Nitrit als auch das Vitamin E Analogon Trolox bilden nach Bestrahlung mit UVA-Strahlung Radikale, welche die GSH-medierte Inhibition der MMP-1-Aktivität aufheben. Genauso führt auch Wasserstoffperoxid (H_2O_2), welches Hydroxylradikale bildet zu einer Reaktivierung von MMP-1. Durch die Bestrahlung von Nitrit kommt es nicht nur zur NO-Bildung, sondern zu einer Reihe an komplexen Reaktionen, bei der sich ebenfalls reaktive Sauerstoffintermediate bilden. NO ist ein wichtiges Signalmolekül in Geweben von Säugetieren. Es bindet z. B. an Heme- und Sulhydryl-Gruppen diverser Proteine und reguliert so wichtige Zellfunktionen (Suschek, Schewe *et al.* 2006). In humaner Haut, vor allem im Schweiß, finden sich erhebliche Mengen an Nitrit, welches entsprechend dem folgenden Mechanismus durch UVA zerfällt (Zafiriou und Bonneau 1987; Fischer und Warneck 1996; Weller, Pattullo *et al.* 1996):



Durch die Bestrahlung von Nitrit wird eine Vielzahl von reaktiven Stickoxiden sowie Sauerstoffintermediate gebildet. In Anwesenheit von GSH können die in diesen Reaktionen entstehenden Komponenten weiter reagieren. Zum einen kann Glutathion in seiner Wirkung als Antioxidans selbst oxidiert und zu GSSG werden, zum anderen

kann GSH durch Reaktion mit den in den vorangegangenen Reaktionen gebildeten Radikalen weitere Reaktionen eingehen.



Diese Reaktionen bewirken auch, dass die NO-Freisetzung aus Nitrit nach Bestrahlung in Anwesenheit von GSH erhöht wird (Suschek, Schroeder *et al.* 2003; Paunel, Dejam *et al.* 2005; Suschek, Schewe *et al.* 2006).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die GSH-medierte Inhibition durch Bestrahlung in Anwesenheit von Nitrit aufgehoben werden kann. Die Beobachtung der Reaktivierung stimmt mit einigen Publikationen überein, in denen es zu einer Aktivierung von proMMPs durch einen nicht-proteolytischen Mechanismus mit Hilfe verschiedener Radikale, insbesondere durch NO oder reaktive Stickoxidspezies, kommt.

So ist zum Beispiel beschrieben, dass NO und seine reaktiven Intermediate in der Aktivierung von MMP-8 (*human neutrophil collagenase*) eine wichtige Rolle spielen. Wobei insbesondere Stickstoffdioxid (NO_2) und Peroxynitrit (ONOO^\cdot) ein hohes Potential zur Aktivierung von MMP-8 zeigen. Dagegen ist die Fähigkeit von NO MMP-8 zu aktivieren nur schwach ausgeprägt und nur mit hohen Konzentrationen von 10 mM NO, generiert aus dem NO-Donor Propylamin NONOate, kommt es zur Aktivierung von MMP-8 (Okamoto, Akaike *et al.* 1997). Auch die Aktivierung von proMMP-1 durch reaktive Sauerstoffspezies konnte zuvor gezeigt werden. Sowohl Hypochlorige Säure (HOCl) und H_2O_2 als auch Hydroxyl-Radikale, gebildet durch die Hypoxanthine/Xanthine Oxidase, führten zu einer Aktivierung von proMMP-1 (Saari, Suomalainen *et al.* 1990; Saari, Sorsa *et al.* 1992). Besonders interessant ist, dass in Anwesenheit von GSH die ONOO^\cdot induzierte Aktivierung von proMMP-8 um ein Vielfaches potenziert werden kann. Auch mit proMMP-9 und proMMP-1 konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden (Okamoto, Akaike *et al.* 1997; Okamoto, Akaike *et al.* 2001; Okamoto, Akuta *et al.* 2004).

Die Aktivierung durch diverse reaktive Stickoxidspezies (RNS) ist vermutlich auf eine Oxidation des Cystein-Restes in der Pro-Domäne zurück zu führen. Zumindest im Fall der HOCl, einem Oxidans, welches während Entzündungsprozessen von der

Myeloperoxidase aus H_2O_2 gebildet wird, konnte eine irreversible Oxidation des Cysteins in der Pro-Domäne nachgewiesen werden (Fu, Kassim *et al.* 2001). Geht man also davon aus, dass die Inhibition mit GSH auf dem gleichen Prinzip beruht wie die durch die Pro-Domäne bewirkte Inhibition, spricht dies auch für ein ähnliches Prinzip bei der Reaktivierung durch H_2O_2 oder durch Radikale, die nach UVA-Bestrahlung von Nitrit oder Trolox gebildet werden. Das GSH, welches sich analog zum Cystein aus der Pro-Domäne an das Zink im aktiven Zentrum gelagert hat, wird oxidiert und so das aktive Zentrum wieder frei für das Substrat.

In allen Versuchen, in denen es zu einer Reaktivierung von MMP-1 kam, war gleichzeitig auch eine erhöhte Bildung von GSSG zu beobachten. Das bedeutet, dass sowohl die Bestrahlung von Nitrit gemeinsam mit GSH, als auch die Bestrahlung in Anwesenheit von Trolox zur Oxidation des GSH führt. Die antioxidative Kapazität von GSH beruht zum großen Teil darauf, dass es Radikalspezies abfängt wobei es selbst oxidiert wird (Wu, Fang *et al.* 2004).

Bei allen Prozessen die eine Reaktivierung bewirken entstehen starke oder langlebige Radikale. Um zu klären, welches der bei der Bestrahlung von Nitrit entstandenen Radikale verantwortlich für die Reaktivierung ist, wurde der Einfluss von verschiedenen Radikalfängern auf die Reaktivierung des MMPs untersucht. Bis auf Natriumascorbat zeigte keine der anderen Substanzen einen Einfluss auf die Reaktivierung. Weder cPTIO (ein NO-Radikalfänger), noch Mannitol (ein Hydroxylradikalfänger) konnte die Reaktivierung verhindern.

Ascorbat ist für viele biologische Funktionen essentiell. Es spielt sowohl in der Kollagen-Synthese, als auch als Antioxidans und ebenfalls bei der Entgiftung von Zellen eine wichtige Rolle. In diesem Zusammenhang ist vor allem anzumerken, dass Ascorbat die S-Nitrosierung von Glutathion sowohl durch NO, als auch durch ONOO^\cdot und $\text{NO}^\cdot/\text{O}_2^\cdot$ verhindert und dass Ascorbat ein effektiver Radikalfänger für NO_2 ist. Es gibt fundamentale Unterschiede zwischen der Nitrosierung von GSH durch $\text{NO}^\cdot/\text{O}_2^\cdot$, ONOO^\cdot und $\text{NO}^\cdot/\text{O}_2^\cdot$. Beispielsweise verhindert Ascorbat die durch $\text{NO}^\cdot/\text{O}_2^\cdot$ induzierte Nitrosierung, nicht aber die durch ONOO^\cdot induzierte. Im Gegenteil, die Bildung von GS-NO durch Reaktion von GSH mit ONOO^\cdot wird sogar durch Ascorbat gesteigert. Hier kommt es bei der Bestrahlung von Nitrit sehr wahrscheinlich zur Bildung von GS-NO über einen radikalischen Mechanismus. NO allein führt allerdings nicht zur Bildung von GS-NO, sondern nur in Kombination mit Sauerstoffradikalen (Schrammel, Gorren *et al.* 2003). Dass der NO-Scavenger cPTIO die Reaktivierung von MMP-1 nicht verhindert, könnte an der Bildung von NO_2 liegen, einer Nebenreaktion der Reaktion von cPTIO

mit NO. NO kann MMP-1 offensichtlich nicht direkt reaktivieren, da der Zusatz von endogenem NO durch den NO-Donor DETA/NO keine Reaktivierung bewirkt. Dies stimmt damit überein, dass im Gegensatz zu ONOO⁻ und NO₂, NO alleine auch nur ein begrenztes Potential zeigt proMMP-8 zu aktivieren. NO₂ und ONOO⁻ dagegen sind potente Aktivatoren von proMMP-8 (Okamoto, Akaike *et al.* 1997). Da es sich bei der Pro-Domäne, insbesondere bei dem Motiv, welches das Cystein enthält, um eine stark konservierte Region der MMPs handelt, ist davon auszugehen, dass sich die Möglichkeiten zur Aktivierung ähneln. Vieles spricht also dafür, dass die Reaktivierung des MMP-1 durch eine oxidative Modifikation des GSH bewirkt wird (Abb. 4-1).

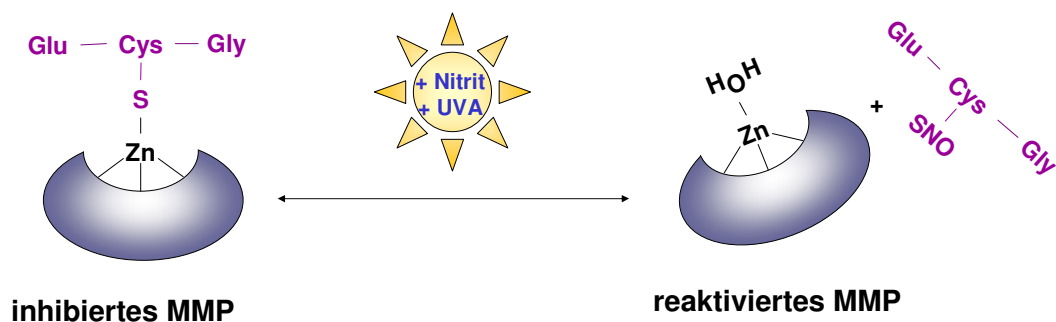


Abb. 4-1: Möglicher Mechanismus zur Reaktivierung von MMP-1.

MMP-1 wird durch das Glutathion inhibiert, indem die Thiolgruppe an das Zink koordiniert. Durch Bestrahlung in Anwesenheit von Nitrit kommt es zur Nitrosierung des GSH, wodurch es sich vom Zink löst und das MMP-1 somit wieder reaktiviert wird.

Oxidierter Thiole inhibieren wie in dieser Arbeit gezeigt die Aktivität von MMP-1 nicht. Da die Oxidation von GSH durch ONOO⁻ in Anwesenheit von Ascorbat eher gesteigert wird, liegt die Vermutung nah, dass die Bildung von NO₂ und die dadurch bewirkte Nitrosierung von GSH maßgeblich an der Reaktivierung beteiligt sind. Nitrosiertes GSH wiederum fungiert selber als NO-Donor und reagiert schnell zu GSSG, welches unter den Bedingungen der Reaktivierung gemessen werden kann (Singh, Hogg *et al.* 1996; Singh, Wishnok *et al.* 1996). In Anwesenheit von Ascorbat dagegen wird das GSH nicht oxidiert und auch kein GSSG gebildet. Alle hier beschriebenen Prozesse spielen in der Hautphysiologie eine wichtige Rolle. Gerade während Entzündungsprozessen

werden eine Vielzahl von reaktiven Sauerstoff- und Stickoxidspezies gebildet. Auch GSH und GS-NO spielen dabei eine wichtige Rolle (Weller, Pattullo *et al.* 1996; Bruch-Gerharz, Ruzicka *et al.* 1998; Xu, Vita *et al.* 2000; Nelson und Melendez 2004; Paunel, Dejam *et al.* 2005).

Intrazellulär können die GSH-Konzentrationen bis zu 10 mM betragen. Extrazellulär liegt GSH allerdings in wesentlich geringerer Konzentration vor. In Entzündungsprozessen, z. B. bei der Wundheilung, kann GSH allerdings freigesetzt werden. Durch Gewebeschädigungen kommt es zu Nekrosen. Im Gegensatz zu Apoptosen laufen Nekrosen unkontrolliert ab und es kommt zur Freisetzung von intrazellulären Komponenten, wie lysosomale Enzyme und auch GSH die in den extrazellulären Raum freigesetzt werden. Nekrosen sind durch die unkontrollierte Freisetzung von intrazellulären Komponenten oft mit extensiver Zerstörung der umgebenden Zellen und einer intensiven entzündlichen Antwort des betreffenden Gewebes assoziiert (Walker, Harmon *et al.* 1988). Dadurch bedingt werden auch reaktive Sauerstoffintermediate gebildet. Während der Wundheilung ist eine Neustrukturierung der ECM essentiell. Die in die Wunde einwandernden Fibroblasten bilden Kollagen und exprimieren verstärkt MMPs, um einen kontrollierten Aufbau der ECM zu gewährleisten (Xue, Le *et al.* 2006). Zu einem verhältnismäßig späten Zeitpunkt im Wundheilungsprozess kommt es dann zur Bildung von NO. Das Zusammenspiel zwischen dem während der Nekrose freigesetztem GSH und der während der Entzündung gebildeten ROS und der zu einem späteren Zeitpunkt gebildeten RNS können daher, insbesondere in der Wundheilung, und in Entzündungsbedingten Gewebeschädigungen einen wichtigen Mechanismus zur Kontrolle der MMP-Aktivität repräsentieren.

Das hier gezeigte UVA-abhängige Konzept zur Kontrolle der MMP-Aktivität basiert auf den inhibitorischen Effekten von reduzierten Thiolen und der Reaktivierung durch S-Nitrosierung durch die enzymunabhängige Bildung von reaktiven Stickoxid-Intermediaten aus Nitrit. Die hier beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass eine Vielzahl von physiologisch relevanten Prozessen, nicht nur auf die Expression von MMPs einwirken, sondern auch die Aktivität von MMPs beeinflussen können. Daher sollte bei der Betrachtung von MMPs immer auch deren Zellumgebung betrachtet und nicht die Aktivität direkt mit der MMP-1 mRNA- oder auch Proteinmenge korreliert werden.

4.3 Einfluss von GSH auf die Aktivität von MMP-1 in humanen Vorhautfibroblasten

Die hier an rekombinantem MMP-1 beschriebenen Prozesse konnten in den Zellkulturüberständen von humanen Vorhautfibroblasten (HVF) verifiziert werden. Fibroblasten sind Hauptbestandteile des Bindegewebes, und maßgeblich am Aufbau der ECM beteiligt. Zu den Hauptprodukten gehört Kollagen und sie sind entscheidend an Prozessen wie der Wundheilung beteiligt. Die resultierende Aktivität nach Behandlung mit GSH bzw. UVA wird durch Normierung auf einen zweiten, aktivitätsunabhängigen Antikörper bestimmt. Da es gerade unter den Bedingungen von oxidativem und nitrosativem Stress zu einer vermehrten Expression von MMP-1 kommt und GSH eine wichtige Rolle in der Abwehr von oxidativem Stress in Zellen hat, war es von Interesse, inwiefern GSH auch in Zellen, die UVA-Strahlung und damit einem Stress ausgesetzt waren, einen Einfluss auf die Aktivität von MMP-1 hat. Eine erhöhte MMP-1-Expression durch UVA-Strahlung ist in der Literatur vielfach beschrieben, auch ein Einfluss von NO auf die MMP-1-Genexpression wird vielfach impliziert (Chakraborti, Mandal *et al.* 2003; Ishii, Ogura *et al.* 2003; Nelson und Melendez 2004). Auch hier in den HVF konnte die Induktion von MMP-1 durch UVA gezeigt werden. Insgesamt enthält der Überstand von HVF 3,93 ng/ml MMP-1. Nach UVA-Bestrahlung steigt die Menge an aktivem MMP-1 um das 5-fache. Ab einer Konzentration von 1 mM Glutathion kommt es bei den unbestrahlten Proben zu einer signifikanten Inhibition der Aktivität des aktiven MMP-1, jedoch nicht bei den bestrahlten Proben. Allerdings weist MMP-1 generell nach Bestrahlung eine um 40 % erniedrigte Aktivität auf. Da es in der Zellkultur eine höhere Konzentration an GSH braucht, um eine signifikante Inhibition zu bewirken, lässt sich auf eine Vielzahl anderer Proteine, mit denen das GSH reagieren kann, zurückführen. So befinden sich im Kulturüberstand eine Fülle weiterer MMPs; zudem spielt GSH noch in einigen anderen Prozessen eine Rolle. Durch Glutathionierung, also der Reaktion von freien reduzierten Thiolen verschiedener Proteine mit GSH, werden viele Prozesse reguliert aber auch Thiolgruppen in Proteinen vor einer irreparablen Schädigung bewahrt (Anselmo und Cobb 2004; Giustarini, Rossi *et al.* 2004). Ferner wirkt es intrazellulär natürlich auch als Antioxidans und ist an Entgiftungsprozessen beteiligt (Wu, Fang *et al.* 2004).

Bestrahlung von Zellen führt zu erhöhtem oxidativen und auch nitrosativem Stress in den Zellen, also zur Bildung von diversen Radikalen. Es ist bekannt, dass sich innerhalb von Zellen das Verhältnis von GSH/GSSG nach UVA-Bestrahlung zugunsten

des oxidierten GSH verschiebt und, dass der Gehalt an reduziertem GSH in der Haut während der UV-Bestrahlung sinkt (Xu, Vita *et al.* 2000; Fang, Yang *et al.* 2002; Wu, Fang *et al.* 2004). Da reduziertem GSH durch oxidativen Stress verbraucht bzw. oxidiert wird kann es MMP-1 nicht mehr inhibieren, da wie zuvor anhand des rekombinanten MMPs gezeigt wurde die Inhibition mit dem Redoxstatus von GSH korreliert ist. Die generell erniedrigte Aktivität des MMP-1 nach UVA-Bestrahlung lässt auf eine durch die Bestrahlung ausgelöste Schädigung des Proteins schließen.

In Überständen von HVF, die mit DETA/NO und GSH inkubiert wurden, führt DETA/NO zu einer Reaktivierung des MMP-1, im Gegensatz zum rekombinanten MMP-1, welches durch DETA/NO alleine nicht reaktiviert wird. Dies lässt sich ebenfalls durch die wesentlich komplexeren Vorgänge die im Zellsystem herrschen begründen. Da humane Zellen einen aeroben Stoffwechsel haben, wird immer eine gewisse Menge an freien Radikalen im System freigesetzt, die die Reaktivierung durch NO beeinflussen oder bewirken können, dass sich reaktive Stickstoffintermediate wie NO₂ bilden (Kroncke, Suschek *et al.* 2000; Fang, Yang *et al.* 2002; Schrammel, Gorren *et al.* 2003). Diese können dann wiederum GSH nitrosieren und so zu einer Reaktivierung führen (Xu, Vita *et al.* 2000; Schrammel, Gorren *et al.* 2003).

Auch wenn man sich die Regulation der MMP-1-Expression z. B. über den MAP-Kinase-Signalweg und über den AP-1-Transkriptionsfaktor betrachtet, sind verschiedene Beispiele an redoxabhängigen Regulationsmechanismen beschrieben worden. Reaktive Sauerstoffspezies führen im Allgemeinen zu einem erhöhten AP-1-Spiegel und zur Translokation von NFκB, die beide wichtig für die Initiierung der MMP-1-Expression sind. Durch Modifikation von Cysteinen in DNA-Bindungsdomänen kann oxidativer Stress die Transkriptionsaktivität von diesen Molekülen erniedrigen. Weitere Beispiele für den Einfluss des Redoxstatus von Zellen auf die MMP-1-Expression sind die Aktivierung des MMP-1-Promotors durch H₂O₂ und der umgekehrte Effekt der γ-Glutamylcystein Synthetase (γGCSH). Eine Induktion von γGCSH führt zur Erhöhung der GSH-Spiegels und verändert so den Redoxstatus der Zellen. Durch den verringerten oxidativen Stress wird die MMP-1-Expression herunter reguliert (Savaraj, Wei *et al.* 2005).

Allerdings beeinflussen reaktive Stickoxid- oder Sauerstoffspezies nicht nur die Promotoraktivität, sie können auch die Aktivität durch oxidative Modifikation des Cysteins in der Pro-Domäne bewirken und damit zu einer Aktivierung führen (Okamoto, Akaike *et al.* 1997; Okamoto, Akaike *et al.* 2001; Okamoto, Valacchi *et al.* 2002; Okamoto, Akuta *et al.* 2004).

Dass der Redoxstatus von Zellen einen wichtigen Einfluss auf die MMP-1-Expression und MMP-1-Aktivität von Zellen hat wurde schon häufig gezeigt. Der Einfluss von niedrigmolekulare Thiolen, bzw. GSH, und reaktiven Stickoxidintermediaten auch auf das MMP-1 aus den Kulturüberständen der HVF, verdeutlicht die Möglichkeit der Aktivitätskontrolle von MMP-1 über diesen Regulationsmechanismus in der Haut.

4.4 MMP-1 Signalwege

Die extrazelluläre Matrix und die in ihr enthaltenen Makromoleküle wie Kollagen sind wichtig für die zelluläre Umgebung. MMPs spielen eine wichtige Rolle im Abbau und in der Neustrukturierung der extrazellulären Matrix. Unter normalen physiologischen Bedingungen werden MMPs auf mehreren Ebenen streng reguliert, sowohl auf der Transkriptionsebene, als auch auf der Ebene der Aktivierung der Pro-Zymogene und durch spezifische Inhibitoren (TIMPs) (Visse und Nagase 2003). Neben der Degradation von Komponenten der extrazellulären Matrix spielen MMPs auch eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Zellproliferation, Differenzierung und des Zelltodes, durch Freisetzung wichtiger Signalmoleküle aus der extrazellulären Matrix (McCawley und Matrisian 2001; Chakraborti, Mandal *et al.* 2003).

Die Erhöhung der MMP-1-Expression nach UV-Bestrahlung wird mit der UV-bedingten frühzeitigen Hautalterung in Verbindung gebracht. Die erhöhte Expression von MMP-1 führt hierbei zu einem verstärkten Abbau des Hautkollagens, wodurch es zum Verlust der Festigkeit und zur Faltenbildung kommt (Brenneisen, Sies *et al.* 2002; Watanabe, Shimizu *et al.* 2004). Durch UVA-Strahlung kommt es in den Zellen sowohl zur Expression von proinflammatorischen Zytokinen als auch zur Expression der iNOS und damit zu einer erhöhten NO-Bildung (Weller 2003). Es ist bekannt, dass MMPs im Allgemeinen in verschiedenen Zelltypen und Krankheitsbildern aufgrund vieler verschiedener Stimuli differentiell reguliert werden. So können verschiedene MMPs durch Phorbolester, Integrin-übermittelte Signale, ECM-Proteine, Zellstress usw. sowohl hoch- als auch herunterreguliert werden. Damit haben auch Zytokine in verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Effekte auf die Expression von MMPs (Mauviel 1993; Vincenti, White *et al.* 1996; Chakraborti, Mandal *et al.* 2003; Dasu, Barrow *et al.* 2003). Eine Fehlregulation von MMPs wird mit einer Vielzahl von pathologischen Effekten in Verbindung gebracht, die möglicherweise zu Krankheiten

wie Arthritis, Krebs, Arteriosklerose, Aneurismen, Nephritis, chronischen Wunden und Fibrosen führen. Der Grundgehalt von MMPs ist in Zellen normal sehr gering, wobei die Expression aber durch inflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakt reguliert wird (Nagase und Woessner 1999; Visse und Nagase 2003).

Demzufolge war es hier von Interesse das Zusammenwirken verschiedener Th-1-Zytokine auf die MMP-1-Expression in Fibroblasten zu untersuchen. Des Weiteren sollte der Einfluss von diesen Zytokinen auf die iNOS-Expression und ein möglicher Zusammenhang zur Expressionskontrolle von MMP-1 untersucht werden. Hierzu wurde der Einfluss der Th-1-Zytokine IL-1 β , IFN- γ und TNF- α auf die HVF nach 6, 12, 24 und 48 Stunden untersucht.

Es konnte hier gezeigt werden, dass die drei verwendeten proinflammatorischen Zytokine in HVF sowohl die iNOS- als auch die MMP-1-Expression unterschiedlich modulieren und zwar schon zu den frühen Zeitpunkten nach Aktivierung mit IL-1 β oder IFN- γ . Die Transkription von MMP-1 ist zu allen drei Zeitpunkten nach Aktivierung mit IL-1 β um das 5-fache und nach 12 Stunden sogar um das 12-fache erhöht, wogegen IFN- γ zu allen Zeitpunkten keinen Einfluss auf die Transkription von MMP-1 hat. Die Transkription von iNOS wird 6 Stunden nach Aktivierung mit IL-1 β und auch nach Aktivierung mit IFN- γ erhöht. Allerdings kommt es auch nur 6 Stunden nach der Aktivierung mit IL-1 β zu einer Erhöhung der iNOS-Transkription um das ca. 25-fache. Bereits 12 Stunden nach der Aktivierung ist die Menge an iNOS-mRNA auf das Grundniveau zurückgegangen. Nach Aktivierung durch IFN- γ dagegen ist die iNOS-mRNA zu allen Zeitpunkten um das ca. 20-fache erhöht. Auch 48 Stunden nach Aktivierung zeigt sich das gleiche Bild. Zu diesem Zeitpunkt steigert IL-1 β die MMP-1-Transkription um das ca. 3-fache, aber nicht die Transkription der iNOS. Durch die Aktivierung mit IFN- γ wird zwar die iNOS-Transkription um das ca. 20-fache erhöht, aber nicht die MMP-1-Transkription. Auch nach Aktivierung der HVF mit TNF- α kommt es nach 48 Stunden zu einer erhöhten Menge an MMP-1-mRNA aber nicht an iNOS-mRNA. Da während einer Entzündung nicht ein Zytokin alleine wirkt, war es von Interesse, inwiefern die Zytokine zusammen auf die iNOS- und MMP-1-Transkription wirken. Dafür wurden die HVF mit den Kombinationen der Zytokine für 48 Stunden inkubiert und der Einfluss der Zytokine auf die iNOS- und MMP-1-Transkription ermittelt. Es zeigt sich, dass es durch IFN- γ in allen Kombinationen zu keiner Erhöhung der Transkription von MMP-1 kommt, dafür aber zu einer starken Erhöhung der iNOS-

Expression. Alleine führt IFN- γ zu einer um das ca. 20-fache gesteigerten, in Kombination mit IL-1 β zu einer um das ca. 650-fache gesteigerten und in Kombination mit TNF- α zu einer um das ca. 550-fache gesteigerten iNOS-Transkription. Die Kombination aller drei Zytokine führt sogar zu einer Steigerung um das über 2000-fache.

Die MMP-1-Transkription wird dagegen durch IL-1 β auf das ca. 3-fache, durch TNF- α auf das ca. 9-fache und durch die Kombination von IL-1 β und TNF- α auf das ca. 7-fache erhöht. IFN- γ führt in den Kombinationen mit nur einem Zytokin, also entweder IL-1 β oder TNF- α , sogar zu einer Halbierung der MMP-1-Transkription. Durch die Kombination aller drei Zytokine bleibt die MMP-1-Transkription unbeeinflusst. IFN- γ scheint in HVF also einen inhibitorischen Effekt auf die durch IL-1 β und TNF- α erhöhte MMP-1-Transkription zu haben.

Dass es durch die Aktivierung mit spezifischen Kombinationen von Zytokinen, z. B. IFN- γ und TNF- α , zu einer erhöhten iNOS-Expression und damit zu einer erhöhten NO-Expression kommt, ist seit vielen Jahren bekannt (Kilbourn und Belloni 1990). Daher sind diese Ergebnisse wenig überraschend und stimmen mit der Literaturlage überein. Allerdings wird eine gesteigerte iNOS-Expression und das dadurch entstehende NO häufig mit einer Erhöhung der MMP-1-Expression in Verbindung gebracht (Dasu, Barrow *et al.* 2003). Dies konnte in den hier verwendeten HVF nicht bestätigt werden, da es gerade in den Zellen, die eine erhöhte iNOS-Transkription zeigen, zu keiner Erhöhung der MMP-1-Transkription kommt. In der Literatur wird allerdings zum einen die Korrelation zwischen NO und einer erhöhten MMP-1-Expression in anderen Zelltypen, so z. B. Zelllinien, Karzinomzellen oder Zellen die nicht humanen Ursprungs waren, nachgewiesen (Sasaki, Hattori *et al.* 1998; Yoshida, Sagawa *et al.* 2001; Ishii, Ogura *et al.* 2003; Lin, Kok *et al.* 2003). Zum anderen wurde in humanen dermalen Fibroblasten die MMP-1- und iNOS-Transkription nur 6 Stunden nach Aktivierung mit den Zytokinen betrachtet (Dasu, Barrow *et al.* 2003). Zu diesem Zeitpunkt kommt es auch hier zu einer Koexpression von iNOS und MMP-1. Da sich dies aber zu den späteren Zeitpunkten nicht fortsetzt, ist ein Zusammenhang zwischen der iNOS und der MMP-1-Expression fraglich. Des Weiteren führen Zytokine immer zu einer Veränderung des Redoxstatus von Zellen. Durch Zytokine steigt der oxidative Stress in den Zellen und eine Aktivierung der MMP-1-Transkription durch ROS ist bekannt. ROS können nicht nur den MAP-Kinase Signalweg, der zur Transkription von MMPs führt, sondern auch direkt den AP-1-Transkriptionsfaktor aktivieren. Es liegt daher also nahe,

dass hier die Transkription von MMP-1 nicht durch das von der iNOS gebildete NO und den daraus gebildeten RNS induziert wird sondern durch ROS (Droge 2002).

Auf Proteinebene zeigen sich die gleichen Tendenzen wie auf mRNA-Ebene. Das heißt, 48 Stunden nach der Aktivierung mit den Zytokinen ist sowohl nach Aktivierung mit IL-1 β als auch mit TNF- α die aktive und auch die Gesamtmenge an MMP-1 in den Überständen der HVF erhöht. Nach Inkubation mit IL-1 β ist sowohl die Menge an aktivem MMP-1 als auch die Gesamtmenge um das ca. 9-fache erhöht. TNF- α führt zu einer Erhöhung der Gesamtmenge um das ca. 14-fache und zu einer Erhöhung der Menge an aktivem MMP-1 um das ca. 9-fache. Nach Aktivierung der Zellen mit IFN- γ dagegen bleibt die Proteinmenge unverändert. Die verschiedenen Kombinationen der Zytokine zeigen auf Proteinebene ebenfalls die gleichen Tendenzen wie auf mRNA-Ebene. Die verschiedenen Kombination von IL-1 β und TNF- α erhöht die Menge an aktivem MMP-1 auf das ca. 19-fache und die Gesamtmenge auf das ca. 17-fache. Im Gegensatz zur mRNA führt die Kombination von IL-1 β mit IFN- γ und die Kombination der drei Zytokine zu einer leichten Erhöhung der Menge an aktivem MMP-1 im Überstand, in beiden Fällen um das ca. 4-fache. Allerdings wird die Menge an sezerniertem Protein nicht signifikant beeinflusst. Auch die Anwesenheit des iNOS-Inhibitors L-NIO während der Zytokinaktivierung beeinflusst die induzierte MMP-1-Expression nicht. Alle diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass in den primären HVF die Induktion der MMP-1-Expression unabhängig von dem durch die iNOS gebildeten NO ist.

Allerdings verschiebt IFN- γ den Anteil an aktivem Protein signifikant. In unbehandelten Zellen beträgt der Anteil an aktivem MMP-1 ca. 25 % der Gesamtmenge. In den mit IFN- γ aktivierten HVF ist der Anteil an aktivem MMP-1 auf ca. 50 % gestiegen. Dies lässt auf einen möglichen Zusammenhang zwischen dem gebildeten NO und der Aktivierung des MMP-1 schließen. Wie schon zuvor diskutiert, können diverse NO-Metabolite wie NO₂ und ONOO⁻, aber auch in geringen Maße NO, zu einer Aktivierung von MMPs führen (Okamoto, Akaike *et al.* 1997). Generell entstehen während eines Entzündungsprozesses sowohl reaktive Stickoxidspezies als auch Sauerstoffspezies, die zu einer Aktivierung des MMPs führen können. Allerdings kommt es nur durch IFN- γ alleine zu einer Verschiebung des Aktiv/Gesamt-Verhältnisses, obwohl in den Kombinationen mit IL-1 β und TNF- α deutlich mehr iNOS produziert wird.

Es konnte hier gezeigt werden, dass, obwohl es sich bei allen drei um proinflammatorische Zytokine handelt, sie deutlich unterschiedlich auf die MMP-1-Expression in HVF einwirken. Der Unterschied in der Regulation des MMP-1 liegt

vermutlich in den unterschiedlichen Signalwegen, die durch die Zytokine IL-1 β , TNF- α und IFN- γ aktiviert werden. Während durch IFN- γ hauptsächlich die Expression von Genen induziert wird, die über den Jak-Stat Signalweg aktiviert werden, wird durch IL-1 β und TNF- α hauptsächlich der Transkriptionsfaktor NF κ B aktiviert (Mauviel 1993; Kleinert, Wallerath *et al.* 1998; O'Shea, Gadina *et al.* 2002). Sowohl IL-1 β als auch TNF- α können zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 führen. Eine Proteinfamilie, die zur Aktivierung des AP-1 führt, ist die Familie der MAP-Kinasen. Die MAPK-Familie besteht aus den c-Jun N-terminalen Kinasen (JNKs), den Extrazellulär Signal-regulierten Kinasen (ERKs) und den p38 Kinasen. JNK und p38 Kinasen werden als Antwort auf verschiedene inflammatorische Zytokine, osmotischen Stress und aufgrund von apoptotischen Signalen aktiviert. Die ERKs dagegen reagieren auf Zytokine, Wachstumsfaktoren und Phorbolester. Alle diese Signale lösen den MAPK-Signalweg aus, der unter anderem in der Aktivierung des AP-1-Transkriptionsfaktors resultiert. Es ist bekannt, dass viele Stimuli, die zur Expression von MMPs führen, ebenfalls die Expression oder Aktivierung von *cfos* und/oder *cjun*, die sich zu Heterodimere zusammenlagern und den Transkriptionsfaktor AP-1 bilden, auslösen. In allen induzierbaren MMPs findet sich bei ungefähr -70 bp in der Promotorregion eine Bindungssequenz für AP-1 (Chakraborti, Mandal *et al.* 2003). Die Promoterregion von MMP-1 enthält eine TATA-Box bei -30 bp, eine AP-1 Bindungsstelle bei -70 bp und eine weitere bei -186 bp, die jedoch nur eine geringe Rolle bei der Transkription spielt. Durch den ERK-Signalweg wird außerdem die Aktivität des Transkriptionsfaktors „*erythoblastosis 26*“ (Ets) reguliert, der mit dem AP-1-Protein im MMP-1-Promotor kooperiert. Die Transkriptionsregulation durch AP-1 ist der hauptsächlich beschriebene Weg zur Transkription von MMP-1. Aber auch der durch IL-1 β und TNF- α aktivierte Weg über NF κ B hat einen Einfluss auf die MMP-1-Expression. So konnte gezeigt werden, dass es, wenn NF κ B im Zytoplasma bleibt und nicht in den Kern transloziert, es zu einer reduzierten Expression von MMP-1 kommt (Vincenti und Brinckerhoff 2002).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass in humanen Hautfibroblasten, die durch UVA-Strahlung induzierten, Phosphatidylcholine-Hydroperoxide zur NF κ B-medierten Induktion von IL-6 führen. Diese wiederum induzieren die MMP-1-Expression. Durch Überexpression der Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathion-Reduktase kann diese UVA-medierte MMP-1-Induktion inhibiert werden (Wenk, Schuller *et al.* 2004). Auch konnte in früheren Arbeiten ein Zusammenhang zwischen GS-NO und der MMP-

Expression gezeigt werden. In Epithelzellen der Luftwege kann GS-NO die Zytokin-medierte MMP-9-Expression inhibieren (Okamoto, Valacchi *et al.* 2002).

Es gibt zwar auch Publikationen, die eine durch IFN- γ induzierte Induktion von MMP-1 über den Jak-Stat Signalweg in verschiedenen Zelltypen zeigen (Korzus, Nagase *et al.* 1997). Dies scheint in HVF allerdings keine maßgebliche Rolle zu spielen. Letztendlich ist bekannt, dass zum einen die unterschiedlichen MMPs sehr verschieden reguliert werden und zum anderen die Regulation von Zelltyp zu Zelltyp stark variiert. Die strikte Regulation der MMPs ist vor dem Hintergrund nachvollziehbar, wenn man bedenkt mit welchen Krankheiten sie assoziiert werden.

In Monozyten führt IFN- γ nur in der Anwesenheit von dem Granulozyten und Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) zu einer erhöhten MMP-1-Expression. Auch TNF- α führt zusammen mit GM-CSF zu einer erhöhten MMP-1-Expression. IFN- γ steigert dies nochmals. IFN- γ erhöht die MMP-1-Expression in Anwesenheit von GM-CSF durch die Stimulation der TNF- α -Produktion über die p38 und ERK 1/2 bzw. MAPK Signalwege, wobei GM-CSF ERK 1/2 und IFN- γ p38 aktiviert. Unterstrichen wird dies dadurch, dass eine Inhibition der TNF-Rezeptoren-1 und -2 die Induktion von MMP-1 durch die Kombination von IFN- γ und GM-CSF verhindert. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass IFN- γ die durch TNF- α induzierte MMP-9-Expression über einen Caspase-8-abhängigen Weg inhibieren kann. Zum einen kann die MMP-9-Expression durch einen Caspase-8-Inhibitor wieder hergestellt werden, zum anderen kann die durch IFN- γ ausgelöste Phosphorylierung von Stat-1 durch einen Caspase-6-Inhibitor unterdrückt werden. Dies lässt auf einen unterdrückenden Effekt von Stat-1 auf MMP-9 schließen (Zhou, Zhang *et al.* 2003). Diese Art der Regulation von MMPs durch IFN- γ könnte möglicherweise auch in den in dieser Arbeit verwendeten Fibroblasten eine Rolle spielen. Außerdem kann NO auch die Bindungsaffinität vom AP-1-Transkriptionsfaktor reduzieren. Das durch die iNOS gebildete NO nach Aktivierung mit IFN- γ könnte daher so zu einer verringerten MMP-1-Transkription führen (Nikitovic, Holmgren *et al.* 1998).

In Anbetracht der oben diskutierten Signalwege ist davon auszugehen, dass das in dieser Arbeit nach Aktivierung gezeigte Expressionsmuster von MMP-1 und iNOS auf den primären HVF durch diese mediert ist. Die durch die Il-1 β und IFN- γ ausgelöste MAPK-Kaskade, führt über eine Aktivierung des AP-1 zu einer MMP-1-Transkription, während der durch IFN- γ ausgelöste Jak-Stat-Signalweg die MMP-1-Transkription nicht beeinflusst. Im Allgemeinen kann hier aber festgehalten werden, dass in HVF das von

der iNOS produzierte NO keinen Einfluss auf die Expression von MMP-1 hat. Es kommt hier durch IFN- γ zwar zu einer erhöhten iNOS-Transkription aber zu keinem Zeitpunkt zu einer erhöhten MMP-1-Expression. Dagegen wird die MMP-1-Expression deutlich durch IL-1 β und TNF- α gesteigert, wobei diese wiederum nicht, bzw. durch IL-1 β nur 6 Stunden nach der Zugabe, die iNOS-Transkription aktivieren. Auch konnte der iNOS-Inhibitor L-NIO die MMP-1-Expression nach Zytokinaktivierung nicht beeinflussen.

Die in dieser Arbeit untersuchten humanen Vorhautfibroblasten stellen ein relevantes Zellkulturmodell dar. Primäre Zellen entsprechen weitestgehend dem Zustand des Gewebes, aus dem sie isoliert wurden, da sie größtenteils unverändert sind. Zelllinien sind dagegen immortalisiert und genetisch verändert. So kommt es z. B. bei Zelllinien häufig zu Verlusten von Zytokinrezeptoren oder anderen Veränderungen im Stoffwechsel. Besonders Tumorzellen oder entsprechende Zelllinien weisen große Unterschiede gegenüber dem normalen physiologischen Zustand des Gewebes auf. Die der Literatur zugrunde liegenden Ergebnisse basieren hauptsächlich auf Untersuchung in Zelllinien und Tumorzellen. Die hier an den primären Vorhautfibroblasten gezeigten Expressionsmuster von MMP-1 und iNOS nach Aktivierung mit den proinflammatorischen Zytokinen entspricht daher eher dem physiologischen Zustand im Gewebe, als die mit Zelllinien ermittelten Ergebnisse.

Eine direkte Korrelation mit dem nach Zytokinaktivierung gebildetem NO und einer erhöhten MMP-1-Expression ist zudem kritisch, da durch Zytokine immer auch der Redoxstatus der Zellen verändert wird und ebenfalls ROS gebildet werden. Ein Einfluss von ROS auf die MMP-1-Expressionsregulation wurde zudem schon postuliert. Daher ist es durchaus realistisch, dass die erhöhte Expression von MMP-1 nach proinflammatorischen Stimuli in den HVF auf einen veränderten Redoxstatus und ROS zurück zu führen ist.

5 Zusammenfassung

Matrix Metalloproteinasen repräsentieren eine Familie von strukturverwandten, zinkabhängigen Endopeptidasen, die am Abbau der extrazellulären Matrix und an der Neustrukturierung beteiligt sind. Unter physiologischen Bedingungen werden MMPs sowohl auf transkriptioneller Ebene, als auch auf posttranskriptioneller Ebene, reguliert. Die Transkription von MMPs wird über den MAP-Kinasen und Serin/Threonin Kinasen mediiert und durch die Bindung der Transkriptionfaktoren AP-1 und Ets initiiert. Die Kontrolle auf posttranskriptioneller Ebene geschieht zum einen über ihre natürlichen Inhibitoren den TIMPs und zum anderen über die Regulation der Aktivierung der Proform der MMPs. In der Proform der MMPs ist ein Cystein aus der Pro-Domäne an das Zink im aktiven Zentrum koordiniert und zur Aktivierung der MMPs kommt es durch Aufspaltung dieser Koordination. In dieser Arbeit wurde ein weiterer und neuer Mechanismus zur Regulation der MMP-1-Aktivität gefunden. Dieser Mechanismus beruht auf einer Thiol-abhängigen Inhibition von MMP-1, die UVA- und Nitrit-abhängig kontrolliert werden kann. Es zeigt sich, dass niedrigmolekulare Thiole wie GSH, Cystein, Homocystein und N-Acetylcystein, die Aktivität von MMP-1 um bis zu 75 % reduziert. Die Effizienz der Inhibition nimmt in der Reihe von Cystein > GSH > Homocystein > N-Acetylcystein ab. Interessanterweise kann die GSH-vermittelte Inhibition von MMP-1 vollständig durch Bestrahlung der Proben in der Anwesenheit von Nitrit aufgehoben werden. Die Aufhebung der Inhibition geht einher mit einer vermehrten Oxidation von GSH. Nitrit ist ein natürlicher Bestandteil der humanen Haut und zerfällt durch UVA-Bestrahlung in NO und in diverse stark oxidierende Komponenten, wie z. B. $\cdot\text{OH}$ - und NO_2 -Radikale. Die UVA/Nitrit-induzierte Reaktivierung von MMP-1 und die Oxidation von GSH kann durch Natriumascorbat, einem effektivem NO_2 -Scavenger, unterdrückt werden. Die GSH-abhängige Inhibition der MMP-1-Aktivität kann auch in den Überständen von humanen Vorhautfibroblasten induziert werden. In den Überständen der Fibroblasten kann eine Reaktivierung durch den NO-Donor DETA/NO bewirkt werden. Bei dem an der Reaktivierung beteiligten Radikal handelt es sich wohl wie in vitro Messungen an rekombinaten MMP-1 zeigen um das Stickstoffdioxid-Radikal. Ein Einfluss des Stickstoffdioxid-Radikals auf die Aktivierung von proMMP-2 konnte schon früher gezeigt werden.

Ein Einfluss von UVA-Strahlung, Zytokinen und durch iNOS produziertes NO auf die Expression von MMP-1 wurde in verschiedenen Zelltypen in der Literatur postuliert. Auch in den HVF regulieren die Zytokine IL-1 β , IFN γ und TNF- α die MMP-1 und iNOS-Expression differenziell. So induzieren nur IL-1 β , TNF- α und deren Kombinationen die MMP-1-Expression. Der iNOS-Inhibitor L-NIO hat aber keinen Einfluss auf die durch die Zytokine induzierte MMP-1-Expression. IFN- γ dagegen führt in allen Kombination zu einer erhöhten iNOS-Expression und zu einer erhöhten Nitrit-Konzentration im Überstand der HVF, aber zu keiner Erhöhung der MMP-1-Expression. In humanen Vorhautfibroblasten ist die durch Zytokine induzierte Expression von MMP-1 daher unabhängig von der iNOS-medierten NO-Synthese. Die Erhöhung der MMP-1-Expression ist daher wahrscheinlich auf die während entzündlichen Prozessen gebildeten ROS zurückzuführen. Eine leichte Erhöhung des Anteils an aktivem MMP-1 nach Aktivierung mit IFN- γ ist dagegen zu beobachten. Die gebildeten RNS-Spezies führen daher vermutlich zu einer verstärkten Aktivierung von proMMP-1.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass MMP-1 auf vielen Ebenen reguliert wird. So repräsentiert die Aktivitätskontrolle durch Thiole und durch den UVA-abhängigen Nitrit-Zerfall ein neues Konzept in der Regulation von MMP-1. Generell zeigen die Ergebnisse, dass die Expression und Aktivität von MMPs immer im nativem Umfeld betrachtet werden muß, da die MMP-mRNA und -Proteinkonzentration nicht direkt mit der Aktivität korreliert werden kann. Insbesondere während entzündlichen Prozessen spielt der hier beschriebene Regulationsmechanismus aufgrund des auftretenden oxidativen und nitrosativen Stress eine entscheidende Rolle.

6 Abstract

Matrix metalloproteinases (MMPs) represent a family of structurally related, zinc-dependent proteinases participating in degradation and remodeling of the extracellular matrix. Under physiological conditions the activity of MMPs is regulated at the transcriptional as well as at the posttranslational level. The transcription is mediated via MAP-kinases or via serine/threonine-kinases and initiated via the transcription factors AP-1 and Ets. Posttranscriptionally, MMPs are on the one hand controlled through the naturally occurring inhibitors, the tissue inhibitors of MMPs (TIMPs) and on the other hand by the activation of proMMPs. In the inactive enzyme a cysteine of the pro-domain is conjugated to a zinc ion in the active center. MMPs become activated when this coordination breaks open and the active center becomes accessible.

Here, a new mechanism, which regulates MMP-activity depending on thiols and UVA-mediated photolysis of nitrite, was demonstrated. Low molecular thiols such as glutathione (GSH), cysteine, homocysteine and N-acetyl-cysteine reduce MMP-1 activity by up to 75 % with an efficiency of cysteine > GSH > homocysteine > N-acetyl-cysteine. In contrast, S-derivatized thiols completely lack this inhibitory activity. Interestingly, GSH-mediated inhibition of MMP-1-activity is completely abrogated by UVA-irradiation of the samples in the presence of nitrite a GSH oxidation to GSSG occurs. Nitrite is a natural constituent of human skin and upon UVA-challenge decomposes to nitric oxide and several strongly oxidizing compounds such as hydroxyl and nitrogen dioxide radicals. The aforementioned UVA/nitrite-induced reactivation of MMP-1 and simultaneous GSSG formation is significantly inhibited by ascorbic acid an effective NO₂ radical scavenger. The GSH-dependent inhibition of MMPs can also be found in supernatants of human foreskin fibroblasts cultures. In these supernatants MMP-1 can be reactivated by adding DETA/NO, a NO-donor molecule. The reactivation as shown in vitro with recombinant MMP-1 appears to be mediated by the nitrogen dioxide radical. Indeed an activating effect of nitrogen dioxide had been shown with proMMP-2.

A number of publications have previously dealt with the influence of UVA irradiation, cytokines and iNOS-derived NO on the MMP-1 expression had been shown previously. Here, in human foreskin fibroblasts a differential regulation of MMP-1 and iNOS by the proinflammatory cytokines IL-1 β , IFN- γ and TNF- α can be observed. IL-1 β and TNF- α and their combination up regulate as well the mRNA as the protein expression of MMP-1. However, iNOS inhibitor L-NIO has no influence on the cytokine-mediated induction of MMP-1 expression. In contrast, IFN γ and its combinations lead to an up-regulation of the iNOS-mRNA expression and to an enhanced nitrite concentration in the supernatants, but not to an induction of MMP-1 expression. Therefore, in primary human foreskin fibroblast the induction of MMP-1 expression is independent of the iNOS-derived NO-formation. The enhanced expression of MMP-1 by the cytokines is maybe a result of a changed redox state after a proinflammatory stimulus. However IFN- γ leads to an enhanced amount of active MMP-1 and therefore a shift in the ratio of active to the complete MMP-1 amount.

In conclusion, MMP-1 is regulated on several different levels. The control of MMP-1-activity based on the inhibitory effect of reduced thiols and reactivation by a mechanism comprising light-induced decomposition of nitrite, as described here, represents a new concept in MMP-1 activity regulation. Therefore, the activity of MMPs has to be considered in their environmental conditions and cannot be directly correlated neither with the amount of MMP-1 mRNA nor protein. Especially, during inflammatory conditions where oxidative or nitrosative stress occurs this mechanism appears of primary importance.

7 Literaturverzeichnis

- Anderson, M. E. (1985). "Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples." Methods Enzymol **113**: 548-55.
- Anselmo, A. N. und M. H. Cobb (2004). "Protein kinase function and glutathionylation." Biochem J **381**(Pt 3): e1-2.
- Arakawa, M., A. Hatamochi, et al. (1996). "Reduced collagenase gene expression in fibroblasts from hypertrophic scar tissue." Br J Dermatol **134**(5): 863-8.
- Banno, Y., S. Wang, et al. (2001). "Involvement of ERK and p38 MAP kinase in oxidative stress-induced phospholipase D activation in PC12 cells." Neuroreport **12**(10): 2271-5.
- Bauer, E. A., A. Z. Eisen, et al. (1970). "Immunologic relationship of a purified human skin collagenase to other human and animal collagenases." Biochim Biophys Acta **206**(1): 152-60.
- Benbow, U. und C. E. Brinckerhoff (1997). "The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about?" Matrix Biol **15**(8-9): 519-26.
- Bender, K., C. Blattner, et al. (1997). "UV-induced signal transduction." J Photochem Photobiol B **37**(1-2): 1-17.
- Bescond, A., T. Augier, et al. (1999). "Influence of homocysteine on matrix metalloproteinase-2: activation and activity." Biochem Biophys Res Commun **263**(2): 498-503.
- Birkedal-Hansen, H., W. G. Moore, et al. (1993). "Matrix metalloproteinases: a review." Crit Rev Oral Biol Med **4**(2): 197-250.
- Blank, C., C. Bogdan, et al. (1996). "Murine epidermal Langerhans cells do not express inducible nitric oxide synthase." Eur J Immunol **26**(4): 792-6.
- Bogdan, C. (2001). "Nitric oxide and the immune response." Nat Immunol **2**(10): 907-16.
- Boger, R. H., P. Vallance, et al. (2003). "Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a key regulator of nitric oxide synthase." Atheroscler Suppl **4**(4): 1-3.
- Brand, A., S. Gil, et al. (2001). "Lipid constituents in oligodendroglial cells alter susceptibility to H₂O₂-induced apoptotic cell death via ERK activation." J Neurochem **76**(3): 910-8.
- Brennan, M., H. Bhatti, et al. (2003). "Matrix metalloproteinase-1 is the major collagenolytic enzyme responsible for collagen damage in UV-irradiated human skin." Photochem Photobiol **78**(1): 43-8.
- Brenneisen, P., H. Sies, et al. (2002). "Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events." Ann N Y Acad Sci **973**: 31-43.
- Bruch-Gerharz, D., K. Fehsel, et al. (1996). "A proinflammatory activity of interleukin 8 in human skin: expression of the inducible nitric oxide synthase in psoriatic lesions and cultured keratinocytes." J Exp Med **184**(5): 2007-12.
- Bruch-Gerharz, D., T. Ruzicka, et al. (1998). "Nitric oxide in human skin: current status and future prospects." J Invest Dermatol **110**(1): 1-7.
- Bruch-Gerharz, D., O. Schnorr, et al. (2003). "Arginase 1 overexpression in psoriasis: limitation of inducible nitric oxide synthase activity as a molecular mechanism for keratinocyte hyperproliferation." Am J Pathol **162**(1): 203-11.

- Caselli, A., G. Camici, et al. (1994). "Nitric oxide causes inactivation of the low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase." J Biol Chem **269**(40): 24878-82.
- Chakraborti, S., M. Mandal, et al. (2003). "Regulation of matrix metalloproteinases: an overview." Mol Cell Biochem **253**(1-2): 269-85.
- Chung, L., D. Dinakarpanian, et al. (2004). "Collagenase unwinds triple-helical collagen prior to peptide bond hydrolysis." Embo J **23**(15): 3020-30.
- Clark, I. M. und T. E. Cawston (1989). "Fragments of human fibroblast collagenase. Purification and characterization." Biochem J **263**(1): 201-6.
- Croen, K. D. (1993). "Evidence for antiviral effect of nitric oxide. Inhibition of herpes simplex virus type 1 replication." J Clin Invest **91**(6): 2446-52.
- Cuda, G., R. Paterno, et al. (2002). "Protection of human endothelial cells from oxidative stress: role of Ras-ERK1/2 signaling." Circulation **105**(8): 968-74.
- Dasu, M. R., R. E. Barrow, et al. (2003). "Matrix metalloproteinase expression in cytokine stimulated human dermal fibroblasts." Burns **29**(6): 527-31.
- Ding, M., J. Li, et al. (2002). "Differential role of hydrogen peroxide in UV-induced signal transduction." Mol Cell Biochem **234-235**(1-2): 81-90.
- Droge, W. (2002). "Free radicals in the physiological control of cell function." Physiol Rev **82**(1): 47-95.
- Eberhardt, W., T. Beeg, et al. (2000). "Nitric oxide modulates expression of matrix metalloproteinase-9 in rat mesangial cells." Kidney Int **57**(1): 59-69.
- Fang, Y. Z., S. Yang, et al. (2002). "Free radicals, antioxidants, and nutrition." Nutrition **18**(10): 872-9.
- Feldman, P. L., O. W. Griffith, et al. (1993). "Irreversible inactivation of macrophage and brain nitric oxide synthase by L-NG-methylarginine requires NADPH-dependent hydroxylation." J Med Chem **36**(4): 491-6.
- Finkel, T. (2001). "Reactive oxygen species and signal transduction." IUBMB Life **52**(1-2): 3-6.
- Finkel, T. und N. J. Holbrook (2000). "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing." Nature **408**(6809): 239-47.
- Fischer, M. und P. Warneck (1996). "Photodecomposition of nitrite and undissociated nitrous acid in aqueous solution." J.Phys.Chem. **100**: 18749-18756.
- Forstermann, U., E. I. Closs, et al. (1994). "Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions." Hypertension **23**(6 Pt 2): 1121-31.
- Fowlkes, J. L., J. J. Enghild, et al. (1994). "Matrix metalloproteinases degrade insulin-like growth factor-binding protein-3 in dermal fibroblast cultures." J Biol Chem **269**(41): 25742-6.
- Fowlkes, J. L., K. Suzuki, et al. (1994). "Proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-3 during rat pregnancy: a role for matrix metalloproteinases." Endocrinology **135**(6): 2810-3.
- Fowlkes, J. L., K. M. Thrailkill, et al. (1995). "Matrix metalloproteinases as insulin-like growth factor binding protein-degrading proteinases." Prog Growth Factor Res **6**(2-4): 255-63.
- Franchi, A., M. Santucci, et al. (2002). "Expression of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 in carcinoma of the head and neck." Cancer **95**(9): 1902-10.

- Frank, G. D., S. Eguchi, et al. (2000). "Involvement of reactive oxygen species in the activation of tyrosine kinase and extracellular signal-regulated kinase by angiotensin II." Endocrinology **141**(9): 3120-6.
- Frears, E. R., Z. Zhang, et al. (1996). "Inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by peroxynitrite." FEBS Lett **381**(1-2): 21-4.
- Fu, X., S. Y. Kassim, et al. (2001). "Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase." J Biol Chem **276**(44): 41279-87.
- Furchgott, R. F. (1955). "The pharmacology of vascular smooth muscle." Pharmacol Rev **7**(2): 183-265.
- Galis, Z. S. und J. J. Khatri (2002). "Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly." Circ Res **90**(3): 251-62.
- Gao, C. Q., G. Sawicki, et al. (2003). "Matrix metalloproteinase-2 mediates cytokine-induced myocardial contractile dysfunction." Cardiovasc Res **57**(2): 426-33.
- Ghezzi, P. (2005). "Regulation of protein function by glutathionylation." Free Radic Res **39**(6): 573-80.
- Giannelli, G., J. Falk-Marzillier, et al. (1997). "Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5." Science **277**(5323): 225-8.
- Giustarini, D., R. Rossi, et al. (2004). "S-glutathionylation: from redox regulation of protein functions to human diseases." J Cell Mol Med **8**(2): 201-12.
- Goldberg, G. I., S. M. Wilhelm, et al. (1986). "Human fibroblast collagenase. Complete primary structure and homology to an oncogene transformation-induced rat protein." J Biol Chem **261**(14): 6600-5.
- Gray, R. D., H. H. Saneii, et al. (1981). "Metal binding peptide inhibitors of vertebrate collagenase." Biochem Biophys Res Commun **101**(4): 1251-8.
- Harmey, J. H., C. D. Bucana, et al. (2002). "Lipopolysaccharide-induced metastatic growth is associated with increased angiogenesis, vascular permeability and tumor cell invasion." Int J Cancer **101**(5): 415-22.
- Ikejiri, M., M. M. Bernardo, et al. (2005). "Potent mechanism-based inhibitors for matrix metalloproteinases." J Biol Chem **280**(40): 33992-4002.
- Imai, K., A. Hiramatsu, et al. (1997). "Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta1 release." Biochem J **322** (Pt 3): 809-14.
- Ishii, Y., T. Ogura, et al. (2003). "Induction of matrix metalloproteinase gene transcription by nitric oxide and mechanisms of MMP-1 gene induction in human melanoma cell lines." Int J Cancer **103**(2): 161-8.
- Iyer, S., R. Visse, et al. (2006). "Crystal structure of an active form of human MMP-1." J Mol Biol **362**(1): 78-88.
- Janin, A., Y. T. Kontinen, et al. (1990). "Fibroblast markers in labial salivary gland biopsies in progressive systemic sclerosis." Clin Exp Rheumatol **8**(3): 237-42.
- Jozic, D., G. Bourenkov, et al. (2005). "X-ray structure of human proMMP-1: new insights into procollagenase activation and collagen binding." J Biol Chem **280**(10): 9578-85.
- Kayagaki, N., A. Kawasaki, et al. (1995). "Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand." J Exp Med **182**(6): 1777-83.

- Kelicen, P., I. Cantuti-Castelvetri, et al. (2002). "The spin trapping agent PBN stimulates H₂O₂-induced Erk and Src kinase activity in human neuroblastoma cells." Neuroreport **13**(8): 1057-61.
- Kerkela, E. und U. Saarialho-Kere (2003). "Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer." Exp Dermatol **12**(2): 109-25.
- Kheradmand, F., E. Werner, et al. (1998). "Role of Rac1 and oxygen radicals in collagenase-1 expression induced by cell shape change." Science **280**(5365): 898-902.
- Kilbourn, R. G. und P. Belloni (1990). "Endothelial cell production of nitrogen oxides in response to interferon gamma in combination with tumor necrosis factor, interleukin-1, or endotoxin." J Natl Cancer Inst **82**(9): 772-6.
- Kleinert, H., T. Wallerath, et al. (1998). "Cytokine induction of NO synthase II in human DLD-1 cells: roles of the JAK-STAT, AP-1 and NF-kappaB-signaling pathways." Br J Pharmacol **125**(1): 193-201.
- Korzus, E., H. Nagase, et al. (1997). "The mitogen-activated protein kinase and JAK-STAT signaling pathways are required for an oncostatin M-responsive element-mediated activation of matrix metalloproteinase 1 gene expression." J Biol Chem **272**(2): 1188-96.
- Kroncke, K. D. (2001a). "Cysteine-Zn²⁺ complexes: unique molecular switches for inducible nitric oxide synthase-derived NO." Faseb J **15**(13): 2503-7.
- Kroncke, K. D. (2001b). "Zinc finger proteins as molecular targets for nitric oxide-mediated gene regulation." Antioxid Redox Signal **3**(4): 565-75.
- Kroncke, K. D., K. Fehsel, et al. (1997). "Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection--how, why, when, and where?" Nitric Oxide **1**(2): 107-20.
- Kroncke, K. D., K. Fehsel, et al. (1998). "Inducible nitric oxide synthase in human diseases." Clin Exp Immunol **113**(2): 147-56.
- Kroncke, K. D., C. V. Suschek, et al. (2000). "Implications of inducible nitric oxide synthase expression and enzyme activity." Antioxid Redox Signal **2**(3): 585-605.
- Kuruganti, P. A., R. D. Wurster, et al. (2002). "Mitogen activated protein kinase activation and oxidant signaling in astrocytoma cells." J Neurooncol **56**(2): 109-17.
- Lander, H. M., D. P. Hajjar, et al. (1997). "A molecular redox switch on p21(ras). Structural basis for the nitric oxide-p21(ras) interaction." J Biol Chem **272**(7): 4323-6.
- Lander, H. M., J. S. Ogiste, et al. (1995). "Nitric oxide-stimulated guanine nucleotide exchange on p21ras." J Biol Chem **270**(13): 7017-20.
- Lander, H. M., J. M. Tauras, et al. (1997). "Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21(ras)-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress." J Biol Chem **272**(28): 17810-4.
- Lauer-Fields, J. L., H. Nagase, et al. (2004). "Development of a solid-phase assay for analysis of matrix metalloproteinase activity." J Biomol Tech **15**(4): 305-16.
- Leone, A. M., P. L. Francis, et al. (1991). "Thermospray tandem mass spectrometric analysis of oxygen incorporation into citrulline by nitric oxide synthase." Biol Mass Spectrom **20**(12): 759-62.

- Leone, A. M., R. M. Palmer, et al. (1991). "Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline." J Biol Chem **266**(35): 23790-5.
- Lin, S. K., S. H. Kok, et al. (2003). "Nitric oxide promotes infectious bone resorption by enhancing cytokine-stimulated interstitial collagenase synthesis in osteoblasts." J Bone Miner Res **18**(1): 39-46.
- Liu, Z., J. M. Shipley, et al. (1998). "Gelatinase B-deficient mice are resistant to experimental bullous pemphigoid." J Exp Med **188**(3): 475-82.
- Matrisian, L. M. (1994). "Matrix metalloproteinase gene expression." Ann N Y Acad Sci **732**: 42-50.
- Matsunaga, K. und R. F. Furchgott (1989). "Interactions of light and sodium nitrite in producing relaxation of rabbit aorta." J Pharmacol Exp Ther **248**(2): 687-95.
- Mauviel, A. (1993). "Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression." J Cell Biochem **53**(4): 288-95.
- McCawley, L. J. und L. M. Matrisian (2001). "Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore!" Curr Opin Cell Biol **13**(5): 534-40.
- Midwinter, R. G., M. C. Vissers, et al. (2001). "Hypochlorous acid stimulation of the mitogen-activated protein kinase pathway enhances cell survival." Arch Biochem Biophys **394**(1): 13-20.
- Mori, M. und T. Gotoh (2000). "Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes." Biochem Biophys Res Commun **275**(3): 715-9.
- Nagase, H., R. Visse, et al. (2006). "Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs." Cardiovasc Res **69**(3): 562-73.
- Nagase, H. und J. F. Woessner, Jr. (1999). "Matrix metalloproteinases." J Biol Chem **274**(31): 21491-4.
- Nathan, C. (1992). "Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells." Faseb J **6**(12): 3051-64.
- Nelson, K. K. und J. A. Melendez (2004). "Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases." Free Radic Biol Med **37**(6): 768-84.
- Nelson, K. K., S. Subbaram, et al. (2006). "Redox-dependent matrix metalloproteinase-1 expression is regulated by JNK through Ets and AP-1 promoter motifs." J Biol Chem **281**(20): 14100-10.
- Neumann, U., H. Kubota, et al. (2004). "Characterization of Mca-Lys-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂, a fluorogenic substrate with increased specificity constants for collagenases and tumor necrosis factor converting enzyme." Anal Biochem **328**(2): 166-73.
- Nikitovic, D., A. Holmgren, et al. (1998). "Inhibition of AP-1 DNA binding by nitric oxide involving conserved cysteine residues in Jun and Fos." Biochem Biophys Res Commun **242**(1): 109-12.
- Nishida, M., Y. Maruyama, et al. (2000). "G alpha(i) and G alpha(o) are target proteins of reactive oxygen species." Nature **408**(6811): 492-5.
- Novaro, V., A. Colman-Lerner, et al. (2001). "Regulation of metalloproteinases by nitric oxide in human trophoblast cells in culture." Reprod Fertil Dev **13**(5-6): 411-20.
- Okamoto, T., T. Akaike, et al. (1997). "Activation of human neutrophil procollagenase by nitrogen dioxide and peroxynitrite: a novel mechanism for procollagenase activation involving nitric oxide." Arch Biochem Biophys **342**(2): 261-74.

- Okamoto, T., T. Akaike, et al. (2001). "Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein S-glutathiolation via disulfide S-oxide formation." J Biol Chem **276**(31): 29596-602.
- Okamoto, T., T. Akuta, et al. (2004). "Molecular mechanism for activation and regulation of matrix metalloproteinases during bacterial infections and respiratory inflammation." Biol Chem **385**(11): 997-1006.
- Okamoto, T., G. Valacchi, et al. (2002). "S-nitrosothiols inhibit cytokine-mediated induction of matrix metalloproteinase-9 in airway epithelial cells." Am J Respir Cell Mol Biol **27**(4): 463-73.
- O'Shea, J. J., M. Gadina, et al. (2002). "Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway." Cell **109** **Suppl**: S121-31.
- Paunel, A. N., A. Dejam, et al. (2005). "Enzyme-independent nitric oxide formation during UVA challenge of human skin: characterization, molecular sources, and mechanisms." Free Radic Biol Med **38**(5): 606-15.
- Persson, B., A. Andersson, et al. (2002). "The redox state of glutathione, cysteine and homocysteine in the extracellular fluid in the skin." Free Radic Res **36**(2): 151-6.
- Petitclerc, E., S. Stromblad, et al. (1999). "Integrin alpha(v)beta3 promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival." Cancer Res **59**(11): 2724-30.
- Powell, W. C., B. Fingleton, et al. (1999). "The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis." Curr Biol **9**(24): 1441-7.
- Reddy, S. P. und B. T. Mossman (2002). "Role and regulation of activator protein-1 in toxicant-induced responses of the lung." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **283**(6): L1161-78.
- Reunanen, N., M. Foschi, et al. (2000). "Activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 inhibits type I collagen expression by human skin fibroblasts." J Biol Chem **275**(44): 34634-9.
- Rutter, J. L., T. I. Mitchell, et al. (1998). "A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription." Cancer Res **58**(23): 5321-5.
- Saari, H., T. Sorsa, et al. (1992). "Reactive oxygen species as regulators of human neutrophil and fibroblast interstitial collagenases." Int J Tissue React **14**(3): 113-20.
- Saari, H., K. Suomalainen, et al. (1990). "Activation of latent human neutrophil collagenase by reactive oxygen species and serine proteases." Biochem Biophys Res Commun **171**(3): 979-87.
- Saarialho-Kere, U. K., M. Vaalamo, et al. (1995). "Interstitial collagenase is expressed by keratinocytes that are actively involved in reepithelialization in blistering skin disease." J Invest Dermatol **104**(6): 982-8.
- Sasaki, K., T. Hattori, et al. (1998). "Nitric oxide mediates interleukin-1-induced gene expression of matrix metalloproteinases and basic fibroblast growth factor in cultured rabbit articular chondrocytes." J Biochem (Tokyo) **123**(3): 431-9.
- Savaraj, N., Y. Wei, et al. (2005). "Redox regulation of matrix metalloproteinase gene family in small cell lung cancer cells." Free Radic Res **39**(4): 373-81.
- Schonbeck, U., F. Mach, et al. (1998). "Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing." J Immunol **161**(7): 3340-6.

- Schrammel, A., A. C. Gorren, et al. (2003). "S-nitrosation of glutathione by nitric oxide, peroxyxynitrite, and (*)NO/O(2)(*)." Free Radic Biol Med **34**(8): 1078-88.
- Sharrocks, A. D. (2001). "The ETS-domain transcription factor family." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(11): 827-37.
- Sies, H. (1999). "Glutathione and its role in cellular functions." Free Radic Biol Med **27**(9-10): 916-21.
- Singh, R. J., N. Hogg, et al. (1996). "Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols." J Biol Chem **271**(31): 18596-603.
- Singh, S. P., J. S. Wishnok, et al. (1996). "The chemistry of the S-nitrosoglutathione/glutathione system." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(25): 14428-33.
- Springman, E. B., E. L. Angleton, et al. (1990). "Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(1): 364-8.
- Stahle-Backdahl, M., M. Inoue, et al. (1994). "92-kD gelatinase is produced by eosinophils at the site of blister formation in bullous pemphigoid and cleaves the extracellular domain of recombinant 180-kD bullous pemphigoid autoantigen." J Clin Invest **93**(5): 2022-30.
- Sternlicht, M. D. und Z. Werb (2001). "How matrix metalloproteinases regulate cell behavior." Annu Rev Cell Dev Biol **17**: 463-516.
- Sudel, K. M., K. Venzke, et al. (2003). "Tight control of matrix metalloproteinase-1 activity in human skin." Photochem Photobiol **78**(4): 355-60.
- Suschek, C., T. Schewe, et al. (2006). "Nitrite, a naturally occurring precursor of NO acting like a "prodrug"." Biological Chemistry **387**(5): 499-506.
- Suschek, C. V., O. Schnorr, et al. (2004). "The role of iNOS in chronic inflammatory processes in vivo: is it damage-promoting, protective, or active at all?" Curr Mol Med **4**(7): 763-75.
- Suschek, C. V., P. Schroeder, et al. (2003). "The presence of nitrite during UVA irradiation protects from apoptosis." Faseb J **17**(15): 2342-4.
- Suzuki, M., G. Raab, et al. (1997). "Matrix metalloproteinase-3 releases active heparin-binding EGF-like growth factor by cleavage at a specific juxtamembrane site." J Biol Chem **272**(50): 31730-7.
- Takeda, K., A. Hatamochi, et al. (1994). "Decreased collagenase expression in cultured systemic sclerosis fibroblasts." J Invest Dermatol **103**(3): 359-63.
- Thraillkill, K. M., L. D. Quarles, et al. (1995). "Characterization of insulin-like growth factor-binding protein 5-degrading proteases produced throughout murine osteoblast differentiation." Endocrinology **136**(8): 3527-33.
- Townsend, D. M., K. D. Tew, et al. (2003). "The importance of glutathione in human disease." Biomed Pharmacother **57**(3-4): 145-55.
- Upadhyya, G. A. und S. M. Strasberg (2000). "Glutathione, lactobionate, and histidine: cryptic inhibitors of matrix metalloproteinases contained in University of Wisconsin and histidine/tryptophan/ketoglutarate liver preservation solutions." Hepatology **31**(5): 1115-22.
- Van Wart, H. E. und H. Birkedal-Hansen (1990). "The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(14): 5578-82.

- Vincenti, M. P. und C. E. Brinckerhoff (2002). "Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors." Arthritis Res **4**(3): 157-64.
- Vincenti, M. P., L. A. White, et al. (1996). "Regulating expression of the gene for matrix metalloproteinase-1 (collagenase): mechanisms that control enzyme activity, transcription, and mRNA stability." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **6**(4): 391-411.
- Visse, R. und H. Nagase (2003). "Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry." Circ Res **92**(8): 827-39.
- Walker, N. I., B. V. Harmon, et al. (1988). "Patterns of cell death." Methods Achiev Exp Pathol **13**: 18-54.
- Watanabe, H., T. Shimizu, et al. (2004). "Ultraviolet A-induced production of matrix metalloproteinase-1 is mediated by macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human dermal fibroblasts." J Biol Chem **279**(3): 1676-83.
- Watanabe, N. und U. Ikeda (2004). "Matrix metalloproteinases and atherosclerosis." Curr Atheroscler Rep **6**(2): 112-20.
- Weller, R. (2003). "Nitric oxide: a key mediator in cutaneous physiology." Clin Exp Dermatol **28**(5): 511-4.
- Weller, R., S. Pattullo, et al. (1996). "Nitric oxide is generated on the skin surface by reduction of sweat nitrate." J Invest Dermatol **107**(3): 327-31.
- Weller, R., R. J. Price, et al. (2001). "Antimicrobial effect of acidified nitrite on dermatophyte fungi, Candida and bacterial skin pathogens." J Appl Microbiol **90**(4): 648-52.
- Wenk, J., P. Brenneisen, et al. (1999). "Stable overexpression of manganese superoxide dismutase in mitochondria identifies hydrogen peroxide as a major oxidant in the AP-1-mediated induction of matrix-degrading metalloprotease-1." J Biol Chem **274**(36): 25869-76.
- Wenk, J., J. Schuller, et al. (2004). "Overexpression of phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase in human dermal fibroblasts abrogates UVA irradiation-induced expression of interstitial collagenase/matrix metalloproteinase-1 by suppression of phosphatidylcholine hydroperoxide-mediated NFkappaB activation and interleukin-6 release." J Biol Chem **279**(44): 45634-42.
- Westermarck, J., T. Holmstrom, et al. (1998). "Enhancement of fibroblast collagenase-1 (MMP-1) gene expression by tumor promoter okadaic acid is mediated by stress-activated protein kinases Jun N-terminal kinase and p38." Matrix Biol **17**(8-9): 547-57.
- Westermarck, J., S. Li, et al. (2000). "Activation of fibroblast collagenase-1 expression by tumor cells of squamous cell carcinomas is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH2-terminal kinase-2." Cancer Res **60**(24): 7156-62.
- Westermarck, J., S. P. Li, et al. (2001). "p38 mitogen-activated protein kinase-dependent activation of protein phosphatases 1 and 2A inhibits MEK1 and MEK2 activity and collagenase 1 (MMP-1) gene expression." Mol Cell Biol **21**(7): 2373-83.
- Whitelock, J. M., A. D. Murdoch, et al. (1996). "The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by

- stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases." *J Biol Chem* **271**(17): 10079-86.
- Woessner, J. F., Jr. (1999). "Matrix metalloproteinase inhibition. From the Jurassic to the third millennium." *Ann N Y Acad Sci* **878**: 388-403.
- Wu, G., Y. Z. Fang, et al. (2004). "Glutathione metabolism and its implications for health." *J Nutr* **134**(3): 489-92.
- Xu, A., J. A. Vita, et al. (2000). "Ascorbic acid and glutathione modulate the biological activity of S-nitrosoglutathione." *Hypertension* **36**(2): 291-5.
- Xue, M., N. T. Le, et al. (2006). "Targeting matrix metalloproteases to improve cutaneous wound healing." *Expert Opin Ther Targets* **10**(1): 143-55.
- Yang, S. H., A. D. Sharrocks, et al. (2003). "Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades." *Gene* **320**: 3-21.
- Yin, L., R. Yamauchi, et al. (2003). "The expression of matrix metalloproteinase-1 mRNA induced by ultraviolet A1 (340-400 nm) is phototherapy relevant to the glutathione (GSH) content in skin fibroblasts of systemic sclerosis." *J Dermatol* **30**(3): 173-80.
- Yoshida, M., N. Sagawa, et al. (2001). "Nitric oxide increases matrix metalloproteinase-1 production in human uterine cervical fibroblast cells." *Mol Hum Reprod* **7**(10): 979-85.
- Yu, Q. und I. Stamenkovic (2000). "Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis." *Genes Dev* **14**(2): 163-76.
- Zafiriou, O. C. und R. Bonneau (1987). "Wavelegth-dependent quantum yield of radical formation from photolysis of nitrite ion in water." *Photochem Photobiol* **45**: 723-727.
- Zaragoza, C., E. Soria, et al. (2002). "Activation of the mitogen activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 by the nitric oxide-cGMP-cGMP-dependent protein kinase axis regulates the expression of matrix metalloproteinase 13 in vascular endothelial cells." *Mol Pharmacol* **62**(4): 927-35.
- Zhou, M., Y. Zhang, et al. (2003). "Interferon-gamma differentially regulates monocyte matrix metalloproteinase-1 and -9 through tumor necrosis factor-alpha and caspase 8." *J Biol Chem* **278**(46): 45406-13.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ala	Alanin
APMA	4-Aminophenylmercuric Acetat
AP-1	<i>Activator Protein-1</i>
BSA	bovines Serumalbumin
Cys	Cystein
DETA/NO	(Z)-1-[N-(2-aminoethyl)-N-(2-ammoniomethyl)amino]diazene-1,2-diolat
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dpa	N-3-(2, 4-Dinitrophenyl)-L-2,3-diaminopropionyl
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ERK	<i>Extracellular signal activated protein kinase</i>
EtBr	Ethidium Bromid
Ets	<i>v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor
GAPDH	Gluceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
Gln	Glutamin
Gly	Glycin
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
HC	Homocystein
HB-EGF	<i>Heparin-binding epidermal growth factor</i>
HVF	humane Vorhautfibroblasten
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HOCl	Hypochlorige Säure
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IGF-BP3	<i>Insulin-like growth factor-binding Protein</i>

IFN	Interferon
IL	Interleukin
Ile	Isoleucin
IRF	Interferon reguliertes Protein
JNK	Janus Kinase
K_M	Michaelis-Menten Konstante
Leu	Leucin
LPS	Lipopolysaccharid
MMP	Matrix Metalloproteinase
MT-MMP	<i>Membran-type matrix metalloproteinase</i>
MAPK	mitogen aktivierte Protein Kinase
MEK	<i>Mitogen activated ERK activating kinase</i>
MCA	(7-Methoxycoumarin-4-yl)acetyl
NAC	N-Acetylcystein
NaAsc	Natriumascorbat
L-NIO	L-N-(-Iminoethyl)-ornithindihydrochlorid
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂	Stickstoffdioxid
NOS	NO-Synthase
eNOS	endotheliale NO-Synthase
cNOS	konstitutive NO-Synthase
iNOS	induzierbare NO-Synthase
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂	Stickstoffdioxid
N ₂ O ₃	Distickstofftrioxid
NF-κB	nukleärer Faktor κB
NTC	<i>non template control</i>
·OH	Hydroxyl Radikal
ONOO ⁻	Peroxinitritanion
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
cPTIO	2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid
qPCR	quantitative Polymerase Kettenreaktion

RGD-Sequenz	Arginin-Glycin-Asparagin
RNS	reaktive Stickoxidspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RSNO	S-Nitrosothiole
RT-PCR	reverse Transkriptase-Polymerase- Kettenreaktion
RXNO	nitrosierte Verbindungen
SDS	Natriumdodecylsulfat
Stat	<i>signal transducer and activatoren of transcription</i>
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TGF	Tumor Wachstumsfaktor
UV	ultraviolette Strahlung
V_{\max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit

9 Lebenslauf:

Persönliche Daten:

Name Sabine Koch
Anschrift: Schornstr. 38
45128 Essen
geboren am 13.08.1977 in Essen

Promotion

11/2003 – 12/2006 Promotion in der Arbeitsgruppe Immunbiologie, Institut für Molekulare Medizin an der Heinrich Heine Universität, Düsseldorf
Thema der Promotion: S-Nitrosierungs- und Thiol-abhängige Regulation der Aktivität von Matrix Metalloproteinase-1: Einfluss des UVA induzierten Zerfalls von Nitrit

Schulausbildung

1984-1997 Grundschule und Gymnasium in Essen

Hochschulausbildung

10/1997 – 3/2000 Grundstudium der Chemie an der Ruhr-Universität Bochum (Fächer: Analytische Chemie, Anorganische Chemie, Mathematik, Organische Chemie, Physik, Physikalische Chemie)

10/1997 – 9/2000 Grundstudium der Biochemie an der Ruhr-Universität Bochum (Fächer: Analytische Chemie, Biochemie, Biologie, Mathematik, Organische Chemie, Physik Physikalische Chemie)

10/2000 – 5/2003 Hauptstudium der Biochemie an der Ruhr-Universität Bochum (Biochemie, Organische Chemie, Physikalische Chemie, Humanbiologie und Molekularbiologie)
Vertiefung im Bereich molekulare Onkologie

- 6/2001 – 8/2001 Laborpraktikum am IFZ (Universitätsklinikum Essen)
Thema: Rolle von DNA Reparaturproteinen bei Behandlung mit dem Zytostatikum Cisplatin
- 11/2002 – 5/2003 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Molekulare Gastroenterologische Onkologie
Thema der Diplomarbeit: Einsatz der siRNA-Technologie zur Expressionskontrolle von DPC4-Zielgenen

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 15. Dezember 2006

(Sabine Koch)