

Untersuchungen zur Substratspezifität von Aggrekanasen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Pharmazie
und Lebensmittelchemie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Christine Hörber
aus Halden/Norwegen

Frankfurt am Main (2000)
(DF1)

vom Fachbereich Biochemie, Pharmazie
und Lebensmittelchemie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. D. Steinhilber

Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. Fasold
Prof. Dr. K.-P. Koller

Datum der Disputation: 19.12.2000

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Degenerative Gelenkerkrankungen der Aventis Pharma Deutschland GmbH, Frankfurt, durchgeführt.

Herrn Dr. Eckart Bartnik danke ich ganz herzlich für die Vergabe des interessanten Themas und die Möglichkeit, diese Dissertation in seiner Arbeitsgruppe bei Aventis anzufertigen, sowie für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und seine stete Unterstützung.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Prof. Dr. Dr. H. Fasold für die Bereitschaft, die extern angefertigte Arbeit im Fachbereich Biochemie, Pharmazie und Lebensmittelchemie anzunehmen und zu begutachten.

Ich bedanke mich sehr bei allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Labors für die große Hilfsbereitschaft und gute Kollegialität während meiner Doktorandenzeit. Mein besonderer Dank gilt dabei Bernd Eidenmüller für die Unterstützung bei technischen Problemen, Dr. Christopher Kern, Melanie Finger für die Einführung in Zellkulturtechniken, Dr. Philipp Haus-Seuffert für Anregungen zur Verfassung des Manuskripts und dessen kritische Durchsicht und Sarah Kujawski für die experimentelle Hilfe und Laborlogistik.

Speziellen Dank auch an Jürgen Doppke, Dagmar Ortlepp, Popi Karadais, die Flexidancers und an viele andere, die mir auf ihre Art und Weise während meiner Doktorandenzeit geholfen haben.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Büttner, F.H., C. Hörber, M. Liesenfeld, C.E. Hughes, B. Caterson, and E. Bartnik. 1998. Measuring aggrecanase activity with an ELISA based assay system. *Trans.Orthop.Res.Soc.* 23: 916.

Hörber, C., Büttner, F.H., Hughes, C.E., Caterson, B., and Bartnik, E. 1999. Glycosylation of the recombinant aggrecan rAgg1_{mut} affects susceptibility to aggrecanase cleavage. *Trans.Orthop.Res.Soc.* 24: 676.

Hörber, C., Büttner, F.H., Kern, C., Schmiedeknecht, G., Bartnik, E. 2000. Truncation of the amino-terminus of the recombinant aggrecan rAgg1_{mut} leads to reduced cleavage at the aggrecanase site. Efficient aggrecanase catabolism may depend on multiple substrate interactions. *Matrix Biol.* 19: 533-543.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Pathophysiologie der Osteoarthritis	1
1.2	Der hyaline Gelenkknorpel	2
1.2.1	Kollagene	4
1.2.2	Das Knorpelproteoglykan Aggrekan	5
1.2.3	Weitere Matrixproteine	7
1.3	Molekulare Veränderungen im Knorpel bei Osteoarthritis	8
1.4	Aggrekandegradation und Aggrekanase	10
1.5	Ziele der Arbeit	13
2.	Material	14
2.1	Geräteverzeichnis	14
2.2	Chemikalien	14
2.3	Enzyme	15
2.4	Antikörper	15
2.5	Puffer und Lösungen	16
2.5.1	Puffer und Lösungen für prokaryontische Zellkultur	16
2.5.2	Puffer und Lösungen für eukaryontische Zellkultur	16
2.5.3	Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten	17
2.5.4	Puffer und Lösungen für proteinchemische Arbeiten	18
2.6	Bakterienstämme	19
2.7	Zelllinien	19
2.8	Plasmide	19
2.9	Oligonukleotide	20
2.10	Synthetische Peptide	21
2.11	Natives Aggrekan aus Rinderknorpel	21
2.12	Aggrekanase-Aktivität aus Schweinechondrozyten	21
3.	Methoden	23
3.1	Prokaryontische Zellkulturtechnik	23
3.1.1	Kultivierung von <i>E.coli</i>	23
3.1.2	Kryokonservierung von <i>E.coli</i>	23
3.1.3	Kompetenzinduktion in <i>E.coli</i>	23
3.1.4	Transformation von <i>E.coli</i>	24
3.1.5	Expression rekombinanter Proteine in <i>E.coli</i>	24
3.1.6	Zellyse von <i>E.coli</i>	25

3.2	Eukaryontische Zellkulturtechnik	25
3.2.1	Kultivierung von COS-7 Zellen	25
3.2.2	Transfektion von COS-7 Zellen mit DEAE-Dextran	26
3.2.3	Kultivierung von Rattenchondrosarkomzellen	26
3.2.4	Zellzahlbestimmung	27
3.3	Isolierung und Analyse von RNA aus COS-7 Zellen	28
3.3.1	Isolierung von RNA	28
3.3.2	Analyse von RNA	28
3.4	DNA-Arbeitstechniken	29
3.4.1	cDNA-Synthese	29
3.4.2	Polymerase-Kettenreaktion	30
3.4.3	Aufreinigen von PCR-Reaktionen	31
3.4.4	Restriktionshydrolyse von DNA	32
3.4.5	Agarose-Gelelektrophorese	32
3.4.6	Elution von DNA aus Agarose-Gelen	33
3.4.7	Ligation von DNA	33
3.4.8	Minipräparation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	33
3.4.9	Maxipräparation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	34
3.4.10	DNA-Sequenzierung	35
3.5	Protein-Arbeitstechniken	36
3.5.1	Reinigung von Fusionsproteinen durch Anti-FLAG-Affinitätschromatographie	36
3.5.2	Reinigung von Fusionsproteinen durch Protein G-Affinitätschromatographie	37
3.5.3	SDS-PAGE	38
3.5.4	Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	39
3.5.5	Nachweis von Proteinen durch Western Blot	39
3.5.6	Aminosäure-Sequenzierung	40
3.6	Deglykosylierung von Aggrekan-Substraten	40
3.7	Aggrekanase-Aktivitätsassays	41
3.7.1	Aggrekanase-Induktion in Rattenchondrosarkomzellen: Assay im zellulären System	41
3.7.2	Aggrekanase-Induktion in Schweinechondrozyten: Assay mit löslicher Aktivität	42
3.7.3	Assay mit humaner rekombinanter Aggrekanase-1 (ADAMTS4)	42
3.7.4	Assay mit humaner rekombinanter Aggrekanase-2 (ADAMTS5)	43

3.8	Matrix-Metalloprotease-Aktivitätsassays	44
3.8.1	MMP-3-Aktivitätstest	44
3.8.2	MT1-MMP-Aktivitätstest	44
3.9	ELISA zum Nachweis von Aggrekan-Fragmenten	44
4.	Ergebnisse	46
4.1	Expression des Aggrekan-Fusionsproteins rAgg1 _{mut} in <i>E.coli</i>	46
4.1.1	Klonierung von rAgg1 _{mut} zur Expression in <i>E.coli</i>	47
4.1.2	Expression von rAgg1 _{mut} in <i>E.coli</i>	47
4.1.3	Reinigung von prokaryontisch exprimiertem rAgg1 _{mut}	49
4.2	Einfluß der N- und O-Glykosylierungen des rekombinanten Aggrekans rAgg1 _{mut} auf den Katabolismus durch Aggrekanase	50
4.2.1	Aggrekanase-Spaltung von prokaryontisch exprimiertem rAgg1 _{mut}	50
4.2.2	Vergleich der Aggrekanase-Spaltung von unterschiedlich glykosyliertem rAgg1 _{mut}	51
4.3	Einfluß bestimmter Sequenzbereiche der interglobulären Domäne von rAgg1 _{mut} auf den Katabolismus durch Aggrekanase	56
4.3.1	N-terminale Deletionen der IGD von rAgg1 _{mut}	58
4.3.2	C-terminale Deletionen der IGD von rAgg1 _{mut}	62
4.3.3	Mutation der MMP-Spaltstelle	66
4.4	Vergleich des Katabolismus der rAgg1 _{mut} -Deletionsmutanten durch verschiedene Aggrekanase-Aktivitäten	68
4.4.1	Aggrekanase-Aktivität von Schweinechondrozyten	68
4.4.2	Humane rekombinante ADAMTS4	70
4.4.3	Humane rekombinante ADAMTS5	73
4.4.4	Humane rekombinante MT1-MMP	74
4.5	Wirkung von Heparin auf Aggrekanase-Aktivitäten und MMPs	76
4.5.1	Wirkung von Heparin auf RCS-Aggrekanase	76
4.5.2	Wirkung von Heparin auf Schweine-Aggrekanase	77
4.5.3	Wirkung von Heparin auf ADAMTS4	78
4.5.4	Wirkung von Heparin auf ADAMTS5	81
4.5.5	Wirkung von Heparin auf MT1-MMP	81
4.5.6	Wirkung von Heparin auf MMP-3	82

5.	Diskussion	84
5.1	Einfluß der N- und O-Glykosylierungen des rekombinanten Aggrekans rAgg1 _{mut} auf den Katabolismus durch Aggrekanase	84
5.2	Einfluß der Länge des rekombinanten Aggrekans rAgg1 _{mut} auf den Katabolismus durch Aggrekanase	87
5.3	Vergleich des Katabolismus der Deletionsmutanten von rAgg1 _{mut} durch verschiedene Aggrekanase-Aktivitäten	90
5.4	Wirkung von Heparin auf Aggrekanase-Aktivitäten und MMPs	93
6.	Zusammenfassung	96
7.	Literaturverzeichnis	98
8.	Abkürzungsverzeichnis	107

1. Einleitung

1.1 Pathophysiologie der Osteoarthritis

Osteoarthritis ist eine degenerative, idiopathische Gelenkerkrankung, die durch die strukturelle Zerstörung des Gelenkknorpels gekennzeichnet ist (1). Unter den arthritischen Erkrankungen stellt die Osteoarthritis weltweit die häufigste Form dar (2). Ihre Auswirkungen führen beim Menschen zu chronischen Behinderungen durch eine Einschränkung der Beweglichkeit und damit zu einer massiven Verschlechterung der gesundheitlichen Lebensqualität. Arbeitsausfälle sind häufig die Folge und erzeugen zusammen mit dem Bedarf an Medikamenten und orthopädischen Maßnahmen hohe Kosten für das Gesundheitssystem der Industrienationen.

Der primär degenerative Charakter der Osteoarthritis grenzt die Krankheit ab von den primär entzündlichen Arthritiden wie der rheumatoiden Arthritis, die zu den Autoimmunkrankheiten zählt. Entzündungen können zwar phasenweise bei Osteoarthritis-Patienten auftreten, sind allerdings nicht systemisch, sondern fokal auf das betroffene Gelenk beschränkt (2). Arthritis stellt vielmehr eine langsam fortschreitende, dynamische Gelenkerkrankung dar, die sich durch „morphologische, biochemische, molekulare und biomechanische Änderungen der Chondrozyten und der extrazellulären Matrix (des Knorpels) manifestiert“ (Definition der American Academy of Orthopaedic Surgeons; (3)). Obwohl die Degradation des Knorpels im Mittelpunkt der Krankheit steht, tendieren neuere Studien dazu, das Gelenk als Organ und Osteoarthritis als Organversagen zu betrachten (4), da die arthrotischen Veränderungen auch die Synovialmembran und den subchondralen Knochen betreffen (1).

Das klinische Krankheitsbild der Osteoarthritis ist gekennzeichnet durch Schmerzen, die unter körperlicher Belastung zunehmen aber auch nachts oder in Ruhe auftreten können, durch morgendliche Steifheit der Gelenke, Einschränkung der Beweglichkeit und durch gelegentliches Anschwellen der Gelenke (5). Besonders betroffen sind dabei die großen, lasttragenden Gelenke der Hüfte und des Knies. Den Symptomen liegen Erscheinungen zugrunde wie die Auffaserung der Knorpels und der Verlust an Knorpelmasse, die Verschmälerung des Gelenkspalts, die Sklerotisierung des subchondralen Knochens, die Osteophytenbildung und Entzündungen der Synovialmembran.

Noch nicht aufgeklärt sind die Ursachen der Osteoarthritis, die kontrovers diskutiert werden. Eine Hypothese sieht das Versagen der Chondrozyten, Synthese und Degradation der Matrixbestandteile im Gleichgewicht zu halten, als wesentliche Ursache für einen Netto-Verlust der Knorpelmatrix an (6). Zahlreiche Studien belegen eine Hochregulierung Matrix-degradierender Proteasen unter arthrotischen Bedingungen (7-10). Eine alternative Theorie geht davon aus, daß Prozesse außerhalb des Knorpels, wie Knochen-Remodelling, Mikrofrakturen und Veränderungen des Synoviums, die eigentlichen Initiatoren der Krankheit

darstellen und Knorpel nur als Folge dieser Vorgänge zerstört wird (6). Versuche mit Meerschweinchen haben gezeigt, daß Veränderungen des subchondralen Knochens in der frühen Lebensphase tatsächlich Arthrose im Kniegelenk der Tiere auslösen (11). Auch die Reaktivierung des sekundären Ossifikationszentrums im kalzifizierten Knorpel mit der Folge einer Verdrängung und Ausdünnung der darüberliegenden Knorpelschicht wird als Ursache für Arthrose diskutiert (4). Wahrscheinlich tragen jedoch mehrere Faktoren in Kombination zur Entstehung der Krankheit bei.

Zu den Risikofaktoren für Osteoarthrose zählen das Alter (12), genetische Prädisposition (13-15), Übergewicht, Trauma, Deformationen und Fehlstellungen der Gelenke, extreme mechanische Belastung sowie weibliches Geschlecht (prämenopausaler Östrogenüberschuß) (16).

Die Möglichkeiten, Osteoarthrose zu therapieren, sind zum aktuellen Zeitpunkt unbefriedigend, da Medikamente für eine ursächliche Therapie, sogenannte „disease-modifying osteoarthritis drugs“ (DMOADs), noch nicht zur Verfügung stehen (5). So verbleiben lediglich Maßnahmen zur Linderung der Symptome, die auf eine Kontrolle des Schmerzes, verbesserte Beweglichkeit und erhöhte gesundheitliche Lebensqualität abzielen. An unterster Stelle der Pyramide des Krankheitsmanagements stehen dabei nicht-pharmakologische Ansätze wie Physiotherapie und Gewichtsreduktion (2). Bei ausbleibendem Erfolg folgt eine pharmakologische Therapie mit Analgetika oder nicht-steroidalen antiinflammatorischen Medikamenten (NSAIDs), wozu auch die jüngst entwickelten spezifischen COX-2-Inhibitoren zählen. Zusätzlich haben intraartikuläre Injektionen von Hyaluronsäure und Glucocorticoiden eine positive Wirkung gezeigt. Als letztes Mittel dienen chirurgische Eingriffe zum Ersatz des gesamten Gelenkes. Die Zahl der Hüftgelenkersatzoperationen in Deutschland betrug 1988 etwa 70000, im Jahr 1992 bereits 100800 (17), und ein weiterer Anstieg ist in einer immer älter werdenden Gesellschaft zu erwarten. Der Bedarf an Medikamenten, die die Ursachen der Osteoarthrose bekämpfen, ist offensichtlich und verlangt ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Prozesse bei Arthrose für eine gezielte Wirkstoffentwicklung.

1.2 Der hyaline Gelenkknorpel

Der Gelenkknorpel ist ein hochspezialisiertes Bindegewebe mit besonderen biomechanischen Eigenschaften, die eine reibungsarme Bewegung der Gelenke und eine Abpufferung der kompressiven Kräfte bei Druckbelastungen ermöglichen. Knorpel ist nicht innerviert, enthält keine Blutgefäße und stellt mit einem Chondrozytenanteil von weniger als 5% des Knorpelvolumens ein zellarmes Gewebe dar (18). Etwa 95% des Knorpelvolumens nimmt die ausgedehnte extrazelluläre Matrix des Gewebes ein. Der hohe Wassergehalt der Matrix von etwa 70% und die beiden wichtigsten Makromoleküle Kollagen und Proteoglykan, die 70%

bzw. 20% der Trockensubstanz ausmachen, verleihen dem Gewebe durch ihre Organisation eine hohe Druck- und Zugfestigkeit: Die Kollagene, hauptsächlich vom Typ II, bilden ein dichtes, fibrilläres Netzwerk, das mit Proteoglykanen ausgefüllt ist. Die polyanionischen Glykosaminoglykan-Seitenketten der Proteoglykane erzeugen einen hohen osmotischen Schwelldruck, dem die Spannung der rigiden Kollagenfibrillen entgegensteht (19). Diese Struktur verleiht dem Knorpel seine stoßdämpfenden, elastischen Eigenschaften, da unter Druck Wasser ausströmt und sich der Knorpel verformt, bei Entlastung Wasser zurückströmt und die Form des Knorpels wiederhergestellt wird.

Die Struktur des adulten Gelenkknorpels ist anisotrop und kann in vier verschiedene Zonen gegliedert werden, wobei die Grenzen fließend sind (20). In der Tangentialzone haben die Chondrozyten eine scheibenförmige Gestalt und sind parallel zur Oberfläche ausgerichtet. Eine sphärische Form zeigen die Chondrozyten der Übergangszone, ellipsoide Formen sind in der Radiärzone zu finden. Dort ordnen sich die Zellen häufig in vertikalen, säulenförmigen Gruppen an, die als Chondrons bezeichnet werden. Die unterste Zone, die an den subchondralen Knochen angrenzt, besteht aus kalzifiziertem Knorpel und enthält nur noch vereinzelt Chondrozyten. Abb. 1 zeigt einen Querschnitt durch einen Kaninchenknorpel.

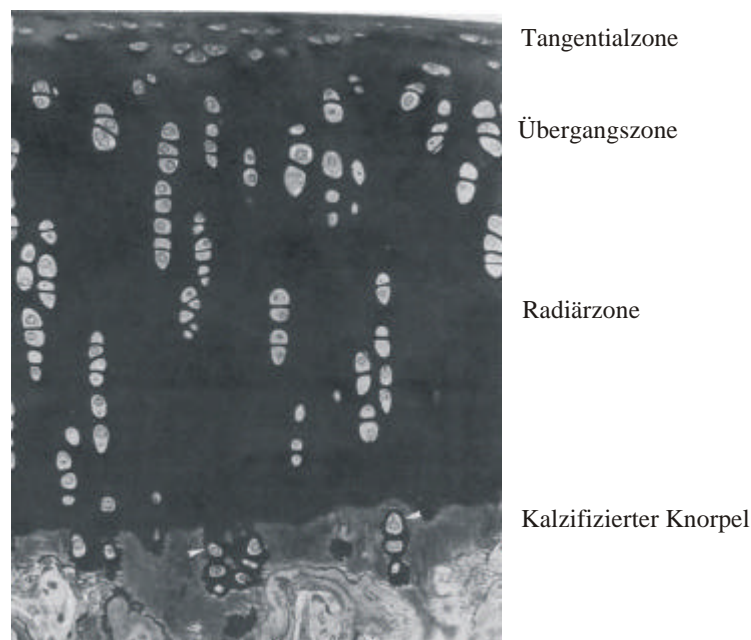


Abb.1: Lichtmikroskopische Aufnahme eines 1 µm-dicken Schnittes eines adulten Kaninchen-Gelenkknorpels nach Toluidin-Blau-Färbung. 300fache Vergrößerung. Nach Hunziker (21).

Chondrozyten stellen den einzigen Zelltyp des Knorpels dar und proliferieren nach der Adoleszenz normalerweise nicht mehr. Sie synthetisieren praktisch die gesamte extrazelluläre Matrix des Knorpels, die kaum exogene Bestandteile enthält, und sind auch für deren Zusammensetzung und Regulation verantwortlich (22). Da Chondrozyten aufgrund ihrer

geringen Dichte im Knorpel keine Zell-Zell-Interaktionen eingehen, übt die extrazelluläre Matrix eine wichtige Funktion bei der Zellkommunikation, sowie bei der Versorgung mit Nährstoffen und der Beseitigung von Stoffwechselprodukten aus (20). Die Zusammensetzung der extrazellulären Knorpelmatrix ist in Abb. 2 schematisch dargestellt und wird im folgenden vorgestellt.

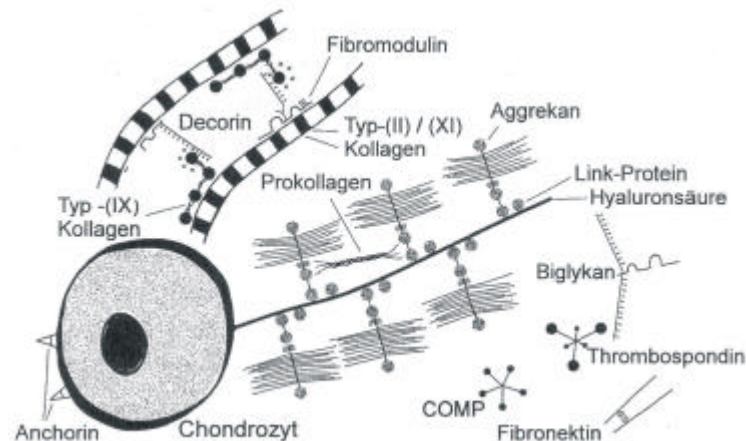


Abb. 2: Schematische Darstellung eines Chondrozyten und der wichtigsten Bestandteile der extrazellulären Knorpelmatrix. Nach Heingard et al. (22).

1.2.1 Kollagene

Mit einem Anteil von etwa 70% an der Trockensubstanz stellen die Kollagene einen Hauptbestandteil der extrazellulären Knorpelmatrix dar. Sie formen ein wasserunlösliches, dreidimensionales Netzwerk von kreuzverbundenen Kollagenfibrillen, in welches löslichere Matrixbestandteile wie Proteoglykane und Glykoproteine eingelagert sind. Etwa 90% des Knorpelkollagens werden durch Typ-II-Kollagen repräsentiert, die übrigen 10% bilden hauptsächlich Typ-IX- und Typ-XI-Kollagen. Alle fibrillären Kollagene zeichnen sich durch eine tripelhelikale Konformation und das Vorkommen der ungewöhnlichen Aminosäuren Hydroxyprolin und Hydroxylysin aus. Die Tripelhelix von Typ-II-Kollagen besteht dabei aus drei identischen α_1 -Polypeptidketten und mißt 300 nm in der Länge und 20-50 nm im Durchmesser (23). Nach Sekretion und extrazellulärer Prozessierung bilden mehrere Kollagenhelices Fibrillen aus, die in der tiefen Zone des Knorpels arkadenförmig organisiert sind, in der Tangentialzone dagegen parallel zur Knorpeloberfläche ausgerichtet sind. Innerhalb dieser Fibrillen bildet Typ-II-Kollagen intermolekulare, kovalente

Quervernetzungen über Hydroxylysin aus, woraus Hydroxylysyl-Pyridinoline entstehen (24), die die Zugfestigkeit des Kollagens weiter erhöhen.

Typ-IX-Kollagen bildet eine wesentlich kürzere Tripelhelix aus drei genetisch distinkten Polypeptidketten aus und wird zusätzlich mit Chondroitinsulfatseitenketten substituiert. Dieser Kollagentyp ist vorwiegend auf der Oberfläche der Typ-II-Fibrillen lokalisiert. Die Fähigkeit, mit Typ-II-Kollagen sowohl intra- als auch interfibrillär kovalente Quervernetzungen auszubilden, verleiht Typ-IX-Kollagen die Bezeichnung als Brückenmolekül. Es trägt maßgeblich zur mechanischen Stabilität und Versteifung des Kollagennetzwerks bei und schützt zusätzlich vor enzymatischen Angriffen (25).

Auch Typ-XI-Kollagen besteht aus drei verschiedenen α -Helices und wird im Inneren der Typ-II-Fibrillen gefunden. Vermutlich spielt dieser Kollagentyp bei der Gewebeorganisation eine Rolle, in dem es das laterale Fibrillenwachstum und den Fibrillendurchmesser kontrolliert (26).

1.2.2 Das Knorpelproteoglykan Aggrekan

Proteoglykane sind im Körper ubiquitär und am stärksten in der extrazellulären Matrix der Bindegewebe vertreten. Charakteristisch ist die ausgeprägte Substitution des Proteinrückgrats mit Glykosaminoglykanen (GAG), die bis zu 95% des Molekulargewichts ausmachen können. GAGs bestehen aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten mit Aminozuckerderivaten, die Carboxylat- und Schwefelgruppen enthalten. Durch die stark negative Nettoladung binden GAGs Wasser und Kationen und beeinflussen so die Eigenschaften extrazellulärer Matrix.

Das Hauptproteoglykan des Knorpels ist Aggrekan, das etwa 90% des gesamten Proteoglykans des Gewebes ausmacht (20). Es verdient seine Bezeichnung der Fähigkeit, große Aggregate zu bilden, indem durchschnittlich 140 Aggrekanmoleküle an ein lineares, extrazelluläres Hyaluronsäuremolekül binden. Diese Bindung wird durch ein kleines globuläres Protein, das „Link Protein“, über nicht-kovalente Wechselwirkungen stabilisiert. Hyaluronsäure wiederum ist über den Zelloberflächenrezeptor CD44 an die Chondrozytenoberfläche gebunden (27). Die Assoziation des Aggrekans mit Hyaluronsäure ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Matrixfunktion, da ohne diese Immobilisierung Aggrekanmoleküle aus der Matrix ausgeschwemmt würden, was zu einem Verlust der viskoelastischen Eigenschaften des Knorpels führen würde. Die Bindung an Hyaluronsäure, und nicht die Synthese der Aggrekanmoleküle selbst, ist der geschwindigkeitslimitierende Schritt bei der Aggregation (28), und dieser Prozeß wird in alterndem Knorpel noch langsamer (29). Die Halbwertszeit von immobilisiertem Aggrekan im Knorpel beträgt etwa 3.2 Jahre (28).

Aggrecan gehört zusammen mit den Proteoglykanen Versikan, Neurokan und Brevikan zur Aggrecan-Genfamilie, da sie strukturelle Motive und die genomische Organisation teilen (30). Das humane Aggrecan-Gen besteht aus 19 Exons, wobei Exon 1 nicht-kodierend ist (31). Das theoretische Molekulargewicht des Proteins mit einer Länge von 2454 Aminosäuren liegt bei 254 kDa, durch die extensive GAG-Substitution kann jedoch ein Molekulargewicht von bis zu 2200 kDa resultieren (32). Die Exon-Organisation des Aggrecans korreliert stark mit seiner Domänen-Organisation, welche in Abb. 3 dargestellt ist.

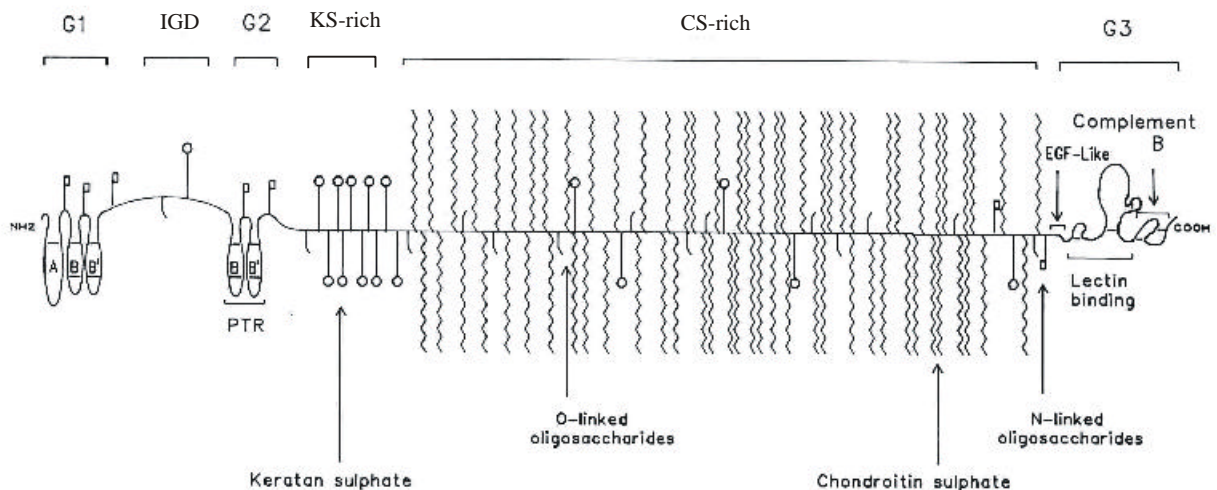


Abb. 3: Schematische Darstellung des Knorpelproteoglykans Aggrecan. G1, G2, G3: Globuläre Domänen 1-3. IGD: Interglobuläre Domäne. KS-reiche Domäne: Anheftungsregion für Keratansulfat. CS-reiche Domäne: Anheftungsregion für Chondroitinsulfat. Nach Hardingham (19).

Aggrecan verfügt über drei globuläre Domänen (G1-G3), die durch zwei interglobuläre Domänen getrennt werden. Die G1-Domäne unterteilt sich in drei Subdomänen, die auch im „Link Protein“ wiederzufinden sind und die für die spezifische Interaktion mit Hyaluronsäure verantwortlich sind. Die Funktion der G2-Domäne ist trotz beträchtlicher Homologie zur G1-Domäne derzeit nicht bekannt. Die G3-Domäne am C-Terminus des Proteins könnte außer für die Translokation und Sekretion von Aggrecan auch für eine Verankerung des Proteins in der extrazellulären Matrix über Interaktionen mit dem Lectin-Modul wichtig sein (33). Allerdings tragen nur etwa 55% der Aggrecanmoleküle in unreifem Knorpel die G3-Domäne, in adultem Knorpel ist der Anteil sogar auf 35% reduziert (34).

Die Keratansulfat(KS)- und Chondroitinsulfat(CS)-reichen Domänen stellen die wesentlichen funktionellen Segmente des Aggrecans dar, da die stark negativ geladenen GAGs für den osmotischen Schwelldruck im Knorpel verantwortlich sind. Etwa 15-25 KS-Ketten sind meist O-glykosidisch an Serin in der KS-reichen Domäne geknüpft, und über 100 CS-Ketten sind mit Serin-Resten der CS-reichen Domäne verknüpft. Dabei kann das Ausmaß der CS-

Substitution im menschlichen Aggrecan stark variieren, da ein Polymorphismus in Form einer variablen Nummer von Tandem-Wiederholungen in der CS-reichen Domäne existiert (35). Zusätzlich ist die CS-reiche Domäne Ziel proteolytischer Angriffe, was zu einer Verkürzung oder gar zum Verlust der CS-reichen Domäne führen kann (36) und in altem Knorpel noch ausgeprägter stattfindet als in jungem (37). Weitere altersabhängige Strukturveränderungen der CS-Ketten wurden bezüglich ihrer Länge und ihrer Sulfatisierungsmuster beobachtet (38). Aggrecane stellen also eine inhomogene Proteinpopulation dar, die in ihrer Wasserbindekapazität und Interaktion mit anderen Matrixbestandteilen stark variieren können. Die interglobuläre Domäne (IGD) zwischen G1 und G2 hat eine stäbchenförmige Struktur und ist nicht GAG-substituiert, worin vermutlich die Begründung für eine besondere Empfindlichkeit dieser Domäne gegenüber proteolytischer Degradation liegt. Verschiedene Matrix-Metalloproteasen (MMPs), darunter MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -13, -14, -19, -20 (39-41) können Aggrecan *in vitro* zwischen N³⁴¹ und F³⁴² proteolysieren, weshalb diese Stelle als allgemeine MMP-Spaltstelle bezeichnet wird. Die Spaltprodukte dieser Proteolyse wurden auch in Synovialflüssigkeiten von Osteoarthritis-Patienten detektiert (10,42,43). Die prädominante Spaltung der IGD unter pathologischen Bedingungen findet allerdings weiter C-terminal zwischen E³⁷³ und A³⁷⁴ statt (44,45). Die für diese Spaltung verantwortliche Protease wird als Aggrecanase bezeichnet, die Spaltstelle entsprechend als Aggrecanase-Schnittstelle. Die exzessive proteolytische Degradation der IGD durch Aggrecanase unter arthrotischen Bedingungen hat dramatische Folgen, da die KS- und CS-reichen Domänen, die für die viskoelastischen Eigenschaften des Knorpels verantwortlich sind, durch die Spaltung freigesetzt werden, aus der Knorpelmatrix diffundieren und die Funktionalität des Knorpels nicht mehr aufrechterhalten werden kann. Eine spezifische Inhibition des Enzyms scheint für die Behandlung von Osteoarthritis deshalb von therapeutischem Nutzen.

1.2.3 Weitere Matrixproteine

Außer Aggrecan kommen im Knorpel weitere kleine Proteoglykane Leucin-reicher Wiederholungen vor, wovon Decorin und Biglykan mit Dermatan-sulfat und Fibromodulin mit Keratan-sulfat substituiert sind. Sie verkörpern nur einen Bruchteil der GAGs im Knorpel und dienen anderen wichtigen Funktionen wie der Zusammensetzung und Erhaltung der Matrix (20). Decorin und Fibromodulin sind auf der Oberfläche der Kollagenfibrillen lokalisiert, stellen eine Assoziation der Fibrillen untereinander her und stabilisieren damit die Fibrilleninteraktion. Ein negativer Einfluß von Decorin auf das Fibrillenwachstum und eine Kontrolle des interfibrillären Abstandes durch Fibromodulin werden ebenfalls diskutiert. Weiterhin könnte die Assoziation mit der Fibrilloberfläche vor proteolytischen Angriffen

auf Kollagen schützen (46). Auch eine Funktion als Speicher für TGF- β aufgrund der Bindung der drei Proteoglykane an den Wachstumsfaktor wurde vorgeschlagen (47).

Fibronektin in einer von Plasma-Fibronektin distinkten Variante ist ein weiterer Bestandteil des Knorpels. Seine Rolle liegt in der Strukturorganisation der Matrix, wofür seine Affinität zu den GAGs der Proteoglykane, zu Kollagenen und zu Integrinrezeptoren der Chondrozyten sprechen (48).

Das „Cartilage Oligomeric Protein“ COMP, das pentamere, fünfte Mitglied der Thrombospondin (TSP)-Genfamilie, kommt in den interterritorialen Zonen der Knorpelmatrix vor. Seine genaue Funktion ist unbekannt, jedoch weisen skelettale Fehlbildungen wie Pseudoachondroplasie und Multiple Epiphysale Dysplasie, die durch Mutationen in COMP verursacht werden, auf seine Wichtigkeit hin (49). Auch TSP-1 ist im Knorpel vorhanden (50) und vermittelt dort Signale zwischen Chondrozyten und der extrazellulären Matrix. Die Rolle von TSP-1 als Hauptaktivator von TGF- β läßt eine Funktion als Speicher für diesen Wachstumsfaktor im Knorpel möglich erscheinen (51), zumal relativ hohe Mengen (0.1-1 μ M) TSP-1 in extrazellulärer Knorpelmatrix gefunden wurden (52).

Neben den beschriebenen strukturellen Makromolekülen sind viele regulatorische, Knorpel-spezifische und unspezifische Moleküle in der Knorpelmatrix zu finden, wie Wachstumsfaktoren, Interleukine, anabole und katabole Enzyme und deren natürliche Inhibitoren.

1.3 Molekulare Veränderungen im Knorpel bei Osteoarthritis

Unter normalen physiologischen Bedingungen sorgen Chondrozyten für ein dynamisches, metabolisches Fließgleichgewicht, bei dem sich Anabolismus und Katabolismus im Knorpel die Waage halten. Das Ausmaß der anabolen und katabolen Prozesse steht unter der engen Kontrolle verschiedener Zytokine. Dabei wirken die Interleukine IL-1 α , IL-1 β und TNF α , die mit inflammatorischen Reaktionen assoziiert sind, im allgemeinen inhibierend auf die Matrix-Synthese und stimulierend auf die Matrix-Degradation. Wachstumsfaktoren wie TGF- β , IGF-1 und bFGF dagegen stimulieren die Matrix-Synthese und inhibieren die Matrix-Degradation (20).

Bei Osteoarthritis ist das Gleichgewicht zwischen auf- und abbauenden Prozessen zugunsten der Degradation verschoben, woraus ein Netto-Verlust an Matrixbestandteilen und letztendlich ein Verlust der Funktion des Knorpels resultiert. Dieser Netto-Verlust ist sowohl auf eine erhöhte katabolische Aktivität als auch auf eine mangelnde Synthese der Matrixproteine zurückzuführen. Eine erhöhte Expression der Matrix-degradierenden MMPs (7-10,43) und Aggrecanase (44,45) in arthrotischem Knorpel ist bewiesen. Eine mangelnde Matrix-Synthese jedoch kann nicht in allen Stadien der Krankheit bestätigt werden. So sind Chondrozyten in der

frühen Phase von Osteoarthritis anabolisch hyperaktiv. Aigner et al. konnten immunhistochemisch eine verstärkte Expression von Typ-II-Kollagen in früh-arthrotischem Knorpel nachweisen (53). Allerdings zeigte eine weitere Studie der Gruppe, daß eine erhöhte Matrixsynthese auf die tieferen Zonen des Knorpels beschränkt und in den oberen, stärker geschädigten Regionen abwesend ist (54). Daraus entwickelten Aigner und Dudhia (55) folgende Hypothese einer dreistufigen Evolution der zellulären Ereignisse während der Osteoarthritis:

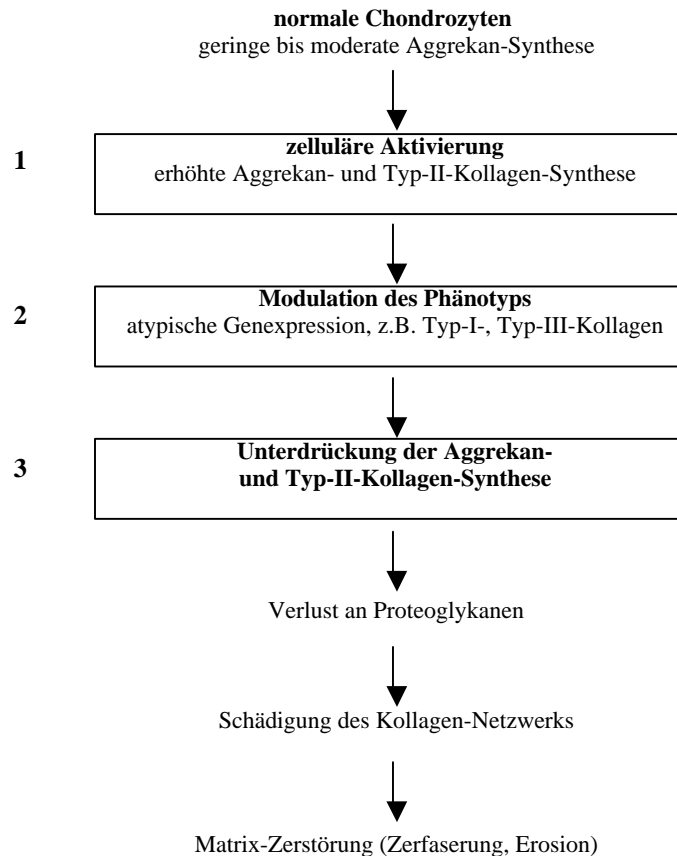


Abb.4: 3-Stufen-Hypothese für die zellulären Ereignisse, die zu Osteoarthritis führen können. Nach Aigner und Dudhia (55).

Dieser dynamische Prozeß beginnt wahrscheinlich an der Oberfläche des Knorpels und schreitet zu den tieferen Zonen fort. Histologische Studien bestätigen einen massiven Proteoglykanverlust an der Knorpeloberfläche in der frühen Krankheit. Die Faktoren, die diesen Prozeß initiieren, sind noch unbekannt, können aber mechanischer oder inflammatorischer Natur sein.

Neben veränderten Expressionsmustern für Aggrecan und Kollagen zeigen auch weitere Matrixbestandteile Veränderungen. So ist die Transkription und Expression von Biglykan, Decorin und Fibromodulin in osteoarthrotischem Knorpelgewebe gegenüber gesundem signifikant erhöht (56). Eine erhöhte Expression und daraus resultierende Akkumulation in der Matrix wurde auch für Fibronectin beobachtet (48), was als Reparaturversuch des Knorpels

gedeutet werden kann. Weiterhin werden bei Osteoarthrose-Patienten erhöhte COMP-Spiegel im Serum und in der Synovialflüssigkeit gemessen, was für eine erhöhte Degradation des Matrixproteins spricht (47). Die Synthese von Thrombospondin-1 ist in stark geschädigtem Knorpel deutlich verringert und geht mit einem Verlust des Proteins aus der Matrix einher (51).

Eine weitere Veränderung unter arthrotischen Bedingungen im Knorpel betrifft den Zelltod der Chondrozyten: In geschädigtem Knorpel ist die Anzahl apoptotischer Chondrozyten deutlich erhöht (57), und eine positive Korrelation zwischen dem Schweregrad der Matrixdegradation und der Zahl der apoptotischen Chondrozyten kann hergestellt werden (58). Ob und wie eine gesteigerte Apoptoserate zum Pathomechanismus der Osteoarthrose beitragen könnte, ist derzeit nicht bekannt.

Es ist allgemein akzeptiert, daß bei der degenerativen Gelenkerkrankung Osteoarthrose das Gleichgewicht zwischen anabolen und katabolen Prozessen zugunsten des Katabolismus verschoben ist, auch wenn die Ursachen für dieses Ungleichgewicht noch ungeklärt sind. Die Inhibition Matrix-degradierender Enzyme, die während der Krankheit verstärkt aktiv sind, scheint demnach ein erfolgsversprechendes therapeutisches Mittel. Aggrekanase zählt zu den wichtigsten katabolen Enzymen bei der Zerstörung der Matrixintegrität im Knorpel und soll im folgenden beschrieben werden.

1.4 Aggrekandegradation und Aggrekanase

Die Spaltung des Aggrekanproteins zwischen E³⁷³ und A³⁷⁴ in der interglobulären Domäne, bewirkt durch Aggrekanase, ist das prominenteste proteolytische Ereignis der Aggrekandegradation bei Osteoarthrose, wie die Analyse der Aggrekanfragmente in Synovialflüssigkeiten von Arthrose-Patienten (44,45) und in *in vitro* Versuchen zeigt (59-61). Erst in späten Phasen der Krankheit können auch MMPs an der Proteolyse der IGD beteiligt sein (62), was zeitlich und räumlich mit der Zerstörung von Typ-II-Kollagen einhergeht (63). Therapeutisch sinnvoll ist eine frühe Inhibition der Aggrekandegradation, da der Verlust des funktional wichtigen, GAG-haltigen C-Terminus des Proteins zu einer höheren Angreifbarkeit des Kollagengerüsts und zum Verlust der Knorpelfunktion führt. Da Aggrekanase für die primäre Proteolyse von Aggrekan verantwortlich ist, stellt das Enzym ein wichtiges therapeutisches Zielmolekül dar.

Die molekulare Identität der Aggrekanase war viele Jahre nicht bekannt. Die Vermutung, Aggrekanase könnte ein noch unbekanntes Mitglied der MMP-Familie sein, wurde nicht bestätigt, da sämtliche getesteten MMPs *in vitro* nicht in der Lage sind, an der Aggrekanase-Schnittstelle zu spalten und stattdessen an der MMP-Schnittstelle N³⁴¹-F³⁴² aktiv sind. Ausnahmen sind MMP-8 und MMP-14 (MT1-MMP), für die die Fähigkeit, unter bestimmten

Bedingungen an der Aggrecanase-Schnittstelle zu spalten, demonstriert wurde (40,64). Jedoch zeigt MMP-8 eine klare Präferenz für die MMP-Schnittstelle (65), und auch MT1-MMP spaltet dort und an zusätzlichen Stellen in der IGD (40). *In vitro* kann Aggrecanase in verschiedenen Zellsystemen durch IL-1 α , IL-1 β , TNF α oder Retinsäure induziert werden (59-61,66). Diese Studien haben bewiesen, daß Aggrecanase spezifisch an der Aggrecanase-Schnittstelle und an keiner weiteren Stelle der IGD spaltet, weshalb mit hoher Wahrscheinlichkeit weder MMP-8 noch MT1-MMP die krankheitsrelevante Aggrecanase repräsentieren.

Erst kürzlich, während der Anfertigung dieser Arbeit, gelang die Identifikation zweier humaner Aggrecanasen, Aggrecanase-1 und -2 (67,68). Aus dem Kulturmedium IL-1-stimulierter boviner Nasenknorpelxplantate konnten die Enzyme gereinigt werden. Peptidsequenz-Homologiesuche und cDNA-Klonierung führten zu den humanen orthologen Enzymen, die sich als Mitglieder der Disintegrin-Metalloproteasen mit Thrombospondin-Motiven, der sogenannten ADAMTS-Familie erwiesen. Diese Proteasen sind eine Subfamilie der 1995 erstmals beschriebenen ADAM-Familie (A Disintegrin and Metalloprotease; (69)), die wiederum neben den Astacinen, MMPs, Reprolysinen und Serralysinen zur Superfamilie der Metzincine, also der Zink-abhängigen Metalloproteasen gehört (70). ADAMTS-Mitglieder zeichnen sich durch eine gemeinsame Domänen-Organisation aus, die eine Signal-, Pro-, Metalloprotease-, Disintegrin-, interne TSP-Typ 1- und Spacer-Domäne und eine variable Anzahl an C-terminalen TSP-Typ 1-Submotiven enthält (71). Die Domänenstruktur der Aggrecanase-1 und -2, die mit ADAMTS4 und ADAMTS5 annotiert wurden, ist zusammen mit ADAMTS1, dem ersten annotierten murinen Familienmitglied, in Abb. 5 dargestellt.

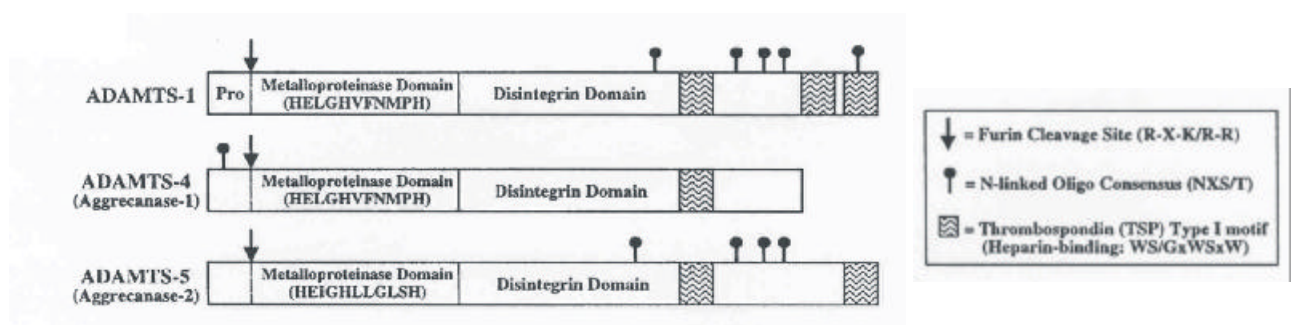


Abb.5: Domänenstruktur von ADAMTS1, ADAMTS4 und ADAMTS5. Alle drei ADAMTS-Mitglieder besitzen in der Metalloprotease-Domäne ein Zink-bindendes aktives Zentrum mit der Konsensus-Sequenz HExxHxxxxxH, aber variieren in der Anzahl der TSP-Typ 1-Motive. Nach Caterson et al. (72).

Alle drei Mitglieder verfügen über eine Furin-Spaltstelle zwischen der Pro- und Metalloprotease-Domäne, so daß eine Aktivierung der als Zymogene exprimierten Enzyme mittels Furin möglich ist. Das aktive Zentrum in der katalytischen Metalloprotease-Domäne besitzt die Konsensus-Sequenz HExxHxxxxxH, in der die drei Histidin-Reste das katalytische Zn^{2+} -Ion binden, und ähnelt damit dem aktiven Zentrum der MMPs und ADAMs. Ein konservierter Cystein-Rest in der Prodomäne der drei ADAMTS-Mitglieder komplexiert vermutlich als vierter Ligand das Zn^{2+} -Ion im inaktiven Proprotein und fungiert als sogenannter „Cystein-Switch“. Erst die Unterbrechung der Cystein- Zn^{2+} -Brücke erlaubt die Abspaltung der Prodomäne und damit die Aktivierung des Enzyms. Die Funktion der Disintegrin-Domäne ist unklar, könnte aber in der Interaktion mit Integrinen auf der Chondrozytenoberfläche liegen. Eine Transmembran-Domäne wie bei ADAM-Proteasen existiert nicht, weshalb ADAMTS lösliche Proteasen sind, die, wie für ADAMTS1 gezeigt (73), vermutlich über die TSP-Typ 1-Motive enge Interaktionen mit der extrazellulären Matrix eingehen.

Humane rekombinante ADAMTS4 und ADAMTS5 spalten die IGD von Aggrecan wie erwartet an der Aggrecanase-, nicht aber an der MMP-Schnittstelle. Allerdings zeigen sie zusätzliche Spaltungsaktivitäten in der CS-reichen Domäne von Aggrecan an den Stellen E¹⁵⁴⁵-G¹⁵⁴⁶, E¹⁷¹⁴-G¹⁷¹⁵, E¹⁸¹⁹-A¹⁸²⁰ und E¹⁹¹⁹-L¹⁹²⁰. Diese Peptidbindungen wurden bereits früher als putative Aggrecanase-Schnittstellen erkannt (74,75), da sie insofern Sequenzähnlichkeit zur IGD-Schnittstelle zeigen, als sie ebenfalls Glutamat in der Position P1 und einen unpolaren oder ungeladenen Rest in der Position P1' besitzen. Interessanterweise wurde kürzlich gezeigt, daß auch ADAMTS1 in der Lage ist, die vierte dieser Peptidbindungen in der CS-reichen Aggrecandomäne zu spalten (76). Ob ADAMTS1 auch die anderen Aggrecanase-Schnittstellen proteolytisch spaltet, bleibt zu untersuchen. Eine hohe Sequenzhomologie zu ADAMTS4 und ADAMTS5 (67) deutet jedoch auf die Möglichkeit hin, daß es sich bei ADAMTS1 um eine weitere Aggrecanase-Aktivität handeln könnte. Expressionsstudien der drei ADAMTS-Mitglieder sind noch unvollständig, weisen aber auf ein breites Expressionsmuster und damit auf weitere Rollen zusätzlich zum Knorpel-Remodelling hin (67). Da Daten aus vergleichbarem gesunden und arthrotischen Gewebe nicht vorliegen, ist derzeit ein Rückschluß darauf, welche der Aggrecanasen für die Pathophysiologie der Osteoarthritis relevant ist, nicht möglich.

Aggrecanase kann aufgrund der Spezifität für einen Glutamat-Rest in der P1-Position des Substrats als Glutamyl-Endopeptidase charakterisiert werden. Dennoch gibt es abgesehen von der Forderung nach einem unpolaren oder ungeladenen Rest an Position P1' keine weiteren auffälligen Sequenzspezifitäten. Vor diesem Hintergrund ist es verwunderlich, daß nicht jedes Protein, das diesen Anforderungen genügt, von Aggrecanase katabolisiert wird. So berichten Sztrolovics et al. (46) von Proteoglykanen Leucin-reicher Wiederholungen, die resistent

gegenüber Proteolyse durch Aggrekanase sind, obwohl sie mehrere potentielle Spaltstellen enthalten. Auch Versuche von Sugimoto et al. (66) und eigene Versuche (unveröffentlicht), die Aggrekanase-Spaltung von Peptidsubstraten zu erreichen, die der Sequenz der Aggrekanase-Schnittstelle entsprachen, schlugen fehl. Im Gegensatz dazu sind viele MMPs in der Lage, kurze Peptidsubstrate, die der Spaltungssequenz der natürlichen Substrate entsprechen, intensiv zu spalten (77-79). Diese Beobachtungen führen zu der Hypothese, Aggrekanase benötige für eine effiziente Katabolisierung zusätzliche strukturelle Elemente im Substrat außer der bloßen Spaltungssequenz. Diese Substratbereiche in einem rekombinanten Aggrekansubstrat zu definieren, ist ein Bestandteil dieser Arbeit.

1.5 Ziele der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Enzymaktivität Aggrekanase weiter zu charakterisieren. Der Fokus lag auf der Untersuchung der Substratspezifität von Aggrekanase, da bisher außer der Forderung nach einem Glutamylrest in der P1-Position und einem unpolaren oder ungeladenen Rest in der P1'-Position kein Anforderungsprofil an ein funktionales Aggrekanase-Substrat beschrieben wurde. Die Substratspezifität sollte erstens bezüglich des Einflusses der Substrat-Glykosylierung auf den Katabolismus durch Aggrekanase beschrieben werden. Zweitens sollte die minimal erforderliche Substratgröße anhand des rekombinanten Substrats rAgg1_{mut} definiert werden und in verschiedenen Aggrekanase-Systemen verglichen werden. Die Rolle des Mukopolysaccharids Heparin als potentieller Inhibitor von Aggrekanase sollte als weiterer Aspekt der Charakterisierung von Aggrekanase untersucht werden.

2. Material

2.1 Geräteverzeichnis

Analysenwaage	Mettler Toledo AT261
Brutschränke	Heraeus
Elektroblot-Apparatur	Hofer Scientific Semi-Phor
Elektrophorese-Apparatur	Hofer Scientific SE280, HE33 und HE99
ELISA-Reader	SLT Spectra
Foto-Apparatur	Polaroid MP4
Lichtmikroskop	Olympus CK2
Netzgeräte	Consort E442
PCR-Maschine	Perkin Elmer 9600
Peristaltikpumpe	Abimed Minipuls 3
pH-Meter	Knick Multi Calimatic 763
Photometer	Beckman DU650
Pipetten	Gilson Pipetman P2, 10, 20, 100, 200, 1000
Schüttelinkubator	New Brunswick Sciences Innova 4300
Sequenziermaschine	Perkin Elmer ABI Prism 310
Sonifikator	Bandelin Sonopuls HD70
SpeedVac	Savant SC110
Sterilbänke	Steag Laminar Flow
Thermomixer	Eppendorf Thermomixer Compact
UV-Illuminator	Spectroline TVR-312A
Waage	Mettler PM4800
Zentrifugen	Fischer Scientific MicroV
	Heraeus Biofuge Pico
	Sorvall RT 6000D (Rotor H1000B)
	Sorvall RC3C Plus (Rotor H6000A)
	Sorvall RC5B (Rotoren SS-34 und HB4)

2.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien und Biochemikalien wurden in p.A. Qualität von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Taufkirchen) bezogen,

wenn nicht anders angegeben. Es wurde vollentsalztes Wasser, über eine Milli-Q-Anlage (Millipore) gereinigt, zum Ansetzen der Lösungen und Nährmedien verwendet.

2.3 Enzyme

AmpliTaq DNA-Polymerase	Perkin Elmer
AMV-Reverse-Transkriptase	Boehringer Mannheim
Chondroitinase ABC	Sigma
DNase I	Boehringer Mannheim
O-Glykosidase	Boehringer Mannheim
N-Glykosidase F	Boehringer Mannheim
Keratanase I	Sigma
Keratanase II	Seikagaku
MMP-3, katalytische Domäne (cdMMP-3)	Aventis, Frankfurt (80)
MT1-MMP, katalytische Domäne (cdMT1-MMP)	Universität Bielefeld (81)
Neuraminidase	Boehringer Mannheim
Pfu DNA-Polymerase	Promega
Restriktionsendonukleasen	Boehringer Mannheim
T4-DNA-Ligase	Boehringer Mannheim

2.4 Antikörper

Anti-FLAG M1	Monoklonaler Mausantikörper (IgG2b) gegen das FLAG-Oktapeptid DYKDDDDK. Das FLAG-Peptid wird erkannt, wenn es sich am freien N-Terminus eines Fusionsproteins befindet. Calcium-abhängig. (Sigma)
Anti-FLAG M2	Monoklonaler Mausantikörper (IgG1) gegen das FLAG-Oktapeptid DYKDDDDK. Das FLAG-Peptid wird unabhängig von der Position innerhalb eines Fusionsproteins erkannt. Nicht Calcium-abhängig. (Sigma)
BC-3	Monoklonaler Mausantikörper (IgG1) gegen das aminoterminal Neopepitop A ³⁷⁴ RGSVI... von humanem Aggrekan nach Aggrekanase-Spaltung zwischen E ³⁷³ -A ³⁷⁴ . (Prof. Dr. Bruce Caterson, Universität Cardiff, Wales, UK; (82))

BC-14	Monoklonaler Mausantikörper (IgG1) gegen das aminoterminalen Neoepitop F ³⁴² FGVGG... von humanem Aggrekan nach Spaltung an der allgemeinen MMP-Schnittstelle zwischen N ³⁴¹ -F ³⁴² . (Prof. Dr. Bruce Caterson, Universität Cardiff, Wales, UK; (83)
	Esel-anti-Schaf/Ziege-IgG, Fab-Fragmente, konjugiert mit alkalischer Phosphatase (Boehringer Mannheim)
	Schaf-anti-Maus-IgG, Fab-Fragmente, konjugiert mit alkalischer Phosphatase (Boehringer Mannheim)
	Ziege-anti-Human-IgG (Cappel, Durham, NC, USA)
	Ziege-anti-Human-IgG, konjugiert mit Peroxidase (Dianova)
	Ziege-anti-Maus-IgG (Dianova)

2.5 Puffer und Lösungen

2.5.1 Puffer und Lösungen für prokaryontische Zellkultur

Ampicillin	100 mg/ml Na-Ampicillin in H ₂ O
IPTG	100 mM in H ₂ O, sterilfiltriert
LB-Medium	5 g/l Bacto Yeast Extract (Difco, Detroit, MI, USA)
	10 g/l Bacto Tryptone (Difco, Detroit, MI, USA)
	10 g/l NaCl
	15 g/l Bacto Agar (nur für Festmedien; Difco, Detroit, MI, USA)
	pH 7.4
Lysis-Puffer	1 mM EDTA in PBS, pH 7.2
Lysozym	10 mg/ml in H ₂ O
Tetracyclin	10 mg/ml in 70% Ethanol
YT-Medium	5 g/l Bacto Yeast Extract (Difco, Detroit, MI, USA)
	20 g/l Bacto Tryptone (Difco, Detroit, MI, USA)
	5 g/l NaCl

2.5.2 Puffer und Lösungen für eukaryontische Zellkultur

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium; 4500 mg/l Glukose, 580 mg/l L-Glutamin (Life Technologies, Paisley, Scotland)
FCS	Fötales Kälberserum (Sigma)

Gentamicin	10 mg/ml (Life Technologies, Paisley, Scotland)
L-Glutamin	200 mM in H ₂ O
HEPES	1 M (Life Technologies, Paisley, Scotland)
NU-Serum	Proteinarmes Supplement (Serva)
PBS	0.2 g/l KCl 0.2 g/l KH ₂ PO ₄ 8 g/l NaCl 1.15 g/l Na ₂ HPO ₄ (Life Technologies, Paisley, Scotland)
Poly-L-Lysin	40 µg/ml in H ₂ O
Pyruvat	100 mM Na-Pyruvat (Life Technologies, Paisley, Scotland)
Retinsäure	5 mM in 96% Ethanol
Trypsin-EDTA	0.5 g/l Trypsin, 0.2 g/l EDTA (Life Technologies, Paisley, Scotland)

2.5.3 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten

DNA-Ladepuffer (10x)	2% (v/v) TAE-Puffer (50x) 0.4% (w/v) Bromphenolblau 0.4% (w/v) Xylencyanol 50% Glycerin
Ethidiumbromid-Lösung	10 mg/ml in H ₂ O
MOPS-Puffer (10x)	400 mM MOPS, pH 7.0 100 mM Na-Acetat 10 mM EDTA
RNA-Laufpuffer	25 ml MOPS-Puffer (10x) 44 ml 37 % Formaldehyd 181 ml DEPC behandeltes H ₂ O
RNA-Probenpuffer	300 µl Formamid, deionisiert 100 µl 37 % Formaldehyd 25 µl MOPS-Puffer (10x) 25 µl Glycerol 2.5 µl 0.5 % Bromphenolblau 2.5 µl 0.5 % Xylencyanol
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris 1 M Essigsäure 50 mM EDTA, pH 8.0

2.5.4 Puffer und Lösungen für proteinchemische Arbeiten

ABTS-Puffer	40 mM Na-Citrat 60 mM Na ₂ HPO ₄ pH 4.4
Ammoniumpersulfat	10% (w/v) Ammoniumpersulfat in H ₂ O
Calciumchlorid	1 mM CaCl ₂ in PBS
Chondroitinase-/Keratanase- Puffer (10x)	1 M Tris-Acetat, pH 6.5
Deglycosylierungspuffer (5x)	100 mM Na-Phosphat, pH 7.2
EDTA	2 mM EDTA in PBS
Elektrophorese- Laufpuffer (10x)	250 mM Tris 1.92 M Glycin 1% (w/v) SDS
ELISA Verdünnungspuffer für Antikörper	0.5% (w/v) BSA 0.05% (v/v) Tween 20 in 1x PBS
ELISA Waschpuffer	0.1% (v/v) Tween 20 in 1x PBS
Entfärbelösung	10% Essigsäure
Färbelösung	10% Essigsäure 0.01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250
Fixierungslösung	25% Isopropanol 10% Essigsäure
Glycin-HCl	100 mM Glycin, mit HCl auf pH 3.0 einstellen
Natrium-Azid	2 % NaN ₃ in H ₂ O
PMSF	100 mM in Isopropanol
Probenpuffer (2x)	125 mM Tris, pH 6.8 5% (w/v) SDS 10% (w/v) Glycerin 0.01% (w/v) Bromphenolblau 10% (v/v) β-Mercaptoethanol (frisch zusetzen)
Sammelgelpuffer (4x)	0.5 M Tris 0.4% (w/v) SDS pH 6.8
TNA-Puffer	50 mM Tris 200 mM NaCl 0.02% (w/v) NaN ₃

	pH7.4
Trenngelpuffer (4x)	1.5 M Tris 0.4% (w/v) SDS
	pH 8.8
Wet-Transfer-Puffer	10 mM Tris 10% Methanol 96 mM Glycin pH 7.5

2.6 Bakterienstämme

<i>E.coli</i> BL21 (DE3)	Novagen
<i>E. coli</i> MC1061/P3	Invitrogen
<i>E. coli</i> XL1-Blue supercompetent	Stratagene

2.7 Zelllinien

COS-7	Zelllinie, die durch stabile Transformation der etablierten Affennierenzelllinie CV-1 mit einer Origin-of-replication-defizienten Mutante von SV40 entstanden ist. Die Linie exprimiert das virale Wildtyp T-Antigen und erlaubt so die Propagation von SV40-DNA mit Deletionen der frühen Region. Fibroblasten-ähnliche Morphologie. (84)
RCS	Ratten-Chondrosarkom-Zelllinie, zur Verfügung gestellt von Dr. J. Kimura, Henry Ford Hospital Detroit, MI, USA. Basiert auf einem Einzelzellklon, isoliert aus einem Chondrosarkom. Fibroblasten-/Chondrozyten-ähnliche Morphologie.

2.8 Plasmide

pET-3d	Novagen
pCDM8, modifiziert	pCDM8 mit zusätzlicher Signalsequenz des humanen Lymphozyten-Glykoproteins CD5 und der Sequenz für die schwere Kette des humanen Immunglobulins IgG1 (85,86)

2.9 Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide wurden von Perkin Elmer, Darmstadt-Weiterstadt, gebrauchsfertig hergestellt. Das 5'-Ende war nicht phosphoryliert. Sequenzierprimer wurden je nach zu sequenzierendem DNA-Abschnitt ausgewählt. Für Klonierungsarbeiten wurden folgende Primer verwendet:

pET-rAgg1 _{mut} F	5' CAC ATG CCA TGG ACT ACA AGG ACG ACG ATG ACA AG 3'
pET-rAgg1 _{mut} R	5' AGT AGT TGA TCA TTT ACC CGG AGA CAG GGA GAG 3'
A ³³⁷ IN ³³⁹ EN F	5' CGC AGA AGA CTT TGT GGC CAT CAA CGA AAA CTT CTT TGG AGT GG 3'
A ³³⁷ IN ³³⁹ EN R	5' C CAC TCC AAA GAA GTT TTC GTT GAT GGC CAC AAA GTC TTC TGC G 3'
Q ³⁶⁸ ITEGE F	5' CTG CCA CTG CCT CGA CAG ATC ACT GAG GGT GAA GCG 3'
Q ³⁶⁸ ITEGE R	5' GGC TTC ACC CTC AGT GAT CTG TCG AGG CAG TGG CAG 3'
BC-3-Standard F	5' CGC GGG GCT AGC CGC CCG AGG CAG CGT GAT CCT TAC C 3'
BC-14-Standard F	5' CGC GGG GCT AGC CTT CTT TGG AGT GGG GGG TGA GGA G 3'
rAgg2 F	5' CGC GGG GCT AGC CGA CTA CAA GGA CGA CGA TGA CAA GGG CGG CGG CCC TCG AAA CAT CAC TGA GGG TGA 3'
rAgg2 R	5' CGC GGG GGA TCC CCG CCG GTA AGG ATC ACG CTG CCT CGG GCT TCA CCC TCA GTG ATG TTT CG 3'
ΔN1 F	5' TCC GTG CTA GCC GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG GAC ATC CCA GAA AAC TTC TTT 3'
ΔN2 F	5' TCC GTG CTA GCC GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG TTC TTT GGA GTG GGG GGT GAG 3'
ΔN3 F	5' TCC GTG CTA GCC GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG GAG GAC ATC ACC GTC CAG ACA 3'
ΔN4 F	5' TCC GTG CTA GCC GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG TGG CCT GAC ATG GAG CTG CCA 3'
ΔN5 F	5' TCC GTG CTA GCC GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG CCT CGA AAC ATC ACT GAG GGT 3'
ΔN R	5' TGA AGC TTA GTA CTC ACC CTC GGG ATC C 3'
ΔC F	5' TCC GTG CTA GCC GAC TAC AAG GAC GAC 3'
ΔC1 R	5' CTC GGG ATC CCC GGC AGG GCC CAG GCC AGG TGT 3'
ΔC2 R	5' CTC GGG ATC CCC AAA GCC CCA GGG CCT GGT GGC 3'

$\Delta C3 R$	5' CTC GGG ATC CCC GAA GGC AGT GGC CCC TAT TTC 3'
$\Delta C4 R$	5' CTC GGG ATC CCC GAA GAT GGG CTT TAC GGT AAG 3'
$\Delta C5 R$	5' CTC GGG ATC CCC TAC GGT AAG GAT CAC GCT GCC 3'
$\Delta C6 R$	5' CTC GGG ATC CCC CAC GCT GCC TCG GGC TTC ACC 3'

2.10 Synthetische Peptide

FLAG-Peptid MDYKDDDDK; mit N-terminalem Methionin zur kompetitiven Elution von prokaryontisch exprimierten Fusionsproteinen von einer M2-Antikörpersäule; HMR, Wiesbaden

2.11 Natives Aggrekan aus Rinderknorpel

Natives Aggrekan wurde laut Heinegard aus bovinen Gelenkknorpeln gewonnen (87). Hierfür wurde das Knorpelmaterial in kleine Stücke geschnitten, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und in einer Gefriermühle zermahlen. Proteoglykane wurden durch anschließende Inkubation in 4 M Guanidiniumhydrochlorid extrahiert. Der Extrakt wurde auf 0.4 M Guanidiniumhydrochlorid eingestellt (assoziative Bedingungen) und einer Dichtegradientenzentrifugation mit 1.64 g/ml CsCl unterzogen. Die unterste Fraktion (A1) wurde auf 4 M Guanidiniumhydrochlorid eingestellt (dissoziative Bedingungen) und erneut mit 1.52 g/ml CsCl zentrifugiert. Die unterste Fraktion aus dieser Zentrifugation wird als A1D1 bezeichnet und enthält Proteoglykanmonomere. Nach dieser Methode isoliertes natives Rinderknorpelaggrekan wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Bruce Caterson (Universität Cardiff, Wales, UK) zur Verfügung gestellt.

2.12 Aggrekanase-Aktivität aus Schweinechondrozyten

Eine lösliche Aggrekanase-Aktivität aus Schweinechondrozyten, induziert durch IL-1 α , wurde von Prof. Dr. Bruce Caterson (Universität Cardiff, Wales, UK) zur Verfügung gestellt. Die Chondrozyten wurden aus metacarpo- und metatarsophalangealen Gelenkknorpeln von 3 bis 6 Monate alten Schweinen isoliert (88). Dazu wurden Knorpelstücke steril von der Gelenkoberfläche entfernt und mit 0.1% Pronase und 0.04% Kollagenase für eine Stunde bzw. über Nacht bei 37°C unter Rühren verdaut. Anschließend wurden die Zellen über einen 40

μ m-Nitex-Filter gegeben, gewaschen und in serumfreiem DMEM resuspendiert, so daß eine Konzentration von 1.2×10^7 Zellen/ml resultierte. Diese Zellsuspension wurde 1:1 mit einer 2%igen (w/v) Seaplaque-Agarose-Lösung in DMEM gemischt und in 60 mm-Petrischalen ausplattiert, die vorher mit einer 1%igen Seaplaque-Agarose-Lösung beschichtet worden waren. Die Endkonzentration betrug 6×10^6 Zellen pro Platte. Nach Erhärten der Agarose wurden pro Platte 4 ml DMEM mit 50 μ g/ml Gentamicin und 10 ng/ml IL-1 α zugegeben. Die Platten wurden 96 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, bevor das konditionierte, Aggrekanasehaltige Medium abgenommen, zentrifugiert und bei -20°C gelagert wurde.

3. Methoden

3.1 Prokaryontische Zellkulturtechnik

3.1.1 Kultivierung von *E.coli*

Sämtliche Arbeiten mit Bakterien wurden an der sterilen Werkbank durchgeführt. Es wurden sterile Plastikröhrchen, Plastikpipetten, Plastikimpfösen, Petrischalen und Pipettenspitzen verwendet. Die plasmidtragenden *E. coli* Stämme wurden in Flüssigkultur gehalten oder auf Festmedien im Verdünnungsausstrich kultiviert. Für die Flüssigkultivierung wurde autoklaviertes LB-Medium mit Antibiotika versetzt, mit *E.coli* angeimpft und bei 37°C unter Schütteln (225 Upm) und guter Belüftung inkubiert. Für *E.coli* XL-1 Blue und BL21(DE3), transformiert mit Ampicillin-resistenten Plasmiden, wurden 50 µg/ml Ampicillin eingesetzt. Für *E.coli* MC1061/P3, transformiert mit pCDM8-Derivaten, wurden 13 µg/ml Ampicillin und 7.5 µg/ml Tetracyclin eingesetzt. Für Festmedien wurde LB-Medium mit 15g/l Bacto-Agar autoklaviert und zunächst ohne Antibiotika in Petrischalen gegossen. Die erforderliche Menge an Antibiotika (s. Flüssigkulturen) wurde bei Bedarf in 100 µl sterilem Wasser gelöst und zur Überschichtung der LB-Agarplatten verwendet. Nach dem Eindiffundieren der Antibiotika-Lösung wurden die Platten mit *E.coli* beimpft und über Nacht bei 37°C mit dem Deckel nach unten inkubiert.

3.1.2 Kryokonservierung von *E.coli*

Zur dauerhaften Lagerung von Bakterienkulturen wurden 800 µl einer stationär gewachsenen Kultur mit 200 µl sterilem Glycerin gemischt und bei -70°C aufbewahrt.

3.1.3 Kompetenzinduktion in *E.coli*

Um die Aufnahmefähigkeit von *E.coli* für Plasmide zu erhöhen, wurden die Zellen durch CaCl₂-Behandlung chemisch kompetent gemacht. 5 ml LB-Medium wurden mit dem entsprechenden Bakterien-Stamm beimpft. Nach 16-18 h Wachstum bei 37°C und 225 Upm wurden 400 µl dieser stationären Kultur zum Animpfen von 40 ml vorgewärmtem LB-Medium verwendet. Diese Kultur wurde bis zu einer OD_{595nm} von 0.4 inkubiert, dann bei 3000g für 10 min bei RT zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 20 ml einer eiskalten 50 mM CaCl₂-Lösung, pH 7.2, resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden

erneut bei 3000g für 10 min bei 4°C zentrifugiert und in einer eiskalten 50 mM CaCl₂-Lösung mit 15% (v/v) Glycerin resuspendiert. Aliquots à 300 µl wurden bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

3.1.4 Transformation von *E.coli*

Für die Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA wurden 50 µl chemisch kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und vorsichtig geschüttelt. 10 µl Plasmid-Lösung oder Ligationsansatz wurden zugegeben, und die Mischung wurde für 20 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock bei 37°C dauerte 5 min, es folgte eine Inkubation auf Eis für weitere 5 min. Danach wurde der komplette Ansatz in 500 µl vorgewärmtes LB-Medium ohne Selektionsdruck überführt und 1 h bei 37°C geschüttelt (225 Upm). Ein 100 µl- und 300 µl-Aliquot der transformierten Zellen wurde auf LB-Agarplatten mit dem geeigneten Antibiotikum unter Verwendung von sterilen Glaskügelchen zur gleichmäßigen Verteilung ausplattiert. Die Platten wurden mit dem Deckel nach unten bei 37°C über Nacht inkubiert.

3.1.5 Expression rekombinanter Proteine in *E.coli*

Prokaryontische Proteinexpression wurde im *E.coli*-Stamm BL21 (DE3) unter Verwendung eines pET-Vektors (Novagen) durchgeführt. BL21 (DE3) trägt lysogen den Bakteriophagen DE3, der für die T7 RNA-Polymerase unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors kodiert. Dieser *lacUV5*-Promotor ist durch Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induzierbar. Die Zugabe von IPTG zu einer wachsenden BL21 (DE3) Kultur induziert T7 RNA-Polymerase, die wiederum das Fremdgen im pET-Vektor, das unter Kontrolle des T7 Promotors steht, transkribiert.

Von einer Übernacht-LB-Kultur von BL21 (DE3), transformiert mit einem pET-Vektor, wurden 100 µl zur Inokulation von 50 ml YT-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin verwendet. Die Kultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6 bei 37°C und 225 Upm inkubiert. Nach Abnehmen einer geringen Menge als nicht-induzierte Kontrolle wurde die restliche Kultur mit 1 mM IPTG versetzt und für weitere 3.5 h bei 28°C inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 5000 g für 10 min zentrifugiert und das Zellpellet bei -70°C bis zur Zellyse aufbewahrt.

3.1.6 Zellyse von *E.coli*

Um rekombinante Proteine nach der Expression in *E.coli* zu reinigen, wurden die Zellen zunächst nach einem Protokoll von Maniatis *et al.* aufgeschlossen (89). Im Kühlraum wurden pro Gramm *E.coli* Pellet (Feuchtgewicht) 3 ml Lysis-Puffer addiert. Die Resuspension wurde mit 4 µl 100 mM PMSF-Lösung, 40 µl Lysozym (10 mg/ml) und 40 µl DNaseI (10 U/µl) pro Gramm Zellpellet versetzt und erst für 20 min auf Eis, dann für 30 min bei RT inkubiert. Für einen vollständigen Zellaufschluß wurde die Lösung im Sonifikator bei 50% Leistung mit einem Puls von 0.5 sec für 1 min behandelt. Danach waren lichtmikroskopisch keine intakten Bakterienzellen mehr zu sehen. Der Ansatz wurde bei 20000 g und 4°C für 30 min zentrifugiert. Pellet und Überstand, über einen 0.2 µm-Filter sterilfiltriert, wurden getrennt voneinander bei -20°C aufbewahrt.

3.2 Eukaryontische Zellkulturtechnik

Sämtliche Arbeiten mit eukaryontischen Zellen wurden an der Sterilbank ausgeführt. Es wurden sterile Einweg-Plastikwaren, autoklavierte Glaswaren und sterile Lösungen verwendet. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ in wasserdampf-gesättigter Atmosphäre.

3.2.1 Kultivierung von COS-7 Zellen

Die Haltung der adhärenenten COS-7 Zellen erfolgte in DMEM, welches mit 10% (v/v) FCS, 2 mM Glutamin, 1 mM Na-Pyruvat und 20 mM HEPES supplementiert wurde. Die Zellen wurden in horizontal gelagerten Zellkulturflaschen (75 cm²) bis zu einer Konfluenz von 80-100% kultiviert, bevor sie verdünnt wurden. Hierfür wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und 1.5 ml Trypsin-EDTA auf den Zellrasen gegeben. Nach wenigen Minuten lösten sich die Zellen von der Oberfläche der Zellkulturflasche. Die Zellen wurden zentrifugiert und in frischem Medium resuspendiert, so daß eine Einzelzellsuspension resultierte, die dann 1:20 auf neue Zellkulturflaschen verteilt wurde. Nach 3-4 Tagen erreichten die Zellen konfluentes Wachstum und wurden abermals verdünnt.

3.2.2 Transfektion von COS-7 Zellen mit DEAE-Dextran

Um COS-7 Zellen transient mit rekombinanter DNA zu transfizieren, wurde das DEAE-Dextran-Transfektionssystem gewählt. Das polykationische, wasserlösliche Diethylaminoethyl(DEAE)-Dextran vermittelt bei dieser Methode vermutlich die produktive Interaktion zwischen negativ geladener DNA und Komponenten der Zelloberfläche im Prozeß der Endocytose und erleichtert dadurch die Aufnahme von Plasmid-DNA. Der genaue molekulare Mechanismus dieses Transfers ist jedoch unbekannt. Zusätzlich wurde Chloroquin zugegeben, welches die Transfektionsfrequenz verbessert, möglicherweise indem die DNA-Degradation durch lysosomale Nukleasen gehemmt wird.

COS-7 Zellen wurden am Tag vor der Transfektion in 100 mm Ø-Petrischalen ausgesät, so daß sie am nächsten Tag etwa 70% konfluent waren. Das Transfektionsmedium wurde hergestellt aus DMEM mit 10% (v/v) NU-Serum, 2 mM Glutamin, 1 mM Na-Pyruvat und 20 mM HEPES. Außerdem wurde während der gesamten Transfektionsdauer Gentamicin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml eingesetzt. Pro Petrischale wurden 5 ml dieses Mediums mit 200 µl einer DEAE-Dextran-Chloroquin-Lösung (1% (w/v) DEAE-Dextran, 2.5 mM Chloroquin-Phosphat; sterilfiltriert) und 10 µg DNA versehen und sterilfiltriert. Für die Transfektion wurde das verbrauchte Kulturmedium der COS-7 Zellen abgesaugt, die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit 5 ml des DNA-haltigen Transfektionsmediums pro Platte bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach etwa 3.5 bis 4 Stunden sahen die Zellen aufgrund der toxischen Eigenschaften von DEAE-Dextran stark beschädigt aus oder hatten sich von der Oberfläche der Petrischale gelöst. Dann wurde ein DMSO-Schock angewendet, um die Transfektionsfrequenz zu erhöhen, wofür das Transfektionsmedium durch 5 ml 10%iges DMSO in PBS ersetzt wurde. Für 2 min wurden die Zellen der DMSO-Lösung ausgesetzt, bevor das Medium durch 10 ml reguläres COS-7 Kulturmedium (s. 3.2.1) mit 50 µg/ml Gentamicin ersetzt wurde. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank aufbewahrt, am nächsten Tag durch Trypsin-EDTA abgelöst und auf zwei neue Petrischalen verteilt. Die Kultivierung erfolgte unter Zufütterung von 5 ml Kulturmedium am Tag 3 für insgesamt 6 Tage, wonach sich ein Maximum an exprimiertem Fremdgen im Kulturüberstand befand.

3.2.3 Kultivierung von Rattenchondrosarkomzellen

Rattenchondrosarkomzellen (RCS Zellen) zur Verwendung im Aggrekanase-Assay (s.3.7.1) wurden vier Tage vor Beginn des Assays frisch aufgetaut und bis zum konfluenten Wachstum kultiviert, um dann direkt in der 96-well-Zellkulturplatte zur Induktion von Aggrekanase-Aktivität ausgesät zu werden. Eine Kultivierung der RCS Zellen über mehrere Passagen

erwies sich als nicht geeignet, da dabei offensichtlich die Induktionsfähigkeit der Aggrekanase durch Retinsäure verloren ging.

Ein Aliquot einer in flüssigem Stickstoff gelagerten Kultur von RCS Zellen à 8×10^6 Zellen wurde im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Zellen wurden in RCS-Medium aufgenommen, welches sich aus DMEM mit 5% (v/v) FCS, 2 mM Glutamin und 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamicin zusammensetzte. Nach Zentrifugation bei 1000 rpm (Sorvall RT 6000D) für 10 min wurden die Zellen in 20 ml RCS-Medium resuspendiert, so daß eine Einzelzellsuspension entstand, welche in einer 75 cm^2 -Zellkulturflasche ausgesät wurde. Die RCS Zellen wuchsen während der viertägigen Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 als adhärente Einzelzellschichtkultur. In dieser Zeit bildeten sie eine extrazelluläre Matrix, die durch Eintrübung des Zellkulturüberstands deutlich sichtbar wurde. Zur Verwendung im Aggrekanase-Assay wurden die konfluent gewachsenen Zellen ohne Trypsin-EDTA-Behandlung von der Oberfläche der Zellkulturflasche abgespült, zentrifugiert und resuspendiert, wobei typischerweise $1.2 - 1.4 \times 10^7$ Zellen pro Flasche gewonnen wurden (s.3.7.1). Die für den Aggrekanase-Assay erforderliche Zellzahl wurde in der 96-well-Zellkulturplatte ausgesät, die übrigen Zellen wurden in RCS-Medium in einer 75 cm^2 -Zellkulturflasche ausgesät. Diese Zellkulturflasche wurde für weitere 3 Tage im Brutschrank inkubiert. Dann wurden Dauerkulturen angelegt, indem 8×10^6 Zellen/ml in 90% (v/v) FCS, 10% (v/v) DMSO eingefroren wurden. Hierfür wurden die Schraubdeckelgefäße zunächst in einer Einfrierbox mit Wärmeisolation (Nalgene) bei -80°C für 2 Tage aufbewahrt, bevor sie in flüssigem Stickstoff gelagert wurden.

3.2.4 Zellzahlbestimmung

Die Konzentration lebender Zellen in einer Zellsuspension wurde nach Ausschlußfärbung mit Eosinrot mikroskopisch mittels einer Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt. Die Zellsuspension wurde 1:10 in 0.5% (w/v) Eosinrot in 0.9% (w/v) NaCl verdünnt, und 20 μl der Verdünnung wurden auf die Kammer aufgetragen. Bis zu 16 Einzelquadrate wurden ausgezählt. Die Zellkonzentration errechnete sich nach der Formel

$$\text{Zellzahl/ml} = N/n \times F \times 5000$$

wobei N = Summe der Zellen in den ausgezählten Quadraten; n = Anzahl der ausgezählten Quadrate; F = Verdünnungsfaktor; 5000 = Kammerfaktor.

3.3 Isolierung und Analyse von RNA aus COS-7 Zellen

3.3.1 Isolierung von RNA

Die Isolierung von gesamter RNA aus transfizierten COS-7 Zellen erfolgte mit Hilfe des RNeasy® Mini Kits von Qiagen. Das Reinigungsprinzip beruht auf der selektiven Bindung von RNA an eine Silika-Gel-Membran bei hohen Salzkonzentrationen. RNA-Moleküle, die größer als 200 Nukleotide sind, werden gebunden, kleinere RNAs wie die 5.8S-rRNA, 5S-rRNA und tRNAs werden ausgewaschen. Dadurch werden größere RNA-Moleküle angereichert.

COS-7 Zellen wurden 3 Tage nach ihrer Transfektion geerntet. Das Kulturmedium wurde abgesaugt, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und trypsiniert. Nach dem Ablösen wurden die Zellen in etwas Kulturmedium (s.3.2.1) aufgenommen und die Zellkonzentration wurde bestimmt. COS Zellen haben einen hohen RNA-Gehalt von etwa $35 \mu\text{g}/10^6$ Zellen. Um die RNA-Bindungskapazität der Silica-Gel-Säulen nicht zu überschreiten, durften maximal 3×10^6 Zellen pro Säule geladen werden. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 1000 rpm (Sorvall RT 6000D) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Pellet wurde das der Zellzahl laut Hersteller entsprechende Volumen Lysis-Puffer RLT zugegeben. RLT Puffer enthält außer β -Mercaptoethanol das stark denaturierende Guanidiniumisothiocyanat, das RNasen sofort inaktiviert. Das Lysat wurde klar und klumpenfrei. Zur Homogenisierung und Verringerung der Viskosität, die durch hochmolekulare genomische DNA verursacht wird, wurde das Lysat über QIAshredder™ (Qiagen) gegeben. Diese Schleudersäulen enthalten ein biopolymeres System zum Scheren genomischer DNA. Das homogenisierte Lysat wurde 1:1 mit RNase-freiem 70% Ethanol gemischt und auf die RNeasy Schleudersäulen aufgetragen. Dabei durfte das aufgetragene Volumen pro Säule maximal einem Ausgangsmaterial von 3×10^6 Zellen entsprechen. Nach Zentrifugation bei 10000 g für 15 sec wurde die Säule mit Puffer RW1 gewaschen und zentrifugiert, mit Puffer RPE gewaschen und zentrifugiert, und durch einen 2 minütigen Zentrifugationsschritt getrocknet. Die gebundene RNA wurde mit RNase-freiem Wasser eluiert. 1 μl RNase-Inhibitor (50 U/ μl ; Boehringer Mannheim) wurden pro Eluat von 60 μl zugegeben.

3.3.2 Analyse von RNA

Die Konzentrationsbestimmung der RNA-Lösung erfolgte spektrophotometrisch bei 260 nm, wobei die Beziehung $1 A_{260} = 40 \mu\text{g}/\text{ml}$ RNA zu Grunde gelegt wurde.

Die Integrität der isolierten RNA wurde auf denaturierenden 1%igen Agarose-Gelen untersucht. Um RNase-freie Bedingungen zu gewährleisten, wurde das verwendete Wasser mit DEPC, einem starken, unspezifischen RNase-Inhibitor, behandelt. Dafür wurde das Reinstwasser mit 0.05 % (v/v) DEPC versetzt und 6 h bei RT gerührt, bevor es autoklaviert wurde. Für das RNA-Gel wurden 0.5 g Agarose mit 36 ml DEPC-Wasser und 5 ml 10x MOPS-Puffer in der Mikrowelle geschmolzen. Nach kurzer Abkühlung wurden 9 ml 37 % Formaldehyd und 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben. Das Gel wurde in eine zuvor für 30 min mit 0.5 M NaOH behandelte Mini-Gelkammer (Hoefer Scientific, HE 33) gegossen. Zur Probenvorbereitung wurde die RNA-Lösung 1:3 mit RNA-Probenpuffer verdünnt, 10 min bei 65°C zur Zerstörung von Sekundärstrukturen inkubiert und auf Eis gehalten. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 70 V für etwa 3 h. Nach dem Lauf sollten unter UV-Bestrahlung zwei starke Banden, die die 28S-rRNA (4718 bp) und die 18S-rRNA (1874 bp) repräsentieren, in einem Intensitätsverhältnis von etwa 2 zu 1 sichtbar sein.

3.4 DNA-Arbeitstechniken

3.4.1 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese aus gesamter RNA (s.3.3.1) wurde das cDNA-Synthese-Kit von Boehringer Mannheim mit Oligo-(dT₁₅)-Primern laut folgendem Protokoll verwendet:

2 µl	10x Reaktionspuffer (100 mM Tris, 500 mM KCl; pH 8.3)
4 µl	MgCl ₂ (25 mM)
2 µl	dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
2 µl	Oligo-(dT ₁₅)-Primer (0.8 µg/µl)
1 µl	RNase-Inhibitor (50 U/µl)
1 µl	RNA-Lösung (1 µg/µl)
7.2 µl	H ₂ O, RNase-frei
<u>0.8 µl</u>	AMV Reverse Transkriptase
20 µl	Gesamtvolumen

Der Ansatz wurde für 10 min bei 25°C und 60 min bei 42°C inkubiert. Durch Erhitzen auf 95°C für 5 min wurde die AMV Reverse Transkriptase inaktiviert.

3.4.2 Polymerase-Kettenreaktion

Zur Amplifizierung definierter Bereiche von Plasmid-DNA oder cDNA über die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (90) wurde die AmpliTaq- oder Pfu-DNA-Polymerase (Perkin Elmer bzw. Promega) verwendet. Neben der 5'3'-Polymeraseaktivität besitzt die Taq-Polymerase auch eine 5'3'-Exonukleaseaktivität, die Pfu-Polymerase dagegen besitzt zusätzlich eine 3'5'-Exonukleaseaktivität, welche auch als „Proofreading“-Aktivität bezeichnet wird. Die Pfu-Polymerase arbeitet dadurch mit einer höheren Genauigkeit als die Taq-Polymerase, erreicht aber nicht so hohe Ausbeuten wie diese.

Standard-PCR

Für eine Standard-PCR unter Verwendung von cDNA als Matrize wurden spezifische Primer eingesetzt, die individuell je nach zu amplifizierendem Genabschnitt definiert wurden. In einem Reaktionsansatz von 50 µl befanden sich typischerweise 5 µl 10x PCR-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.01% Gelatine; Perkin Elmer), 200 µM jedes dNTPs, je 20 pmol Primer und 5 µl cDNA (aus cDNA-Synthese-Ansatz s.3.4.1). Die Mischung wurde auf Eis angesetzt, und die Reaktion wurde nach einem „Hot Start“ von 2 min bei 94°C durch Zugabe von 0.5 µl AmpliTaq-DNA-Polymerase (5 U/µl) gestartet. Die Hybridisierungstemperatur in den folgenden Reaktionszyklen richtete sich nach der Schmelztemperatur T_m der Primer, die sich nach der Formel $T_m [^{\circ}\text{C}] = (N_T + N_A) \times 2 + (N_G + N_C) \times 4$ errechnet, wobei N_X die Anzahl des Nukleotids X bedeutet. Die Hybridisierungstemperatur sollte die Schmelztemperatur um mindestens 5°C unterschreiten. Typischerweise wurde in 35 Zyklen nach folgendem Programm amplifiziert:

Denaturierung:	94°C	30 sec
Hybridisierung:	50-65°C	30 sec
Elongation:	72°C	1 min
gefolgt von	72 °C	7 min, zum Auffüllen von nicht vollständig verlängerten Reaktionsprodukten.

PCR zur Generierung von Deletionsmutanten von rAgg1_{mut}

Als Matrize für die Herstellung von rAgg1_{mut}-Deletionsmutanten und des BC-3-Standardproteins diente der modifizierte Vektor pCDM8 (s.2.8), der die kodierende Sequenz für das rekombinante Aggrekan rAgg1_{mut} enthielt (40). Der Reaktionsansatz entsprach dem der Standard-PCR, mit dem Unterschied, daß Pfu-DNA-Polymerase und der dazugehörige 10x PCR-Puffer von Promega verwendet wurden (200 mM Tris-HCl, pH 8.8, 100 mM KCl, 100

mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, 1% Triton X-100). 100 ng Plasmid-DNA wurden eingesetzt. Die Reaktion wurde nach „Hot Start“ durch Zugabe von 0.5 µl Pfu-DNA-Polymerase (2-3 U/µl) gestartet und folgte dem PCR-Programm der Standard-PCR, das allerdings auf 28 Zyklen limitiert wurde.

PCR für die ortsspezifische Mutagenese von rAgg1_{mut}

Ortsspezifische Mutagenese des rekombinanten Aggrekans rAgg1_{mut} wurde mit Hilfe des QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kits von Stratagene durchgeführt. Bei dieser Methode wird die gewünschte Punktmutation über zwei Primer definiert, die beide die Mutation tragen und mit der gleichen Sequenz des Plasmids auf gegenüberliegenden Strängen hybridisieren. Während der PCR wird mittels der Pfu-DNA-Polymerase ein mutiertes Plasmid generiert. Das Parental-Plasmid wird anschließend durch Behandlung mit der Endonuklease *DpnI* verdaut. *DpnI* ist spezifisch für methylierte DNA, wie sie in fast allen *E.coli*-Stämmen vorliegt, und greift die neu synthetisierte DNA nicht an. Das mutierte Plasmid kann dann in *E.coli* transformiert werden.

Beim Primer-Design ist auf eine Länge von 25-45 Basen zu achten, wobei die Mutation in der Mitte des Primers liegen sollte. Der GC-Gehalt sollte mindestens 40% betragen, und die Schmelztemperatur sollte etwa 10°C über der Elongationstemperatur von 68°C liegen.

Ein Reaktionsansatz von 50 µl beinhaltete 5 µl 10x Reaktionspuffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.8, 100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, 1% Triton X-100), 200 µM jedes dNTPs, je 125 ng Primer und 5, 10, 20 oder 50 ng pCDM8/rAgg1_{mut}. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl Pfu-DNA-Polymerase (2.5 U/µl) gestartet. Nach einer Denaturierung bei 95°C für 30 sec folgte die 3-Schritt-PCR

Denaturierung:	95°C	30 sec
Hybridisierung:	55-60°C	1 min
Elongation:	68°C	9 min (2 Minuten/Kilobase Plasmidgröße)

für 16 Zyklen.

An die PCR schloß sich der *DpnI*-Verdau an (1 µl *DpnI* (10 U/µl) pro PCR-Ansatz, 1 hr bei 37°C). 1 µl des mutierten Plasmidansatzes konnte dann laut Transformationsprotokoll (s.3.1.4) in *E.coli* MC1061/P3 transformiert werden.

3.4.3 Aufreinigen von PCR-Reaktionen

PCR-Reaktionen wurden mit Hilfe des QIAquick™ PCR Purification Kits von Qiagen gereinigt, um Primer, überschüssige Nukleotide, Salze und Enzyme zu entfernen. Dabei wird

die selektive Bindung von DNA an Silica-Gel-Membranen in Schleudersaulchen ausgenutzt. PCR-Produkte zwischen 100 bp und 10 kb werden in Anwesenheit hoher Konzentrationen von chaotropen Salzen an die Membran gebunden. Es wurde das Protokoll des Herstellers befolgt, wonach die Schleudersaulen mit einem Gemisch aus PCR-Ansatz und Puffer PB beladen, zentrifugiert und mit Puffer PE gewaschen wurden. Die Elution des gereinigten PCR-Ansatzes erfolgte mit Puffer EB (10 mM Tris-HCl, pH 8.5).

3.4.4 Restriktionshydrolyse von DNA

Restriktionsendonukleasen hydrolysieren Phosphodiesterbindungen innerhalb spezifischer Erkennungssequenzen in DNA-Strängen. Diese Eigenschaft wurde zur Klonierung und Kartierung genetischer Konstrukte ausgenutzt. Eine Einheit (Unit) Restriktionsenzymaktivitat ist definiert als die Enzymmenge, die 1 μ g Lambda-DNA in einer Stunde unter optimalen Reaktionsbedingungen vollständig hydrolysiert. Folgendes Protokoll wurde verwendet:

300 ng- 1 μ g	DNA (Plasmid oder PCR-Produkt)
1 μ l	10x optimaler Reaktionspuffer (Boehringer Mannheim)
1 μ l	Restriktionsenzym (2-10 U; Boehringer Mannheim)
x μ l	H ₂ O, so daß ein Gesamtvolumen von 10 μ l resultiert.

Der Ansatz wurde für 1-18 h bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert.

3.4.5 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente können aufgrund ihrer negativen Nettoladung gelelektrophoretisch aufgetrennt werden. Sie wandern im elektrischen Feld zur Anode. Eine Auftrennung verschieden großer Fragmente resultiert aus dem Siebeffekt des Agarosegels, in dem kleinere Fragmente eine größere Mobilität besitzen als größere. 1.5 %ige Agarosegele wurden zur Analyse von Restriktionsspaltungsansatzen verwendet, 0.7 %ige Gele mit geringerer Schmelztemperatur wurden im Falle von preparativen Ansätzen mit anschließender Gelelution verwendet. Horizontale Gelkammern für ein Gelvolumen von 50 oder 200 ml standen zur Verfügung (Hoefer Scientific, HE 33 oder 99). Die Agarose wurde im entsprechenden Volumen 1x TAE-Puffer aufgekocht, auf etwa 60°C abgekühlt und mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0.5 μ g/ml) versetzt, um die Nukleinsäuren unter UV-Licht sichtbar zu machen. Die DNA wurde in 1x DNA-Ladepuffer aufgetragen und die Elektrophorese mit 1x TAE als Laufpuffer bei einer Feldstärke von 5V/cm durchgeführt.

3.4.6 Elution von DNA aus Agarose-Gelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarose-Gelen wurde das QIAquick™ Gel Extraction Kit von Qiagen verwendet. Die Silica-Gel-Membran in den Schleudersäulchen bindet in Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze selektiv DNA-Fragmente zwischen 70 bp und 10 kb. Die Elution wurde laut Angaben des Herstellers durchgeführt. Dafür wurde zunächst das DNA-Fragment aus dem 0.7 %igen Agarose-Gel ausgeschnitten, gewogen und mit 3 Volumen Puffer QG bei 50°C für 10 min inkubiert. Nachdem die Agarose geschmolzen war, wurde der Ansatz 1:1 mit Isopropanol gemischt und auf die Schleudersäule aufgetragen. Es folgte eine kurze Zentrifugation, ein Waschschrift mit Puffer PE, erneute Zentrifugation und anschließend die Elution mit Puffer EB (10 mM Tris-HCl, pH 8.5). Die DNA-Fragmente konnten nun in einer Ligationsreaktion eingesetzt werden.

3.4.7 Ligation von DNA

Zur Vorbereitung der Ligationsreaktion, bei der die Enden zweier Nukleinsäuremoleküle enzymatisch miteinander verknüpft werden, mußte zunächst die Konzentration der Vektor- und Insert-DNA bestimmt werden. Hierfür wurden je 2 µl der Vektor- und Insert-DNA und 2 µl einer DNA-Massenleiter (Boehringer Mannheim) mit bekannten Konzentration der einzelnen DNA-Fragmente nebeneinander auf ein Agarose-Gel aufgetragen und die DNA-Konzentrationen im Vergleich zur Massenleiter abgeschätzt. Drei Ligationsansätze mit einem molaren Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:1, 1:3 und 1:5 wurden parallel gefahren. Dabei wurde die Menge Vektor auf 100 ng festgelegt. Dem Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 10 µl wurden außerdem 1 µl 10x T4-Ligase-Puffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl; Boehringer Mannheim) zugesetzt. Die Ligation fand bei 16°C während 16 h statt.

3.4.8 Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Das QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen beruht auf einer modifizierten Methode der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (91). Nach alkalischer Lyse der Bakterien wird das Lysat neutralisiert und auf eine hohe Konzentration chaotroper Salze eingestellt, so daß die Nukleinsäuren selektiv an die Silica-Gel-Membran der Schleudersäulchen binden können. Es wurde dem Protokoll des Herstellers gefolgt.

5 ml einer Über-Nacht-Bakterienkultur wurden abzentrifugiert (10 min, 5000 g) und das Pellet in 250 µl Puffer P1 resuspendiert. Die Zugabe von 250 µl Puffer P2 lysierte die Bakterien. Durch 350 µl Puffer N3 wurde der pH-Wert neutralisiert und Proteine, Zelldebris und bakterielle DNA fielen aus. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation abgetrennt, die in Lösung verbleibende Plasmid-DNA wurde auf die Schleudersäule aufgetragen. Nach kurzer Zentrifugation wurde mit Puffer PB und PE gewaschen, bevor die saubere Plasmid-DNA mit Puffer EB (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) eluiert wurde.

Die Konzentrationsbestimmung der DNA-Lösung erfolgte spektrophotometrisch bei 260 nm, wobei die Beziehung $1 A_{260} = 50 \mu\text{g/ml DNA}$ zu Grunde gelegt wurde. Der Quotient aus A_{260} und A_{280} ist ein Maß für die Reinheit der DNA und sollte zwischen 1.8 und 2.0 liegen. Niedrigere Werte sprechen für eine Verunreinigung durch Proteine, deren Absorptionsmaximum bei 280 nm liegt.

3.4.9 Maxipräparation von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Das QIAfilter Plasmid Maxi Kit (Qiagen) beruht wie das QIAPrep Spin Miniprep Kit auf einer modifizierten Methode der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (91), setzt allerdings zur spezifischen Bindung der Nukleinsäuren Anionenaustauschersäulen ein. Die DNA bindet bei niedrigen Salzkonzentrationen an die Säule und wird durch hohe Salzkonzentrationen eluiert. Material aus maximal 250 ml Bakterienkultur (low copy-Plasmide) kann pro Säule geladen werden.

250 ml einer Über-Nacht-Bakterienkultur wurden abzentrifugiert (10 min, 5000 g) und das Pellet in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Die Zugabe von 10 ml Puffer P2 lysierte die Bakterien. Durch 10 ml eiskalten Puffer P3 wurde der pH-Wert neutralisiert und Proteine, Zelldebris und bakterielle DNA fielen aus. Das Präzipitat wurde nach 10 min Inkubation bei RT abgetrennt, indem es über eine QIAfilterspritze gegeben wurde. Die in Lösung verbliebene Plasmid-DNA passierte die Filterspitze und wurde auf die zuvor mit Puffer QBT äquilibrierte Anionenaustauschersäule aufgetragen. Die Säule wurde mit 60 ml Puffer QC gewaschen, bevor die Plasmid-DNA mit 15 ml Puffer QF eluiert wurde. Durch Zugabe von 10.5 ml Isopropanol wurde die DNA präzipitiert. Es folgte eine 45 minütige Zentrifugation bei 20000 g, 4°C (Rotor HB-4), ein Waschschriff mit 70 %igem Ethanol und eine erneute Zentrifugation für 10 min. Die saubere DNA wurde 5 min luftgetrocknet und in einem geeigneten Volumen von Puffer EB (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) oder Wasser aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte analog 3.4.8.

Puffer P1:	50 mM	Tris-HCl, pH 8.0
	10 mM	EDTA

	100 µg/ml	RNase A
Puffer P2:	200 mM	NaOH
	1% (w/v)	SDS
Puffer P3:	3M	K-Acetat, pH 5.5
Puffer QBT:	750 mM	NaCl
	50 mM	MOPS, pH 7.0
	15% (v/v)	Isopropanol
	0.15% (v/v)	Triton X-100
Puffer QC:	1 M	NaCl
	50 mM	MOPS, pH 7.0
	15% (v/v)	Isopropanol
Puffer QF:	1.25 M	NaCl
	50 mM	Tris-HCl, pH 8.5
	15% (v/v)	Isopropanol

3.4.10 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung doppelsträngiger DNA wurde an der Sequenziermaschine Perkin Elmer ABI Prism 310 nach dem Dideoxy-Kettenabbruchverfahren durchgeführt. In diesem Verfahren, ursprünglich beschrieben von Sanger *et al.* (92), wird mit Hilfe einer Taq-DNA-Polymerase in Anwesenheit geringer Konzentrationen an Dideoxynukleotiden (ddNTPs) DNA synthetisiert. Dideoxynukleotide werden von der DNA-Polymerase als Substrat erkannt und in den wachsenden DNA-Strang eingebaut. Dieser DNA-Strang kann jedoch nicht verlängert werden, da sich am ddNTP kein freies 3'-OH-Ende befindet. Durch die geringen Konzentrationen der ddNTPs im Vergleich zu den anwesenden dNTPs entsteht eine Population von unvollständig synthetisierten DNA-Strängen, die alle das gleiche 5'-Ende besitzen, aber in ihrer Länge variieren, bei optimalen Verhältnissen um genau eine Base. Ist nun jedes der vier ddNTPs mit einem anderen Farbstoff versehen, so läßt sich die Basensequenz ablesen durch Übersetzen der Farbsequenz, die in einem geeigneten System detektiert wird. Die Sequenziermaschine Perkin Elmer ABI Prism 310 ist ein solches System, das auf laserinduzierter Fluoreszenz-Kapillar-Elektrophorese beruht. Fluoreszenzfarbstoff-markierte DNA-Fragmente trennen sich in einem Polymer nach ihrer Größe auf, werden in der Kapillare durch Lasereinwirkung angeregt, und das emittierte, Farbstoff-spezifische Signal wird detektiert.

Es wurde das kompatible Sequenzierkit AmpliTaqFS BigDyeTerminator Cycle Sequencing Kit von PE Applied Biosystems verwendet. Farbstoff-markierte ddNTPs, dNTPs, AmpliTaq FS, MgCl₂ und Reaktionspuffer sind in einem optimierten "Premix" vorhanden. In einem Reaktionsansatz waren

8 μ l	Premix
500 ng	DNA-Matrize, doppelsträngig
10 pmol	Sequenzierprimer
2 μ l	DMSO
x μ l	H ₂ O, auf 20 μ l auffüllen.

Die Sequenzierreaktion wurde in der PCR-Maschine PE 9600 in 25 Zyklen nach folgendem Programm durchgeführt:

Denaturierung:	96°C	10 sec
Hybridisierung:	45-60°C	5 sec
Elongation:	60°C	4 min

Mit dem DyeEx Spin Kit von Qiagen wurden nicht-inkorporierte Terminator-Nukleotide entfernt. Bei dieser Gelfiltration im Schleudersäulenformat werden kleine Nukleotide in den Poren der Gelkügelchen zurückgehalten, während große DNA-Fragmente im Filtrat bleiben, da sie nicht in die Poren eindringen können. Pro DyeEx Säule wurde ein Sequenzieransatz von 20 μ l geladen und kurz zentrifugiert. Das Filtrat wurde 2 min bei 90°C denaturiert und im PE ABI Prism 310 unter Standardbedingungen analysiert.

3.5 Protein-Arbeitstechniken

3.5.1 Reinigung von Fusionsproteinen durch Anti-FLAG-Affinitätschromatographie

Aggrekan-Fusionsproteine, die N-terminal das FLAG-Epitop DYKDDDDK trugen, wurden in COS-7 Zellen exprimiert (s.3.2.2). Eine dem Konstrukt vorgeschaltete Signalsequenz gewährleistete die Sekretion der Fusionsproteine ins Zellkulturmedium. Zellkulturüberstand wurde 6 Tage nach der Transfektion abgenommen und mit 25 mM HEPES, 0.3 mM PMSF und 0.02 % Natrium-Azid versetzt (Endkonzentrationen). 1 ml einer Anti-FLAG-M1-Affinitäts-Agarose (Sigma) wurden in eine mit PBS gespülte Plastiksäule mit einem Gesamtvolumen von 20 ml überführt. Die M1-Agarose wurde mit 100 mM Glycin-HCl, pH 3.0, rekonstituiert und mit PBS gewaschen. Im Kühlraum wurden dann etwa 250 ml Zellkulturüberstand mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe mehrfach über Nacht über die Säule gegeben. Am nächsten Tag wurde die Säule mit 1 mM CaCl₂ in PBS gespült. Die Elution der gebundenen FLAG-Fusionsproteine erfolgte mit einer 2 mM EDTA-Lösung in PBS, da EDTA die für die M1-Bindung an FLAG notwendigen Calciumionen chelatisiert. Ein erstes 1 ml-Aliquot EDTA-Lösung wurde hierfür auf die Säule aufgetragen und für 30 min inkubiert. Sieben weitere Aliquots EDTA-Lösung wurden für je 8 min inkubiert. In den Eluaten wurde der Proteingehalt spektrophotometrisch bei 280 nm bestimmt, wobei die Beziehung $1 A_{280} = 1$

mg/ml Protein zu Grunde gelegt wurde. Eluate, die mindestens eine Proteinkonzentration von 10 µg/ml hatten, wurden lyophilisiert. Das getrocknete Protein aller Eluate wurde in soviel H₂O vereint, daß etwa 1 mg/ml resultierte. Die exakte Konzentration der Resuspension wurde nochmals spektrophotometrisch ermittelt. Das gereinigte Fusionsprotein wurde auf einem SDS-PAGE Gel auf Molekulargewicht und Reinheit überprüft und bei –20°C gelagert.

Wurden Aggrekan-Fusionsproteine, die N-terminal das FLAG-Epitop trugen, in *E.coli* exprimiert (3.1.5), so war eine Reinigung über eine Anti-FLAG-M2-Affinitäts-Agarose erforderlich (Sigma). Der Antikörper M2 erkennt im Gegensatz zu M1 das FLAG-Epitop auch dann, wenn N-terminal ein Methionin-Rest das Epitop flankiert. Die Vorbereitung der M2-Affinitätssäule erfolgte analog der M1-Säule. Prokaryontisch exprimiertes Fusionsprotein lag nach Zentrifugation des *E.coli* Zellaufschlusses im Überstand vor (3.1.6). Dieser wurde 1:10 mit PBS verdünnt und auf 300 µM PMSF und 0.02% Na-Azid eingestellt (Gesamtvolumen ca. 200 ml), bevor er mehrfach über Nacht über die Säule gegeben wurde. Die Elution des prokaryontisch exprimierten Proteins erfolgte kompetitiv mit dem FLAG-Peptid MDYKDDDDK. Mit 10 x 1 ml einer 18.75 µM Peptidlösung in PBS, was laut Hersteller 5 mol Säulenäquivalent entsprach, wurde das Fusionsprotein heruntergewaschen. Die Eluate wurden vereint, dialysiert gegen PBS, lyophilisiert und in H₂O resuspendiert, bevor die Proteinkonzentration spektrophotometrisch bestimmt wurde. Nach der Kontrolle auf dem SDS-PAGE Gel wurde das Protein bei –20°C gelagert.

3.5.2 Reinigung von Fusionsproteinen durch Protein G-Affinitätschromatographie

Die Reinigung der BC-3- und BC-14-Standardproteine, die kein FLAG-Epitop trugen, aber C-terminal die schwere Kette des humanen Immunglobulins IgG1 besaßen, erfolgte affinitätschromatographisch mit einer Protein G-Säule. Die Fusionsproteine wurden in COS-7 Zellen exprimiert, der Transfektionsüberstand wurde laut 3.5.1 geerntet. Eine HiTrap Protein G-Sepharose-Säule (Amersham Pharmacia Biotech; Uppsala, Schweden) mit einem Sepharose Volumen von 1 ml wurde unter Verwendung einer FPLC-Anlage mit 0.1 M Glycin, pH 9.0 äquilibriert. Etwa 250 ml Transfektionsüberstand wurden mit einer Flußrate von 1 ml/min auf die Säule aufgetragen. Nach einem Waschschrift mit 0.1 M Glycin, pH 9.0 wurde das Fusionsprotein mit 0.1 M Glycin-HCl, pH 3.0 eluiert und in 2 ml-Fractionen aufgefangen, die mit 100 µl 1 M Tris-HCl, pH 9.0 neutralisiert wurden. Die Protein G-Affinitätschromatographie wurde freundlicherweise im Labor Dr. Ulmer, Aventis, Frankfurt durchgeführt.

3.5.3 SDS-PAGE

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen (0.1 % SDS) über eine eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (93). Mini-Gel-Apparaturen SE 280 von Hoefer Scientific mit Glasplattenmaßen von 8 x 10 cm wurden verwendet. Bei einer Dicke der Abstandhalter von 1 mm resultierte ein Gelvolumen von etwa 10 ml. Ein 10 %iges Acrylamid-Trenngel wurde folgendermaßen hergestellt:

2.5 ml	40 % Acrylamid (Acrylamid: Bisacrylamid = 29:1; Sigma)
2.5 ml	4x Trenngelpuffer
5 ml	H ₂ O
75 µl	10 % Ammoniumpersulfat
7.5 µl	TEMED (Sigma)

Die Lösung wurde zwischen zwei saubere Glasplatten gegossen, die mit Abstandhaltern vertikal fixiert waren. Für eine glatte Gelfront wurde Butanol über die Lösung geschichtet. Nach etwa 1 h war die Polymerisation beendet. Butanol wurde entfernt, und ein 3.5 %iges Sammelgel mit folgender Zusammensetzung wurde über das Trenngel gegossen:

280 µl	40 % Acrylamid (Acrylamid: Bisacrylamid = 29:1; Sigma)
625 µl	4x Sammelgelpuffer
1.6 ml	H ₂ O
20 µl	10 % Ammoniumpersulfat
2.5 µl	TEMED (Sigma)

Dabei wurde ein Kamm mit 10 Taschen à 20 µl Probenvolumen eingesetzt. Nach 30 min war die Polymerisation beendet. Der Kamm wurde entfernt und das Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt. Die Proben wurden 1:1 mit 2x Probenpuffer gemischt, dem zuvor 10 % β-Mercaptoethanol frisch zugesetzt wurden. Nach der Denaturierung bei 95°C für 10 min wurden die Proben aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte mit 1x Laufpuffer bei 30 mA und 100-150 V für 2-3 h und wurde beendet, wenn das Bromphenolblau des Probenpuffers den unteren Glasplattenrand erreicht hatte. Das Gel wurde anschließend mit Coomassie Blue angefärbt oder auf eine Membran geblottet.

War der Einsatz eines Gradientengeles notwendig, so wurden die 4-12 %igen Acrylamid-Fertiggele NuPAGE Bis-Tris von Novex (San Diego, CA, USA) mit der dazugehörigen Apparatur (XCell Sure Lock) verwendet. Die Auftrennung der Proteine erfolgte ebenfalls unter denaturierenden, reduzierenden Bedingungen. Es wurde den Angaben des Herstellers unter Verwendung des mitgelieferten MOPS-Laufpuffers gefolgt. Die Probenbehandlung erfolgte wie bei selbstgegossenen Gelen. Die Elektrophorese fand bei 200 V während 1 h statt.

3.5.4 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Um Proteine nach der Elektrophorese im SDS-Polyacrylamidgel sichtbar zu machen, wurden sie mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Zunächst wurde das Gel für 30 min in Fixierungslösung inkubiert, danach für 1 h in Färbelösung. Die Entfärbung in Entfärbelösung wurde durchgeführt, bis die Proteine als blaue Banden vor klarem Hintergrund erschienen. Die Gele wurden anschließend feucht in Plastikfolie eingeschweißt und bei 4°C gelagert.

3.5.5 Nachweis von Proteinen durch Western Blot

Als Western Blot bezeichnet man den Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Träger-Membran und die Detektion mit mono- oder polyklonalen Antikörpern, die gegen die Proteine oder deren Domänen gerichtet sind. Die Proteine wurden zunächst über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Es wurde ein vorgefärbter Längenstandard verwendet (Rainbow coloured protein molecular weight marker; Amersham, Buckinghamshire, UK), dessen Banden während der Gelelektrophorese sichtbar sind. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 30 min in Wet-Transfer-Puffer äquilibriert. Parallel wurde eine auf die Gelgröße zugeschnittene PVDF-Membran (0.45 µm Porengröße; Millipore), die zuvor kurz mit Methanol benetzt wurde, in Wet-Transfer-Puffer zusammen mit 6 Lagen 2MM Papier (Whatman) äquilibriert. In einer Semi-Dry-Elektroblot-Apparatur (Hoefer Scientific) wurde auf der Anodenplatte folgende Transferanordnung zusammengesetzt: 3 Lagen 2 MM Papier, darauf die PVDF-Membran, darauf das SDS-Polyacrylamidgel, darauf 3 Lagen 2 MM Papier. Die Kathodenplatte wurde aufgesetzt und der Transfer erfolgte bei 60 mA und 30 V während 35-45 min. Ein erfolgreicher Transfer war an der Übertragung des vorgefärbten Längenstandards auf die PVDF-Membran zu erkennen.

Nach der Proteinübertragung wurde die PVDF-Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen in 5% BSA in TNA-Puffer bei RT geschüttelt. Nach kurzem Waschen in TNA-Puffer wurde der Blot für 60 min bei RT mit dem Primärantikörper, verdünnt in 1 % BSA in TNA-Puffer, inkubiert. Folgende Erstantikörperverdünnungen wurden gewählt:

Anti-FLAG M1:	1:1000 (mit 1 mM CaCl ₂)
Anti-FLAG M2:	1:1000
BC-3:	1:500
BC-14:	1:1000
Ziege-anti-Human-IgG:	1:200

Nach 3 kurzen Waschschritten mit TNA-Puffer folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, der mit alkalischer Phosphatase konjugiert und gegen die konservierte Domäne des Erstantikörpers gerichtet war. Der Zweitantikörper, ebenfalls in 1 % BSA in TNA-Puffer verdünnt, wurde folgendermaßen eingesetzt:

Esel-anti-Ziege-IgG-AP: 1:500

Schaf-anti-Maus-IgG-AP: 1:500

Nach 60 minütigem Schütteln wurde der Blot dreimal gewaschen und durch Inkubation mit dem Phosphatase-Substrat BCIP/NBT (Sigma) entwickelt. Wenn die angefärbten Banden deutlich gegen den ungefärbten Hintergrund zu sehen waren, wurde die Entwicklung durch Waschen in H₂O abgestoppt. Die Membran wurde anschließend an der Luft getrocknet.

3.5.6 Aminosäure-Sequenzierung

Für die Bestimmung der Aminosäuresequenz von Aggrekan-Fusionsproteinen wurde das durch Anti-FLAG-Affinitätschromatographie gereinigte Protein zunächst auf einem SDS-PAGE Gel aufgetrennt. Nach dem Ausschneiden der Banden wurden die Gelstücke gewaschen, mit DTT reduziert und alkyliert. Das Protein wurde anschließend im Gel durch die Endoproteinase AspN verdaut. Durch Acetonitrilbehandlung wurden die Fragmente extrahiert und mittels RP-HPLC (C-18 Säule, 0.3 x 250 mm; Vydac) aufgetrennt. Die einzelnen Peaks wurden einer Aminosäuresequenzanalyse mit dem Sequenzierautomat Applied Biosystems Procise cLC nach dem Prinzip des Edman-Abbaus unterzogen. Die Arbeiten wurden freundlicherweise im Labor Dr. Klaus Sauber, Aventis, Frankfurt, durchgeführt.

3.6 Deglykosylierung von Aggrekan-Substraten

Um den Einfluß der Verzuckerung von Aggrekan-Fusionsproteinen auf deren Eignung als Aggrekanase-Substrate zu testen, wurden N- und O-glykosidisch verknüpfte Glykanketten enzymatisch vom Proteinrückgrat abgespalten. Dafür wurden 10 µg Aggrekan-Fusionsprotein in 100 µl 1x Deglykosylierungspuffer aufgenommen (20 mM Na-Phosphat, pH 7.2) und mit 100 mU N-Glykosidase F, 620 µU O-Glykosidase und 500 µU Neuraminidase für 18 h bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde danach lyophilisiert, in 10 µl H₂O resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Eine andere Art von Deglykosylierung stellt die Abspaltung von Chondroitinsulfat- und Keratansulfat-Seitenketten von nativem Aggrekan (2.11) dar, die im folgenden als GAG (Glykosaminoglykan)-Abspaltung bezeichnet wird. Diese Behandlung war notwendig, um

natives Rinderknorpel-Aggrekan auf ein SDS-Gel zur Western Blot-Analyse auftragen zu können. Hierfür wurde natives Aggrekan mit einem GAG-Gehalt von 10 µg in 100 µl 1x Chondroitinase-/Keratanase-Puffer aufgenommen (0.1 M Tris-Acetat, pH 6.5) und mit 10 mU Chondroitinase ABC, 10 mU Keratanase I und 0.1 mU Keratanase II für 2 h bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde danach für 2 h gegen H₂O dialysiert und lyophilisiert.

3.7 Aggrekanase-Aktivitätsassays

3.7.1 Aggrekanase-Induktion in Rattenchondrosarkomzellen: Assay im zellulären System

Rattenchondrosarkomzellen (RCS Zellen) wurden wie unter 3.2.3 beschrieben kultiviert. Zur Verwendung im Aggrekanase-Assay wurden die konfluent gewachsenen Zellen ohne Trypsin-EDTA-Behandlung von der Oberfläche der Zellkulturflasche abgespült, zentrifugiert und in purem DMEM resuspendiert, wobei typischerweise $1.2 - 1.4 \times 10^7$ Zellen pro Flasche gewonnen wurden. Eine 96-well-Zellkulturplatte wurde über Nacht im Brutschrank mit 100 µl pro Vertiefung einer Poly-L-Lysin-Lösung (40 µg/ml in H₂O) vorbeschichtet. Poly-L-Lysin wurde entfernt, und pro Vertiefung wurden 8×10^4 Zellen in 100 µl serumfreiem DMEM ausgesät. Durch Zugabe von Retinsäure mit einer Endkonzentration von 1 µM, bezogen auf ein Vertiefungsvolumen von 300 µl, wurde in den RCS Zellen Aggrekanase-Aktivität induziert. Als Negativkontrolle wurden Zellen mit dem entsprechenden Volumen 96 % Ethanol versetzt, da Retinsäure in Ethanol angesetzt war. Pro Vertiefung wurden 200 µl serumfreies DMEM mit 1.5 µl Gentamicin-Lösung (10 mg/ml) zupipettiert. Die 96-well-Zellkulturplatte wurde für 48 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach dieser Zeit wurde entweder Aggrekan-Fusionsprotein oder natives Rinderknorpel-Aggrekan als Aggrekanase-Substrat zugegeben. Die Assay-Platte wurde für weitere 4 h inkubiert. Sollten potentielle Aggrekanase-Inhibitoren getestet werden, so wurden diese bereits nach 47 h, also eine Stunde vor Substratzugabe, zupipettiert. Nach einer Gesamtinkubationszeit von 52 h wurden aus jeder Vertiefung 200 µl Überstand möglichst zellfrei abgenommen und auf Spaltung der Aggrekanase-Substrate untersucht. Dies geschah entweder mittels eines ELISAs (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay; s.3.9) oder nach Dialyse gegen H₂O über Nacht mit Hilfe eines Western Blots (3.5.5).

3.7.2 Aggrekanase-Induktion in Schweinechondrozyten: Assay mit löslicher Aktivität

Eine lösliche Aggrekanase-Aktivität aus Schweinechondrozyten, induziert durch IL-1 α , wurde von Prof. Dr. Bruce Caterson (Universität Cardiff, Wales, UK) zur Verfügung gestellt (2.12). Die Aggrekanase-Aktivität befand sich nach 96 stündiger Inkubation der Chondrozyten mit 10 ng/ml IL-1 α im Zellkulturüberstand, welcher abgenommen, zentrifugiert und im Aktivitätsassay verwendet wurde. In einer 96-well-Zellkulturplatte wurden 200 μ l des Aggrekanase-haltigen Überstandes mit 100 μ l DMEM pro Vertiefung gemischt. Für die Negativkontrolle wurden 300 μ l reines DMEM verwendet. Als Aggrekanase-Substrat diente ein Aggrekan-Fusionsprotein. Sollten potentielle Aggrekanase-Inhibitoren getestet werden, so wurden diese bereits eine Stunde vor Substratzugabe zupipettiert. Die Assay-Platte wurde für 17 h ab Substratzugabe im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz in eine ELISA-Platte überführt (3.9), um Substratfragmente, die durch Aggrekanase-Spaltung entstanden waren, zu detektieren.

3.7.3 Assay mit humaner rekombinanter Aggrekanase-1 (ADAMTS4)

Humane rekombinante Aggrekanase-1 (ADAMTS4) wurde erstmals von Tortorella et al. kloniert (68). Aufgrund der publizierten Teilsequenz (Orthopaedic Research Society Conference 1999) wurde mit dem BLAST-Algorithmus eine Genbanksuche durchgeführt, bei der der Plasmid-Klon KIAA0688 des Kazusa DNA Research Instituts (Chiba, Japan) identifiziert wurde (Dr. Christopher Kern, Aventis, Frankfurt). Der Klon deckte die komplette Länge der kodierenden Sequenz für humane ADAMTS4 ab, welche PCR-amplifiziert wurde. Die PCR-Primer waren mit den Restriktionsschnittstellen für *NotI* und *EcoRI* versehen, um das PCR-Produkt in den Baculovirus-Transfervektor pVL1392 (PharMingen, San Diego, CA, USA), nach *NotI/EcoRI*-Verdau von Vektor und PCR-Produkt, zu ligieren. *Spodoptera frugiperda* (Sf9)-Insektzellen wurden durch Lipofektion mit dem rekombinanten Transfervektor ADAMTS4/pVL1392 und linearisierter Virus-DNA BaculoGold® (PharMingen, San Diego, CA, USA) ko-transfiziert. Der resultierende ADAMTS4-Baculovirus wurde für die Infektion von Sf9-Zellkulturen verwendet. Analog hierzu wurde der Wildtyp-Virus als Negativkontrolle hergestellt. Infizierte Zellen wurden in serumfreiem EX-CELL™ 401 Medium (JRH Biosciences; Lenexa, KA, USA) für 48 h kultiviert, bevor der Überstand abgenommen und bei -20°C gelagert wurde. Die Klonierungs- und Expressionsarbeiten wurden bei der Firma InViTek in Berlin durchgeführt.

Für die Aggrekanase-Aktivitätstestung wurden 30 μ l des Sf9-Zellkulturüberstandes mit 270 μ l DMEM in einer 96-well-Zellkulturplatte gemischt. Als Substrat diente entweder ein

Aggrekan-Fusionsprotein oder natives Rinderknorpel-Aggrekan. Sollten potentielle Aggrekanase-Inhibitoren getestet werden, so wurden diese bereits eine Stunde vor Substratzugabe zupipettiert. Nach Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ für 17 h ab Substratzugabe wurde der Ansatz komplett in die ELISA-Platte transferiert, um die Substratspaltung aufgrund von Aggrekanase-Aktivität zu analysieren (3.9). Wurde natives Aggrekan als Substrat verwendet, so wurde diese Analyse im Western Blot vollzogen (3.5.5).

3.7.4 Assay mit humaner rekombinanter Aggrekanase-2 (ADAMTS5)

Humane rekombinante Aggrekanase-2 (ADAMTS5) wurde erstmals kloniert von Abbaszade et al. (67). Mit einem Hidden Markov Algorithmus wurde vor der Veröffentlichung von Abbaszade *et al.* eine Genbanksuche durchgeführt. Hierzu wurde mit verschiedenen ADAM-Protease-Sequenzen und ADAMTS4 als Vorlage nach weiteren homologen Proteasen gesucht. Dabei fiel der Klon 5022290 der Incyte Datenbank (Incyte; Palo Alto, CA, USA) durch große Homologie auf. Die kodierende Region dieses Klons umfaßte nur einen Teilbereich aus der katalytischen Domäne sowie die erste Thrombospondin-ähnliche Domäne. Mittels PCR wurde dieser Sequenzbereich amplifiziert und als Sonde verwendet, um aus einer Chondrozyten-cDNA-Bank nach positiven Klonen zu suchen. Nachdem ein positiver Klon gefunden wurde, konnten mit Hilfe der mittlerweile publizierte Sequenz für ADAMTS5 zwei Teilbereiche von ADAMTS5 aus dem cDNA-Klon PCR-amplifiziert werden. Über die Verknüpfung beider Teile durch die Einführung einer *NdeI*-Restriktionsschnittstelle wurde die volle Länge der kodierenden Region für humane ADAMTS5 erhalten. Diese Region wurde dann in den Vektor pcDNA3.1- (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) kloniert. Die Klonierungsarbeiten wurden freundlicherweise im Labor Dr. Dittrich, Aventis, Frankfurt, durchgeführt.

Zur Expression von rekombinanter humaner ADAMTS5 wurden COS-7 Zellen mit der DEAE-Dextran-Methode transfiziert (3.2.2). Für die Aggrekanase-Aktivitätstestung wurden 150 µl des COS-7-Zellkulturüberstandes mit 150 µl DMEM in einer 96-well-Zellkulturplatte gemischt. Als Substrat diente ein Aggrekan-Fusionsprotein. Sollten potentielle Aggrekanase-Inhibitoren getestet werden, so wurden diese bereits eine Stunde vor Substratzugabe zupipettiert. Nach Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ für 17 h ab Substratzugabe wurde der Ansatz komplett in die ELISA-Platte transferiert, um die Substratspaltung aufgrund von Aggrekanase-Aktivität zu analysieren (3.9).

3.8 Matrix-Metalloprotease-Aktivitätsassays

3.8.1 MMP-3-Aktivitätstest

Zur Überprüfung der Empfindlichkeit der Aggrekan-Fusionsproteine gegenüber der Spaltung durch MMP-3 an der allgemeinen MMP-Spaltstelle wurde ein MMP-3-Aktivitätstest durchgeführt. Hierfür wurden im Eppendorfreaktionsgefäß 312.5 µg/ml des Aggrekan-Fusionsproteins mit 31.3 µg/ml rekombinanter humaner MMP-3 (katalytische Domäne: G⁹⁸-P²⁷³; hergestellt im Labor Dr. Weithmann, Aventis, Frankfurt, nach einer Methode von Ye *et al.* (80)) in MMP-3-Verdauopuffer (0.1 M MES, 0.1 M NaCl, 0.01 M CaCl₂, 0.5 % Brij, pH 6.0) für 8 h bei 37°C inkubiert. 5 µg des katabolisierten Substrats wurden im ELISA (3.9) auf Substratspaltung aufgrund von MMP-Aktivität untersucht.

3.8.2 MT1-MMP-Aktivitätstest

Zur Aktivitätstestung von MT1-MMP wurden 312.5 µg/ml des Aggrekan-Fusionsproteins durch 12 µg/ml der katalytischen Domäne von humaner rekombinanter MT1-MMP (81), zur Verfügung gestellt von Prof. H. Tschesche, Universität Bielefeld, verdaut. Die Ansätze wurden im Eppendorfreaktionsgefäß für 17 h bei 37°C in 50 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7.5, mit 10 mM CaCl₂ und 100 mM NaCl inkubiert. 5 µg des katabolisierten Substrats wurden im ELISA (3.9) auf Substratspaltung an der Aggrekanase-Schnittstelle aufgrund von MT1-MMP-Aktivität untersucht.

3.9 ELISA zum Nachweis von Aggrekan-Fragmenten

Um Aggrekan-Fragmente zu analysieren, die aus der Katabolisierung der Aggrekan-Fusionsproteine durch Aggrekanase oder MMPs hervorgegangen waren, wurde ein Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) eingesetzt (94). Mit diesem „Sandwich“-ELISA konnten 1. die Aggrekanase-Spaltprodukte mit aminoterminalen Neopepitop A³⁷⁴RGSVI... durch den monoklonalen Antikörper BC-3 (82) nachgewiesen werden, und 2. die MMP-Spaltprodukte mit aminoterminalen Neopepitop F³⁴²FGVGG... durch den monoklonalen Antikörper BC-14 (83) nachgewiesen werden. Zunächst wurde eine 96-well-Polystyrol-Platte (Immunplatte Maxisorp, Nunc, Dänemark) mit einem Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper über Nacht bei 4°C beschichtet. Die Antikörperkonzentration betrug 5 µg/ml in PBS. Die Platte wurde zweimal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen. Nichtbesetzte potentielle

Bindungsstellen wurden während 1 h bei RT mit einer 5 %igen BSA-Lösung in 0.05 % Tween-20/PBS abgesättigt. Nach zweimaligem Waschen wurde entweder der Mausantikörper BC-3 oder BC-14 aufgetragen. Die Verdünnung betrug in beiden Fällen 1:1000 in Antikörper-Verdünnungspuffer, die Inkubation erfolgte bei RT für 1 h. Die Platte wurde zweimal mit Waschpuffer gespült. Zur Bindung der Aggrekan-Fragmente wurden 200 µl Überstand aus dem RCS-Aggrekanase-Assay und 300 µl Verdauansatz aus den übrigen Aggrekanase- bzw. MMP-Assays in die Vertiefungen der ELISA-Platte überführt. Die Inkubation erfolgte bei RT für 2 h. Die Platte wurde abermals gewaschen. Es folgte die Detektion der gebundenen Aggrekan-Fragmente über die C-terminal gelegene, humane IgG1-Domäne der Aggrekan-Fusionsproteine. Dafür wurde ein Peroxidase-konjugierter Ziege-anti-Human-Antikörper 1:1000 in Verdünnungspuffer auf die ELISA-Platte aufgetragen. Nach einer Inkubation von 1 h bei RT wurde die Platte gewaschen und eine ABTS-Lösung (1.5 mg/ml in ABTS-Puffer) mit 0.01 % H₂O₂ aufgetragen. Das Peroxidase-Substrat ABTS verfärbte sich bei seiner Oxidation dunkelgrün. Diese Färbung wurde photometrisch bei 405 nm gemessen.

4. Ergebnisse

4.1 Expression des Aggrekan-Fusionsproteins rAgg1_{mut} in *E.coli*

Für die Charakterisierung der Aggrekanase und für die Testung potentieller synthetischer Aggrekanase-Inhibitoren in *in vitro* Testsystemen ist es erforderlich, über ein geeignetes Aggrekanase-Substrat zu verfügen. Natives Aggrekan, isoliert aus tierischem Knorpelgewebe, kann *in vitro* als natürliches Aggrekanase-Substrat eingesetzt werden. Die Aufbereitung des nativen Aggrekans bringt allerdings verschiedene Nachteile mit sich. Die Methode ist zeit- und materialaufwendig. Außerdem stellt das gewonnene Material eine inhomogene Mischpopulation aus kompletten und teilweise degradierten Aggrekanmolekülen dar, wie sie bereits im Knorpel vorliegen. Eine Alternative zu nativem Aggrekan stellt deshalb der Einsatz rekombinant hergestellter Substrate dar. Ein solches künstliches Substrat ist das Aggrekan-Fusionsprotein rAgg1_{mut}, dargestellt in Abb.6 (40). Es verfügt über die interglobuläre Domäne des humanen Aggrekans, die für Detektionszwecke N-terminal vom FLAG-Epitop und C-terminal von der schweren Kette des humanen Immunglobulins IgG1 flankiert wird.

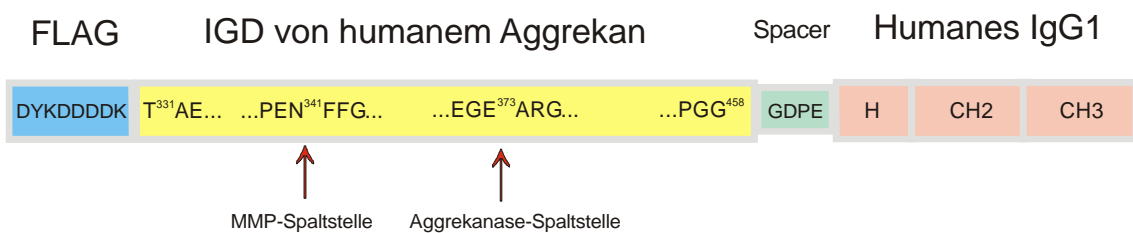


Abb. 6: Schematische Darstellung des rekombinanten Aggrekan-Fusionsproteins rAgg1_{mut}. Die interglobuläre Domäne (IGD) des humanen Aggrekans ist N-terminal fusioniert mit dem FLAG-Epitop DYKDDDDK, und C-terminal fusioniert mit einem Spacer und der schweren Kette des humanen Immunglobulins IgG1. H: Hinge-Region. CH2 und CH3: Domänen des humanen Immunglobulins IgG1. Die MMP-Spaltstelle und Aggrekanase-Spaltstelle sind markiert. Die Aminosäurenumerierung der IGD entspricht der humanen Aggrekan-Sequenz.

Dieses Aggrekan-Fusionsprotein wurde von Büttner et al. hergestellt (40). Es handelt sich dabei um eine Modifikation des Mutter-Konstrukts rAgg1 (85), bei dem eine alternative Splice-Donor-Stelle am N-Terminus der interglobulären Domäne durch eine Punktmutation inaktiviert wurde. Die Verwendung von rAgg1_{mut} in *in vitro* Aggrekanase- und MMP-Aktivitätsassays zeigt, daß rAgg1_{mut} ein geeignetes Substrat für die genannten Enzyme ist, da es an den beschriebenen Schnittstellen E³⁷³-A³⁷⁴ bzw. N³⁴²-F³⁴³ von Aggrekanase bzw. MMPs proteolysiert wird (40,85).

Die Expression von rAgg1_{mut} erfolgte bislang eukaryontisch durch transiente Transfektion von COS-7 Zellen. Der Vorteil der eukaryontischen Expression liegt in der Verzuckerung der exprimierten Fusionsproteine, so daß ein dem nativen Aggrekan ähnliches Glykosylierungsmuster zu erwarten ist. Nachteil der transienten Expression in COS-7 Zellen ist allerdings der hohe Arbeits- und Zeitaufwand der wiederholten Transfektionen und Zellkultivierungen. Aus diesem Grund war es Ziel dieses Arbeitsabschnittes, die Expression des Aggrekanase-Fusionsproteins rAgg1_{mut} zu vereinfachen, um größere Mengen des Aggrekanase-Substrats für Charakterisierungsstudien und zur Testung potentieller Aggrekanase-Inhibitoren im Hoch-Durchsatz-Verfahren bereitzustellen. rAgg1_{mut} wurde zu diesem Zweck in *E.coli* exprimiert.

4.1.1 Klonierung von rAgg1_{mut} zur Expression in *E.coli*

Für die prokaryontische Expression von rAgg1_{mut} mußte zunächst ein genetisches Konstrukt ohne Intron-Sequenzen generiert werden. Hierfür wurden COS-7 Zellen mit dem Shuttle-Vektor pCDM8/rAgg1_{mut} transfiziert, der noch die Exon-Intron-Organisation der schweren Kette des humanen Immunglobulins IgG1 besaß. Aus den transfizierten COS-7 Zellen wurde die gesamte RNA isoliert, die als Matrize für die cDNA Synthese mit Oligo-dT-Primern diente. Die Primer für die PCR-Amplifikation der kodierenden Sequenz von rAgg1_{mut} (pET-rAgg1_{mut} F und pET-rAgg1_{mut} R, s. 2.9) wurden so synthetisiert, daß der 5'-Primer eine Restriktionsschnittstelle für *NcoI* enthielt, gefolgt von den Codons für Methionin und für die acht Aminosäuren des FLAG-Epitops. Der 3'-Primer enthielt eine Restriktionsschnittstelle für *BclI*. Somit konnte das PCR-Produkt über *NcoI* und *BclI* in einen *NcoI/BamHI*-geschnittenen pET3d-Vektor ligiert werden. Die Sequenz des eingefügten Abschnittes, der das Fusionsprotein kodiert, wurde durch eine Sequenzierung überprüft.

4.1.2 Expression von rAgg1_{mut} in *E.coli*

Für die prokaryontische Expression von rAgg1_{mut} wurden *E.coli* BL21(DE3) mit dem Expressionsvektor pET3d/rAgg1_{mut} transformiert. Durch Zugabe von IPTG zu einer wachsenden Kultur transformierter BL21(DE3) wurde die Transkription von rAgg1_{mut} induziert. Nach Inkubation mit IPTG für 3.5 h wurden die *E.coli*-Zellen geerntet und aufgeschlossen. Das Zellysate wurde bei 20000 g und 4°C für 30 min zentrifugiert, um lösliche Proteine von ungelösten Proteinen und Zellbruchstücken zu trennen. Pellet und Überstand wurden einer SDS-PAGE unter reduzierenden, denaturierenden Bedingungen unterzogen, um

die Expression des rekombinanten Proteins zu überprüfen. Abb. 7 zeigt das Coomassie Blau gefärbte 10 %ige Polyacrylamid-Gel.

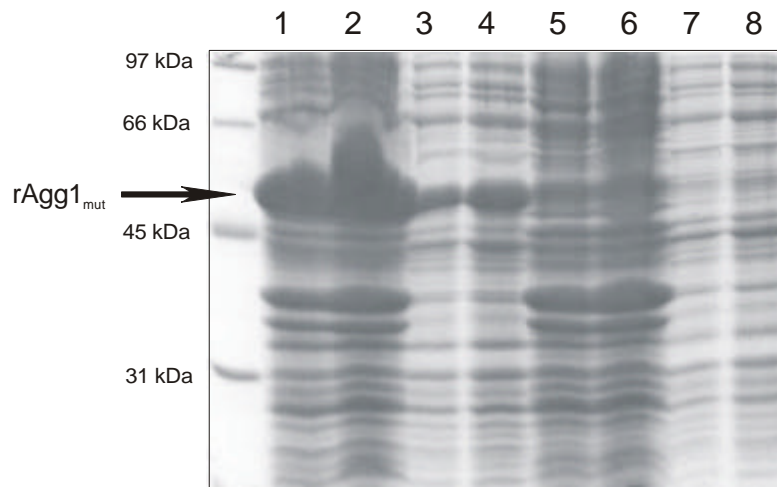


Abb.7: SDS-PAGE des *E.coli*-Zellysats nach und vor IPTG-Induktion. Das Zellysats, aus 25 ml *E.coli*-Kultur, wurde bei 20000 g für 30 min zentrifugiert. Der Überstand betrug 800 μ l, das Pellet wurde in 20 μ l Wasser resuspendiert. Bahn 1 und 2: 2.5 μ l und 5 μ l des Pellets lysierter, IPTG-induzierter *E.coli*. Bahn 3 und 4: 2.5 μ l und 5 μ l des Überstands lysierter, IPTG-induzierter *E.coli*. Bahn 5 und 6: 2.5 μ l und 5 μ l des Pellets lysierter, nicht-induzierter *E.coli*. Bahn 7 und 8: 2.5 μ l und 5 μ l des Überstands lysierter, nicht-induzierter *E.coli*.

Sowohl im Pellet als auch im Überstand des Zellysats IPTG-induzierter Zellen ist bei etwa 50 kDa eine starke Bande zu sehen (Bahn 1-4), die im Zellysats nicht-induzierter *E.coli* fehlt (Bahn 5-8). Dies deutet auf eine starke Überexpression des Fusionsproteins rAgg1_{mut} in den IPTG-induzierten Zellen hin. Das theoretische Molekulargewicht von rAgg1_{mut} beträgt 41 kDa. Grund für die Auftrennung im SDS-Gel bei etwa 50 kDa könnte ein anomales elektrophoretisches Laufverhalten sein.

Überexprimiertes rAgg1_{mut} konnte sowohl im Pellet als auch im Überstand nach Zentrifugation der lysierten, IPTG-induzierten *E.coli* gefunden werden. Dies zeigt, daß unter den gewählten Bedingungen ein Teil des Fusionsproteins nicht in Lösung vorliegt. Dennoch wurde auf eine weitere Behandlung des ungelösten Proteins im Pellet verzichtet, da eine Aufarbeitung eventuell vorliegender Inclusion Bodies eine Denaturierung und Rückfaltung erfordert hätte. Da ausreichende Mengen an löslichem Protein vorhanden waren, wurden alle weiteren Schritte zur Reinigung des Fusionsproteins mit dem Überstand nach Zentrifugation des Zellaufschlusses durchgeführt.

4.1.3 Reinigung von prokaryontisch exprimiertem rAgg1_{mut}

In *E.coli* exprimiertes rAgg1_{mut} aus der löslichen Fraktion nach Bakterienlyse wurde mittels Anti-FLAG-M2-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Elution erfolgte kompetitiv mit einem Überschuß an FLAG-Peptid. Das Eluat wurde unter reduzierenden, denaturierenden Bedingungen auf einem 10%igen SDS-Gel auf Reinheit und Molekulargewicht des Fusionsproteins geprüft. Außerdem wurde die korrekte Expression des N-terminalen FLAG-Epitops und der C-terminalen humanen IgG1-Domäne im Western Blot mit dem Anti-FLAG-M2-Antikörper bzw. mit einem Anti-Human IgG-Antikörper verifiziert (Abb. 8).

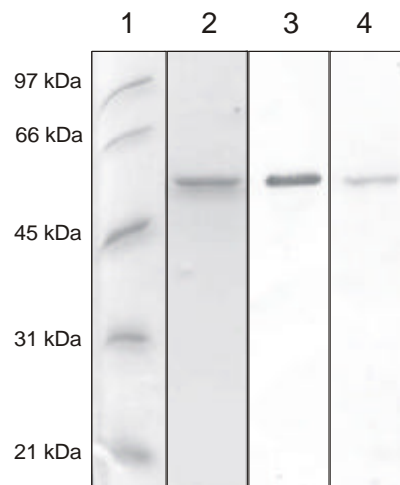


Abb. 8: Prokaryontisch exprimiertes rAgg1_{mut}, gereinigt mittels Anti-FLAG-Affinitätschromatographie, in der SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse. Bahn 1: Molekulargewichtsstandard. Bahn 2: 10 %iges SDS-Gel, Coomassie Blau-gefärbt. Bahn 3 und 4: Western Blot und Immundetektion mit Anti-FLAG-M2-Antikörper bzw. Anti-Human IgG-Antikörper.

In der SDS-PAGE ist nach Coomassie Blau-Färbung nur eine einzige Bande bei etwa 50 kDa zu erkennen (Abb. 8, Bahn 2). Dies ist auch der Fall, wenn die Probe unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetragen wird, was darauf hinweist, daß nur Monomere des Fusionsproteins gebildet werden (Daten nicht gezeigt). Im Western Blot kann unter Verwendung des Anti-FLAG-M2-Antikörpers und eines Anti-Human IgG-Antikörpers nachgewiesen werden, daß der N- und C-Terminus von rAgg1_{mut} korrekt exprimiert sind. In beiden Fällen färbt sich nur eine Bande bei etwa 50 kDa (Bahn 3 und 4). Die Ergebnisse zeigen, daß aus der affinitätschromatographischen Reinigung reines, prokaryontisch exprimiertes Fusionsprotein rAgg1_{mut} mit korrekt exprimiertem N- und C-Terminus hervorging.

4.2 Einfluß der N- und O-Glykosylierung des rekombinanten Aggrekans $rAgg1_{mut}$ auf den Katabolismus durch Aggrekanase

4.2.1 Aggrekanase-Spaltung von prokaryontisch exprimiertem $rAgg1_{mut}$

Das in *E.coli* exprimierte Fusionsprotein $rAgg1_{mut}$ (4.1) wurde im Rattenschondrosarkom (RCS)-Aggrekanase-Assay auf seine Funktionalität als Aggrekanase-Substrat getestet. Die durch Retinsäure induzierte Aggrekanase-Aktivität der RCS Zellen generiert das Neoepitop $A^{374}RGSV...$, das durch den monoklonalen Antikörper BC-3 spezifisch im ELISA nachgewiesen werden kann. Zum Vergleich wurde prokaryontisch und eukaryontisch exprimiertes Protein parallel getestet. Die Ergebnisse sind in Abb. 9 dargestellt.

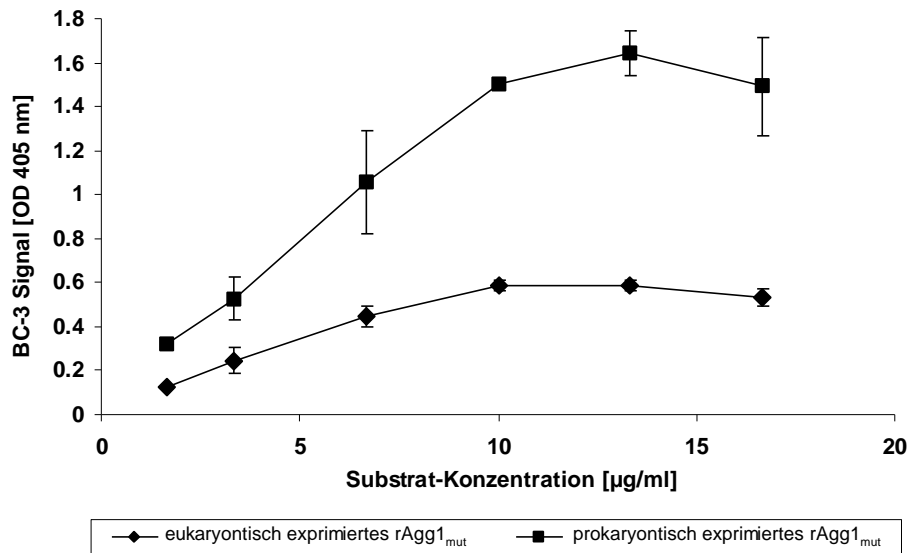


Abb. 9: Prokaryontisch und eukaryontisch exprimiertes $rAgg1_{mut}$ als Substrat im Rattenschondrosarkom-Aggrekanase-Assay. Aggrekan-Spaltprodukte mit dem Neoepitop $A^{374}RGSV...$ wurden im BC-3-ELISA nachgewiesen.

Die Titration beider Fusionsproteine im RCS-Aggrekanase-Assay zeigt ein deutlich höheres BC-3-ELISA-Signal für das in *E.coli* exprimierte $rAgg1_{mut}$ als für das COS-7 exprimierte $rAgg1_{mut}$. Dies bedeutet zum einen, daß prokaryontisch exprimiertes, nicht-glykosyliertes $rAgg1_{mut}$ ein funktionales Substrat für RCS-Aggrekanase ist. Zum anderen können von diesem Substrat mehr Aggrekanase-Spaltprodukte nachgewiesen werden als von glykosyliertem $rAgg1_{mut}$ aus COS-7-Zellen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß ein zuckerfreies Substrat von Aggrekanase besser katabolisiert wird als ein verzuckertes Substrat.

Die Funktionalität des prokaryontisch exprimierten rAgg1_{mut} als Aggrekanase-Substrat wurde zusätzlich in einem Western Blot unter Verwendung des BC-3-Antikörpers verifiziert. Hierfür wurde das Substrat wiederum im RCS-Aggrekanase-Assay eingesetzt. Der RCS-Überstand, der die katabolen Aggrekanfragmente enthielt, wurde auf einem 10 %igen SDS-PAGE-Gel unter reduzierenden, denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran gebロットet. Die Immundetektion mit dem monoklonalen Antikörper BC-3 zeigt, daß sich nur eine Bande mit BC-3 anfärbt, d.h. nur ein BC-3-reaktives Aggrekan-Spaltprodukt gebildet wird (Daten nicht gezeigt). Die Größe des Aggrekanfragments beträgt etwa 45 kDa und entspricht damit einem Molekulargewichtsverlust gegenüber dem unprozessierten Substrat von etwa 5 kDa, was aus der Abspaltung der 51 N-terminalen Aminosäuren theoretisch resultieren sollte. Auch mit Hilfe des BC-3-Western Blots kann demnach bewiesen werden, daß das prokaryontisch exprimierte, zuckerfreie rAgg1_{mut} im RCS-Aggrekanase-Assay als Substrat erkannt und spezifisch an der Aggrekanase-Spaltstelle geschnitten wird.

4.2.2 Vergleich der Aggrekanase-Spaltung von unterschiedlich glykosyliertem rAgg1_{mut}

Abb. 9 zeigt, daß von *E.coli*-exprimiertem rAgg1_{mut} mehr Aggrekanase-Spaltprodukte generiert werden als von COS-7 exprimiertem rAgg1_{mut}. Um die Hypothese zu überprüfen, der Glykosylierungszustand des rekombinanten Aggrekanase-Substrats rAgg1_{mut} habe einen Einfluß auf dessen Katabolisierung durch Aggrekanase, wurde COS-7 exprimiertes rAgg1_{mut} enzymatisch deglykosyliert und als Aggrekanase-Substrat getestet. Weiterhin wurde der Einfluß der N-Glykosylierung auf die Aggrekanase-Spaltbarkeit überprüft. Das Fusionsprotein rAgg1_{mut} verfügt über drei potentielle N-Glykosylierungsstellen, die sich durch die Abfolge der drei Aminosäuren N-X-S/T auszeichnen. Zwei dieser N-Glykosylierungsstellen befinden sich in der interglobulären Domäne von Aggrekan, die dritte befindet sich in der IgG1-Domäne CH2. Besonderes Interesse fiel auf die erste potentielle N-Glykosylierungsstelle N³⁶⁸, da diese nur sechs Aminosäuren N-terminal von der Aggrekanase-Spaltstelle (N³⁶⁸ITEGE) entfernt ist. Zu diesem Zweck wurde durch ortsspezifische Mutagenese eine Mutante des COS-7 exprimierten rAgg1_{mut} hergestellt, bei der das potentiell N-glykosylierte Asparagin durch ein Glutamin ersetzt ist. Diese Mutante (N368Q) wurde ebenfalls als Aggrekanase-Substrat getestet.

Die Deglykosylierung des eukaryontisch exprimierten Fusionsproteins wurde durch Inkubation mit N-Glykosidase F, O-Glykosidase und Neuraminidase erreicht. Die Kombination dieser Enzyme sorgt für eine Entfernung nahezu aller N- und O-gebundener Glykanketten, sofern diese nicht schwefelsubstituiert sind.

Die Mutante N368Q von rAgg1_{mut} wurde durch ortsspezifische Mutagenese mit Hilfe des QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kits von Stratagene hergestellt. Die Punktmutation wurde über die Primer Q³⁶⁸ITEGE F und Q³⁶⁸ITEGE R (s. 2.9) in den eukaryontischen Expressionsvektor pCDM8/rAgg1_{mut} eingeführt, und das Konstrukt wurde in COS-7 Zellen exprimiert. Die Reinigung erfolgte analog zum Wildtyp-rAgg1_{mut} über eine Anti-FLAG-Affinitätssäule. N368Q-rAgg1_{mut} ist in Abb. 10 schematisch dargestellt.

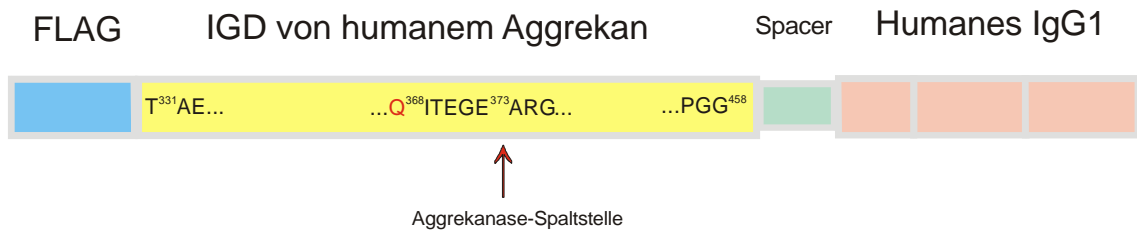


Abb. 10: Schematische Darstellung der Mutante N368Q von eukaryontisch exprimiertem rAgg1_{mut}. Durch den Austausch der Aminosäure Asparagin durch Glutamin in Position 368 wurde die potentielle N-Glykosylierungsstelle in der Nähe der Aggrekanase-Spaltstelle aufgehoben.

Die Molekulargewichtsveränderungen, die aus der Deglykosylierung von Wildtyp-rAgg1_{mut} bzw. aus der Aufhebung der potentiellen N-Glykosylierungsstelle der Mutante N368Q-rAgg1_{mut} resultieren, wurden mit einem 10 %igen SDS-Gel sichtbar gemacht (Abb. 11).

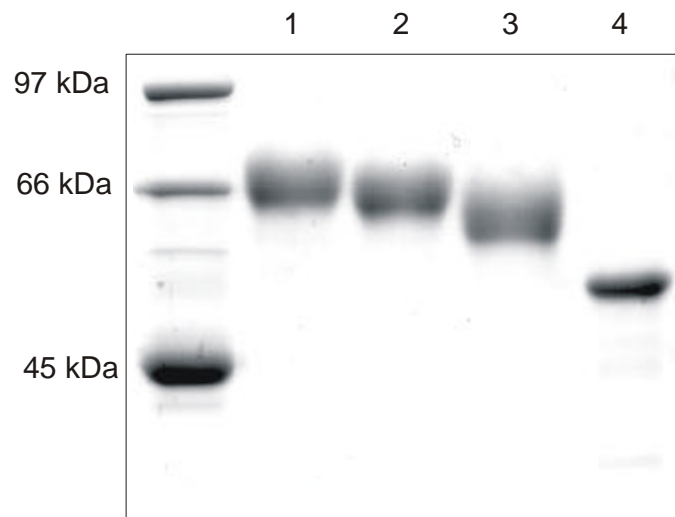


Abb. 11: SDS-PAGE unterschiedlich glykosylierter Formen von rAgg1_{mut} nach Coomassie Blau-Färbung. Bahn 1: COS-7 exprimiertes rAgg1_{mut}. Bahn 2: COS-7 exprimierte Mutante N368Q von rAgg1_{mut}. Bahn 3: COS-7 exprimiertes, enzymatisch deglykosyliertes rAgg1_{mut}. Bahn 4: *E.coli*-exprimiertes rAgg1_{mut}.

Eukaryontisch exprimiertes rAgg1_{mut} in Bahn 1 hat ein apparentes Molekulargewicht von etwa 72 kDa, wie bereits von Büttner et al. gezeigt (40). Durch den Aminosäureaustausch von N³⁶⁸

nach Q³⁶⁸ und die daraus resultierende Aufhebung der N-Glykosylierung reduziert sich das apparente Molekulargewicht um etwa 4 kDa auf 68 kDa (Bahn 2). Die enzymatische Deglykosylierung von Wildtyp-rAgg1_{mut} ergibt einen apparenten Molekulargewichtsverlust von etwa 10 kDa (Bahn 3), das behandelte Fusionsprotein läuft bei 62 kDa. Prokaryontisch exprimiertes rAgg1_{mut} zeigt ein apparentes Molekulargewicht von 50 kDa (Bahn 4). Die Ergebnisse zeigen erstens, daß COS-7 exprimiertes rAgg1_{mut} glykosyliert ist. Zweitens läßt sich schließen, daß die potentielle N-Glykosylierungsstelle N³⁶⁸ im Wildtyp-rAgg1_{mut} tatsächlich verzuckert ist, aber noch weitere Aminosäuren des Fusionsproteins mit Glykanen substituiert sein müssen, um den Molekulargewichtsunterschied zu enzymatisch deglykosyliertem rAgg1_{mut} zu erklären. Drittens fällt auf, daß durch enzymatische Deglykosylierung des COS-7 exprimierten Proteins nicht das Molekulargewicht von unverzuckertem, *E.coli*-exprimiertem rAgg1_{mut} erreicht wird. Gründe für diese Diskrepanz könnten entweder in einer unvollständigen Deglykosylierung liegen oder in einer je nach Expressionssystem unterschiedlichen Proteinfaltung, die durch SDS-Denaturierung nicht vollständig aufgehoben wurde.

Die vier verschiedenen Versionen von rAgg1_{mut} (Abb. 11) wurden auf ihre Funktionalität als Aggrekanase-Substrate im RCS-Aggrekanase-Assay getestet. Die Titration der Fusionsproteine, dargestellt in Abb. 12, zeigt, daß sowohl deglykosyliertes COS-7 exprimiertes rAgg1_{mut} als auch die COS-7 exprimierte Mutante N368Q von der RCS-Aggrekanase-Aktivität als Substrat akzeptiert werden. Dabei wurden im BC-3 ELISA für die deglykosylierte Form des eukaryontisch exprimierten rAgg1_{mut} etwa um den Faktor 2 höhere BC-3 Signale gemessen als für die unbehandelte Form des Substrats. Die BC-3 Signale liegen damit im Bereich des prokaryontisch exprimierten Substrats. Die Aufhebung der N-Glykosylierungsstelle N³⁶⁸ bei der Mutante N368Q führt zu keiner wesentlichen Änderung der Spaltung an der Aggrekanase-Schnittstelle im Vergleich zu Wildtyp-rAgg1_{mut}. Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, daß eine unglykosylierte Form von rAgg1_{mut} durch die in Rattenchondrosarkomzellen induzierte Aggrekanase-Aktivität effizienter katabolisiert werden kann als das glykosylierte rekombinante Substrat. Dennoch spielt dabei die Verzuckerung der Aminosäure N³⁶⁸ in der Nähe der Aggrekanase-Spaltstelle offensichtlich keine entscheidende Rolle, da die Deletion dieser Glykosylierungsstelle zu keiner signifikanten Steigerung der Substratspaltung führt. Dies könnte auf eine besondere Bedeutung der anderen zwei potentiellen N-Glykosylierungsstellen bzw. der unbekanntenen Anzahl an O-Glykosylierungen des Fusionsproteins hinweisen. Alternativ ist denkbar, daß durch den Aminosäureaustausch von N³⁶⁸ nach Q eine Konformationsänderung im Protein induziert wird, die einen negativen Einfluß auf die Spaltbarkeit des Substrats durch Aggrekanase ausübt.

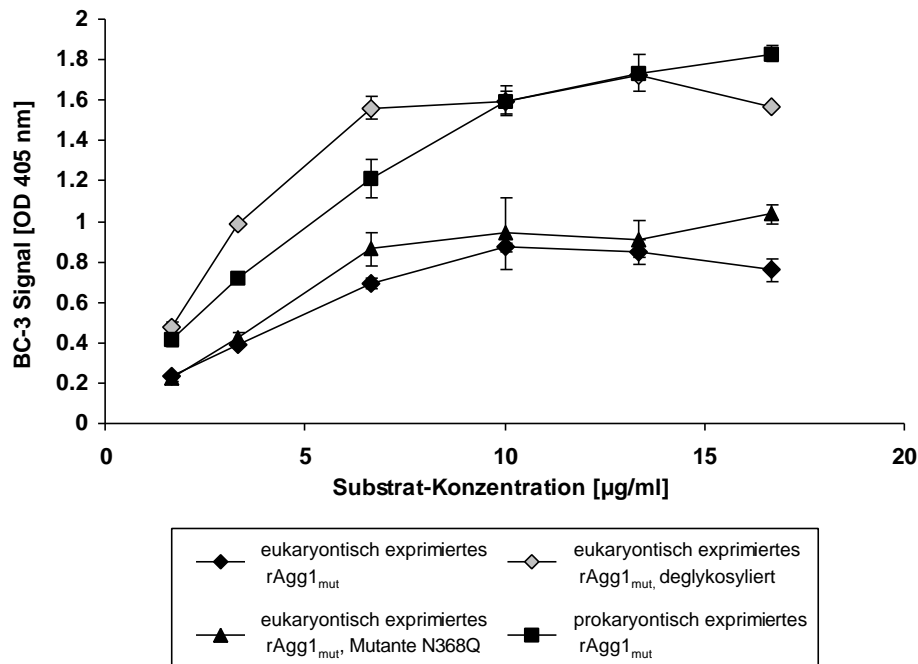


Abb. 12: Unterschiedlich glykosylierte Formen von rAgg1_{mut} als Substrate im Rattenchondrosarkom-Aggrekanase-Assay. Aggrekan-Spaltprodukte mit dem Neopepitop A³⁷⁴RGSV... wurden im BC-3-ELISA nachgewiesen.

Zur Verdeutlichung der unterschiedlichen Katabolisierung von glykosyliertem und nicht-glykosyliertem rekombinanten Substrat wurde eine Aggrekanase-Spaltungskinetik mit den vier rAgg1_{mut}-Versionen erstellt und die kinetischen Parameter V_{max} und K_m bestimmt. Hierfür wurden sechs verschiedene Substratkonzentrationen für 15, 30, 45, 60 min, 2 und 4 h im RCS-Aggrekanase-Assay inkubiert und die Aggrekanase-generierten Spaltprodukte im BC-3 ELISA nachgewiesen. Die Anfangssteigungen der BC-3 Signalkurven (BC-3 Signal/Zeit) wurden graphisch bestimmt und in Abb. 13 im $v/[S]$ -Graphen dargestellt. Mit Hilfe der Software GraFit 3.0 wurde ein zugehöriger Kurvenfit unter Annahme einer Michaelis-Menten-Kinetik erstellt und die kinetischen Parameter berechnet. Das Programm führt eine nicht-lineare Regressionsanalyse durch, bei der iterativ das Parameter-Set V_{max} und K_m verbessert wird, bis die Änderung des χ^2 -Wertes gegenüber der vorherigen Berechnung unter 1 % liegt. Die von GraFit 3.0 kalkulierten Fits sind in Abb. 13 durch die durchgezogenen Kurven dargestellt. Der $v/[S]$ -Graph zeigt eine deutlich höhere maximale Produktbildungsrate für deglykosyliertes eukaryontisch exprimiertes und für prokaryontisch exprimiertes rAgg1_{mut} im Vergleich zu unbehandeltem rAgg1_{mut} aus COS-7 Zellen und dessen Mutante N368Q.

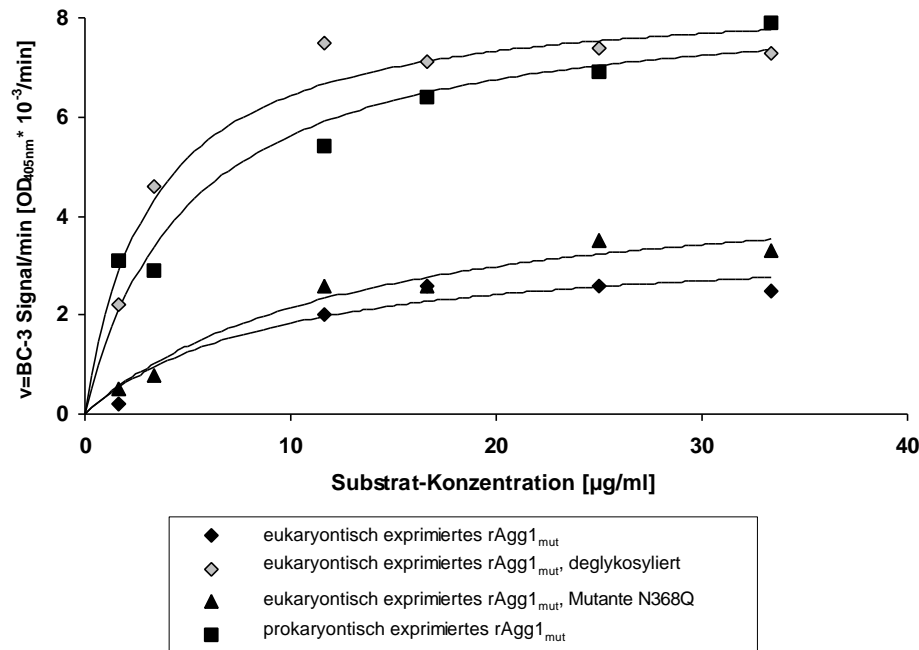


Abb. 13: Aggrekanase-Spaltungskinetik der unterschiedlich glykosylierten Formen von rAgg1_{mut}. Sechs verschiedene Substratkonzentrationen wurden für 15, 30, 45, 60 min, 2 und 4 h im RCS-Aggrekanase-Assay eingesetzt. Die Aggrekanase-generierten Neopeptide A³⁷⁴RGSV... wurden in BC-3 ELISA nachgewiesen. Aus der Auftragung der BC-3 Signale pro Zeit wurden mittels Tangentenbildung die Anfangssteigungen ermittelt und in den v/[S]-Graphen übertragen, der die Produktbildungsrate v (BC-3 Signal/min) über der Substratkonzentration [S] darstellt. Die Datenpunkte wurden mit Hilfe des Programms GraFit 3.0 gefittet, wobei eine Kinetik nach Michaelis-Menten zu Grunde gelegt wurde. Die durchgezogenen Linien stellen das Ergebnis des Fits dar.

Die kinetischen Parameter V_{\max} und K_m , die den Kurvenfits in Abb. 13 zu Grunde liegen und durch das Programm GraFit 3.0 errechnet wurden, sind in der Tabelle 1 aufgeführt. Die berechneten maximalen Produktbildungsraten V_{\max} für die Aggrekanase-Spaltung von deglykosyliertem eukaryontisch exprimiertem rAgg1_{mut} und von prokaryontischem rAgg1_{mut} sind gleich und liegen um Faktor 2.4 über dem kalkulierten V_{\max} -Wert für unbehandeltes rAgg1_{mut} aus COS-7 Zellen. Für die Mutante N368Q von COS-7 exprimiertem rAgg1_{mut} wurde ein etwas höherer V_{\max} -Wert als für das Wildtyp-Substrat errechnet. Die errechneten maximalen Produktbildungsraten tragen die Einheit "BC-3 Signal/Zeit" [$\text{OD}_{405\text{nm}} \times 10^{-3}/\text{min}$] und lassen damit keine Aussage über die absolut produzierte Menge an rAgg1_{mut}-Spaltprodukt zu. Die Bestimmung einer absoluten Produktbildungsrate wäre nur unter Verwendung eines BC-3 reaktiven Standardproteins im BC-3 ELISA möglich. Ein solcher Standard stand zum Zeitpunkt der Experimente nicht zur Verfügung. Die errechneten V_{\max} -Werte sind also relative Werte. Dennoch läßt sich die oben gemachte Aussage treffen, daß unglykosyliertes rAgg1_{mut} mit einem mehr als doppelt so hohem V_{\max} von Aggrekanase gespalten wird als das glykosylierte rekombinante Substrat.

Die errechneten K_m -Werte liegen für die nicht-glykosylierten Substrate niedriger als für unbehandeltes rAgg1_{mut} aus COS-7 Zellen und dessen Mutante N368Q. Jedoch sind die kalkulierten Werte mit starken Standardfehlern (größer 20%) behaftet, so daß nicht mit ausreichender Sicherheit davon ausgegangen werden kann, daß die errechneten Werte den wirklichen K_m -Werten gleichen. Es kann deshalb höchstens eine Tendenz zu einer höheren Aggrekanase-Affinität zu unglykosylierten Substraten erkannt werden.

rAgg1 _{mut}	$V_{max} \pm \text{Standardfehler}$ [BC-3 Signal * 10 ⁻³ /min]	$K_m \pm \text{Standardfehler}$ [µg/ml]
Eukaryontisch exprimiert	3.5 ± 0.7	2.7 ± 1.7
Eukaryontisch exprimiert, deglykosyliert	8.5 ± 0.6	1.0 ± 0.3
Eukaryontisch exprimiert, Mutante N368Q	4.9 ± 0.7	3.8 ± 1.4
Prokaryontisch exprimiert	8.5 ± 0.8	1.5 ± 0.5

Tab. 1: Kinetische Parameter V_{max} und K_m der Aggrekanase-Spaltung von unterschiedlich glykosylierten Formen von rAgg1_{mut}. Die Parameter wurden durch das Programm GraFit 3.0 anhand der experimentell ermittelten Produktbildungsraten errechnet.

Die Kinetik bestätigt damit, daß nicht-glykosyliertes Substrat rAgg1_{mut} mit einer höheren maximalen Geschwindigkeit durch Aggrekanase katabolisiert wird als es für die glykosylierte Form des Substrats der Fall ist. Die Affinität von Aggrekanase zu nicht-glykosyliertem Substrat liegt in der gleichen Größenordnung wie die Affinität zu glykosyliertem rAgg1_{mut}. Zusammenfassend weisen diese Versuche darauf hin, daß der Glykosylierungszustand des rekombinanten Substrats rAgg1_{mut} dessen Spaltbarkeit durch Aggrekanase beeinflusst, wobei ein weniger glykosyliertes Substrat empfindlicher ist gegenüber Aggrekanase-Spaltung als die glykosylierte Form von rAgg1_{mut}.

4.3 Einfluß bestimmter Sequenzbereiche der interglobulären Domäne von rAgg1_{mut} auf den Katabolismus durch Aggrekanase

Die Spaltung durch Aggrekanase an der Schnittstelle E³⁷³-A³⁷⁴ in der interglobulären Domäne ist in der Literatur bisher außer für natives Aggrekan nur für rekombinantes Aggrekan beschrieben, welches die gesamte interglobuläre Domäne (40,85) oder sogar zusätzlich die globulären Domänen G1 und G2 einschließt (95). Die Umsetzung von Peptidsubstraten, ähnlich wie für viele MMPs publiziert (77-79), wurde bisher für Aggrekanase nicht gezeigt.

Eigene Versuche, für Screenings im Hoch-Durchsatz-Format ein Aggrekanase-Substrat zu generieren, das aus einem Peptid von nur 10 Aminosäuren vor und hinter der Aggrekanase-Spaltstelle besteht, führten zu keinem funktionalen Substrat (Daten nicht gezeigt). Auch die rAgg1_{mut}-Variante rAgg2, schematisch dargestellt in Abb. 14, wird nicht als Aggrekanase-Substrat akzeptiert. Wie rAgg1_{mut} verfügt rAgg2 N-terminal über ein FLAG-Epitop und C-terminal über die schwere Kette von humanem IgG1. Die Sequenz der interglobulären Domäne ist jedoch auf 16 Aminosäuren um die Aggrekanase-Spaltstelle herum reduziert.

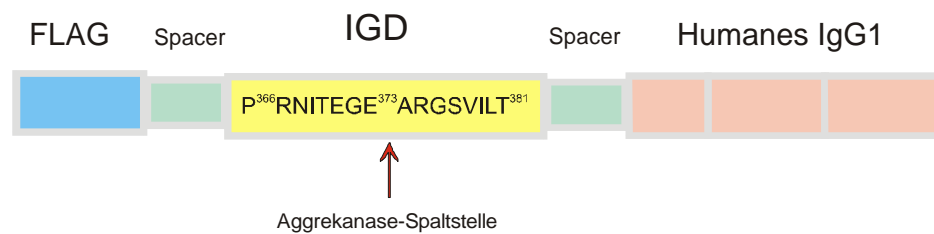


Abb. 14: Schematische Darstellung des rekombinanten Fusionsproteins rAgg2. Der Ausschnitt der interglobulären Domäne (IGD) des humanen Aggrekans ist auf 16 Aminosäuren um die Aggrekanase-Spaltstelle begrenzt. Ein zusätzliches Spacer-Peptid GGG trennt das FLAG-Epitop von der IGD.

Das Konstrukt wurde mit den überlappenden Primern rAgg2 F und rAgg2 R (2.9) hergestellt, die für die 8 Aminosäuren vor und hinter der Aggrekanase-Spaltstelle kodierten (Büttner, unveröffentlicht). Nach einer Klenow-Auffüllreaktion wurde der Abschnitt PCR-amplifiziert und über die flankierenden *NheI*- und *BamHI*-Restriktionsschnittstellen in den eukaryontischen Expressionsvektor pCDM8 ligiert. Das Konstrukt wurde in COS-7 Zellen exprimiert und analog zu rAgg1_{mut} über eine Anti-FLAG-Affinitätssäule gereinigt. Die korrekte Expression wurde mit SDS-PAGE (s. Abb. 21, Bahn 7) und im Anti-Human IgG- und Anti-FLAG-Western Blot verifiziert (Daten nicht gezeigt).

Der Einsatz von rAgg2 im Rattenchondrosarkom-Aggrekanase-Assay und die anschließende Analyse im BC-3-ELISA zeigen, daß das Fusionsprotein nicht an der Aggrekanase-Spaltstelle proteolysiert wird (Abb. 15).

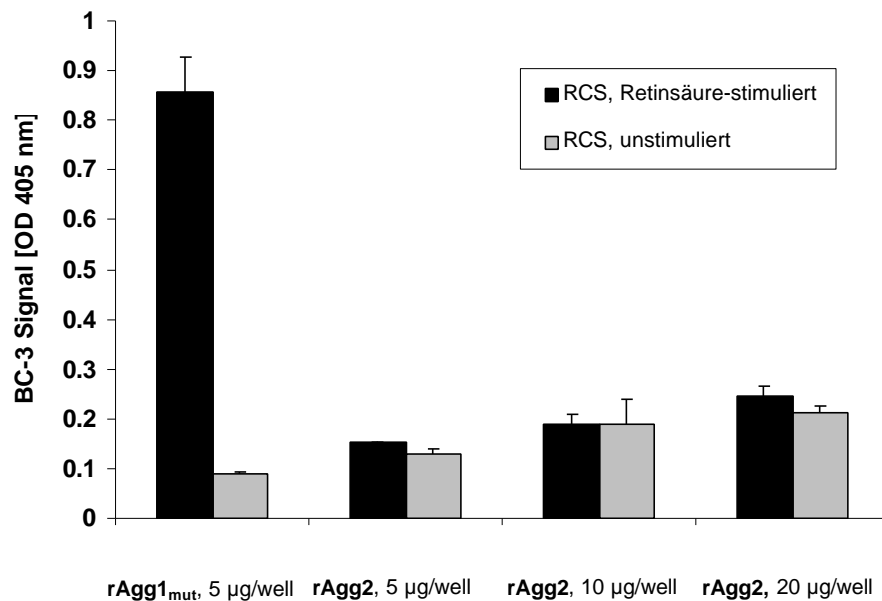


Abb. 15: Das Fusionprotein rAgg2 im Vergleich zu rAgg1_{mut} als Substrat im Rattenchondrosarkom-Aggrekanase-Assay. 5 µg/well rAgg1_{mut} bzw. 5, 10 und 20 µg/well rAgg2 wurden zu stimulierten und nicht-stimulierten RCS Zellen gegeben. Aggrekan-Spaltprodukte mit dem Neopepitop A³⁷⁴RGSV... wurden im BC-3-ELISA nachgewiesen.

Aufgrund der genannten Beobachtungen wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, Aggrekanase benötige zusätzlich zur eigentlichen Aggrekanase-Spaltstelle noch weitere Substratdomänen, um Aggrekan effizient zwischen E³⁷³ und A³⁷⁴ zu proteolysieren. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde das funktionale, rekombinante Substrat rAgg1_{mut} schrittweise am Amino- bzw. am Carboxyterminus der interglobulären Domäne verkürzt. Diese Deletionsmutanten von rAgg1_{mut} wurden im Rattenchondrosarkom-Aggrekanase-Assay auf ihre Spaltbarkeit getestet, um eine für Aggrekanase minimal notwendige Substratgröße zu definieren.

4.3.1 N-terminale Deletionen der IGD von rAgg1_{mut}

Die N-terminalen Deletionsmutanten des Aggrekanasesubstrats rAgg1_{mut} wurden über PCR-Klonierung generiert. Die genetischen Konstrukte hierfür wurden mit einer Serie von Vorwärts-Primern (ΔN1 F bis ΔN5 F, s. 2.9) hergestellt, die eine *NheI*-Restriktionsschnittstelle und das FLAG-Epitop kodierte, gefolgt von der Sequenzinformation für die IGD ab der gewünschten Aminosäure. Der Rückwärts-Primer (ΔN R) kodierte den C-Terminus der IGD und eine *BamHI*-Restriktionsschnittstelle und war für alle Konstrukte gleich. Nach PCR-Amplifikation mit pCDM8/rAgg1_{mut} als Matrize konnte das Konstrukt über die beiden

Restriktionsschnittstellen in den mit *NheI* und *BamHI* geschnittenen Expressionsvektor pCDM8 ligiert werden. Folgende Mutanten mit N-terminaler Deletion der IGD, bezeichnet als $\Delta N1$ bis $\Delta N5$, wurden nach dieser Methode hergestellt (Abb. 16):

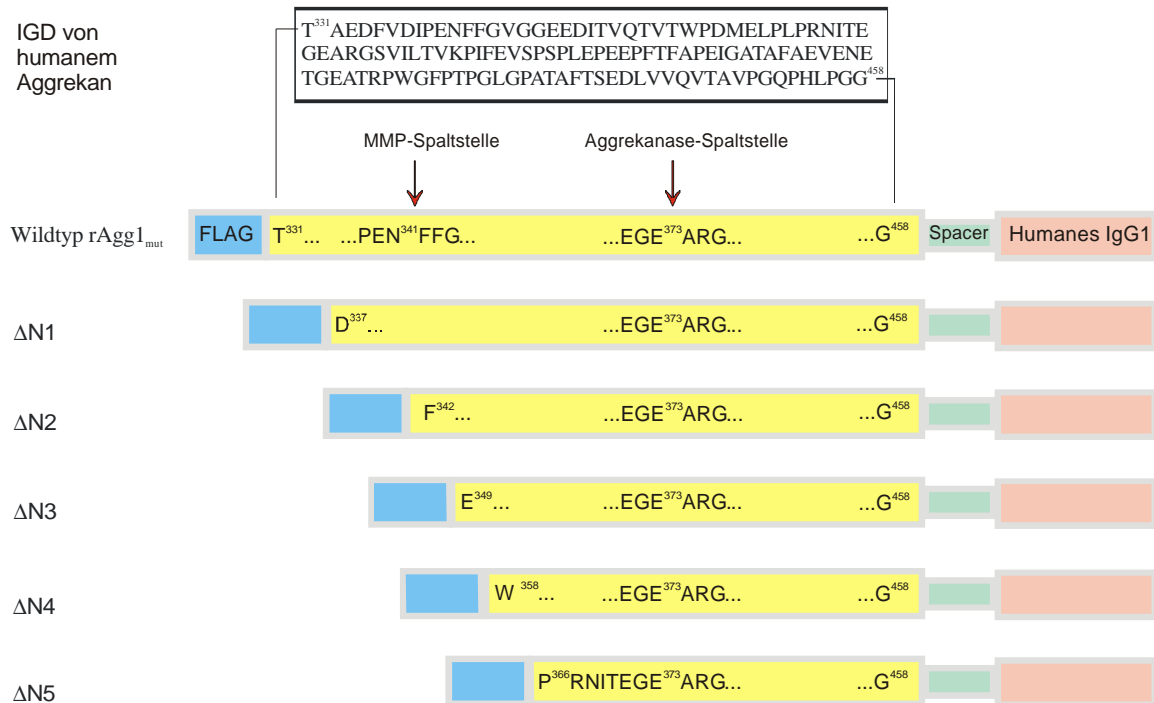


Abb. 16: N-terminale Deletionsmutanten von rAgg1_{mut}. Die interglobuläre Domäne von humanem Aggrecan wurde schrittweise am Aminoterminus verkürzt. Die Mutanten wurden $\Delta N1$ bis $\Delta N5$ genannt.

Die Expression der Deletionsmutanten erfolgte eukaryontisch in COS-7 Zellen. Zur Aufreinigung der Fusionsproteine wurde wie für das Wildtyp-Substrat eine Anti-FLAG-M1-Affinitätssäule verwendet. Die Ausbeuten an gereinigtem Fusionsprotein betragen 2-4 mg/l Transfektionsüberstand und gleichen damit der Ausbeute an Wildtyp-rAgg1_{mut}. Die Reinheit und das Molekulargewicht der Proteine wurden auf einem Coomassie Blau-gefärbten, 10 %igen SDS-PAGE Gel untersucht (Abb. 17).

Die Substratmutanten zeigen eine höhere elektrophoretische Mobilität, die mit dem reduzierten Molekulargewicht im Vergleich zu Wildtyp-rAgg1_{mut} in Einklang steht. Wie bei rAgg1_{mut} ist auch bei den Substratderivaten ein anomales Laufverhalten zu beobachten, denn die Deletionen scheinen eine größere Molekulargewichtsveränderung zur Folge zu haben als es rechnerisch aufgrund der Anzahl der entfernten Aminosäuren der Fall sein sollte. Alle Fusionsproteine trennen sich als nur eine Bande auf und scheinen wie das Wildtyp-Substrat glykosyliert zu sein, worauf die relativ diffusen Banden hinweisen.

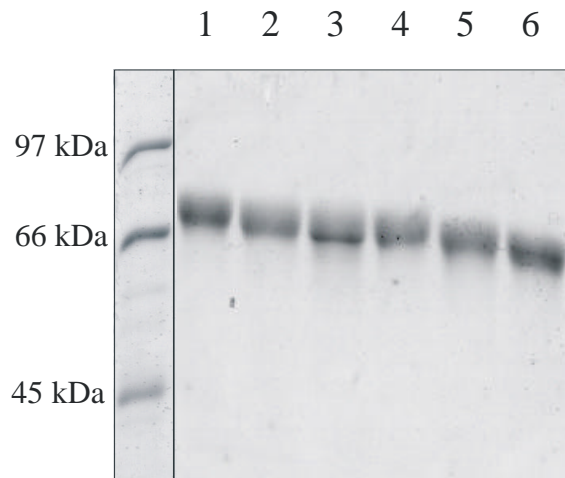


Abb. 17: SDS-PAGE der N-terminalen Deletionsmutanten von rAgg1_{mut}. Ein 10% iges Polyacrylamidgel wurde unter reduzierenden, denaturierenden Bedingungen gefahren. 3 µg jedes Fusionsproteins wurden aufgetragen. Bahn 1: Wildtyp rAgg1_{mut}. Bahn 2 bis 6: N-terminale Deletionsmutanten ΔN1 bis ΔN5.

Die N-terminalen Deletionsmutanten von rAgg1_{mut} wurden im Rattenchondrosarkom-Aggrekanase-Assay auf ihre Funktionalität als Aggrekanase-Substrate getestet, wobei der Nachweis Aggrekanase-generierter Neoepitope im BC-3 ELISA erfolgte.

Um unterschiedliche BC-3 Signale zueinander in Bezug stellen zu können, mußte zunächst der lineare Bereich des BC-3 ELISAs bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurde ein BC-3-Standardprotein hergestellt, das mit dem BC-3 reaktiven Epitop A³⁷⁴RGSV... begann, mit der humanen IgG Domäne endete und damit Aggrekanase-katabolisiertes rAgg1_{mut} repräsentierte. Die Herstellung erfolgte über PCR-Klonierung mit pCDM8/rAgg1_{mut} als Matrize. Der Vorwärts-Primer (BC-3-Standard F, s. 2.9) kodierte eine *NheI*-Restriktionsschnittstelle gefolgt von der Sequenzinformation für ARGSVILT, als Rückwärts-Primer wurde ΔN R wie für die N-terminalen Deletionsmutanten verwendet. Die Klonierung in den Vektor pCDM8 und die Expression in COS-7 Zellen erfolgte analog zu den rAgg1_{mut}-Deletionsmutanten. Das Konstrukt wurde über eine HiTrap Protein G-Sepharose-Säule gereinigt (3.5.2). Die Titration des BC-3-Standardproteins im BC-3 ELISA zeigt einen linearen Anstieg des BC-3 Signals von 31 bis 500 ng Protein pro Vertiefung der Assayplatte (Abb. 18). Die BC-3 Signale, die durch die katabolen Produkte von rAgg1_{mut} erzeugt wurden, lagen in diesem linearen Bereich, wobei optische Dichten größer 1.5 in der Auswertung nicht berücksichtigt wurden.

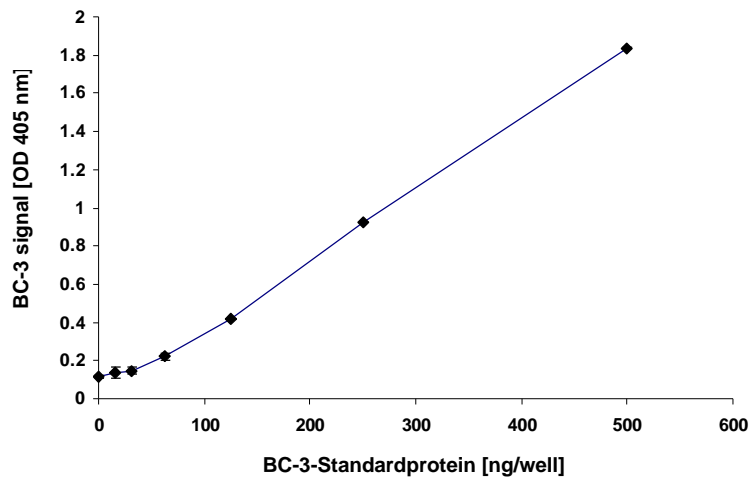


Abb. 18: Linearer Bereich des BC-3 ELISAs. Die Linearität wurde mit Hilfe eines BC-3 reaktiven Standardproteins bestimmt, das mit A³⁷⁴RGSV... begann und mit der humanen IgG Domäne, analog zu rAgg1_{mut}, endete.

Abb. 18 zeigt, daß die BC-3 Signale unter den gewählten Bedingungen proportional zu gebundenen BC-3 reaktiven Fragmenten sind.

Für die Testung der N-terminalen Deletionsmutanten von rAgg1_{mut} auf ihre Funktionalität als Aggrekanase-Substrate im Rattenchondrosarkom-Aggrekanase-Assay wurden 5 µg jedes Fusionsproteins pro Vertiefung zu Retinsäure-stimulierten RCS Zellen in der 96-well-Zellkulturplatte pipettiert. Die Ergebnisse der Katabolisierung der Substratmutanten aus 3 bis 5 unabhängigen Experimenten sind in Abb. 19 dargestellt, wobei für jede Substratvariante eine Dreifachbestimmung durchgeführt wurde. Die BC-3 Signale, die im linearen Bereich des ELISAs lagen, sind relativ zu dem durch Spaltung des Wildtyp-Substrats erzeugten BC-3 Signal dargestellt. Die Hintergrundsignale, erzeugt durch Zugabe der Substrate zu unstimulierten RCS Zellen, sind bei allen rAgg1_{mut}-Derivaten ähnlich und wurden für die Darstellung subtrahiert. Abb. 19 zeigt, daß die aminoterminale Deletion der ersten 6 Aminosäuren der IGD, repräsentiert durch die Mutante ΔN1, keinen Einfluß auf die Spaltbarkeit durch Aggrekanase hat. Im Gegensatz dazu wird die Mutante ΔN2, die um die N-terminalen Aminosäuren bis zur MMP-Spaltstelle verkürzt ist, wesentlich schwächer durch Aggrekanase gespalten. Das BC-3 Signal beträgt nur 43% des durch die Spaltung von rAgg1_{mut} erzeugten Signals. Die Mutante ΔN3, bei der die gesamte MMP-Spaltstelle deletiert ist, wird zu einem ähnlichen Ausmaß wie ΔN2 katabolisiert. Das BC-3 Signal erreicht 46% im Vergleich zum Wildtyp-Substrat. Eine weitere Verkürzung des Aminoterminus der IGD, bei der nur noch 16 bzw. 8 Aminosäuren der Aggrekanase-Spaltstelle vorangehen, verhindert die Aggrekanase-Spaltung vollständig, wie anhand der Mutanten ΔN4 und ΔN5 gezeigt ist.

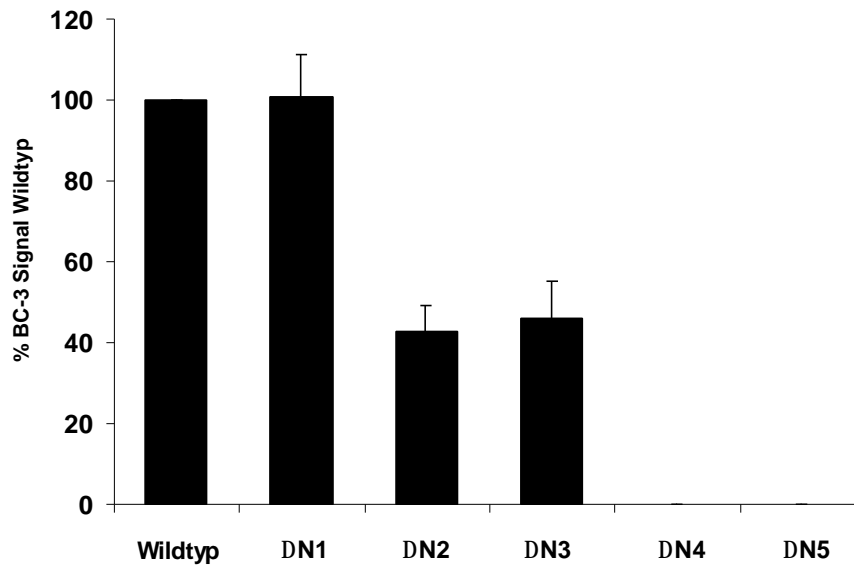


Abb. 19: Katabolismus der N-terminalen Deletionsmutanten von rAgg1_{mut} im RCS-Aggrekanase-Assay. 5 µg jedes Fusionsproteins wurden pro Vertiefung im 96-well-Format eingesetzt. Aggrekan-Spaltprodukte mit dem Neoepitop A³⁷⁴RGSV... wurden im BC-3-ELISA nachgewiesen. Die BC-3 Signale wurden auf die Umsetzung von Wildtyp-rAgg1_{mut} bezogen. Der Mittelwert ± Standardabweichung von 3 bis 5 separaten Experimenten, jeweils mit Dreifachbestimmung, ist dargestellt.

Demnach wird das rekombinante Aggrekan rAgg1_{mut} nicht mehr effizient an der Aggrekanase-Spaltstelle geschnitten, wenn der N-Terminus der IGD auf 32 Aminosäuren oder weniger vor der Aggrekanase-Schnittstelle verkürzt ist.

4.3.2 C-terminale Deletionen der IGD von rAgg1_{mut}

Die genetischen Konstrukte zur Herstellung der Mutanten mit C-terminal verkürzter IGD wurden mit einer Serie von Rückwärts-Primern (Δ C1 R bis Δ C6 R, s. 2.9) hergestellt, die für eine *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle kodierten, gefolgt von der Sequenzinformation für die gewünschten carboxyterminalen Aminosäuren der IGD. Der Forwärts-Primer (Δ C F) kodierte für eine *Nhe*I-Restriktionsschnittstelle, das FLAG-Epitop und den Aminoterminus der IGD und war für alle Konstrukte gleich. Analog der Herstellung der N-terminalen Deletionsmutanten wurden die PCR-amplifizierten Konstrukte über die beiden Restriktionsschnittstellen in den mit *Nhe*I und *Bam*HI geschnittenen Expressionsvektor pCDM8 ligiert. Folgende C-terminale Deletionsmutanten von rAgg1_{mut}, bezeichnet als Δ C1 bis Δ C6, wurden hergestellt (Abb. 20):

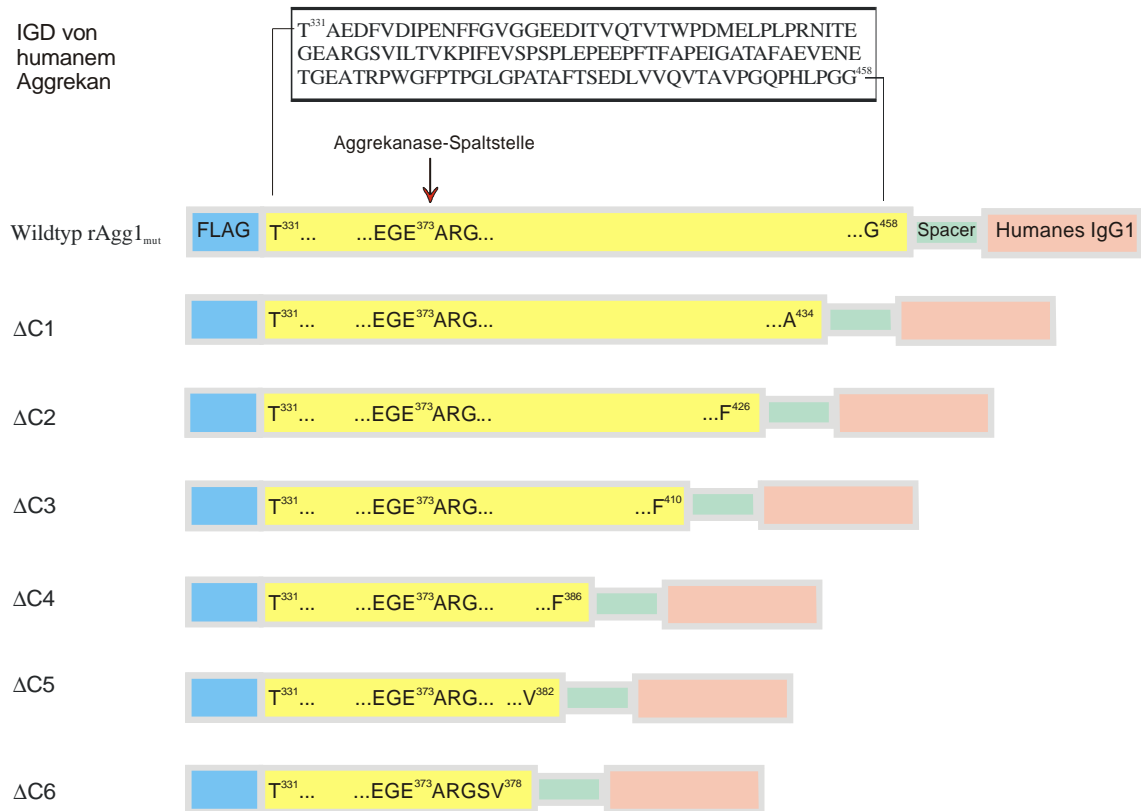


Abb. 20: C-terminale Deletionsmutanten von rAgg1_{mut}. Die interglobuläre Domäne von humanem Aggrekan wurde schrittweise am Carboxyterminus verkürzt. Die Mutanten wurden ΔC1 bis ΔC6 genannt.

Die in COS-7 Zellen exprimierte Deletionsmutanten wurden über eine Anti-FLAG-M1-Affinitätssäule gereinigt. Auf einem 10 %igen SDS-PAGE Gel wurden Reinheit und Molekulargewicht der Fusionsproteine überprüft (Abb. 21). Alle C-terminalen Deletionsmutanten von rAgg1_{mut}, bis auf ΔC4, trennen sich als Einzelbanden auf, wobei sich die Deletionen in einer erhöhten elektrophoretischen Mobilität widerspiegeln. Die Mutante ΔC4 trennt sich als zwei Banden mit apparenten Molekulargewichten von etwa 50 und 45 kDa auf. Beide Banden färben sich im Western Blot sowohl mit dem M1-Antikörper gegen das aminotermine FLAG-Epitop als auch mit einem Antikörper gegen die carboxyterminale humane IgG-Domäne an (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, daß in der 45 kDa-Bande ein zentraler Bereich des Fusionsproteins fehlt. Um diesen Bereich zu identifizieren, wurden beide Banden einer Aminosäuresequenzierung unterzogen. Das Ergebnis beider Banden unterscheidet sich um genau ein Proteinfragment, das in der 50 kDa-Bande detektiert wird aber in der 45 kDa-Bande fehlt. Dieses Fragment ist in der Hinge-Region des humanen IgG lokalisiert. Da die Sequenzinformation für das humane IgG im pCDM8-Vektor als Exon-Intron-Organisation vorliegt, ist es möglich, daß beim Spleißen die Spleißakzeptor-Stelle vor

der Hinge-Region übergangen und stattdessen die nächste Spleißakzeptor-Stelle vor der CH2-Domäne verwendet wird. Dieser alternative Spleißvorgang hätte ein Ausschneiden der Hinge-Region zur Folge und könnte den Größenunterschied zwischen den beiden Banden von ?C4 erklären.

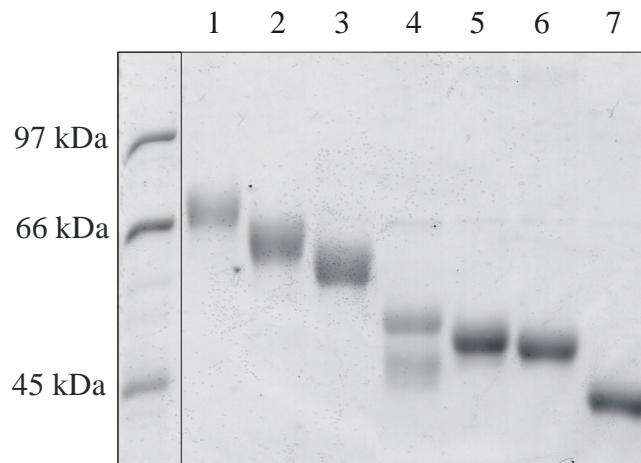


Abb. 21: SDS-PAGE der C-terminalen Deletionsmutanten von $rAgg1_{mut}$. Ein 10%iges Polyacrylamidgel wurde unter reduzierenden, denaturierenden Bedingungen gefahren. 3 μ g jedes Fusionsproteins wurden aufgetragen. Bahn 1 bis 6: C-terminale Deletionsmutanten $\Delta C1$ bis $\Delta C6$. Bahn 7: $rAgg2$ (s. 4.3).

Wie für die N-terminalen Deletionsmutanten von $rAgg1_{mut}$ beschrieben (4.3.1), wurden auch die am C-Terminus trunkierten Mutanten im Rattenchondrosarkom-Aggrekanase-Assay auf ihre Funktionalität als Aggrekanase-Substrate getestet. Die Versuchsbedingungen waren identisch. Die Ergebnisse von 3 bis 5 unabhängigen Experimenten sind in Abb. 22 dargestellt. Die relativen BC-3 Signale der Mutanten $\Delta C1$ bis $\Delta C4$, bezogen auf das durch Aggrekanase-Spaltung des Wildtyps $rAgg1_{mut}$ generierte BC-3 Signal, zeigen, daß die Deletion C-terminaler Aminosäuren der IGD keinen negativen Effekt auf die Spaltbarkeit durch Aggrekanase hat, wenn 13 Aminosäuren oder mehr der Aggrekanase-Schnittstelle folgen. Die BC-3 Signale, die durch die Spaltung dieser Mutanten erzeugt werden, erreichen 121, 168, 148 und 150% des Wildtyp-Signals. Die verbesserte Spaltbarkeit dieser Mutanten könnte in einer entspannteren Konformation im Vergleich zum Substrat mit vollständiger IGD begründet sein. Möglicherweise stellt die C-terminale Region in der dreidimensionalen Struktur von $rAgg1_{mut}$ ein sterisches Hindernis für den Angriff durch Aggrekanase dar.

Eine starke Einschränkung der Umsetzung durch Aggrekanase wird für die Mutante $\Delta C5$ beobachtet, die nur noch 9 Aminosäuren C-terminal zur Aggrekanase-Spaltstelle besitzt. Das BC-3 Signal der Spaltprodukte dieser Mutante beträgt nur 9 % des Wildtyp BC-3 Signals. $\Delta C6$, mit nur 5 Aminosäuren C-terminal zur Aggrekanase-Spaltstelle, erzeugt im

Aggrekanase-Assay überhaupt kein BC-3 Signal, was auf einen vollständigen Verlust der Spaltbarkeit durch Aggrekanase hinweist.

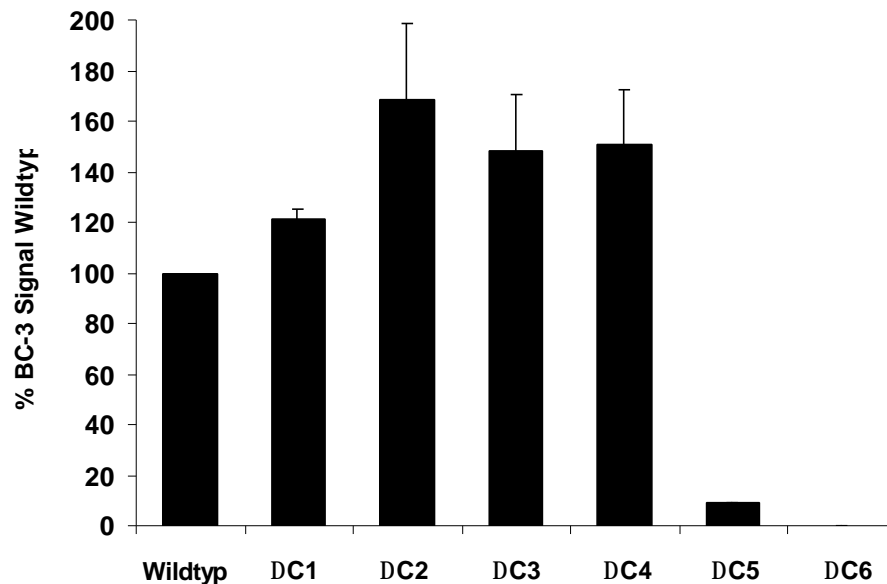


Abb. 22: Katabolismus der C-terminalen Deletionsmutanten von rAgg1_{mut} im RCS-Aggrekanase-Assay. 5 µg jedes Fusionsproteins wurden pro Vertiefung im 96-well-Format eingesetzt. Aggrekan-Spaltprodukte mit dem Neoepitop A³⁷⁴RGSV... wurden im BC-3-ELISA nachgewiesen. Die BC-3 Signale wurden auf die Umsetzung von Wildtyp-rAgg1_{mut} bezogen. Der Mittelwert ± Standardabweichung von 3 bis 5 separaten Experimenten, jeweils mit Dreifachbestimmung, ist dargestellt.

Im Gegensatz zu den N-terminalen Deletionen der IGD, die bereits bei einer Reduktion auf 32 Aminosäuren N-terminal zur Aggrekanase-Schnittstelle eine deutlich eingeschränkte Aggrekanase-Spaltbarkeit zur Folge haben, zeigen die C-terminalen Deletionen bei vergleichbarer Verkürzung demnach keinen negativen Einfluß auf die Empfindlichkeit gegenüber Aggrekanase. Die Spaltung des rekombinanten Aggrekans rAgg1_{mut} an der Aggrekanase-Schnittstelle ist also nicht effizient, wenn das Substrat N-terminal auf 32 Aminosäuren oder weniger und C-terminal auf 9 Aminosäuren oder weniger von der Spaltstelle entfernt verkürzt wird.

Dieses Ergebnis deutet auf eine besondere Rolle des Aminoterminus der IGD von Aggrekan für den Aggrekanase-Katabolismus hin. Bei der Frage nach charakteristischen Eigenschaften der IGD auf der N-terminalen Seite der Aggrekanase-Spaltstelle, die möglicherweise relevant für eine effiziente Aggrekanase-Spaltung sein könnten, fällt die MMP-Spaltstelle als einzige Sequenz mit einer beschriebenen Funktion auf. Außerdem zeigt sich bei der Serie der N-terminalen Deletionen von rAgg1_{mut} eine drastische Einschränkung der Spaltbarkeit durch Aggrekanase, wenn der Aminoterminus der IGD bis zur MMP-Spaltstelle verkürzt und diese

damit inaktiviert wird (Mutante $\Delta N2$). Aus diesem Grund sollte im folgenden untersucht werden, ob die Funktionalität der MMP-Spaltstelle für eine effiziente Aggrekanase-Spaltung von Bedeutung ist.

4.3.3 Mutation der MMP-Spaltstelle

Die MMP-Spaltstelle im rekombinanten Aggrekan $rAgg1_{mut}$ sollte funktional ausgeschaltet werden, um den Effekt auf die Spaltbarkeit des Substrats durch Aggrekanase zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden durch ortsspezifische Mutagenese zwei Aminosäuren auf der N-terminalen Seite der MMP-Spaltstelle ausgetauscht, die maßgeblich die Spezifität vieler MMPs für diese Spaltstelle bestimmen: D^{337} und P^{339} . Die Aminosäure D^{337} wurde durch A ersetzt und P^{339} durch N, da A in Position P_5 und N in Position P_3 als inhibitorisch für die MMP-Spaltung beschrieben wurden (77). Die resultierende Mutante von $rAgg1_{mut}$ mit der Sequenz $\dots A^{337}IN^{339}ENFFGVG\dots$ wurde rA^M genannt und ist in Abb.23 schematisch dargestellt.

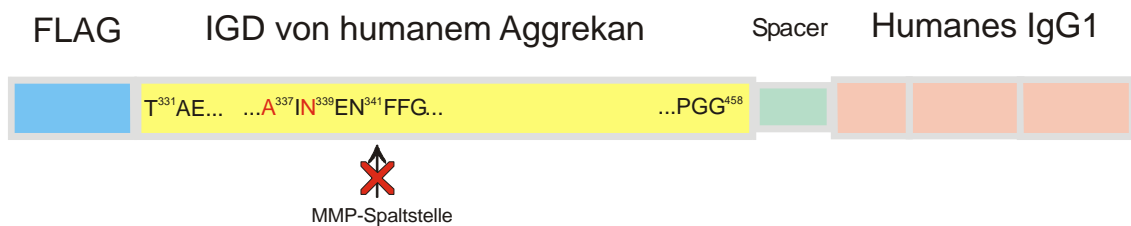


Abb. 23: Schematische Darstellung der Punktmutante rA^M von eukaryontisch exprimiertem $rAgg1_{mut}$. Durch den Austausch der Aminosäure Aspartat durch Alanin in Position 337 und Prolin durch Asparagin in Position 339 wurde die MMP-Spaltstelle funktional ausgeschaltet.

Zur Einführung der Punktmutationen in den eukaryontischen Expressionsvektor $pCDM8/rAgg1_{mut}$ wurde das QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kits von Stratagene unter Verwendung der Primer $A^{337}IN^{339}EN$ F und $A^{337}IN^{339}EN$ R (s. 2.9) benutzt. Das Konstrukt wurde in COS-7 Zellen exprimiert und analog zum Wildtyp- $rAgg1_{mut}$ über eine Anti-FLAG-Affinitätssäule gereinigt. Eine SDS-PAGE Analyse zeigt, daß sich das apparente Molekulargewicht der Mutante gegenüber dem Wildtyp nicht ändert (Daten nicht gezeigt).

Um zu überprüfen, ob die eingeführten Punktmutationen in rA^M tatsächlich die Spaltung durch MMPs zwischen N^{341} und F^{342} verhindern, wurde die Mutante mit der katalytischen Domäne von MMP-3 als repräsentative Matrix-Metalloprotease inkubiert. MMP-3 ist in der Lage, $rAgg1_{mut}$ an der allgemeinen MMP-Spaltstelle zu proteolysieren (40). MMP-Spaltungsaktivität wurde in einem ELISA unter Verwendung des BC-14-Antikörpers, der

spezifisch das durch MMP-Spaltung generierte Neopeptid $F^{342}FG\dots$ erkennt, nachgewiesen. Dabei zeigt sich, daß rA^{M-} tatsächlich nicht von MMP-3 an der allgemeinen MMP-Spaltstelle proteolytisch wird (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß der doppelte Aminosäureaustausch die Funktionalität der allgemeinen MMP-Spaltstelle in rA^{M-} aufhebt.

Der Einfluß der mutierten MMP-Schnittstelle auf die Aggrekanase-Spaltung wurde nun im RCS Aggrekanase-Assay untersucht. 5 μg der Mutante rA^{M-} bzw. des Wildtyp- $rAgg1_{mut}$ wurden pro Vertiefung mit Retinsäure-stimulierten RCS Zellen inkubiert und die Aggrekanase-Spaltprodukte im BC-3 ELISA nachgewiesen. Das Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten mit Dreifachbestimmung ist in Abb. 24 dargestellt.

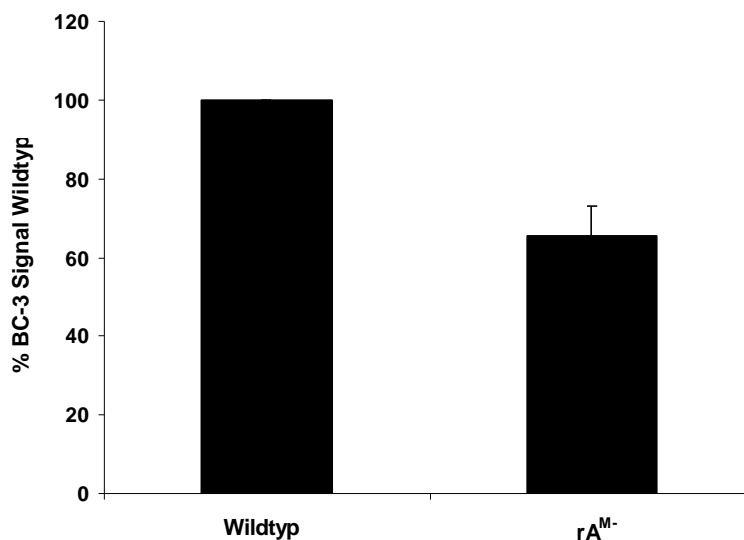


Abb. 24: Katabolismus der Punktmutante rA^{M-} von $rAgg1_{mut}$ im RCS-Aggrekanase-Assay. 5 μg wurden pro Vertiefung im 96-well-Format eingesetzt. Aggrekan-Spaltprodukte mit dem Neopeptid $A^{374}RGSV\dots$ wurden im BC-3-ELISA nachgewiesen. Die BC-3 Signale wurden auf die Umsetzung von Wildtyp- $rAgg1_{mut}$ bezogen. Der Mittelwert \pm Standardabweichung von 3 separaten Experimenten, jeweils mit Dreifachbestimmung, ist dargestellt.

Die Umsetzung der Mutante rA^{M-} durch RCS-Aggrekanase ist im Vergleich zum Wildtyp-Substrat eingeschränkt, worauf das auf 65% reduzierte BC-3 Signal hinweist. Offensichtlich führt das Ausschalten der allgemeinen MMP-Schnittstelle zu einer verminderten Spaltbarkeit durch die in RCS Zellen induzierte Aggrekanase.

Zusammenfassend zeigen die Studien zum Katabolismus durch RCS-Aggrekanase,

1. daß ein rekombinantes Aggrekan-Substrat, das nur acht Aminosäuren N-terminal und acht Aminosäuren C-terminal der Aggrekanase-Spaltstelle umfaßt, nicht von Aggrekanase katabolisiert wird.

2. daß ein rekombinantes Aggrekan-Substrat mehr als 32 Aminosäuren N-terminal aber nur zwischen 9 und 13 Aminosäuren C-terminal zur Aggrekanase-Spaltstelle umfassen muß, um von Aggrekanase effizient katabolisiert zu werden.
3. daß die MMP-Spaltstelle 32 Aminosäuren N-terminal zur Aggrekanase-Spaltstelle für die Katabolisierung durch Aggrekanase nicht funktional intakt vorliegen muß, dies aber die Effizienz der Aggrekanase-Spaltung fördert.

Diese Eigenschaften, die auf eine besondere Funktion des Aminoterminus der IGD von rAgg1_{mut} für einen effizienten Aggrekanase-Katabolismus hinweisen, wurden für die in Rattenchondrosarkomzellen induzierte Aggrekanase-Aktivität bestimmt. Ihre Gültigkeit sollte nun auch in anderen Aggrekanase-Systemen überprüft werden.

4.4 Vergleich des Katabolismus der rAgg1_{mut}-Deletionsmutanten durch verschiedene Aggrekanase-Aktivitäten

4.4.1 Aggrekanase-Aktivität von Schweinechondrozyten

Die Deletions- und Punktmutanten von rAgg1_{mut} sowie rAgg2 sollten auf ihre Spaltbarkeit durch Aggrekanase von induzierten Schweinechondrozyten getestet werden. Bei der Enzymaktivität handelt es sich um eine durch IL-1 α induzierte, lösliche Aggrekanase-Aktivität. Fünf μ g jedes Fusionsproteins wurden als Substrat pro Vertiefung im Assay eingesetzt und das Aggrekanase-generierte Neopepitop A³⁷⁴RGSV... durch den monoklonalen Antikörper BC-3 im ELISA nachgewiesen. Das Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten mit Dreifachbestimmung ist in Abb. 25 dargestellt.

Wie im RCS-Aggrekanase-Assay beobachtet, nimmt die Spaltbarkeit des rekombinanten Substrats auch für die lösliche Schweine-Aggrekanase mit abnehmender Länge des Aminoterminus der IGD ab. Dies zeigt das schrittweise reduzierte BC-3 Signal nach Katabolisierung der Mutanten Δ N1 bis Δ N5. Besonders deutlich ist die Reduktion der BC-3-Reaktivität für die Mutante Δ N2, bei der die aminoterminalen Seite der MMP-Schnittstelle deletiert ist, aber noch 32 Aminosäuren vor der Aggrekanase-Spaltstelle erhalten bleiben. Das BC-3 Signal beträgt nur 58% des Wildtyp-BC-3 Signals. Die Deletion sieben weiterer Aminosäuren (Δ N3) schränkt die Spaltbarkeit durch die Schweine-Aggrekanase noch stärker ein, und die Mutanten Δ N4 und Δ N5 werden praktisch nicht umgesetzt. Die C-terminalen Verkürzungen der IGD in Δ C1 bis Δ C4 haben wie auch im RCS-Assay keinen negativen Effekt auf die Umsetzung durch die lösliche Schweine-Aggrekanase. Die BC-3 Signale

übertreffen sogar die des Wildtyp-rAgg1_{mut} um 69-95%. Erst Δ C5 wird kaum noch durch Aggrekanase katabolisiert, und Δ C6 wird überhaupt nicht an der Aggrekanase-Spaltstelle proteolysiert. Die Umsetzung der Punktmutante rA^M erzeugt im Gegensatz zum RCS-Assay ein vergleichbares BC-3 Signal wie Wildtyp-Agg1_{mut}, was darauf hinweist, daß die in Schweinechondrozyten induzierte Aggrekanase unsensibel gegenüber der Mutation der MMP-Spaltstelle ist. Das Fusionsprotein rAgg2 wird von der löslichen Schweine-Aggrekanase wie von der RCS-Aggrekanase nicht proteolysiert.

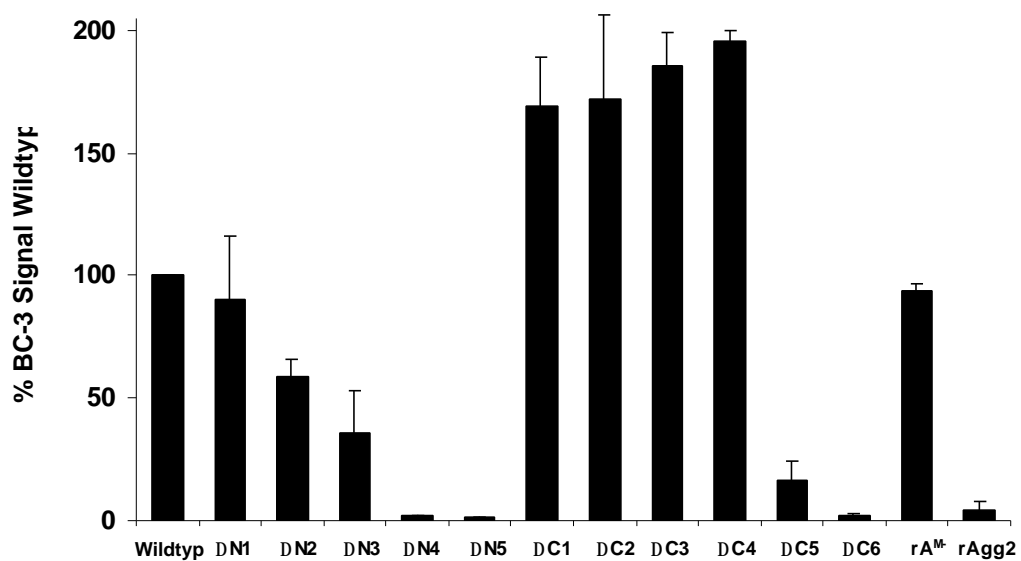


Abb. 25: Katabolismus der Deletions- und Punktmutanten von rAgg1_{mut} und rAgg2 im Assay mit löslicher Aggrekanase von Schweinechondrozyten. 5 μ g jedes Fusionsproteins wurden pro Vertiefung im 96-well-Format eingesetzt. Aggrekan-Spaltprodukte mit dem Neoepitop A³⁷⁴RGSV... wurden im BC-3-ELISA nachgewiesen. Die BC-3 Signale wurden auf die Umsetzung von Wildtyp-rAgg1_{mut} bezogen. Der Mittelwert \pm Standardabweichung von 3 separaten Experimenten, jeweils mit Dreifachbestimmung, ist dargestellt.

Das Substratprofil, das anhand der Deletionsmutanten von rAgg1_{mut} für die lösliche Schweine-Aggrekanase ermittelt wurde, ähnelt demnach stark dem Profil der Rattenchondrosarkom-Aggrekanase. Auch hier zeigt sich eine besondere Rolle des Aminoterminus der IGD für eine effiziente Katabolisierung, die für den Carboxyterminus nicht beobachtet wird.

4.4.2 Humane rekombinante ADAMTS4

Für einen weiteren Vergleich der Substratanforderungen verschiedener Aggrekanase-Systeme wurde humane rekombinante Aggrekanase-1 (ADAMTS4) auf die Spaltung der Deletions- und Punktmutanten von rAgg1_{mut} untersucht. Das Enzym wurde in kompletter Länge in Sf9-Insektzellen exprimiert. Fünf µg jedes Fusionsproteins wurden als Substrat pro Vertiefung im ADAMTS4-Assay eingesetzt und das Aggrekanase-generierte Neoepitop A³⁷⁴RGSV... durch den monoklonalen Antikörper BC-3 im ELISA nachgewiesen. Das Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten mit Dreifachbestimmung ist in Abb. 26 dargestellt.

Auch im ADAMTS4-Assay erweist sich die schrittweise N-terminale Verkürzung der IGD von rAgg1_{mut} als hemmend für die Spaltung an der Aggrekanase-Schnittstelle. Bereits die Deletion von 6 Aminosäuren (ΔN1) führt zu einer verminderten Aggrekanase-Spaltung. Eine deutliche Reduktion des BC-3 Signals auf 51% im Vergleich zum Wildtyp-Substrat geht mit der Deletion der aminoterminalen Seite der MMP-Spaltstelle einher (ΔN2). Das Ausmaß der Umsetzung dieser Substratvariante steht damit im Einklang mit der Umsetzung durch RCS-Aggrekanase und Schweine-Aggrekanase.

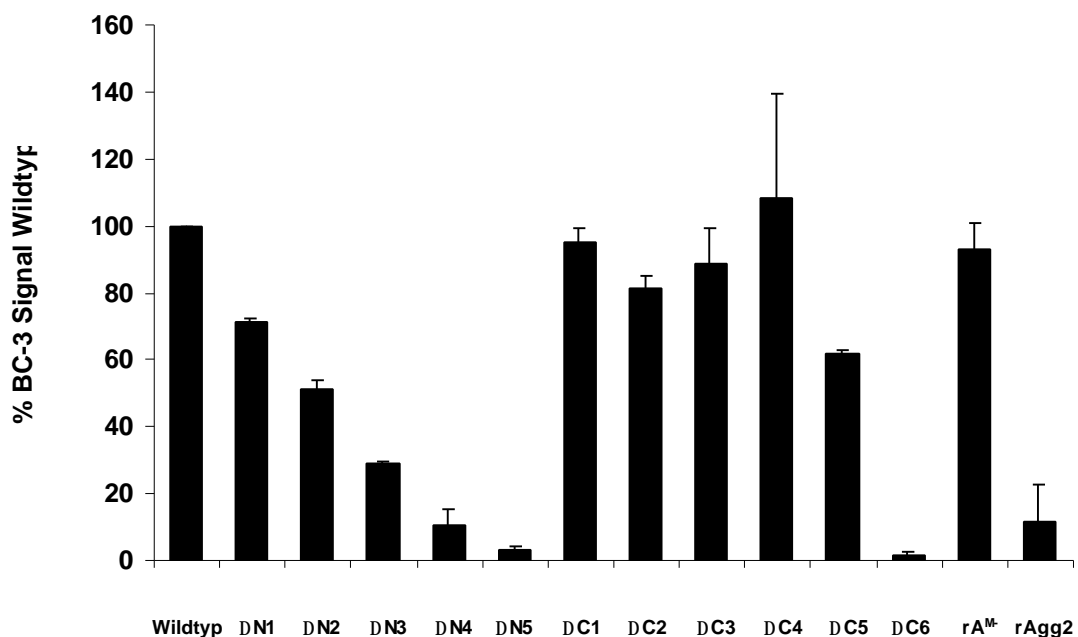


Abb. 26: Katabolismus der Deletions- und Punktmutanten von rAgg1_{mut} und rAgg2 im ADAMTS4-Assay. 5 µg jedes Fusionsproteins wurden pro Vertiefung im 96-well-Format eingesetzt. Aggrekan-Spaltprodukte mit dem Neoepitop A³⁷⁴RGSV... wurden im BC-3-ELISA nachgewiesen. Die BC-3 Signale wurden auf die Umsetzung von Wildtyp-rAgg1_{mut} bezogen. Der Mittelwert ± Standardabweichung von 3 separaten Experimenten, jeweils mit Dreifachbestimmung, ist dargestellt.

Auch bezüglich der weiteren Substratverkürzungen am N-Terminus verhält sich ADAMTS4 ähnlich wie die beiden anderen Aggrekanase-Systeme: mit fortschreitender Deletion läßt die Spaltbarkeit durch ADAMTS4 nach, wobei $\Delta N4$ kaum noch und $\Delta N5$ nicht mehr umgesetzt werden. Die C-terminalen Deletionen der IGD in $\Delta C1$ bis $\Delta C4$ führen höchstens zu schwach negativen Effekten oder zu keinem Effekt auf die Spaltbarkeit der Substrate durch ADAMTS4. Erst die Mutante $\Delta C5$ wird deutlich schwächer von ADAMTS4 umgesetzt, obwohl diese Spaltung ein BC-3 Signal von noch 62% im Vergleich zum Wildtyp-Substrat erzeugt. In diesem Punkt unterscheidet sich ADAMTS4 deutlich von den anderen getesteten Aggrekanase-Systemen, die lediglich BC-3 Signale von 9% (RCS-Aggrekanase) und 16% (Schweine-Aggrekanase) im Vergleich zur Spaltung des Wildtyp-Substrats erzielen. Die Mutante $\Delta C6$ wird von ADAMTS4 wie von den anderen getesteten Aggrekanase-Systemen nicht katabolisiert. Bezüglich der Umsetzung der Punktmutante rA^{M-} verhält sich ADAMTS4 wie die Schweine-Aggrekanase unsensibel gegenüber der Mutation der MMP-Spaltstelle und erzielt ein dem Wildtyp-Substrat vergleichbares BC-3 Signal. Die Substratvariante $rAgg2$ wird durch ADAMTS4 nur gering katabolisiert.

Das Substratprofil für humane rekombinante ADAMTS4, das anhand der Deletionsmutanten von $rAgg1_{mut}$ ermittelt wurde, ähnelt stark dem Profil der Rattenchondrosarkom- und Schweine-Aggrekanase. Auch hier zeigt sich eine besondere Rolle des Aminoterminus der IGD für eine effiziente Katabolisierung.

Besonders auffallend ist die in den drei Aggrekanase-Systemen übereinstimmende deutliche Einschränkung der Spaltbarkeit der Mutante $\Delta N2$. Die Sequenz der interglobulären Domäne von $\Delta N2$ beginnt mit $F^{342}FGVG...$, was dem aminoterminalen Neoepitop von Aggrekan nach MMP-Spaltung entspricht. Dieser Mutante kommt besondere Bedeutung zu, da mehrere Veröffentlichungen darauf hinweisen, daß MMP-gespaltenes natives Aggrekan *in vivo* und *in vitro* nicht weiter an der Aggrekanase-Schnittstelle proteolysiert wird (10,60). $\Delta N2$ ist jedoch nicht identisch mit einem MMP-gespaltenen Molekül $rAgg1_{mut}$, da dem Abschnitt der interglobulären Domäne noch das FLAG-Epitop DYKDDDDK vorausgeht. Um genauer zu untersuchen, ob ein MMP-gespaltenes Molekül von $rAgg1_{mut}$ noch durch Aggrekanase spaltbar ist und um somit die Rolle der Aminosäuren N-terminal zur MMP-Spaltstelle für den Aggrekanase-Katabolismus zu klären, wurde ein Fusionsprotein hergestellt, das identisch ist mit MMP-gespaltenem $rAgg1_{mut}$. Das Fusionsprotein wurde wegen seiner Reaktivität mit dem BC-14-Antikörper, der spezifisch das Neoepitop $F^{342}FG...$ erkennt, als BC-14-Standardprotein bezeichnet und ist in Abb. 27 schematisch dargestellt.

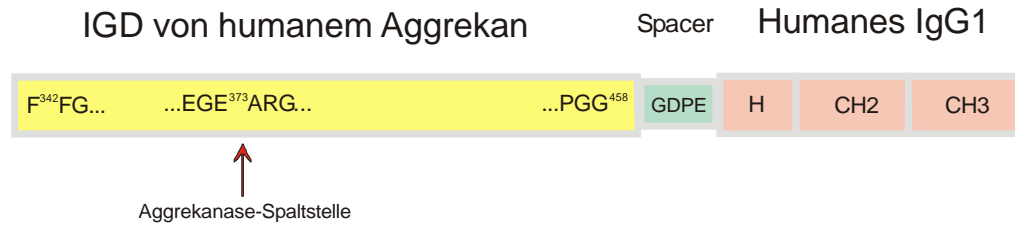


Abb. 27: Schematische Darstellung des BC-14-Standardproteins. Das Fusionsprotein entspricht dem an der MMP-Schnittstelle gespaltenen rAgg1_{mut}.

Das Konstrukt wurde analog zu den rAgg1_{mut}-Derivaten über PCR-Klonierung mit dem Vektor pCDM8/rAgg1_{mut} als Matrize hergestellt. Dafür wurde der Vorwärts-Primer BC-14-Standard F (2.9) verwendet, der eine *NheI*-Restriktionsschnittstelle gefolgt von der Sequenzinformation für FFGVGGEE kodierte. Als Rückwärts-Primer diente ΔN R (2.9) wie zur Herstellung der N-terminalen Deletionsmutanten von rAgg1_{mut}. Die Klonierung in den Vektor pCDM8 und die Expression in COS-7 Zellen erfolgte analog zu den rAgg1_{mut}-Deletionsmutanten. Das Konstrukt wurde über eine HiTrap Protein G-Sepharose-Säule (3.5.2) gereinigt.

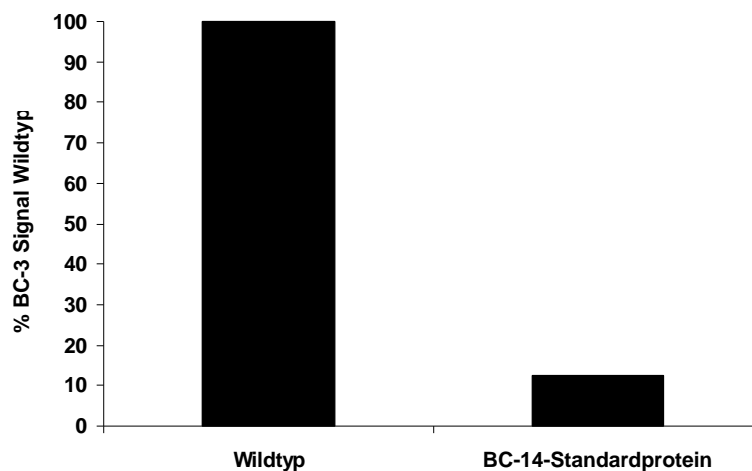


Abb. 28: Katabolismus des BC-14-Standardproteins im Vergleich zu rAgg1_{mut} im ADAMTS4-Assay. 5 µg jedes Fusionsproteins wurden pro Vertiefung im 96-well-Format eingesetzt. Aggrecan-Spaltprodukte mit dem Neopepitop A³⁷⁴RGSV... wurden im BC-3-ELISA nachgewiesen. Die BC-3 Signale wurden auf die Umsetzung von Wildtyp-rAgg1_{mut} bezogen.

Der Einsatz des BC-14-Standardproteins im ADAMTS4-Assay zeigt eine weitgehende Aufhebung der Spaltbarkeit durch Aggrecanase, da das BC-3-ELISA-Signal nur 13 % des Wildtyp-Signals beträgt. Dies bedeutet, daß die Aminosäuren N-terminal zur MMP-Schnittstelle in der IGD tatsächlich eine wesentliche Rolle für einen effizienten Aggrecanase-Katabolismus spielen. Im Vergleich zur Mutante ΔN2, die die identische Sequenz der IGD

beinhaltet, ist der negative Effekt auf die Aggrekanase-Spaltbarkeit im BC-14-Standardprotein deutlich größer. Diese Diskrepanz könnte darin begründet sein, daß das der IGD-Sequenz vorgeschaltete FLAG-Epitop in Δ N2 teilweise die fehlenden N-terminalen Aminosäuren der IGD zu substituieren vermag und dadurch ADAMTS4 eine effizientere Spaltung an der Aggrekanase-Schnittstelle erlaubt.

Dieses Ergebnis verdeutlicht die Substratspezifität von ADAMTS4, die für eine effiziente Katabolisierung des Aggrekan-Substrats rAgg1_{mut} die Anwesenheit von Aminosäuren N-terminal zur MMP-Schnittstelle verlangt.

4.4.3 Humane rekombinante ADAMTS5

Als weiteres Aggrekanase-System wurde humane rekombinante Aggrekanase-2 (ADAMTS5) auf die Substratspezifität anhand der Katabolisierung der Deletions- und Punktmutanten von rAgg1_{mut} untersucht. ADAMTS5 wurde in kompletter Länge von COS-7 Zellen exprimiert. Fünf μ g jedes Fusionsproteins wurden als Substrat pro Vertiefung im ADAMTS5-Assay eingesetzt und das Aggrekanase-generierte Neoepitop A³⁷⁴RGSV... durch den monoklonalen Antikörper BC-3 im ELISA nachgewiesen. Das Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten mit Dreifachbestimmung ist in Abb. 29 dargestellt.

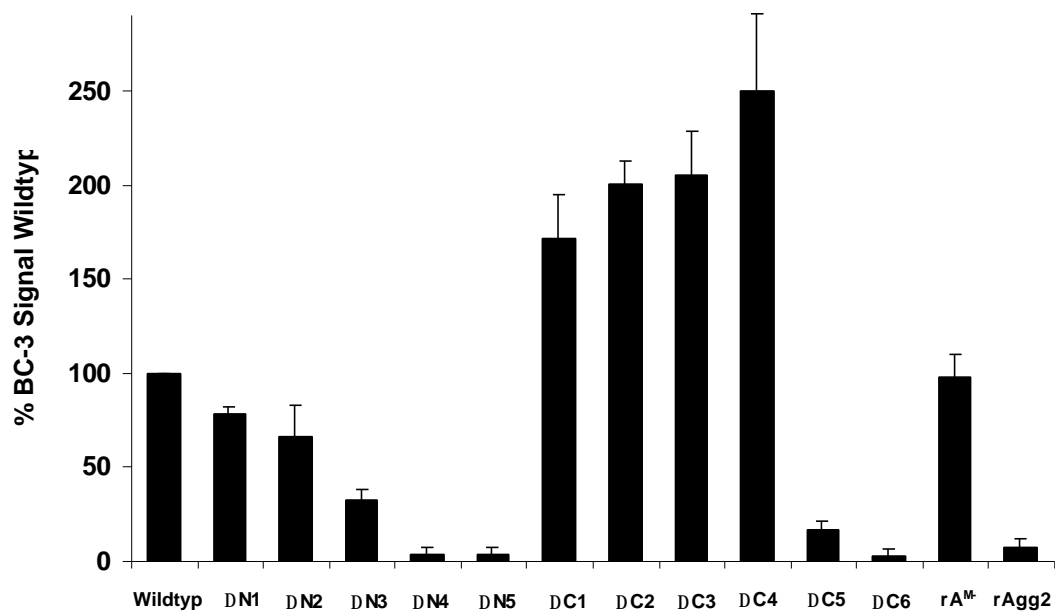


Abb. 29: Katabolismus der Deletions- und Punktmutanten von rAgg1_{mut} und rAgg2 im ADAMTS5-Assay. 5 μ g jedes Fusionsproteins wurden pro Vertiefung im 96-well-Format eingesetzt. Aggrekan-Spaltprodukte mit dem Neoepitop A³⁷⁴RGSV... wurden im BC-3-ELISA nachgewiesen. Die BC-3 Signale wurden auf die Umsetzung von Wildtyp-rAgg1_{mut} bezogen. Der Mittelwert \pm Standardabweichung von 3 separaten Experimenten, jeweils mit Dreifachbestimmung, ist dargestellt.

ADAMTS5 zeigt wie bereits ADAMTS4, RCS- und Schweine-Aggrekanase eine verminderte Spaltfähigkeit des rekombinanten Substrats mit dessen abnehmender Größe am Aminoterminus. Die BC-3 Signale nach Inkubation mit ADAMTS5 betragen 79, 66, und 32% für die Deletionsmutanten $\Delta N1$ bis $\Delta N3$, bezogen auf das Wildtyp-Signal. $\Delta N4$ und $\Delta N5$ werden praktisch nicht von ADAMTS5 gespalten. Die C-terminalen Deletionsmutanten dagegen werden besser als das Wildtyp-Substrat umgesetzt, was in BC-3 Signalen von 171, 200, 205 und 250% für $\Delta C1$ bis $\Delta C4$ resultiert. Auch dieser Effekt ähnelt dem Spaltverhalten von RCS- und Schweine-Aggrekanase. Die Mutante $\Delta C5$ wird nur noch schwach und $\Delta C6$ gar nicht von ADAMTS5 an der Aggrekanase-Schnittstelle gespalten. Das funktionale Ausschalten der MMP-Schnittstelle in der Mutante rA^M ändert die Spaltbarkeit an der Aggrekanase-Schnittstelle gegenüber dem Wildtyp-Substrat nicht. Schließlich ist auch ADAMTS5 wie die anderen Aggrekanase-Systeme nicht in der Lage, $rAgg2$ zu katabolisieren. Zusammenfassend verhält sich ADAMTS5 bezüglich der Spaltung der Deletions- und Punktmutanten von $rAgg1_{mut}$ an der Aggrekanase-Schnittstelle ähnlich wie die drei oben beschriebenen Aggrekanase-Systeme. Der Aminoterminus der IGD spielt auch für ADAMTS5 eine entscheidende Rolle für die effiziente Katabolisierung an der Aggrekanase-Schnittstelle, vergleichbare carboxyterminale Deletionen hingegen wirken sich nicht negativ auf die Spaltbarkeit durch ADAMTS5 aus.

4.4.4 Humane rekombinante MT1-MMP

Auch die katalytische Domäne der humanen, rekombinanten MT1-MMP ist in der Lage, das künstliche Aggrekan $rAgg1_{mut}$ an der Aggrekanase-Schnittstelle zu proteolysieren (40). Außerdem konnte die Expression von MT1-MMP in gesundem und arthrotischem Knorpel nachgewiesen werden (96). Aufgrund dieser Befunde ist es denkbar, daß MT1-MMP für einen Teil der Spaltung von Aggrekan an der Aggrekanase-Schnittstelle verantwortlich ist. Um die Substratspezifität von MT1-MMP mit den Spezifitäten der bisher beschriebenen Aggrekanase-Systeme zu vergleichen und mögliche Unterschiede zwischen den Aktivitäten aufzuzeigen, wurden die Deletions- und Punktmutanten von $rAgg1_{mut}$ auf ihre Spaltbarkeit durch MT1-MMP untersucht. Bei der Enzymaktivität handelt es sich um die gereinigte katalytische Domäne von MT1-MMP, die in *E. coli* exprimiert wurde (81). Die Fusionsproteine wurden mit MT1-MMP inkubiert und die Verdauansätze im BC-3 ELISA auf die Bildung des Neoepitops $A^{374}RGSV...$ untersucht. Das Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten mit Dreifachbestimmung ist in Abb. 30 für ausgewählte Fusionsproteine dargestellt.

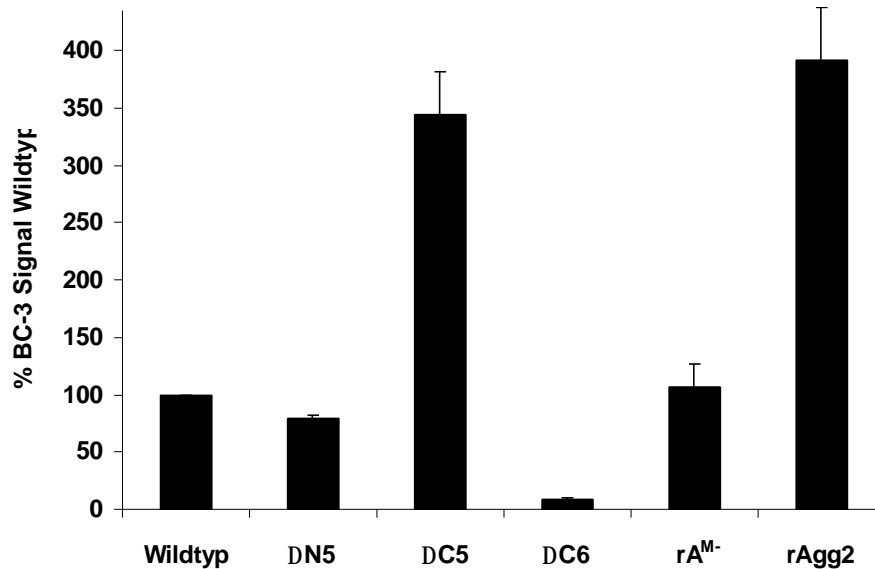


Abb. 30: Katabolismus ausgewählter Mutanten von rAgg1_{mut} und von rAgg2 durch MT1-MMP. Aggrekan-Spaltprodukte mit dem Neopeptid A³⁷⁴RGSV... wurden im BC-3-ELISA nachgewiesen. Die BC-3 Signale wurden auf die Umsetzung von Wildtyp-rAgg1_{mut} bezogen. Der Mittelwert \pm Standardabweichung von 3 separaten Experimenten, jeweils mit Dreifachbestimmung, ist dargestellt.

Δ N5, die Mutante von rAgg1_{mut} mit der größten Deletion am N-Terminus der IGD, wird an der Aggrekanase-Schnittstelle gespalten, wie das BC-3 Signal von 80%, bezogen auf die Umsetzung des Wildtyp-Substrats, zeigt. MT1-MMP ist somit die einzige der getesteten Enzymaktivitäten, die in der Lage ist, das auf 8 Aminosäuren vor der Aggrekanase-Spaltstelle verkürzte Substrat zu katabolisieren. Die Mutante Δ C5, mit einem Rest von 9 Aminosäuren C-terminal zur Aggrekanase-Spaltstelle, wird extensiv durch MT1-MMP gespalten, was in einem BC-3 Signal von 353% des Signals für rAgg1_{mut} resultiert. Auch dieses Spaltverhalten steht im Gegensatz zu der deutlich eingeschränkten Umsetzung dieser Mutante durch die vier Aggrekanase-Systeme. Womöglich begünstigt diese Deletion die Zugänglichkeit des Substrats für die Matrix-Metalloprotease MT1-MMP. Die kürzeste C-terminale Deletionsmutante Δ C6, mit einem Rest von 5 Aminosäuren angrenzend an die Aggrekanase-Schnittstelle, wird jedoch kaum durch MT1-MMP katabolisiert. Die restlichen N- und C-terminalen Deletionsmutanten (Δ N1 bis Δ N4 und Δ C1 bis Δ C4) werden von MT1-MMP an der Aggrekanase-Schnittstelle gespalten, was in mindestens so starken BC-3 Signalen wie für das Wildtyp-Substrat resultiert (Daten nicht gezeigt). Allerdings treten hier hohe Abweichungen zwischen den einzelnen Experimenten auf, sodaß eine quantitative Aussage nicht sinnvoll ist. Die Punktmutante rA^M mit mutierter MMP-Spaltstelle wird in ähnlichem Maß gespalten wie das Wildtyp-Substrat. Der MT1-MMP-Verdau der Substratvariante rAgg2 erzeugt ein starkes BC-3 Signal von 388% verglichen mit dem Signal erzeugt durch die Umsetzung des Wildtyp-Substrats. Diese

Fähigkeit, rAgg2 an der Aggrekanase-Schnittstelle zu proteolysieren, wird nur für MT1-MMP beobachtet und von den anderen untersuchten Enzymaktivitäten nicht geteilt.

Die Ergebnisse zeigen, daß 8 Aminosäuren N-terminal und 8 Aminosäuren C-terminal zur Aggrekanase-Spaltstelle ausreichen, um eine effiziente Spaltung an der Aggrekanase-Schnittstelle des Fusionsproteins durch die katalytische Domäne der MT1-MMP zu erlauben. Die Substratspezifität von MT1-MMP unterscheidet sich damit markant von der Spezifität der RCS- und der Schweine-Aggrekanase sowie von ADAMTS4 und ADAMTS5. Die Forderung einer N-terminalen Länge von mehr als 32 Aminosäuren vor der Aggrekanase-Schnittstelle für eine effiziente Spaltung an der Aggrekanase-Schnittstelle ist somit charakteristisch für die vier Aggrekanase-Systeme und wird von MT1-MMP nicht geteilt.

4.5 Wirkung von Heparin auf Aggrekanase-Aktivitäten und MMPs

Die bisher beschriebenen Versuche dienten der Charakterisierung von Aggrekanase-Aktivitäten anhand ihrer Substratspezifität. Um einen weiteren Aspekt der Charakterisierung von Aggrekanase hinzuzufügen, wurden die verschiedenen Aggrekanase-Aktivitäten auf ihre Hemmbarkeit durch das Mucopolysaccharid Heparin untersucht. Die Grundlage für diese Untersuchungen bildet ein Bericht von Sugimoto et al. (66), der die Inhibition einer Aggrekanase-Aktivität, induziert in Explantkulturen boviner Nasenknorpel, durch Heparin beschreibt. Es sollte nun gezeigt werden, ob das Inhibitionspotential von Heparin auch auf die vier zur Verfügung stehenden Aggrekanase-Systeme zutrifft. Im Vergleich dazu sollte die Heparin-Wirkung auf MMPs getestet werden, um eine mögliche Selektivität des Inhibitionsmechanismus aufzudecken.

Bei dem verwendeten Heparin handelt es sich um das Natriumsalz von Enoxaparin (Clexane®, Rhone-Poulenc Rorer), ein fraktioniertes Heparin niedriger Molekülmasse mit einem mittleren Molekulargewicht von 4500 Da.

4.5.1 Wirkung von Heparin auf RCS-Aggrekanase

Heparin wurde als potentieller Inhibitor im RCS-Aggrekanase-Assay getestet. Die Substanz mit einer Konzentration der Stammlösung von 100 mg/ml wurde seriell verdünnt und eine Stunde vor Zugabe des Aggrekanase-Substrats zu den Retinsäure-stimulierten RCS-Zellen pipettiert. Als Aggrekanase-Substrat dienten 5 µg eukaryontisch exprimiertes rAgg1_{mut} pro Vertiefung der Assay-Platte. Nach Ende der Inkubationszeit wurden Aggrekanase-generierte Neopeptide im BC-3 ELISA nachgewiesen. Abb. 31 zeigt in einem repräsentativen

Experiment den Effekt auf die Aggrekanase-Aktivität, wobei das BC-3 Signal erzeugt von RCS-Aggrekanase ohne Heparin-Zugabe als 100 % Aktivität dargestellt ist.

Ab einer Heparin-Endkonzentration von 1.7 mg/ml ist eine deutliche Inhibition der Spaltung des rekombinanten Substrats rAgg1_{mut} durch Aggrekanase zu beobachten. Bei der höchsten eingesetzten Heparin-Konzentration von 16.7 mg/ml beträgt die Aggrekanase-Aktivität nur noch 7 % der Aktivität ohne Heparin-Zusatz. Dies entspricht einem IC₅₀-Wert von schätzungsweise 8 mg/ml.

Dieses Ergebnis zeigt, daß die in RCS-Zellen induzierte Aggrekanase unter den gewählten Bedingungen von Heparin, wenn auch mit hohem IC₅₀, inhibiert wird.

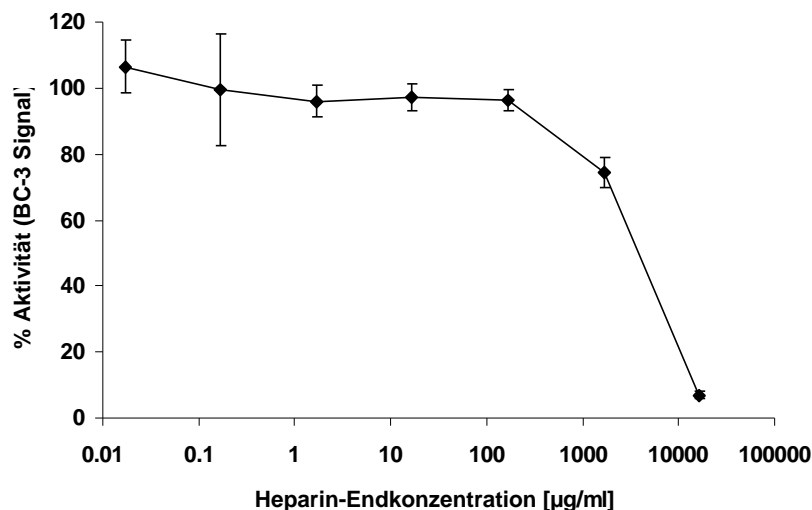


Abb. 31: Inhibition der RCS-Aggrekanase durch Heparin. Heparin wurde eine Stunde vor Zugabe des Substrats rAgg1_{mut} zum RCS-Aggrekanase-Assay pipettiert. Aggrekan-Spaltprodukte mit dem Neoepitop A³⁷⁴RGSV... wurden im BC-3-ELISA nachgewiesen. Die BC-3 Signale (Mittelwerte aus Doppelbestimmung ± Standardabweichung) wurden auf das BC-3 Signal erzeugt durch Aggrekanase ohne Heparin-Zusatz (100% Aktivität) bezogen.

4.5.2 Wirkung von Heparin auf Schweine-Aggrekanase

Die Wirkung von Heparin wurde ebenfalls im Assay mit löslicher Aggrekanase-Aktivität aus Interleukin-1 α stimulierten Schweinechondrozyten getestet. Heparin wurde eine Stunde vor Substratzugabe in den gleichen Endkonzentrationen wie im RCS-Aggrekanase-Assay zupipettiert. Als Substrat dienten 1.25 μ g prokaryontisch exprimiertes rAgg1_{mut} pro Vertiefung der Assay-Platte. Der Nachweis Aggrekanase-generierter Neoepitope erfolgte im BC-3 ELISA. Das Ergebnis ist in Abb. 32 dargestellt.

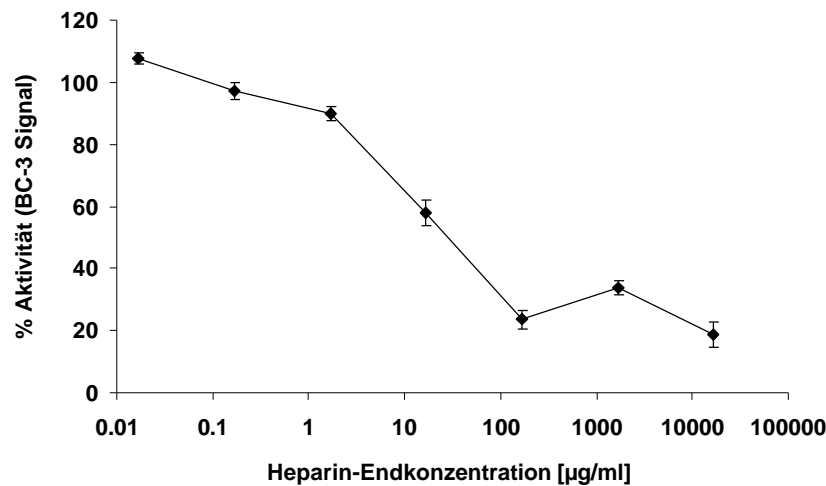


Abb. 32: Inhibition der Schweine-Aggrekanase durch Heparin. Heparin wurde eine Stunde vor Zugabe des Substrats rAgg1_{mut} zum Schweine-Aggrekanase-Assay pipettiert. Aggrekan-Spaltprodukte mit dem Neoepitop A³⁷⁴RGSV... wurden im BC-3-ELISA nachgewiesen. Die BC-3 Signale (Mittelwerte aus Doppelbestimmung ± Standardabweichung) wurden auf das BC-3 Signal erzeugt durch Aggrekanase ohne Heparin-Zusatz (100% Aktivität) bezogen.

Wie RCS-Aggrekanase wird auch die Aggrekanase-Aktivität aus stimulierten Schweinechondrozyten dosisabhängig durch Heparin inhibiert. Der negative Effekt ist dabei deutlicher: Eine Hemmung der Aktivität ist bereits bei 17 µg/ml zu beobachten, und der IC₅₀ liegt etwa bei 80 µg/ml.

4.5.3 Wirkung von Heparin auf ADAMTS4

Auch im ADAMTS4-Assay erfolgte die Testung von Heparin als potentieller Inhibitor. Wie in den beiden vorher beschriebenen Assays wurde Heparin eine Stunde vor Substratzugabe in den genannten Endkonzentrationen zum ADAMTS4-Assay pipettiert. Als Substrat diente 1 µg prokaryontisch exprimiertes rAgg1_{mut} pro Vertiefung der Assay-Platte. Aggrekanase-generierte Neoepitope wurden im BC-3 ELISA nachgewiesen. Abb. 33 zeigt ein repräsentatives Ergebnis.

Heparin inhibiert auch ADAMTS4 dosisabhängig bezüglich der Spaltung des rekombinanten Substrats rAgg1_{mut}. Verglichen mit den anderen Aggrekanase-Systemen ist ADAMTS4 am empfindlichsten gegenüber Heparin: Schon bei einer Heparin-Endkonzentration von 17 µg/ml resultiert ein Verlust von 90% der Aggrekanase-Aktivität. Der IC₅₀ beträgt ungefähr 0.6 µg/ml.

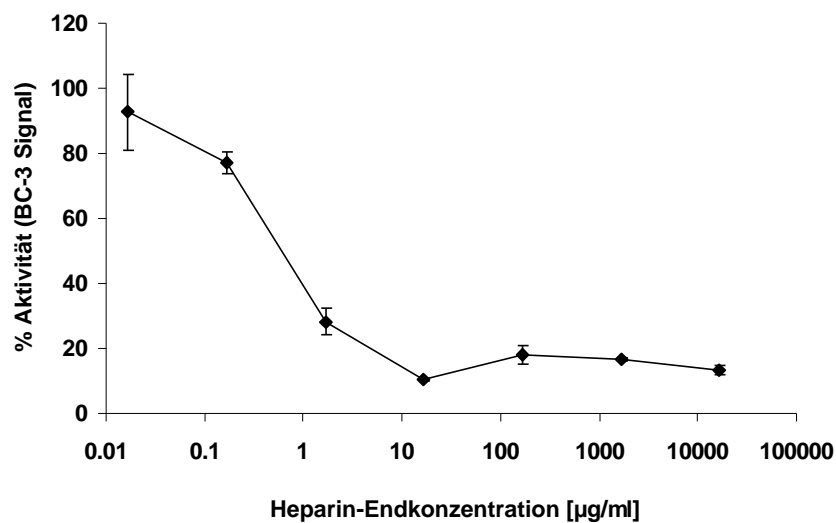


Abb. 33: Inhibition von ADAMTS4 durch Heparin. Heparin wurde eine Stunde vor Zugabe des Substrats rAgg1_{mut} zum ADAMTS4-Assay pipettiert. Aggrekan-Spaltprodukte mit dem Neoepitop A³⁷⁴RGSV... wurden im BC-3-ELISA nachgewiesen. Die BC-3 Signale (Mittelwerte aus Doppelbestimmung ± Standardabweichung) wurden auf das BC-3 Signal erzeugt durch Aggrekanase ohne Heparin-Zusatz (100% Aktivität) bezogen.

Alle bisherigen Versuche wurden mit Hilfe des rekombinanten Aggrekanase-Substrats rAgg1_{mut} durchgeführt. Um die Frage zu klären, ob der beobachtete inhibitorische Effekt von Heparin auf die Aggrekanase-Aktivität vom Substrat abhängt und nur für ein künstliches Substrat Bedeutung habe, wurde die native Aggrekanpräparation A1D1 in Anwesenheit von Heparin im ADAMTS4-Assay verdaut. 13 µg Glykosaminoglykan (GAG) wurden pro Vertiefung im ADAMTS4-Assay eingesetzt. Die Heparin-Endkonzentrationen entsprachen denjenigen der vorherigen Assays. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben wie unter 3.6 beschrieben enzymatisch deglykosyliert, um die Keratansulfat- und Chondroitinsulfat-Seitenketten der Proteoglykane abzutrennen, da diese ein Eindringen der Proben in die Polyacrylamidmatrix verhindern. Nach Dialyse und Lyophilisieren folgte die Auftrennung auf einem 4-12%igen SDS-Gradientengel, bevor ein Western Blot mit anschließender Immunfärbung mit dem Antikörper BC-3 durchgeführt wurde. Das Ergebnis ist in Abb. 34 dargestellt.

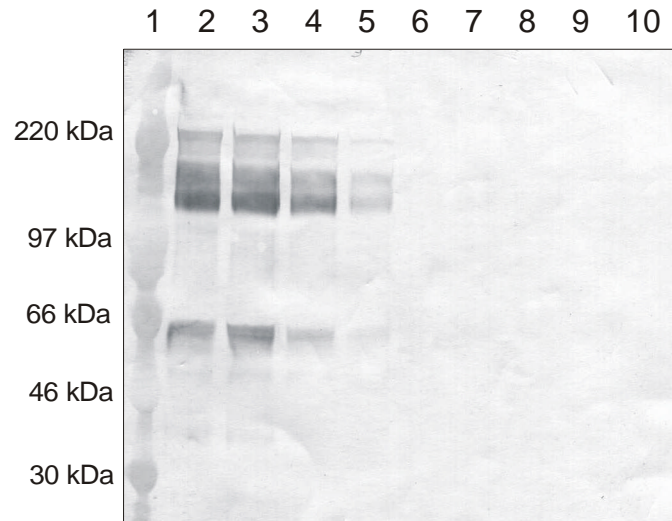


Abb. 34: BC-3-Western Blot von nativem Aggrekan A1D1 nach ADAMTS4 Verdau unter Zugabe von Heparin. 13 μg GAG wurden pro Bahn aufgetragen. Bahn 1: Vorgefärbter Protein-Längenstandard. Bahn 2: ADAMTS4-Verdau von A1D1 ohne Heparin. Bahn 3 bis 8: Zusatz von Heparin von 0.17, 1.7, 17, 167, 1667, 16667 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Bahn 9: Unverdautes A1D1, 16667 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Heparin. Bahn 10: Unverdautes A1D1, ohne Heparin.

Der BC-3-Western Blot zeigt zunächst, daß A1D1 von ADAMTS4 ohne Zusatz von Heparin an der Aggrekanase-Schnittstelle gespalten wird (Bahn 2). Die resultierenden BC-3-reaktiven Banden trennen sich bei etwa 60 kDa, als Schmier zwischen 130 und 150 kDa und bei über 220 kDa auf. Das Auftreten mehrerer BC-3-reaktiver Banden ist darin begründet, daß die Präparation von A1D1 aus bovinen Gelenkknorpeln zwar lange Aggrekanmoleküle mit großer Dichte anreichert, aber dennoch ein heterogenes Gemisch darstellt. Auch unter physiologischen Bedingungen treten im Knorpel C-terminale Prozessierungen am Aggrekan auf, die trunkierte Aggrekanmoleküle unterschiedlicher C-terminaler Länge entstehen lassen. Die relativ distinkte Bande bei 60 kDa repräsentiert vermutlich ein Fragment, das durch die Spaltung zwischen der G2-Domäne und der KS-reichen Domäne durch MMPs entstanden ist (Chris Little, Universität Cardiff, UK; persönliche Mitteilung).

Durch die Zugabe von Heparin zum ADAMTS4-Assay wird die Spaltung von nativem Aggrekan an der Aggrekanase-Schnittstelle deutlich gehemmt. Dosisabhängig schwächen sich die BC-3-reaktiven Banden ab, bis ab einer Heparin-Konzentration von 167 $\mu\text{g}/\text{ml}$ keine Banden mehr zu sehen sind. Der IC_{50} liegt etwa zwischen 0.17 und 1.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und deckt sich damit mit dem IC_{50} , der unter Verwendung des rekombinanten Substrats für die ADAMTS4-Inhibition beobachtet wird. Dieses Experiment zeigt somit, daß Heparin sowohl die Spaltung eines artifiziellen als auch nativen Substrats an der Aggrekanase-Schnittstelle durch ADAMTS4 inhibiert.

4.5.4 Wirkung von Heparin auf ADAMTS5

Der Effekt von Heparin wurde ebenfalls im ADAMTS5-Assay überprüft.

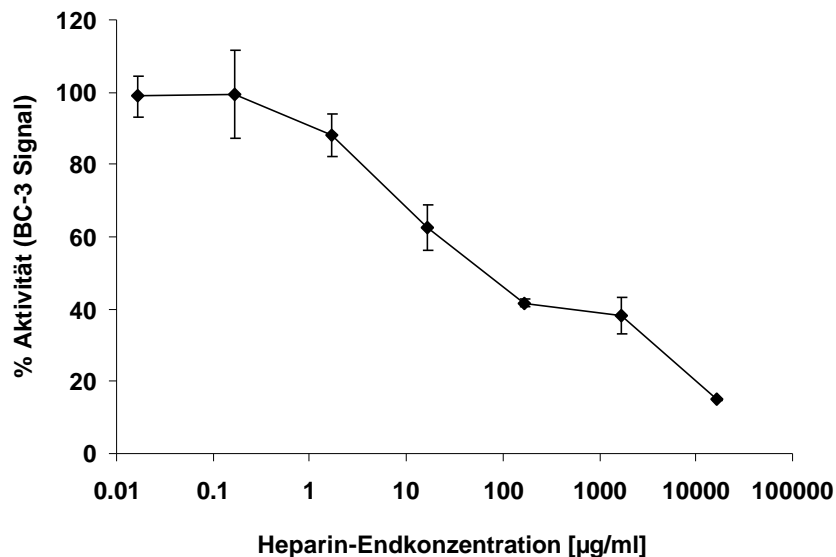


Abb. 35: Inhibition von ADAMTS5 durch Heparin. Heparin wurde eine Stunde vor Zugabe des Substrats rAgg1_{mut} zum ADAMTS5-Assay pipettiert. Aggrekan-Spaltprodukte mit dem Neopepitop A³⁷⁴RGSV... wurden im BC-3-ELISA nachgewiesen. Die BC-3 Signale (Mittelwerte aus Doppelbestimmung ± Standardabweichung) wurden auf das BC-3 Signal erzeugt durch Aggrekanase ohne Heparin-Zusatz (100% Aktivität) bezogen.

Eine Stunde vor Substratzugabe wurde Heparin in den gleichen Endkonzentrationen wie in den anderen Aggrekanase-Systemen zum ADAMTS5-Assay pipettiert. 3 µg prokaryontisch exprimiertes rAgg1_{mut} wurden pro Vertiefung der Assay-Platte als Substrat eingesetzt. Der Nachweis der Aggrekanase-generierten Neopepitope erfolgte im BC-3 ELISA. Das Ergebnis ist in Abb. 35 gezeigt: Auch auf die Aggrekanase-Aktivität von ADAMTS5 wirkt Heparin inhibierend. Eine Hemmung der Enzymaktivität zeigt sich ab 1.7 µg/ml Heparin. Bei der höchsten Heparin-Konzentration von 16667 µg/ml beträgt die Restaktivität von ADAMTS5 15%. Der daraus abgeschätzte IC₅₀ liegt bei etwa 146 µg/ml.

4.5.5 Wirkung von Heparin auf MT1-MMP

Da die Matrix-Metalloprotease MT1-MMP das rekombinante Aggrekan rAgg1_{mut} an der Aggrekanase-Schnittstelle zu spalten vermag (40) und damit ebenfalls eine Form von Aggrekanase-Aktivität besitzt, wurde die rekombinante, katalytische Domäne humaner MT1-MMP auf ihre Hemmbarkeit durch Heparin getestet.

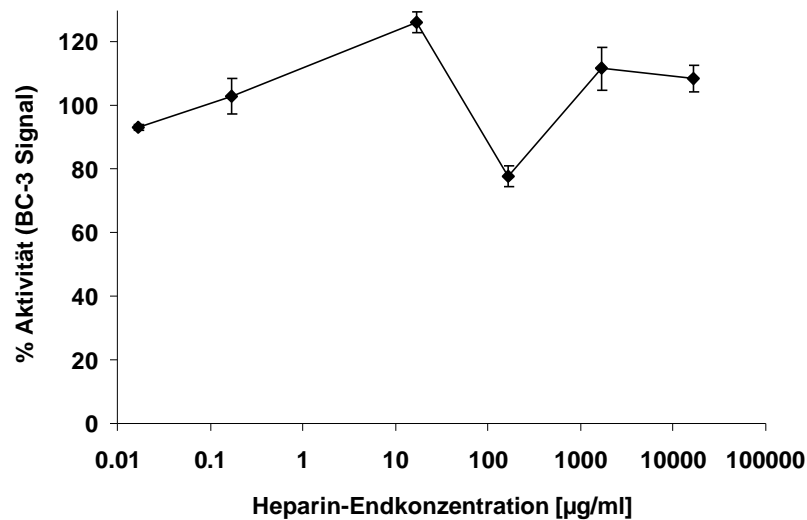


Abb. 36: Effekt von Heparin auf die MT1-MMP-Spaltung von rAgg1_{mut}. Heparin wurde zusammen mit dem Substrat rAgg1_{mut} zum MT1-MMP-Assay gegeben. Aggrekan-Spaltprodukte mit dem Neoepitop A³⁷⁴RGSV... wurden im BC-3-ELISA nachgewiesen. Die BC-3 Signale (Mittelwerte aus Doppelbestimmung ± Standardabweichung) wurden auf das BC-3 Signal erzeugt durch MT1-MMP ohne Heparin-Zusatz (100% Aktivität) bezogen.

Heparin wurde in den gleichen Endkonzentrationen wie in den Aggrekanase-Systemen zum MT1-MMP-Aktivitätstest pipettiert. Als Substrat dienten 5 µg eukaryontisch exprimiertes rAgg1_{mut} pro Verdauansatz. Der Nachweis der Aggrekanase-generierten Neoepitope in den Verdauansätzen erfolgte im BC-3 ELISA. Abb. 36 zeigt, daß die Enzymaktivitäten um den Vergleichswert ohne Heparin-Zugabe von 100 % schwanken, wobei maximal 126% und minimal 78% Aktivität erreicht werden. Die Aktivitäten korrelieren dabei nicht mit der Heparin-Konzentration. 109 % Enzymaktivität werden noch bei der höchsten Heparin-Konzentration von 16667 µg/ml ermittelt. Eine Inhibitor der Spaltung von rAgg1_{mut} durch die katalytische Domäne von MT1-MMP kann durch Heparin demnach nicht festgestellt werden.

4.5.6 Wirkung von Heparin auf MMP-3

Um den Einfluß von Heparin auf eine weitere Matrix-Metalloprotease zu überprüfen und mit dem Effekt auf Aggrekanasen zu vergleichen, wurde die katalytische Domäne von MMP-3 auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Heparin untersucht.

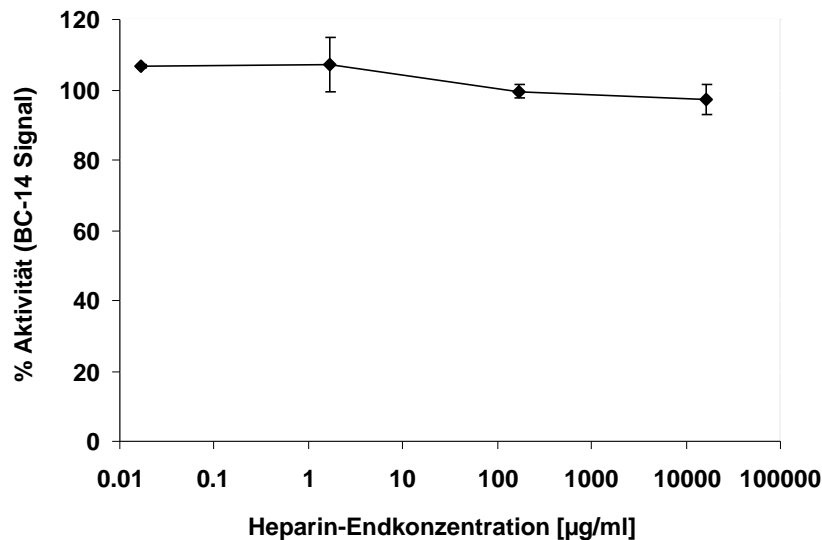


Abb. 37: Effekt von Heparin auf die MMP-3-Spaltung von rAgg1_{mut}. Heparin wurde zusammen mit dem Substrat rAgg1_{mut} zum MMP-3-Aktivitäts-Assay gegeben. Aggrekan-Spaltprodukte mit dem Neopeptop F³⁴²FGVG... wurden im BC-14-ELISA nachgewiesen. Die BC-14 Signale (Mittelwerte aus Doppelbestimmung ± Standardabweichung) wurden auf das BC-14 Signal erzeugt durch MMP-3 ohne Heparin-Zusatz (100% Aktivität) bezogen.

Die rekombinante katalytische Domäne humaner MMP-3 wurde während des Substrat-Verdaus den in Abb. 37 genannten Heparin-Endkonzentrationen ausgesetzt. Als Substrat für MMP-3 dienen 5 µg eukaryontisch exprimiertes rAgg1_{mut} pro Verdauungsansatz. Der Nachweis der MMP-3-generierten Neopeptope F³⁴²FGVG... erfolgte im BC-14 ELISA. Das Ergebnis zeigt, daß die resultierenden MMP-3 Aktivitäten unter Heparin-Zusatz zwischen 97% und 107% in bezug auf die Aktivität ohne Heparin liegen, was einer Schwankung um die 100%-Marke im Bereich der Standardabweichungen entspricht. Damit hat Heparin keinerlei Wirkung auf die Spaltung von rAgg1_{mut} an der allgemeinen MMP-Schnittstelle durch die katalytische Domäne von MMP-3.

Zusammenfassend wurde gezeigt, daß Enoxaparin, ein fraktioniertes Heparin niedriger Molekülmasse, die Aggrekanase-Aktivitäten der vier getesteten Aggrekanase-Systeme hemmt. Die IC₅₀-Werte von Heparin betragen etwa 8000, 80, 0.6 und 146 µg/ml für die Hemmung der RCS-Aggrekanase, der Schweine-Aggrekanase, von ADAMTS4 bzw. von ADAMTS5. Im Gegensatz zu den Aggrekanasen werden die katalytischen Domänen der beiden Matrix-Metalloproteasen MT1-MMP und MMP-3 in ihrer Spaltung an der Aggrekanase- bzw. MMP-Schnittstelle nicht inhibiert. Im Vergleich der getesteten Protease-Aktivitäten erscheint Heparin damit als Inhibitor der Proteasen mit Metalloprotease-, Disintegrin- und Thrombospondin-Domäne (ADAMTS), nicht aber der Matrix-Metalloproteasen, wenn diese nur über ihre Metalloprotease-Domäne verfügen.

5. Diskussion

Die Protease-Aktivität Aggrekanase ist verantwortlich für die Spaltung von Aggrekan zwischen Glu³⁷³ und Ala³⁷⁴ in der interglobulären Domäne des Knorpelproteoglykans. Diese Aktivität ist Bestandteil des physiologischen Knorpelmetabolismus. Unter osteoarthrotischen Bedingungen jedoch treten Aggrekan-Fragmente, die durch Aggrekanase generiert wurden, deutlich vermehrt auf (44), was zu einem Verlust an Knorpelmatrix und damit zum Versagen der Knorpelfunktion führt. Aggrekanase wird deshalb eine wesentliche Rolle bei den frühen Ereignissen in der Pathophysiologie der Osteoarthritis zugeschrieben (43-45). Die molekulare Identität von Aggrekanase blieb lange Zeit ungeklärt. Kürzlich wurden jedoch zwei Enzyme kloniert, Aggrekanase-1 und -2, die Aggrekan spezifisch zwischen Glu³⁷³ und Ala³⁷⁴ proteolysieren (67,68) und zur Familie der ADAMTS-Proteasen gehören (ADAMTS4 und ADAMTS5; Human Gene Nomenclature Committee). Bisher sind gewebespezifische Expressionsmuster dieser Enzyme noch unvollständig (67), weshalb die Frage unbeantwortet bleibt, welche dieser Aggrekanasen oder welches bisher noch unbekannte Enzym die pathophysiologisch relevante Aggrekanase bei Osteoarthritis darstellt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Enzymaktivität Aggrekanase weiter zu charakterisieren. Zum einen sollte die Substratspezifität von Aggrekanase näher untersucht werden, da bisher außer der Forderung nach einem Glutamyrest an der P1-Position und einem unpolaren oder ungeladenen Rest an der P1'-Position (97) kein Anforderungsprofil an ein funktionales Aggrekanase-Substrat beschrieben wurde. Die Substratspezifität wurde erstens bezüglich des Einflusses der Substrat-Glykosylierung auf den Katabolismus durch Aggrekanase untersucht, und zweitens bezüglich der minimal erforderlichen Substratgröße definiert. Zum anderen wurde als weiterer Aspekt der Charakterisierung von Aggrekanase die Rolle des Mukopolysaccharids Heparin als potentieller Inhibitor von Aggrekanase untersucht.

5.1 Einfluß der N- und O-Glykosylierung des rekombinanten Aggrekans rAgg1_{mut} auf den Katabolismus durch Aggrekanase

Der Einfluß des Glykosylierungszustandes eines Substrats auf dessen Spaltbarkeit durch Aggrekanase wurde anhand des Aggrekan-Fusionsproteins rAgg1_{mut} untersucht. Das in COS-7 Zellen exprimierte rekombinante Aggrekan rAgg1_{mut} ist ein aktives Substrat für eine in Rattenchondrosarkom-Zellen induzierte Aggrekanase-Aktivität (85). Während der Expression in COS-Zellen werden Proteine im Golgi-Apparat posttranslational glykosyliert. Dabei können die Aminosäuren Serin und Threonin O-glykosidisch und Asparagin N-glykosidisch mit Oligosacchariden verschiedener Kompositionen substituiert werden. Die O-glykosidische

Verzuckerung tritt bevorzugt aber nicht zwingend in der Sequenz X-S/T-P-X-P auf (98), die N-glykosidische Verzuckerung dagegen tritt fast nur in dem Sequon N-X-S/T auf (99). Auch rAgg1_{mut} erfährt während seiner Expression im COS-System Verzuckerungen, wie eine Glykoanalyse des Fusionsproteins zeigt (Dr. Hermentin, Behringwerke AG, Marburg; Daten nicht gezeigt). Die Glykoanalyse weist darauf hin, daß zwei der drei möglichen N-Glykosylierungsstellen substituiert sind und auch O-Glykosylierungen vorliegen. Dieses Ergebnis wurde durch die Behandlung von rAgg1_{mut} mit N-Glykosidase F und O-Glykosidase bestätigt, da ein Molekulargewichtsverlust des Fusionsproteins von etwa 10 kDa resultiert.

Der Vergleich des Katabolismus von COS-7 exprimiertem rAgg1_{mut} mit dessen enzymatisch deglykosylierter Form und prokaryontisch exprimiertem rAgg1_{mut} durch Aggrekanase zeigt, daß die unglykosylierten Formen des Substrats mit einer mehr als zweimal höheren maximalen Produktbildungsrate V_{max} umgesetzt werden als es für glykosyliertes rAgg1_{mut} der Fall ist. Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß N- und O-Glykosylierungen von rAgg1_{mut} einen negativen Einfluß auf dessen Spaltbarkeit durch Aggrekanase ausüben, bzw. daß das Entfernen dieser Zuckerseitenketten den Katabolismus durch Aggrekanase positiv beeinflusst. Die an das Proteinrückgrat geknüpften Oligosaccharide stellen möglicherweise eine sterische Behinderung für die Erkennung, Bindung und Spaltung durch Aggrekanase dar. Inwieweit der positive Effekt auf Aggrekanase-Spaltung im Falle der enzymatischen N-Deglykosylierung auch der Deaminierung von Asparagin zuzuschreiben ist, bei der Asparagin in Aspartat umgewandelt wird, läßt sich mit den beschriebenen Methoden nicht feststellen. Gegen einen indirekten positiven Effekt aufgrund der Modifikation der Asparagine in Aspartate und für einen direkten positiven Effekt aufgrund der Zuckerabspaltungen spricht allerdings die Umsatzrate des unglykosylierten, prokaryontisch exprimierten rAgg1_{mut}, die der von enzymatisch deglykosyliertem rAgg1_{mut} gleicht.

Eine nähere Untersuchung sollte Aufschluß darüber geben, ob die Verzuckerung der Aminosäure N³⁶⁸ einen maßgeblichen Beitrag zu dem beobachteten Effekt leistet. N³⁶⁸IT ist neben N⁴¹⁵ET in der interglobulären Domäne und NST in der CH2-Domäne des IgG1 eine potentielle N-Glykosylierungsstelle. Die drei N-Glykosylierungsstellen sind mit einer Wahrscheinlichkeit von 85%, 25% bzw. 100% glykosyliert, wie sich aus Mutationsstudien mit dem Sequon N-X-S/T ableiten läßt (100,101). Wegen der hohen Glykosylierungswahrscheinlichkeit und der Nähe von N³⁶⁸ zur Aggrekanase-Schnittstelle E³⁷³-A³⁷⁴ bestand die Vermutung, daß diese Glykosylierungsstelle einen Effekt auf die Spaltbarkeit von rAgg1_{mut} durch Aggrekanase haben könnte. Deshalb wurde durch ortsspezifische Mutagenese der Austausch von Asparagin durch Glutamin vorgenommen, was eine Glykosylierung ausschließt, ohne die Netto-Ladung des Proteins zu ändern. Die Spaltung der Mutante N368Q durch Aggrekanase zeigt jedoch keine signifikante Erhöhung der Umsatzrate gegenüber dem Wildtyp-Substrat. Womöglich hat Aggrekanase zwar aufgrund

der Abwesenheit der sperrigen Zuckerketten leichteren Zugang zur Aggrekanase-Schnittstelle, aber eine nachteilige Konformationsänderung durch den Aminosäureaustausch könnte einer wesentlich verbesserten Umsetzung entgegenwirken. Eine alternative Erklärung ist, daß die Nicht-Glykosylierung dieser einzelnen Aminosäure allein nicht ausreicht, um einen positiven Effekt nach sich zu ziehen. Dies würde bedeuten, daß auch die weiteren N-Glykosylierungen und die unbekannte Zahl der O-Glykosylierungen von rAgg1_{mut} eine wesentliche Rolle bei der Inhibition der Spaltung durch Aggrekanase spielen.

Dies ist die erste Arbeit, die sich mit dem Einfluß der N- und O-Glykosylierung auf die Spaltbarkeit eines Aggrekanase-Substrats beschäftigt. Eine andere Art von Verzuckerung und deren Einfluß auf die Spaltbarkeit von nativem Aggrekan durch eine in Rinderknorpel induzierte Aggrekanase-Aktivität wurde von Pratta et al. untersucht (102). Es handelt sich hierbei um den Effekt der Keratan- und Chondroitinsulfatseitenketten in der KS- und CS-reichen Domäne von Aggrekan auf die Aggrekanase-Spaltung. Die Studie zeigt, daß die enzymatische Abtrennung der schwefelhaltigen Oligosaccharide die Spaltung zwischen E³⁷³-A³⁷⁴ durch Aggrekanase völlig unterbindet. Die Autoren schließen daraus, daß die KS- und CS-Substitutionen am Substrat zwingend notwendig sind für die Spaltung durch Aggrekanase. Diese Schlußfolgerung steht zunächst im Widerspruch zu den hier präsentierten Ergebnissen: Das rekombinante Aggrekan rAgg1_{mut} verfügt nicht über die KS- und CS-reiche Domäne von Aggrekan und besitzt im Gegensatz zu nativem bovinem Aggrekan, das an N³⁶⁸ in der Nähe der Aggrekanase-Schnittstelle eine KS-Kette trägt (103), keinerlei KS-Substitution (85), wird aber dennoch von einer in Rattenchondrosarkomzellen induzierten Aggrekanase spezifisch gespalten. Die unterschiedlichen Effekte der Substratverzuckerung könnten auf die Verwendung verschiedener Aggrekanase-Systeme (Rind versus Ratte) zurückzuführen sein, die sich womöglich in ihrer Empfindlichkeit gegenüber KS- und CS-Substitution am Substrat unterscheiden. Weiterhin ist denkbar, daß bei nur genügend hohem Substrat:Enzym-Verhältnis auch ein nicht-KS-/CS-verzuckertes Substrat von Aggrekanase gespalten wird. Über die Substrat:Enzym-Verhältnisse kann allerdings keine Aussage gemacht werden, da beide Studien mit ungereinigten Aktivitäten in Zellkultursystemen gearbeitet haben. Der positive Einfluß der KS- und CS-Substitution und der negative Einfluß der N- und O-Glykosylierung auf den Katabolismus der Aggrekan-Substrate müssen sich dennoch nicht ausschließen. KS und CS sind wesentlich größere Zucker als die gewöhnlichen N- und O-glykosidisch verknüpften Zucker, und sie sind durch die Sulfatgruppen stark negativ geladen. Ein Modell ist demnach denkbar, in dem die großen, stark negativ geladen KS- und CS-Seitenketten die Erkennung des Substrats durch Aggrekanase zwar erleichtern, aber der eigentliche Spaltmechanismus durch die N- und O-glykosidisch verknüpften Zucker sterisch behindert wird.

Beispiele für den Einfluß des Glykosylierungszustandes von Proteinen auf deren Funktion in einem biologischen Prozeß gibt es in der Literatur zahlreiche (104). So konnte für das

Matrixprotein Fibronectin eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Proteasen nach Abtrennung der N-verknüpften Zuckerketten gezeigt werden, und eine differentielle Verzuckerung von Osteonectin führt zu veränderten Eigenschaften der Kollagen-Bindung (104). Ein Regulationsmechanismus für die Spaltbarkeit von Aggrecan durch Aggrecanase über das Ausmaß der Verzuckerung, ähnlich wie hier *in vitro* demonstriert, ist auch für das native Aggrecan *in vivo* denkbar. Ob und wie sich der Glykosylierungszustand von Aggrecan während des Krankheitsverlaufs von Osteoarthritis ändert und damit die Empfindlichkeit gegenüber Aggrecanase-Spaltung beeinflusst, ist derzeit für die N- und O-Glykosylierung nicht bekannt und bedarf weiterer Untersuchungen.

5.2 Einfluß der Länge des rekombinanten Aggrecans rAgg1_{mut} auf den Katabolismus durch Aggrecanase

Aggrecanase ist in der Lage, neben dem nativen Substrat Aggrecan auch die rekombinanten Aggrecane rAgg1_{mut} (40,85) und rG1-G2 (95) spezifisch zwischen E³⁷³ und A³⁷⁴ zu spalten. In rAgg1_{mut} umfaßt der Aggrecanabschnitt die gesamte interglobuläre Domäne, in der die Aggrecanase-Schnittstelle lokalisiert ist, in rG1-G2 sind zusätzlich die beiden globulären Domänen G1 und G2 vorhanden. Für andere, insbesondere kürzere Substrate ist eine Spaltung durch Aggrecanase bisher nicht beschrieben worden. Obwohl *in vitro*-Systeme zur Generierung von Aggrecanase-Aktivität seit mehreren Jahren zur Verfügung stehen (61,105), und obwohl die Substratspezifität von Aggrecanase noch weitgehend ungeklärt ist, sind Versuche, mit Hilfe kurzer synthetischer Peptidsubstrate die Sequenzspezifität von Aggrecanase zu definieren, nicht publiziert worden. Für MMPs dagegen wurden strukturelle Anforderungen an ein Substrat durch einen systematischen Aminosäureaustausch in synthetischen Peptiden bestimmt (77). MMPs sind demnach in der Lage, kurze fluorogene Peptide, die auf der Sequenz der natürlichen Substrate basieren, zu spalten (78,79). Womöglich wurden für Aggrecanase ähnliche Ansätze verfolgt, blieben aber aufgrund des Unvermögens der Aggrecanase, Peptide zu spalten, erfolglos und wurden nie veröffentlicht.

In eigenen Arbeiten mit einem 20 Aminosäuren-langen Peptid, das die Aggrecanase-Schnittstelle repräsentiert, konnte eine Spaltung dieses Peptids durch Aggrecanase nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Auch rAgg2, das dem Fusionsprotein rAgg1_{mut} analoge Konstrukt mit einem 16 Aminosäure-langen Abschnitt der IGD mit zentral gelegener Aggrecanase-Schnittstelle (je 8 Aminosäuren N- und C-terminal von der Schnittstelle), wird von einer in Rattenchondrosarkomzellen induzierten Aggrecanase nicht gespalten. Diese Befunde führten zu der Arbeitshypothese, Aggrecanase benötige neben der eigentlichen Spaltstelle zusätzliche strukturelle Elemente im Substrat, um es effizient zu katabolisieren.

Um diese Hypothese zu testen, wurde ausgehend von rAgg1_{mut} eine Serie von Substratmutanten mit schrittweisen Deletionen der Amino- bzw. Carboxytermini der IGD hergestellt und ihre Empfindlichkeit gegenüber Aggrekanase-Spaltung im Rattenchondrosarkom-Aggrekanase-Assay analysiert. Die stufenweise Verkürzung der IGD am N-Terminus korreliert mit einer verminderten Aggrekanase-Spaltbarkeit der Substratmutanten. Bereits die Deletion der Aminosäuren N-terminal zur MMP-Schnittstelle ($\Delta N2$: 32 Aminosäuren N-terminal zur Aggrekanase-Schnittstelle) führt zu einer drastischen Einschränkung der Umsetzung durch Aggrekanase. Einen vollständigen Verlust der Spaltbarkeit hat die Verkürzung auf 16 Aminosäuren der IGD oder weniger N-terminal zur Aggrekanase-Schnittstelle zur Folge. Im Gegensatz dazu wirken sich vergleichbare C-terminale Deletionen der IGD nicht negativ auf die Spaltung durch Aggrekanase aus. Dieses Ergebnis weist auf eine besondere Rolle der Aminosäuresequenz am N-Terminus der IGD hin, die die MMP-Schnittstelle beinhaltet, um eine effiziente Katabolisierung durch Aggrekanase zu ermöglichen. Die Funktionalität der MMP-Schnittstelle ist dabei für die in Rattenchondrosarkomzellen induzierte Aggrekanase hilfreich aber nicht entscheidend, wie eine leicht verminderte Spaltbarkeit des Substrats als Folge der Mutation der MMP-Schnittstelle zeigt. Vielmehr scheint der Aggrekanabschnitt um die MMP-Schnittstelle als Gesamtheit für eine effiziente Aggrekanase-Spaltung wichtig zu sein. Die drastische Einschränkung der Aggrekanase-Spaltbarkeit, die aus der Deletion aller Aminosäuren N-terminal der MMP-Schnittstelle resultiert ($\Delta N2$), wirft die Frage auf, ob ein MMP-gespaltenes Aggrekanmolekül, dessen IGD-Sequenz identisch mit der von $\Delta N2$ ist, weiterhin von Aggrekanase proteolysiert werden kann. Anders als MMP-gespaltenes rAgg1_{mut} trägt die Substratmutante $\Delta N2$ allerdings N-terminal zum Epitop F³⁴²FGVG... das FLAG-Peptid DYKDDDDK. Das BC-14-Standardprotein, das MMP-gespaltene rAgg1_{mut} exakt widerspiegelt, zeigt im Test auf Spaltbarkeit durch ADAMTS4 eine gegenüber $\Delta N2$ weiter verminderte, wenn auch nicht völlig unterdrückte Umsetzung. Dies verdeutlicht einerseits, daß der für eine effiziente Aggrekanase-Spaltung wichtige Aggrekanbereich hauptsächlich N-terminal der MMP-Schnittstelle lokalisiert ist. Zweitens weist das Ergebnis darauf hin, daß das FLAG-Epitop das Fehlen der Aggrekan-Sequenz teilweise kompensieren kann. Die Anforderungen an die Spezifität dieser Sequenz wären dementsprechend als gering einzuschätzen.

Ähnliche Ergebnisse wurden kürzlich von Mercuri et al. publiziert (106): Das MMP-13-vorgesparte rekombinante Aggrekan rG1-G2 (95) mit dem aminoterminalen Neoepitop F³⁴²FGVG... kann von einer gereinigten Aggrekanase-Aktivität aus IL-1 α stimuliertem Rinderknorpel nicht an der Aggrekanase-Schnittstelle gespalten werden. Dagegen werden Substratmutanten von rG1-G2 mit mutierter MMP-Schnittstelle (DIPEN³⁴¹→DIGSA³⁴¹; F³⁴²FGVG→G³⁴²TRVG; Δ EN³⁴¹FF) ohne Einschränkung zwischen E³⁷³-A³⁷⁴ gespalten. In

Inhibitionsversuchen mit Peptiden, die die MMP-Spaltstelle repräsentieren, reduziert das 10-mer Peptid FVDIPENFFG die Aggrekanase-Spaltung von rG1-G2 auf die Hälfte, das 7-mer IPENFFG hingegen hat keinen Effekt. Diese Ergebnisse stehen insofern mit den hier gezeigten Daten in Einklang, als beide Studien zeigen, daß ein MMP-gespaltenes rekombinantes Aggrekan nicht oder nur gering von Aggrekanase katabolisiert wird. Die Daten von Mercuri et al. (106) und die eigenen Befunde zeigen übereinstimmend, daß die exakte Aminosäuresequenz der MMP-Schnittstelle keine entscheidende Rolle spielt, sondern vielmehr die Gesamtheit des Aggrekanbereichs N-terminal zur MMP-Schnittstelle die Effizienz der Aggrekanase-Spaltung beeinflußt.

Auch Little et al. (60) sehen keine weitere Umsetzung von nativem Aggrekan durch eine lösliche Aggrekanase-Aktivität in konditioniertem Medium IL-1 stimulierter Schweinechondrozyten, wenn die Aggrekan-Monomere zuvor durch MMP-1 an der MMP-Schnittstelle proteolytisch wurden. Diese *in vitro*-Daten unterstützen die Vermutung von Fosang et al. (10), MMP-generierte Aggrekanfragmente seien resistent gegenüber sekundärer Aggrekanase-Spaltung *in vivo*, worauf Analysen der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Osteoarthritis und rheumatoider Arthritis hinweisen.

Zusammengefaßt führen die vorgestellten Daten zu der Vermutung, der Aminoterminus der IGD von Aggrekan beinhalte eine weitere Stelle, über die Aggrekanase mit dem Substrat interagiert und die die Aggrekanase-Spaltung moduliert. Eine solche zusätzliche Andockstelle im Substrat könnte mit einer sogenannten „Exosite“ im Enzym, also einer Interaktionsstelle zusätzlich zum aktiven Zentrum, wechselwirken (107). „Exosite“-abhängige Hydrolysen wurden für verschiedene Proteasen beschrieben. Die prominenteste darunter ist die Serinprotease Thrombin mit einer „Exosite“ für die spezifische Erkennung von Fibrinogen (108). Auch für ADAM-Proteasen wurde eine distale Interaktion zwischen den Enzymen und ihren Substraten postuliert, die wichtig sei für den als „Shedding“ bezeichneten Prozeß des Abstoßens extrazellulärer Bereiche der membrangebundenen Substrate durch ADAM-Proteolyse (109). Weiterhin stellten Maskos et al. (110) aufgrund von Andock-Experimenten die Hypothese auf, pro-TNF α interagiere mit TACE (ADAM17) über eine Anheftungsregion im Enzym im Abstand von mehreren Aminosäuren zum aktiven Zentrum. Chung et al. (111) schließen aus Versuchen mit MMP-3-/MMP-1-chimären Proteinen, daß für die kollagenolytische Aktivität von MMP-1 zusätzlich zum aktiven Zentrum auch die Hemopexin-Domäne und eine weitere Region der katalytischen Domäne essentiell sind. Diese zusätzlich wichtige Region der katalytischen Domäne befindet sich in einer Schleife an der Oberfläche des globulären Enzyms zwischen einer α -Helix und einem β -Faltblatt. Die Autoren vermuten, daß sich solche ausgedehnten Substraterkennungsstellen von MMPs als nützlich für die selektive Spaltung von großen, ausgedehnten Makromolekülen der extrazellulären Matrix erweisen. Interessanterweise weist eine Konsensus-Vorhersage der Sekundärstruktur von

rAgg1_{mut}, die durch die Kombination verschiedener Standardalgorithmen berechnet wurde, auf eine mögliche Schleifenstruktur für die Region der MMP-Schnittstelle hin, gefolgt von einem β -Faltblatt für die Sequenz D³⁵⁰ITVQTVT, gefolgt von einer weiteren Schleife für die Aggrekanase-Schnittstelle (Daten nicht gezeigt). Es ist denkbar, daß die putative Schleife der MMP-Schnittstelle ebenso mit Aggrekanase, möglicherweise über eine den MMPs ähnliche „Exosite“, in Wechselwirkung tritt wie es für die Interaktion zwischen der Aggrekanase-Schnittstelle und dem aktiven Zentrum des Enzyms der Fall ist. Ein zusätzlicher Kontakt über diese „Exosite“ könnte zu einer Konformationsänderung des Substrats, und damit zu einer verbesserten Spaltbarkeit durch Aggrekanase, und/oder zu einer Konformationsänderung des Enzyms, und damit zu einer höheren katalytischen Aktivität führen.

Die Forderung nach zusätzlichen strukturellen Elementen im Substrat für eine effiziente Katabolisierung durch Aggrekanase könnte erklären, warum das rekombinante Substrat rAgg2 und synthetische Peptide, die die Aggrekanase-Schnittstelle beinhalten, nicht von Aggrekanase gespalten werden. Hinweise auf das Unvermögen einer in bovinen Nasenknorpelimplantaten induzierten Aggrekanase-Aktivität, kurze Peptide zu spalten, die der Aggrekanase-Schnittstelle entsprechen, liefern auch Sugimoto et al. (66). Weiterhin berichten Sztrolovics et al. (46) von der Resistenz kleiner Proteoglykane Leucin-reicher Wiederholungen gegenüber Aggrekanase-Spaltung, obwohl diese Proteoglykane über potentielle Aggrekanase-Schnittstellen verfügen, was ebenfalls mit der Abwesenheit zusätzlicher Interaktionsstellen erklärt werden könnte.

Zusammenfassend wird für Aggrekanase eine Substratspezifität postuliert, die zusätzlich zur eigentlichen Aggrekanase-Schnittstelle eine weitere Andockstelle im Substrat für eine effiziente Aggrekanase-Spaltung fordert. Diese Erkennungsstelle für eine putative „Exosite“ von Aggrekanase ist am Aminoterminus der IGD von Aggrekan lokalisiert und beinhaltet zumindest die N-terminale Region der MMP-Schnittstelle. Therapeutisch gesehen kann eine zusätzliche Interaktion zwischen Aggrekanase und dem Substrat einen Angriffspunkt für spezifische Aggrekanase-Inhibitoren bieten, welche die Effizienz der Aggrekanase-Spaltung durch Störung dieser Interaktion herabsetzen könnten.

5.3 Vergleich des Katabolismus der Deletionsmutanten von rAgg1_{mut} durch verschiedene Aggrekanase-Aktivitäten

Die Anforderung an ein Aggrekanase-Substrat, zusätzlich zur Aggrekanase-Schnittstelle weitere Aggrekanase-Sequenzen im Bereich der MMP-Schnittstelle zu beinhalten, wurde für eine in Rattenschondrosarkomzellen induzierte Aggrekanase definiert. Der Vergleich dieser Substratspezifität mit derjenigen einer löslichen Aggrekanase-Aktivität aus IL-1-stimulierten

Schweinechondrozyten, humaner rekombinanter ADAMTS4 und humaner rekombinanter ADAMTS5 zeigt ein sehr ähnliches Substratanforderungsprofil aller vier Aggrekanase-Systeme. Bei sämtlichen getesteten Aggrekanasen hemmen schrittweise N-terminale Deletionen der IGD im Substrat rAgg1_{mut} sukzessive die Spaltung an der Aggrekanase-Schnittstelle, insbesondere wenn die Aminosäuren N-terminal zur MMP-Schnittstelle deletiert sind. Auf vergleichbare C-terminale Deletionen der IGD reagieren die Aggrekanase-Systeme mit unvermindertem Spaltungsvermögen. Der Aminoterminus der IGD spielt demnach für alle Aggrekanasen eine wichtige Rolle für eine effiziente Spaltung des Substrats rAgg1_{mut}, unabhängig davon, ob die Enzymaktivität aus Mensch, Ratte oder Schwein stammt. Für eine speziesübergreifende wichtige Funktion des Aggrekanabereichs an der MMP-Schnittstelle argumentiert auch die Tatsache, daß die IGD von ihrem N-Terminus bis einschließlich der Aggrekanase-Schnittstelle bei den bisher analysierten Säugerspezies extrem konserviert ist (112,113). Die Sequenzidentität in diesem Abschnitt beträgt 94% zwischen Mensch und Ratte bzw. zwischen Mensch und Schwein. Ab der 13. Aminosäure C-terminal zur Aggrekanase-Schnittstelle bis zum C-Terminus der IGD läßt die Sequenzidentität deutlich nach und beträgt nur noch 81% zwischen Mensch und Ratte bzw. 52% zwischen Mensch und Schwein. Die starke Homologie des Aminoterminus der IGD im Vergleich zum Bereich C-terminal der Aggrekanase-Schnittstelle könnte Ausdruck der bedeutenden Funktion der N-terminalen Aminosäuren sein und erklären, warum Aggrekanasen empfindlicher auf N-terminale Deletionen als auf C-terminale Deletionen der IGD reagieren.

Wenn auch die Substratspezifität prinzipiell gleich ist für die getesteten Aggrekanase-Systeme, so bestehen doch geringfügige Unterschiede bei der Umsetzung einzelner Substratmutanten von rAgg1_{mut}. Die Mutante rA^M mit mutierter MMP-Schnittstelle wird uneingeschränkt von der Schweine-Aggrekanase und von ADAMTS4 und ADAMTS5 katabolisiert, die RCS-Aggrekanase dagegen reagiert mit einer auf 65% reduzierten Umsetzung auf die Punktmutationen D³³⁷IP³³⁹EN→A³³⁷IN³³⁹EN. Da Prolin potentiell Knicke in einer dreidimensionalen Proteinstruktur induziert (114), könnte die Substitution von P³³⁹ durch N³³⁹ eine wesentliche Konformationsänderung des Substrats bewirken. Vermutlich sind Spezies-abhängige Unterschiede der Enzymaktivitäten für die stärkere Sensitivität der Ratten-Aggrekanase gegenüber dieser Mutation verantwortlich. Hinweise auf Speziesunterschiede bei den verwandten MMPs und auf den Einfluß einzelner Aminosäureunterschiede zwischen Mensch und Kaninchen auf die Enzymaktivität beschreiben Johnson et al. (115). So könnten Ratten-spezifische Abweichungen in der Aggrekanase-Sequenz dazu führen, daß das Enzym sensibler ist gegenüber der Mutation an der MMP-Schnittstelle.

Auch die Substratmutante ΔC5 wird nicht im gleichen Ausmaß von allen Aggrekanasen umgesetzt. So erscheint die humane rekombinante ADAMTS4 nur wenig sensitiv gegenüber der Deletion aller Aminosäuren der IGD, die der 9. Aminosäure C-terminal der Aggrekanase-

Schnittstelle folgen. Die Umsetzung von $\Delta C5$ durch die anderen Aggrekanasen ist dagegen vernachlässigbar gering. Im Vergleich zur Schweine- und Ratten-Aggrekanase könnte diese Diskrepanz auf Speziesunterschieden zwischen den Enzymaktivitäten beruhen. Bezüglich der Diskrepanz zur humanen rekombinanten ADAMTS5 könnte neben der unterschiedlichen Sequenz per se (48% Identität; (67)) auch eine unterschiedliche Prozessierung oder Verzuckerung in den beiden Expressionssystemen Sf9-Zellen und COS 7-Zellen eine Rolle spielen.

Trotz geringer Unterschiede in der Umsetzung der Substratmutanten von rAgg1_{mut} läßt sich zusammenfassend feststellen, daß alle Aggrekanase-Aktivitäten eine ausgedehnte Aggrekanase-Sequenz am Aminoterminus der IGD für einen effizienten Katabolismus des rekombinanten Substrats benötigen. Im Gegensatz dazu stehen die Substratanforderungen der MT1-MMP für eine Spaltung an der Aggrekanase-Schnittstelle. Die katalytische Domäne rekombinanter, humaner MT1-MMP ist unsensibel gegenüber allen N-terminalen Deletionen der IGD von rAgg1_{mut}, das heißt auch $\Delta N5$ mit acht Aminosäuren der IGD N-terminal zur Aggrekanase-Schnittstelle wird zwischen E³⁷³ und A³⁷⁴ gespalten. Ebenso wird die Substratvariante rAgg2 effizient durch MT1-MMP katalysiert. Nur die Deletionsmutante $\Delta C6$, bei der fünf Aminosäuren der IGD C-terminal zur Aggrekanase-Schnittstelle verbleiben, wird von der Matrix-Metalloprotease kaum noch umgesetzt. Dies bedeutet, daß die kritische Substratgröße für die katalytische Domäne von MT1-MMP N-terminal weniger als acht und C-terminal zwischen fünf und acht Aminosäuren zur Aggrekanase-Schnittstelle beträgt. Zur effizienten Spaltung von rAgg1_{mut} zwischen E³⁷³ und A³⁷⁴ benötigt MT1-MMP also keine weitere Andockstelle am Substrat außer der Spaltstelle selbst, das heißt zumindest die katalytische Domäne geht keine weiteren Interaktionen mit dem Substrat außer am aktiven Zentrum ein. Ob die katalytische Domäne oder andere Enzymdomänen im Falle der getesteten Aggrekanasen für die postulierte zusätzliche Interaktion zwischen Enzym und Aminoterminus der IGD von Aggrekan verantwortlich sind, läßt sich aus den vorliegenden Daten nicht ableiten. Dafür wären Studien mit schrittweise verkürzten Enzymvarianten zur Definition der Rolle der einzelnen Domänen notwendig.

Die Substratspezifität der untersuchten Aggrekanasen, die am Aminoterminus der IGD eine minimale Länge von 32 Aminosäuren zur Aggrekanase-Schnittstelle für eine effiziente rAgg1_{mut}-Spaltung fordert, ist charakteristisch für Schweine-Aggrekanase, für Ratten-Aggrekanase, für ADAMTS4 und ADAMTS5 und wird von MT1-MMP nicht geteilt. Dies ist ein Hinweis darauf, daß MT1-MMP keine „wirkliche“ Aggrekanase-Aktivität darstellt. Untermauert wird diese Annahme durch Spaltungsversuche mit einer Mutante von rAgg1_{mut}, deren Aggrekanase-Schnittstelle durch die Punktmutation NITEGE³⁷³→NITEGA³⁷³ außer Funktion gesetzt wurde. Alle untersuchten Aggrekanasen sind nicht in der Lage, diese Mutante an der Aggrekanase-Schnittstelle zu spalten, die katalytische Domäne der MT1-MMP

jedoch zeigt eine extensive Umsetzung (Daten nicht gezeigt). MT1-MMP ist demnach keine Glutamyl-Endopeptidase, eine Eigenschaft, die als Charakteristikum für Aggrekanasen angesehen wird (74,97,116,117). MT1-MMP unterscheidet sich von Aggrekanasen auch dadurch, daß das Enzym die IGD von Aggrekan nicht nur, wie für Aggrekanasen charakteristisch, zwischen E³⁷³ und A³⁷⁴ spaltet (40). So berichten Büttner et al. (40) und Fosang et al. (118) von mehreren Spaltstellen in der IGD unter *in vitro* Bedingungen, unter anderem an der allgemeinen MMP-Schnittstelle N³⁴¹-F³⁴² und an weiteren, C-terminal lokalisierten Stellen. Auch D'Ortho et al. (119) und Ohuchi et al. (120) haben gezeigt, daß MT1-MMP in der Lage ist, natives Aggrekan *in vitro* zu degradieren, wobei die genauen Schnittstellen nicht lokalisiert wurden. Für eine Rolle von MT1-MMP im Krankheitsprozeß der Osteoarthritis spricht eine erhöhte Expression von MT1-MMP durch Chondrozyten in arthrotischem Knorpel (121). Eine Involvierung von MT1-MMP in der Pathophysiologie von OA ist demnach sowohl indirekt als Aktivator von MMP-2 und MMP-13 als auch direkt in der Degradation von Matrixbestandteilen denkbar (121), wenngleich eine Beteiligung von MT1-MMP an der Degradation von Aggrekan *in vivo* bisher nicht gezeigt werden konnte (118). Aufgrund der deutlichen Unterschiede der Substratspezifität von MT1-MMP im Vergleich zu den Aggrekanasen ist es allerdings unwahrscheinlich, daß die prädominante Funktion von MT1-MMP *in vivo* in der Spaltung von Aggrekan an der Aggrekanase-Schnittstelle liegt.

5.4 Wirkung von Heparin auf Aggrekanase-Aktivitäten und MMPs

Eine weitere Charakterisierung von Aggrekanase besteht in der Profilierung potentieller inhibitorischer Verbindungen. Eine inhibitorische Wirkung auf Aggrekanase, die in Explantkulturen boviner Nasenknorpel durch Retinsäure induziert wurde, ist für Heparin gezeigt worden (66). Alle vier in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Aggrekanase-Systeme werden von Enoxaparin, einem fraktionierten Heparin niedriger Molekülmasse, ebenfalls in ihrer Umsetzung eines Aggrekanase-Substrats gehemmt. Dabei findet eine Inhibition der Aggrekanase-Aktivität unabhängig davon statt, ob das rekombinante Substrat rAggI_{mut}, glykosyliert oder nicht, oder das native Aggrekan A1D1 verwendet wird. Die Heparin-Konzentrationen, bei welchen die Enzymaktivitäten auf die Hälfte reduziert werden (IC₅₀), schwanken allerdings erheblich zwischen den Aggrekanase-Systemen. Am schwächsten hemmt Heparin die RCS-Aggrekanase. Da der RCS-Aggrekanase-Assay ein zelluläres Testsystem ist, könnte Heparin durch Zelloberflächenrezeptoren oder durch Komponenten der extrazellulären Matrix, die von RCS-Zellen massiv gebildet wird, unspezifisch gebunden werden und damit nicht mehr der Interaktion mit Aggrekanase zur Verfügung stehen. Alternativ ist ein Abbau von Heparin durch sekretierte Heparinasen denkbar.

Die IC_{50} -Werte für Heparin in den zellfreien Aggrekanase-Systemen sind um wenigstens zwei Größenordnungen kleiner als im zellulären RCS-Assay. Ein direkter Vergleich der Inhibitionskonstanten in den zellfreien Systemen bzw. eine Aussage über die Identität der beiden Aggrekanasen aus Schwein und Ratte anhand eines solchen Vergleichs mit ADAMTS4 und ADAMTS5 ist im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, da keine gereinigten Enzympräparationen zur Verfügung standen.

Im Kontrast zu Aggrekanasen werden die Matrix-Metalloproteasen MT1-MMP und MMP-3 nicht durch Heparin inhibiert. Jedoch muß bei diesem Vergleich berücksichtigt werden, daß im Falle der beiden MMPs nur mit der katalytischen Domäne gearbeitet wurde, alle Aggrekanasen dagegen lagen als Enzyme mit voller Länge vor. Jüngste Versuche zur Heparin-Wirkung auf weitere MMPs weisen tatsächlich darauf hin, daß auch MMP-2 und MMP-13 durch Heparin inhibiert werden können, wenn sie als Enzyme mit voller Länge vorliegen (Labor Dr. Weithmann, Aventis, Frankfurt; persönliche Kommunikation). Die Hemmung durch Heparin ist demnach nicht spezifisch für ADAMTS-Proteasen, sondern ist auch für MMPs möglich. Dennoch müssen die Inhibitionsmechanismen für beide Protease-Klassen unterschiedlich sein. Im Fall von MMP-13 handelt es sich um eine reine Störung der Interaktion zwischen der Hemopexin-Domäne von MMP-13 und dessen Substrat Typ II-Kollagen, was sich aus der Konzeption des Testsystems schließen läßt. Die Interaktion ist für das Typ II-Kollagen-Spaltungsvermögen von MMP-13 essentiell (122). MMP-2 dagegen wird durch Heparin in der Fähigkeit, ein fluorogenes Peptidsubstrat zu spalten, inhibiert, was auf einer Interaktion von Heparin entweder mit der katalytischen Domäne, der Fibronectin-Typ II-Domäne oder mit der Hemopexin-Domäne von MMP-2 beruhen könnte. Die Hemopexin-Domänen der MMPs sind dafür bekannt, die Substratspezifität der MMPs maßgeblich über Wechselwirkungen mit dem Substrat zu beeinflussen (123). Im Fall der Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9) spielt weiterhin die Fibronectin-Typ II-ähnliche Domäne eine wesentliche Rolle bei der Bindung an Gelatin (124). Eine Interaktion von Heparin mit der Hemopexin- oder Fibronectin-Domäne von MMP-2 könnte demnach entweder sterisch die Substraterkennung behindern oder aber eine Konformationsänderung des Enzyms bewirken, die sich negativ auf die Aktivität des katalytischen Zentrums auswirken könnte.

Im Fall der Aggrekanasen, die zu den ADAMTS-Proteasen gehören, muß ein alternativer Mechanismus die Inhibition durch Heparin vermitteln, da ADAMTSs keine Hemopexin- oder Fibronectin-Domänen besitzen. Die Struktur aller aktiven ADAMTS-Mitglieder weist eine Metalloprotease-, Disintegrin-, Spacer-Domäne und unterschiedlich viele Thrombospondin (TSP)-Typ 1-Domänen auf (125). Eine Interaktion mit Heparin ist prinzipiell für jede dieser Domänen denkbar. Darunter ist eine Wechselwirkung mit der TSP-Typ 1-Domäne sehr wahrscheinlich, da es Hinweise gibt auf eine Interaktion zwischen der Sequenz W-S-X-W des TSP-Typ 1-Motivs bzw. zwischen den TSP-Typ 1-Motiven muriner ADAMTS1 mit Heparin

(73,126). Ein Indiz für die Aggrekanase-Hemmung durch Heparin aufgrund der Heparin-Affinität zu den TSP-Motiven der ADAMTS-Mitglieder liefern Tortorella et al. (52) mit der Feststellung, das TSP-Motiv der ADAMTS4 sei wichtig für die Substraterkennung und -Spaltung. Diese Schlußfolgerung stützt sich erstens auf den Befund, daß eine um das TSP-1-Motiv verkürzte Version von ADAMTS4 natives Aggrekan nicht spalten kann. Zweitens können Peptide, die das TSP-1-Motiv repräsentieren, die Bindung von ADAMTS4 an Aggrekan und damit dessen Spaltung verhindern. Drittens wird gezeigt, daß GAG-freies, natives Aggrekan von ADAMTS4 nicht umgesetzt wird. Dieser letzte Punkt steht im Widerspruch zu den hier vorgestellten Daten, da humane ADAMTS4 das rekombinante Substrat rAgg1_{mut}, das nicht GAG-substituiert ist (85), effizient an der Aggrekanase-Schnittstelle spaltet. Außerdem widerspricht dieser Punkt dem Bericht von Mercuri et al. (95), der einen effizienten Katabolismus des rekombinanten Aggrekans rG1-G2, das ebenfalls nicht GAG-substituiert ist, durch eine Aggrekanase-Aktivität im Medium von IL-1-stimuliertem bovinem Nasenknorpel zeigt. Womöglich läßt sich diese Diskrepanz durch ein höheres Substrat:Enzym-Verhältnis in den letzten beiden Fällen erklären, welches bei genügend hoher Substratmenge auch die Spaltung GAG-freier Aggrekane erlauben könnte.

Obwohl sich die hier beschriebene Inhibition der Aggrekanasen durch Heparin nicht durch eine gestörte Interaktion zwischen den TSP-1-Motiven der Proteasen und den GAG-Seitenketten des Substrats erklären läßt (da keine GAG-Substitution vorliegt), ist eine störende Interaktion von Heparin mit TSP-1 insofern denkbar, als dieser Komplex sterisch die Bindung der Aggrekanasen an das Aggrekan-Substrat behindern könnte. Alternativ könnte die Bindung von Heparin an die TSP-Motive der Aggrekanasen zu einer Konformationsänderung der Enzyme mit negativen Auswirkungen auf die Aktivität des katalytischen Zentrums führen.

Die Untersuchungen zur Wirkung von Heparin auf Aggrekanasen und auf MMPs zeigen demnach, daß ein fraktioniertes Heparin niedriger Molekülmasse in der Lage ist, beide Protease-Klassen zu inhibieren, sofern die Enzyme in ihrer vollen Länge vorliegen. Dabei existieren im Falle der Aggrekanasen Hinweise auf eine Involvierung der TSP-ähnlichen Domänen im Inhibitionsmechanismus; der inhibitorische Effekt auf MMPs dagegen könnte über MMP-spezifische Domänen vermittelt werden. Deletionen einzelner Enzymdomänen und deren Auswirkungen auf die Hemmung durch Heparin werden hilfreich sein zur Aufklärung des exakten Heparin-Inhibitionsmechanismus.

6. Zusammenfassung

Osteoarthritis ist eine degenerative Gelenkerkrankung, die in einem schleichenden Prozeß zur Zerstörung des Knorpels in den gewichtstragenden Gelenken insbesondere der Hüfte und des Knies führt. Chronische Behinderungen sind die Folge. Die hohe Prävalenz in der vorwiegend älteren Bevölkerung hat zur Bezeichnung als Volkskrankheit geführt. Die genauen Ursachen der Osteoarthritis sind weitgehend unbekannt, jedoch wird davon ausgegangen, daß eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen anabolen und katabolen Prozessen, die am normalen Knorpelmetabolismus beteiligt sind, zugunsten des Katabolismus stattfindet.

Ein Charakteristikum der Krankheit ist die verstärkte Degradation des Proteoglykans Aggrecan, einem der Hauptbestandteile der Knorpelmatrix. Dafür verantwortlich ist besonders im frühen Krankheitsstadium die Enzymaktivität „Aggrecanase“, in späteren Phasen sind auch verschiedene Matrix-Metalloproteasen (MMPs) beteiligt. Die Enzymaktivität Aggrecanase blieb lange Zeit unentdeckt und wurde unter den Mitgliedern der MMP-Familie vermutet. Jedoch weisen MMPs und Aggrecanase eine unterschiedliche Spezifität für Aggrecan auf, da MMPs die interglobuläre Domäne des Aggrecans bevorzugt zwischen N³⁴¹ und F³⁴² spalten (MMP-Schnittstelle), Aggrecanase dagegen nur zwischen E³⁷³ und A³⁷⁴ (Aggrecanase-Schnittstelle). Daß es sich bei MMPs und Aggrecanase um distinkte Aktivitäten handelt, zeigt die jüngste Klonierung zweier Aggrecanasen, die der Familie der ADAMTS-Proteasen angehören. Trotz der Identifikation dieser zwei Aggrecanasen, die über eine Metalloprotease-, Disintegrin- und Thrombospondin-Domäne verfügen, sind viele Enzym-Charakteristika noch ungeklärt, und auch die Frage, welches dieser beiden Enzyme oder welches noch unentdeckte Enzym in der Pathophysiologie der Osteoarthritis die bedeutendste Rolle spielt, ist noch offen. Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Untersuchung der noch weitgehend ungeklärten Substratspezifität der Aggrecanase. Besonderes Interesse bestand in der Frage, welche minimalen Anforderungen ein Substrat erfüllen muß, um von Aggrecanase als solches akzeptiert zu werden, da Hinweise existieren, daß kurze Peptide, die die Schnittstelle in nativem Aggrecan repräsentieren, nicht als Aggrecanase-Substrat erkannt und gespalten werden. In dieser Arbeit wird gezeigt, daß tatsächlich Sequenzbereiche des Aggrecans distal zur Aggrecanase-Schnittstelle für eine effiziente Spaltung durch Aggrecanase notwendig sind. Durch Mutations- und Deletionsstudien mit einem funktionalen rekombinanten Substrat, das die gesamte interglobuläre Domäne des Aggrecans mit der Aggrecanase-Schnittstelle beinhaltet, wird gezeigt, daß die Substratregion der MMP-Schnittstelle, insbesondere deren N-terminale Hälfte, wichtig ist für eine effiziente Spaltung an der Aggrecanase-Schnittstelle 32 Aminosäuren weiter C-terminal. Dieses Ergebnis weist auf die Möglichkeit hin, Aggrecanase trete über eine zweite, von der eigentlichen Schnittstelle distinkten Interaktionsstelle mit dem Substrat in Wechselwirkung. Diese Substratspezifität ist in verschiedenen zellulären und nicht-zellulären sowie rekombinanten Aggrecanase-Systemen reproduzierbar und somit für

Aggrecanase charakteristisch. Die membrangebundene MMP-14, die unter bestimmten Bedingungen in der Lage ist, eine Proteolyse der Aggrecanase-Schnittstelle zu erzeugen, teilt diese Eigenschaft nicht und ist deshalb als Kandidat für die pathologische Aggrecanase-Aktivität unwahrscheinlich.

Desweiteren wurde die Rolle der Substratglykosylierung für die Degradation durch Aggrecanase untersucht. Die Ergebnisse zeigen, daß die N- und O-Glykosylierungen des rekombinanten Substrats dessen Spaltung durch Aggrecanase negativ beeinflussen. Einen zusätzlichen Aspekt der Aggrecanase-Charakterisierung stellt die Inhibition der Enzymaktivität durch das Mukopolysaccharid Heparin dar. Heparin bindet vermutlich an Enzymdomänen außerhalb der katalytischen Domäne und hemmt so die für eine effiziente Spaltung nötigen Interaktionen zwischen diesen Domänen und dem Substrat.

Die Charakterisierung der Enzymaktivität Aggrecanase, die in dieser Arbeit beschrieben ist, führt zu einem besseren Verständnis der molekularen Mechanismen der Aggrecan-Degradation und kann zur Entwicklung neuer Ansätze zur Inhibition des Enzyms im Zuge der Osteoarthrosebekämpfung beitragen.

7. Literaturverzeichnis

1. Martel, P.J. 1999. Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 7:371-373.
2. Creamer, P. and M.C. Hochberg. 1997. Osteoarthritis. *Lancet* 350:503-508.
3. Kuettner, K.E. and V.M. Goldberg. 1995. Osteoarthritic Disorders. American Academy of Orthopaedic Surgeons.
4. Radin, E.L. 1998. Die Ätiologie und Behandlung der Arthrose. *Rheumatologie in Europa* 27:47-48.
5. Subcommittee on Osteoarthritis of the American College of Rheumatology. 2000. Recommendations for the Medical Management of Osteoarthritis of the Hip and Knee. *Arthritis Rheum.* 49:1905-1915.
6. Dean, D.D. 1991. Proteinase-mediated cartilage degradation in osteoarthritis. *Semin.Arthritis Rheum.* 20:2-11.
7. Chubinskaya, S., K.E. Kuettner, and A.A. Cole. 1999. Expression of matrix metalloproteinases in normal and damaged articular cartilage from human knee and ankle joints. *Lab.Invest.* 79:1669-1677.
8. Ishiguro, N., T. Ito, H. Ito, H. Iwata, H. Jugessur, M. Ionescu, and A.R. Poole. 1999. Relationship of matrix metalloproteinases and their inhibitors to cartilage proteoglycan and collagen turnover: analyses of synovial fluid from patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 42:129-136.
9. Mehraban, F., M.W. Lark, F.N. Ahmed, F. Xu, and R.W. Moskowitz. 1998. Increased secretion and activity of matrix metalloproteinase-3 in synovial tissues and chondrocytes from experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 6:286-294.
10. Fosang, A.J., K. Last, and R.A. Maciewicz. 1996. Aggrecan is degraded by matrix metalloproteinases in human arthritis. Evidence that matrix metalloproteinase and aggrecanase activities can be independent. *J.Clin.Invest.* 98:2292-2299.
11. Dieppe, P. and M. Billingham. 1998. Symposium Arthrose. Editoriale. *Rheumatologie in Europa* 27:44-45.
12. Hamerman, D. 1989. The biology of osteoarthritis. *N.Engl.J.Med.* 320:1322-1330.
13. Felson, D.T., N.N. Couropmitree, C.E. Chaisson, M.T. Hannan, Y. Zhang, T.E. McAlindon, M. LaValley, D. Levy, and R.H. Myers. 1998. Evidence for a Mendelian gene in a segregation analysis of generalized radiographic osteoarthritis: the Framingham Study. *Arthritis Rheum.* 41:1064-1071.
14. Spector, T.D., F. Cicuttini, J. Baker, J. Loughlin, and D. Hart. 1996. Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study. *BMJ.* 312:940-943.
15. Eyre, D.R., M.A. Weis, and R.W. Moskowitz. 1991. Cartilage expression of a type II collagen mutation in an inherited form of osteoarthritis associated with a mild chondrodysplasia. *J.Clin.Invest.* 87:357-361.
16. Petersson, I.F. 1998. Epidemiologische Risikofaktoren für die Arthrose peripherer Gelenke. *Rheumatologie in Europa* 27:45-46.

17. Gierse, H., B. Maaz, and T. Wessolowski. 1992. Hüftendoprothetik- Eine Standortbestimmung. *Dt.Ärzteblatt* 89:38-41.
18. Lohmander, L.S. 1991. Rolle und Bedeutung von Bindegewebsmarkern in Synovia und Serum in der Therapiekontrolle. In *Therapeutische Zugänge zu Gelenkerkrankungen*. H.H. Raspe. Zuckerschwerdt Verlag München, 28-36.
19. Hardingham, T.E., A.J. Fosang, and J. Dudhia. 1992. Aggrecan, the chondroitin sulfate/keratan sulfate proteoglycan from cartilage. In *Articular cartilage and osteoarthritis*. K.E. Kuettner. Raven Press, New York. 5-19.
20. Kuettner, K.E. 1994. Cartilage integrity and homeostasis. In *Rheumatology*. J.H. Klippel and P. Dieppe. Mosby, 6.1-6.16.
21. Hunziker, E.B. 1992. Articular cartilage structure in humans and experimental animals. In *Articular cartilage and osteoarthritis*. K.E. Kuettner. Raven Press, New York. 183-199.
22. Heinegard, D. and E.R. Pimentel. 1992. Cartilage matrix proteins. In *Articular cartilage and osteoarthritis*. K.E. Kuettner. Raven Press, New York. 95-110.
23. Eyre, D.R. 1991. The collagens of articular cartilage. *Semin.Arthritis Rheum.* 21:2-11.
24. Eyre, D.R., J. Wu, C. Niyibizi, and L. Chun. 1990. The cartilage collagens: Analysis of their cross-linking interactions and matrix organisation. In *Methods in research*. A. Maroudas and K. Kuettner. Academic Press, London. 28-33.
25. Van-der-Rest, M. and R. Mayne. 1988. Type IX collagen proteoglycan from cartilage is covalently cross-linked to type II collagen. *J.Biol.Chem.* 263:1615-1618.
26. Mendler, M., B.S. Eich, L. Vaughan, K.H. Winterhalter, and P. Bruckner. 1989. Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX, and XI. *J.Cell Biol.* 108:191-197.
27. Knudson, C.B. 1993. Hyaluronan receptor-directed assembly of chondrocyte pericellular matrix. *J.Cell Biol.* 120:825-834.
28. Maroudas, A., M.T. Bayliss, and R. Schneiderman. 1998. Quantitative studies of aggrecan turnover in human cartilage based on structural data and aspartic acid racemization. *Trans.Orthop.Res.Soc.* 23:80.
29. Bayliss, M.T., S. Howat, C. Davidson, and J. Dudhia. 2000. The organization of aggrecan in human articular cartilage. Evidence for age-related changes in the rate of aggregation of newly synthesized molecules. *J.Biol.Chem.* 275:6321-6327.
30. Schwartz, N.B., E.W. Pirok, J. Mensch-JR, and M.S. Domowicz. 1999. Domain organization, genomic structure, evolution, and regulation of expression of the aggrecan gene family. *Prog.Nucleic.Acid.Res.Mol.Biol.* 62:177-225.
31. Valhmu, W.B., G.D. Palmer, P.A. Rivers, S. Ebara, J.F. Cheng, S. Fischer, and A. Ratcliffe. 1995. Structure of the human aggrecan gene: exon-intron organization and association with the protein domains. *Biochem.J.* 309:535-542.
32. Watanabe, H., Y. Yamada, and K. Kimata. 1998. Roles of aggrecan, a large chondroitin sulfate proteoglycan, in cartilage structure and function. *J.Biochem.Tokyo* 124:687-693.

33. Day, J.M., A.D. Murdoch, and T.E. Hardingham. 1999. The folded protein modules of the C-terminal G3 domain of aggrecan can each facilitate the translocation and secretion of the extended chondroitin sulfate attachment sequence. *J.Biol.Chem.* 274:38107-38111.
34. Flannery, C., V. Stanescu, M. Morgelin, R. Boynton, J. Gordy, and J. Sandy. 1992. Variability in the G3 domain content of bovine aggrecan from cartilage extracts and chondrocyte cultures. *Arch.Biochem.Biophys.* 297:52-60.
35. Doege, K.J., S.N. Coulter, L.M. Meek, K. Maslen, and J.G. Wood. 1997. A human-specific polymorphism in the coding region of the aggrecan gene. Variable number of tandem repeats produce a range of core protein sizes in the general population. *J.Biol.Chem.* 272:13974-13979.
36. Vilim, V. and A.J. Fosang. 1993. Characterization of proteoglycans isolated from associative extracts of human articular cartilage. *Biochem.J.* 293:165-172.
37. Vilim, V. and A.J. Fosang. 1994. Proteoglycans isolated from dissociative extracts of differently aged human articular cartilage: characterization of naturally occurring hyaluronan-binding fragments of aggrecan. *Biochem.J.* 304:887-894.
38. Plaas, A.H., P.S. Wong, P.J. Roughley, R.J. Midura, and V.C. Hascall. 1997. Chemical and immunological assay of the nonreducing terminal residues of chondroitin sulfate from human aggrecan. *J.Biol.Chem.* 272:20603-20610.
39. Fosang, A.J., P.J. Neame, K. Last, T.E. Hardingham, G. Murphy, and J.A. Hamilton. 1992. The interglobular domain of cartilage aggrecan is cleaved by PUMP, gelatinases, and cathepsin B. *J.Biol.Chem.* 267:19470-19474.
40. Büttner, F.H., C.E. Hughes, D. Margerie, A. Lichte, H. Tschesche, B. Caterson, and E. Bartnik. 1998. Membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) cleaves the recombinant aggrecan substrate rAgg1mut at the 'aggrecanase' and the MMP sites. Characterization of MT1-MMP catabolic activities on the interglobular domain of aggrecan. *Biochem.J.* 333:159-165.
41. Stracke, J.O., A.J. Fosang, K. Last, F.A. Mercuri, A.M. Pendas, E. Llano, R. Perris, P.E. Di Cesare, G. Murphy, and V. Knauper. 2000. Matrix metalloproteinases 19 and 20 cleave aggrecan and cartilage oligomeric protein (COMP). *FEBS Lett.* 478:52-56.
42. Flannery, C.R., M.W. Lark, and J.D. Sandy. 1992. Identification of a stromelysin cleavage site within the interglobular domain of human aggrecan. Evidence for proteolysis at this site in vivo in human articular cartilage. *J.Biol.Chem.* 267:1008-1014.
43. Lark, M.W., E.K. Bayne, and L.S. Lohmander. 1995. Aggrecan degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Acta Orthop.Scand.Suppl.* 266:92-97.
44. Sandy, J.D., C.R. Flannery, P.J. Neame, and L.S. Lohmander. 1992. The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. Evidence for the involvement in osteoarthritis of a novel proteinase which cleaves the Glu 373-Ala 374 bond of the interglobular domain. *J.Clin.Invest.* 89 :1512-1516.
45. Lohmander, L.S., P.J. Neame, and J.D. Sandy. 1993. The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. Evidence that aggrecanase mediates cartilage degradation in inflammatory joint disease, joint injury, and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 36:1214-1222.

46. Sztrolovics, R., R.J. White, A.R. Poole, J.S. Mort, and P.J. Roughley. 1999. Resistance of small leucine-rich repeat proteoglycans to proteolytic degradation during interleukin-1-stimulated cartilage catabolism. *Biochem.J.* 339:571-577.
47. Neame, P.J., H. Tapp, and A. Azizan. 1999. Noncollagenous, nonproteoglycan macromolecules of cartilage. *Cell Mol.Life Sci.* 55:1327-1340.
48. Chevalier, X. 1993. Fibronectin, cartilage, and osteoarthritis. *Semin.Arthritis Rheum.* 22:307-318.
49. Briggs, M.D., S.M. Hoffman, L.M. King, A.S. Olsen, H. Mohrenweiser, J.G. Leroy, G.R. Mortier, D.L. Rimoim, R.S. Lachman, and E.S. Gaines. 1995. Pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia due to mutations in the cartilage oligomeric matrix protein gene. *Nat.Genet.* 10:330-336.
50. Miller, R.R. and C.A. McDevitt. 1988. Thrombospondin is present in articular cartilage and is synthesized by articular chondrocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 153:708-714.
51. Pfander, D., T. Cramer, D. Deuerling, G. Weseloh, and B. Swoboda. 2000. Expression of thrombospondin-1 and its receptor CD36 in human osteoarthritic cartilage. *Ann.Rheum.Dis.* 59 :448-454.
52. Tortorella, M.D., M. Pratta, R.Q. Liu, I. Abbaszade, H. Ross, T. Burn, and E. Arner. 2000. The Thrombospondin Motif of Aggrecanase (ADAMTS-4) is Critical for Aggrecan Substrate Recognition and Cleavage. *J.Biol.Chem.* 275:25791-25797.
53. Aigner, T., K. Gluckert, and K. von-der-Mark. 1997. Activation of fibrillar collagen synthesis and phenotypic modulation of chondrocytes in early human osteoarthritic cartilage lesions. *Osteoarthritis Cartilage* 5:183-189.
54. Aigner, T., S.I. Vornehm, G. Zeiler, J. Dudhia, K. von-der-Mark, and M.T. Bayliss. 1997. Suppression of cartilage matrix gene expression in upper zone chondrocytes of osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum.* 40:562-569.
55. Aigner, T. and J. Dudhia. 1997. Phenotypic modulation of chondrocytes as a potential therapeutic target in osteoarthritis: a hypothesis. *Ann.Rheum.Dis.* 56:287-291.
56. Cs Szabo, G., P.J. Roughley, A.H. Plaas, and T.T. Glant. 1995. Large and small proteoglycans of osteoarthritic and rheumatoid articular cartilage. *Arthritis Rheum.* 38:660-668.
57. Blanco, F.J., R. Guitian, M.E. Vazquez, F.J. de-Toro, and F. Galdo. 1998. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis Rheum.* 41:284-289.
58. Hashimoto, S., R.L. Ochs, S. Komiya, and M. Lotz. 1998. Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 41:1632-1638.
59. Arner, E.C., C.E. Hughes, C.P. Decicco, B. Caterson, and M.D. Tortorella. 1998. Cytokine-induced cartilage proteoglycan degradation is mediated by aggrecanase. *Osteoarthritis Cartilage* 6:214-228.
60. Little, C.B., C.R. Flannery, C.E. Hughes, J.S. Mort, P.J. Roughley, C. Dent, and B. Caterson. 1999. Aggrecanase versus matrix metalloproteinases in the catabolism of the interglobular domain of aggrecan *in vitro*. *Biochem.J.* 344:61-68.

61. Sandy, J.D., P.J. Neame, R.E. Boynton, and C.R. Flannery. 1991. Catabolism of aggrecan in cartilage explants. Identification of a major cleavage site within the interglobular domain. *J.Biol.Chem.* 266:8683-8685.
62. Van Meurs, J., P.L. van-Lent, A.E. Holthuysen, I.I. Singer, E.K. Bayne, and W.B. van-den-Berg. 1999. Kinetics of aggrecanase- and metalloproteinase-induced neoepitopes in various stages of cartilage destruction in murine arthritis. *Arthritis Rheum.* 42:1128-1139.
63. Van Meurs, J., P. Van Lent, R. Stoop, A. Holthuysen, I. Singer, E. Bayne, J. Mudgett, R. Poole, C. Billingham, P. Van der Kraan, P. Buma, and W. Van den Berg. 1999. Cleavage of aggrecan at the ASN³⁴¹-PHE³⁴² site coincides with the initiation of collagen damage in murine antigen-induced arthritis - A pivotal role for stromelysin 1 in matrix metalloproteinase activity. *Arthritis Rheum.* 42:2074-2084.
64. Fosang, A.J., K. Last, P.J. Neame, G. Murphy, V. Knauper, H. Tschesche, C.E. Hughes, B. Caterson, and T.E. Hardingham. 1994. Neutrophil collagenase (MMP-8) cleaves at the aggrecanase site E373-A374 in the interglobular domain of cartilage aggrecan. *Biochem.J.* 304:347-351.
65. Arner, E.C., C.P. Decicco, R. Cherney, and M.D. Tortorella. 1997. Cleavage of native cartilage aggrecan by neutrophil collagenase (MMP-8) is distinct from endogenous cleavage by aggrecanase. *J.Biol.Chem.* 272:9294-9299.
66. Sugimoto, K., M. Takahashi, Y. Yamamoto, K. Shimada, and K. Tanzawa. 1999. Identification of aggrecanase activity in medium of cartilage culture. *J.Biochem.(Tokyo)* 126:449-455.
67. Abbaszade, I., R.Q. Liu, F. Yang, S.A. Rosenfeld, O.H. Ross, J.R. Link, D.M. Ellis, M.D. Tortorella, M.A. Pratta, J.M. Hollis, R. Wynn, J.L. Duke, H.J. George, M.C. Hillman, Jr., K. Murphy, B.H. Wiswall, R.A. Copeland, C.P. Decicco, R. Bruckner, H. Nagase, Y. Itoh, R.C. Newton, R.L. Magolda, J.M. Trzaskos, G.F. Hollis, E.C. Arner, and T.C. Burn. 1999. Cloning and characterization of *ADAMTS11*, an aggrecanase from the ADAMTS family. *J.Biol.Chem.* 274:23443-23450.
68. Tortorella, M.D., T.C. Burn, M.A. Pratta, I. Abbaszade, J.M. Hollis, R. Liu, S.A. Rosenfeld, R.A. Copeland, C.P. Decicco, R. Wynn, A. Rockwell, F. Yang, J.L. Duke, K. Solomon, H. George, R. Bruckner, H. Nagase, Y. Itoh, D.M. Ellis, H. Ross, B.H. Wiswall, K. Murphy, M.C. Hillman, Jr., G.F. Hollis, R.C. Newton, R.L. Magolda, J.M. Trzaskos, and E.C. Arner. 1999. Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins. *Science* 284:1664-1666.
69. Wolfsberg, T.G., P. Primakoff, D.G. Myles, and J.M. White. 1995. ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. *J.Cell Biol.* 131:275-278.
70. Mullberg, J., K. Althoff, T. Jostock, and J.S. Rose. 2000. The importance of shedding of membrane proteins for cytokine biology. *Eur.Cytokine.Netw.* 11:27-38.
71. Primakoff, P. and D.G. Myles. 2000. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends.Genet.* 16:83-87.
72. Caterson, B., C.R. Flannery, C.E. Hughes, and C.B. Little. 2000. Mechanisms involved in cartilage proteoglycan catabolism. *Matrix Biol.* 19:333-344.

73. Kuno, K. and K. Matsushima. 1998. ADAMTS-1 protein anchors at the extracellular matrix through the thrombospondin type I motifs and its spacing region. *J.Biol.Chem.* 273:13912-13917.
74. Sandy, J.D., A.H. Plaas, and T.J. Koob. 1995. Pathways of aggrecan processing in joint tissues. Implications for disease mechanism and monitoring. *Acta Orthop.Scand.Suppl.* 266:26-32.
75. Ilic, M.Z., H.C. Robinson, and C.J. Handley. 1998. Characterization of aggrecan retained and lost from the extracellular matrix of articular cartilage. Involvement of carboxyl-terminal processing in the catabolism of aggrecan. *J.Biol.Chem.* 273:17451-17458.
76. Kuno, K., Y. Okada, H. Kawashima, H. Nakamura, M. Miyasaka, H. Ohno, and K. Matsushima. 2000. ADAMTS-1 cleaves a cartilage proteoglycan, aggrecan. *FEBS Lett.* 478:241-245.
77. Niedzwiecki, L., J. Teahan, R.K. Harrison, and R.L. Stein. 1992. Substrate specificity of the human matrix metalloproteinase stromelysin and the development of continuous fluorometric assays. *Biochemistry* 31:12618-12623.
78. Nagase, H. and G.B. Fields. 1996. Human matrix metalloproteinase specificity studies using collagen sequence-based synthetic peptides. *Biopolymers* 40:399-416.
79. Nagase, H., C.G. Fields, and G.B. Fields. 1994. Design and characterization of a fluorogenic substrate selectively hydrolyzed by stromelysin 1 (matrix metalloproteinase-3). *J.Biol.Chem.* 269:20952-20957.
80. Ye, Q.Z., L.L. Johnson, D.J. Hupe, and V. Baragi. 1992. Purification and characterization of the human stromelysin catalytic domain expressed in Escherichia coli. *Biochemistry* 31:11231-11235.
81. Lichte, A., H. Kolkenbrock, and H. Tschesche. 1996. The recombinant catalytic domain of membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) induces activation of progelatinase A and progelatinase A complexed with TIMP-2. *FEBS Lett.* 397:277-282.
82. Hughes, C.E., B. Caterson, A.J. Fosang, P.J. Roughley, and J.S. Mort. 1995. Monoclonal antibodies that specifically recognize neopeptide sequences generated by 'aggrecanase' and matrix metalloproteinase cleavage of aggrecan: application to catabolism in situ and in vitro. *Biochem.J.* 305:799-804.
83. Caterson, B., C.E. Hughes, P. Roughley, and J.S. Mort. 1995. Anabolic and catabolic markers of proteoglycan metabolism in osteoarthritis. *Acta Orthop.Scand.Suppl.* 266:121-124.
84. Gluzman, Y. 1981. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23:175-182.
85. Hughes, C.E., F.H. Buttner, B. Eidenmuller, B. Caterson, and E. Bartnik. 1997. Utilization of a recombinant substrate rAgg1 to study the biochemical properties of aggrecanase in cell culture systems. *J.Biol.Chem.* 272:20269-20274.
86. Aruffo, A., I. Stamenkovic, M. Melnick, C.B. Underhill, and B. Seed. 1990. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 61:1303-1313.
87. Heinegard, D. 1972. Extraction, fractionation and characterization of proteoglycans from bovine tracheal cartilage. *Biochim.Biophys.Acta* 285:181-192.

88. Hughes, C.E., C.B. Little, F.H. Buttner, E. Bartnik, and B. Caterson. 1998. Differential expression of aggrecanase and matrix metalloproteinase activity in chondrocytes isolated from bovine and porcine articular cartilage. *J.Biol.Chem.* 273:30576-30582.
89. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
90. Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
91. Birnboim, H.C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic.Acids.Res.* 7:1513-1523.
92. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 74:5463-5467.
93. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
94. Büttner, F.H., C. Hörber, M. Liesenfeld, C.E. Hughes, B. Caterson, and E. Bartnik. 1998. Measuring aggrecanase activity with an ELISA based assay system. *Trans.Orthop.Res.Soc.* 23:916.
95. Mercuri, F.A., K.J. Doege, E.C. Arner, M.A. Pratta, K. Last, and A.J. Fosang. 1999. Recombinant human aggrecan G1-G2 exhibits native binding properties and substrate specificity for matrix metalloproteinases and aggrecanase. *J.Biol.Chem.* 274:32387-32395.
96. Büttner, F.H., S. Chubinskaya, D. Margerie, K. Huch, J. Flechtenmacher, A.A. Cole, K.E. Kuettner, and E. Bartnik. 1997. Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase in human articular cartilage. *Arthritis Rheum.* 40:704-709.
97. Loulakis, P., A. Shrikhande, G. Davis, and C.A. Maniglia. 1992. N-terminal sequence of proteoglycan fragments isolated from medium of interleukin-1-treated articular-cartilage cultures. Putative site(s) of enzymic cleavage. *Biochem.J.* 284:589-593.
98. Yoshida, A., M. Suzuki, H. Ikenaga, and M. Takeuchi. 1997. Discovery of the shortest sequence motif for high level mucin-type O-glycosylation. *J.Biol.Chem.* 272:16884-16888.
99. Kasturi, L., J.R. Eshleman, W.H. Wunner, and E.S. Shakin. 1995. The hydroxy amino acid in an Asn-X-Ser/Thr sequon can influence N-linked core glycosylation efficiency and the level of expression of a cell surface glycoprotein. *J.Biol.Chem.* 270:14756-14761.
100. Shakin-Eshleman SH, S.L. Spitalnik, and L. Kasturi. 1996. The amino acid at the X position of an Asn-X-Ser sequon is an important determinant of N-linked core-glycosylation efficiency. *J.Biol.Chem.* 271:6363-6366.
101. Kasturi, L., H. Chen, and E.S. Shakin. 1997. Regulation of N-linked core glycosylation: use of a site-directed mutagenesis approach to identify Asn-Xaa-Ser/Thr sequons that are poor oligosaccharide acceptors. *Biochem.J.* 323:415-419.
102. Pratta, M.A., M. Tortorella, and E.C. Arner. 1999. Aggrecan glycosylation affects cleavage by aggrecanase. *Trans.Orthop.Res.Soc.* 24:407.

103. Barry, F.P., L.C. Rosenberg, J.U. Gaw, T.J. Koob, and P.J. Neame. 1995. N- and O-linked keratan sulfate on the hyaluronan binding region of aggrecan from mature and immature bovine cartilage. *J.Biol.Chem.* 270:20516-20524.
104. Varki, A. 1993. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology.* 3:97-130.
105. Lark, M.W., J.T. Gordy, J.R. Weidner, J. Ayala, J.H. Kimura, H.R. Williams, R.A. Mumford, C.R. Flannery, S.S. Carlson, M. Iwata, and J.D. Sandy. 1995. Cell-mediated catabolism of aggrecan. Evidence that cleavage at the "aggrecanase" site (Glu373-Ala374) is a primary event in proteolysis of the interglobular domain. *J.Biol.Chem.* 270:2550-2556.
106. Mercuri, F.A., R.A. Maciewicz, J. Tart, K. Last, and A.J. Fosang. 2000. Mutations in the interglobular domain of aggrecan alter matrix metalloproteinase and aggrecanase cleavage patterns: Evidence that matrix metalloproteinase cleavage interferes with aggrecanase activity. *J.Biol.Chem.* In press.
107. Imper, V. and H.E. Van Wart. 1998. Substrate Specificity and Mechanisms of Substrate Recognition of the Matrix Metalloproteinases. In *Matrix Metalloproteinases*. Parks, W.C., and R.P. Mecham. Academic Press, San Diego, 219-242.
108. Stubbs, M.T. and W. Bode. 1995. The clot thickens: clues provided by thrombin structure. *Trends.Biochem.Sci.* 20:23-28.
109. Black, R.A. and J.M. White. 1998. ADAMs: focus on the protease domain. *Curr.Opin.Cell Biol.* 10:654-659.
110. Maskos, K., C.C. Fernandez, R. Huber, G.P. Bourenkov, H. Bartunik, G.A. Ellestad, P. Reddy, M.F. Wolfson, C.T. Rauch, B.J. Castner, R. Davis, H.R. Clarke, M. Petersen, J.N. Fitzner, D.P. Cerretti, C.J. March, R.J. Paxton, R.A. Black, and W. Bode. 1998. Crystal structure of the catalytic domain of human tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95:3408-3412.
111. Chung, L., K. Shimokawa, D. Dinakarandian, F. Grams, G.B. Fields, and H. Nagase. 2000. Identification of the 183RWTNNFREY191 Region as a Critical Segment of Matrix Metalloproteinase 1 for the Expression of Collagenolytic Activity. *J.Biol.Chem.* 275:29610-29617.
112. Hering, T.M., J. Kollar, and T.D. Huynh. 1997. Complete coding sequence of bovine aggrecan: comparative structural analysis. *Arch.Biochem.Biophys.* 345:259-270.
113. Flannery, C.R., C.B. Little, and B. Caterson. 1998. Molecular cloning and sequence analysis of the aggrecan interglobular domain from porcine, equine, bovine and ovine cartilage: comparison of proteinase-susceptible regions and sites of keratan sulfate substitution. *Matrix Biol.* 16:507-511.
114. Vanhoof, G., F. Goossens, M. De, I. D. Hendriks, and S. Scharpe. 1995. Proline motifs in peptides and their biological processing. *FASEB J.* 9:736-744.
115. Johnson, L.L., D.A. Bornemeier, J.A. Janowicz, J. Chen, A.G. Pavlovsky, and D.F. Ortwine. 1999. Effect of species differences on stromelysin-1 (MMP-3) inhibitor potency. An explanation of inhibitor selectivity using homology modeling and chimeric proteins. *J.Biol.Chem.* 274:24881-24887.
116. Ilic, M.Z., C.J. Handley, H.C. Robinson, and M.T. Mok. 1992. Mechanism of catabolism of aggrecan by articular cartilage. *Arch.Biochem.Biophys.* 294:115-122.

117. Tortorella, M.D., M. Pratta, R.Q. Liu, J. Austin, O.H. Ross, I. Abbaszade, T. Burn, and E. Arner. 2000. Sites of aggrecan cleavage by recombinant human aggrecanase-1 (ADAMTS-4). *J.Biol.Chem.* 275:18566-18573.
118. Fosang, A.J., K. Last, Y. Fujii, M. Seiki, and Y. Okada. 1998. Membrane-type 1 MMP (MMP-14) cleaves at three sites in the aggrecan interglobular domain. *FEBS Lett.* 430:186-190.
119. D'Ortho, M.P., H. Will, S. Atkinson, G. Butler, A. Messent, J. Gavrilovic, B. Smith, R. Timpl, L. Zardi, and G. Murphy. 1997. Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases. *Eur.J.Biochem.* 250:751-757.
120. Ohuchi, E., K. Imai, Y. Fujii, H. Sato, M. Seiki, and Y. Okada. 1997. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J.Biol.Chem.* 272:2446-2451.
121. Imai, K., S. Ohta, T. Matsumoto, N. Fujimoto, H. Sato, M. Seiki, and Y. Okada. 1997. Expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and activation of progelatinase A in human osteoarthritic cartilage. *Am.J.Pathol.* 151:245-256.
122. Knauper, V., S. Cowell, B. Smith, O.C. Lopez, M. O'Shea, H. Morris, L. Zardi, and G. Murphy. 1997. The role of the C-terminal domain of human collagenase-3 (MMP-13) in the activation of procollagenase-3, substrate specificity, and tissue inhibitor of metalloproteinase interaction. *J.Biol.Chem.* 272:7608-7616.
123. Massova, I., L.P. Kotra, R. Fridman, and S. Mobashery. 1998. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB J.* 12:1075-1095.
124. Murphy, G., Q. Nguyen, M.I. Cockett, S.J. Atkinson, J.A. Allan, C.G. Knight, F. Willenbrock, and A.J. Docherty. 1994. Assessment of the role of the fibronectin-like domain of gelatinase A by analysis of a deletion mutant. *J.Biol.Chem.* 269:6632-6636.
125. Hurskainen, T.L., S. Hirohata, M.F. Seldin, and S.S. Apte. 1999. ADAM-TS5, ADAM-TS6, and ADAM-TS7, novel members of a new family of zinc metalloproteases. General features and genomic distribution of the ADAM-TS family. *J.Biol.Chem.* 274:25555-25563.
126. Guo, N.H., H.C. Krutzsch, E. Negre, V.S. Zabrenetzky, and D.D. Roberts. 1992. Heparin-binding peptides from the type I repeats of thrombospondin. Structural requirements for heparin binding and promotion of melanoma cell adhesion and chemotaxis. *J.Biol.Chem.* 267:19349-19355.

8. Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2-Azino-Bisethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure
ADAM	A Disintegrin And Metalloprotease
ADAMTS	A Disintegrin And Metalloprotease with Thrombospondin Motifs
BSA	Bovines Serumalbumin
COMP	Cartilage Oligomeric Protein
CS	Chondroitinsulfat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FCS	Fötale Kälberserum
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
GAG	Glykosaminoglykan
IGD	Interglobuläre Domäne
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
IL-1	Interleukin-1
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
KS	Keratansulfat
MMP	Matrix-Metalloprotease
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RCS	Rattenchondrosarkom
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
TSP	Thrombospondin
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Christine Hörber
Anschrift Leibnizstraße 32
55118 Mainz
Geburtsdatum 16.4.1971
Geburtsort Halden/Norwegen

Schulbildung

1977-1981 Grundschule in Seligenstadt/Klein-Welzheim
1981-1983 Förderstufe Gerhardt-Hauptmann-Schule Mainhausen
1983-1990 Einhardgymnasium Seligenstadt

Hochschulausbildung

10/1990 - 7/1996 Studium der Technischen Biologie an der Universität Stuttgart
Hauptfach Bioverfahrenstechnik, Nebenfächer Industrielle Genetik
und Mikrobiologie
10/1992 Vordiplom
7/1996 Abschluß des Studiums als Diplom-Biologin, technisch orientiert
3/1997-10/2000 Dissertation in der Abteilung Degenerative Gelenkerkrankungen bei Aventis
Pharma Deutschland GmbH, Frankfurt/Main
Thema: „Untersuchungen zur Substratspezifität von Aggrekanasen“

Auslandsaufenthalte

8/1993 – 8/1994 Auslandsstudium an der Portland State University, Oregon, USA
Studienarbeit in Biophysik: „Effect of Trypsin Digestion on Electrokinetic
Properties of Sarcoplasmic Reticulum Vesicles“
8/1995 – 7/1996 Diplomarbeit an der Danish Technical University, Lyngby, Dänemark
Department of Environmental Science and Engineering: „Tetrachloroethene
Dechlorination by *Dehalospirillum multivorans* Immobilized in Upflow
Anaerobic Sludge Blanket Reactors“