

# **Hyaluronsäure-abhängige Transkription von Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9)**

**Ch. Fieber**

**Institut für Toxikologie und Genetik**

**November 2000**



**Forschungszentrum Karlsruhe**

**Technik und Umwelt**

**Wissenschaftliche Berichte**

**FZKA 6526**

**Hyaluronsäure-abhängige Transkription von  
Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9)**

**Christina Fieber**

**Institut für Toxikologie und Genetik**

**Von der Fakultät II – Biologie der Universität Hohenheim  
genehmigte Dissertation**

**Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe**

**2000**

Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH  
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe

Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft  
Deutscher Forschungszentren (HGF)

ISSN 0947-8620

**Aus dem Institut für Toxikologie und Genetik  
Forschungszentrum Karlsruhe  
Prof. Dr. Peter Herrlich**

**Hyaluronsäure-abhängige Transkription von  
Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9)**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften  
der Fakultät Biologie II der Universität Hohenheim

von

**Christina Fieber**

aus Bremen

2000

Die vorliegende Arbeit wurde am 30.05.2000 von der Fakultät II - Biologie der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften“ angenommen.

Tag der mündlichen Prüfung: 14.07.2000

Dekan: Prof. Dr. A. Preiß

Berichterstatter, 1. Prüfer: Prof. Dr. P. Herrlich

Mitberichterstatter, 2. Prüfer: Prof. Dr. A. Preiß

Ich versichere ehrenwörtlich, diese Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben. Wörtlich oder indirekt übernommenes Gedankengut wurden nach bestem Wissen als solches kenntlich gemacht.

Christina Fieber, 22.02.2000

## Zusammenfassung

Zahlreiche korrelative und funktionelle Evidenzen lassen vermuten, daß Matrixmetalloproteinasen (MMP) von gewichtiger Bedeutung bei der Tumorerkrankung oder Metastasierung sind. Den Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 kommen dabei eine besondere Rolle zu aufgrund ihrer Fähigkeit Kollagen IV, den Hauptbestandteil der Basalmembran, zu degradieren. So ist die Invasivität eines Tumors immer mit Defekten in der Basalmembran assoziiert. In verschiedenen humanen Karzinomen findet man MMP-9-Aktivität hauptsächlich an der Grenze des invadierenden Tumors zum benachbarten Stroma, wo das Enzym sowohl von Tumorzellen als auch von den umgebenden Stromazellen, wie Fibroblasten oder Makrophagen, gebildet wird. Verschiedene Wachstumsfaktoren, Tumorpromotoren, Onkogen-Produkte aber auch Komponenten der extrazellulären Matrix, wie Laminin, Fibronectin oder Kollagen, können die Synthese von Matrixmetalloproteinasen, wie z. B. von MMP-2 und MMP-9, induzieren.

Hyaluronsäure, eine ubiquitäre Komponente der extrazellulären Matrix, findet man verstärkt akkumuliert in der Peripherie von Tumoren und eine erhöhte Hyaluronsäure-Synthese ist häufig mit einer erhöhten Invasivität oder Migrationsfähigkeit von Zellen assoziiert.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß Hyaluronsäure in einer metastatischen Lungenkarzinomzelllinie 3LL für die Synthese von MMP-9, MMP-13 und der Serin-Proteinase u-PA verantwortlich ist, und so möglicherweise ursächlich in die Entstehung invasiver Eigenschaften involviert ist. Die Induktion der Expression von MMP-9 durch Hyaluronsäure beruht auf transkriptioneller Aktivierung des MMP-9-Gens und wird über einen Mechanismus vermittelt, an dem NF- $\kappa$ B beteiligt ist.

Die Beeinflussung von Vorgängen im Zellkern über die extrazelluläre Matrix erfordert die Beteiligung spezifischer Zelloberflächenrezeptoren, dies scheint auch für die Aktivierung von MMP-9 durch Hyaluronsäure zu gelten, da durch Suramin, einen Inhibitor von Liganden-Rezeptor-Interaktionen, die MMP-9-Induktion verhindert wird. CD44 oder RHAMM, die beiden bekannten Hyaluronsäure-Rezeptoren, sind für die Hyaluronsäure-abhängige transkriptionelle Aktivierung von MMP-9 nicht notwendig. Der für diesen Effekt verantwortliche Rezeptor ist nicht bekannt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte RHAMM als ein intrazelluläres Hyaluronsäure-bindendes Protein mit einem Molekulargewicht von 95 kDa bzw. von 105 kDa in 3LL-Zellen charakterisiert werden.

## **Abstract**

### **Hyaluronic acid-dependent transcription of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)**

Numerous correlative and functional evidence suggest that matrix metalloproteinases (MMP) play an important role in the process of tumor invasion and metastasis formation. Particularly the gelatinases MMP-2 and MMP-9 have a pivotal function in these processes, due to their ability to degrade collagen type IV, which is the major compound of the basal membrane. In this respect, a correlation has been postulated between defects in the basement membrane and the invasiveness of a tumor. In various human carcinomas, MMP-9 activity is found particularly at the leading edges of the invading tumor adjacent to the host stroma. The degradative enzyme is secreted both by the tumor cells themselves as well as by the surrounding stromal cells, like fibroblasts or macrophages. The synthesis of the matrix metalloproteinases, like e. g. MMP-2 or MMP-9 is under the control of various growth factors, tumor promoters, oncogene products, but can also be regulated by different components of the extracellular matrix, e. g. laminin, fibronectin or collagen.

Hyaluronic acid, which is the major glycosaminoglycan of the extracellular matrix, is found to be strongly accumulated at the periphery of tumors. An elevated synthesis of hyaluronic acid is often associated with an increased aggressiveness of the tumor, or the migration of tumor cells.

In the present work it could be shown, that hyaluronic acid induces the synthesis of MMP-9, MMP-13 and the serin protease u-PA (urokinase-type plasminogen activator) in the metastatic lung carcinoma cell line 3LL. This induction might be causally involved in the generation of an invasive phenotype.

The expression of MMP-9 by hyaluronic acid is dependent on the transcriptional activation of the MMP-9 gene and is mediated through a mechanism involving activation of nuclear factor- $\kappa$ B.

The involvement of specific cell surface receptors is required for the regulation of processes in the nucleus by components of the extracellular matrix. This is probably also the case for the activation of MMP-9 by hyaluronic acid since Suramin, an inhibitor of ligand-receptor interactions, prevents hyaluronic acid-mediated expression of MMP-9.

However neither CD44 nor RHAMM, the hyaluronic acid receptors known so far, are necessary for the hyaluronic acid-dependent transcriptional activation of MMP-9. The receptor responsible for the induction is still unknown.

This work demonstrates that RHAMM protein is not an extracellular but rather an intracellular hyaluronic acid-binding protein, and has a MW of about 95 kDa, respectively of about 105 kDa in 3LL cells.



<b>Inhaltsverzeichnis</b>	Seite
<b>1 Einleitung</b> .....	1
<b>1.1 Die physiologische Funktion der extrazellulären Matrix</b> .....	1
<b>1.2 Proteolytische Enzyme der extrazellulären Matrix</b> .....	2
1.2.1 Das Plasmin/Plasminogen-Aktivator-System.....	3
1.2.2 Matrixmetalloproteinasen (MMP).....	3
<b>1.3 Der Einfluß von Hyaluronsäure und der Hyaluronsäure-Rezeptoren in der Tumorgenese</b> .....	7
1.3.1 CD44.....	7
1.3.2 RHAMM.....	10
<b>1.4 Die Bedeutung von MMP-9 in der Tumorgenese</b> .....	11
<b>1.5 Regulation der Expression von MMP-9</b> .....	12
<b>1.6 Fragestellung</b> .....	13
<b>2 Material und Methoden</b> .....	15
<b>2.1. Material</b> .....	15
<b>2.2 Methoden</b> .....	21
2.2.1 Behandlung von Nukleinsäuren.....	21
2.2.2 DNA-Präparation.....	23
2.2.3 Proteinchemische Methoden.....	25
2.2.4 Handhabung von Bakterien .....	28
2.2.5 Zellkultur .....	29
<b>3 Ergebnisse</b> .....	31
<b>3.1 Hyaluronsäure induziert die Expression von MMP-9 in der murinen metastatischen 3LL Lewis Lungenkarzinomzelllinie</b> .....	31
3.1.1 In 3LL-Zellen läßt sich gelatinolytische Aktivität nach Hyaluronsäure-Behandlung nachweisen.....	31
Hyaluronsäure induziert die Expression von MMP-9-mRNA.....	32
3.1.2 Induziert Hyaluronsäure in 3LL-Zellen auch die Expression anderer proteolytischer Enzyme ?.....	34
3.1.3 Hyaluronsäure hat keinen Einfluß auf die Expression von TIMP-1 .....	35

3.1.4 In 3LL-Tumoren ist MMP-9-Aktivität nachweisbar.....	35
Nach <i>in vivo</i> Passage sind 3LL-Tumorzellen in der Lage, auf Hyaluronsäure mit der Synthese von MMP-9 zu reagieren .....	37
3.1.5 In 3LL-Zellen ist MMP-9 nicht mit der Zelloberfläche assoziiert.....	38
<b>3.2 Analyse des Signaltransduktionsweges, über den Hyaluronsäure die Aktivierung des MMP-9-Gens vermittelt .....</b>	<b>40</b>
3.2.1 Hyaluronsäure vermittelt die transkriptionelle Aktivierung des MMP-9-Gens und nicht die Stabilisierung der MMP-9-mRNA .....	40
3.2.2 Ist für die Hyaluronsäure-induzierte MMP-9-Expression <i>de novo</i> Proteinbiosynthese notwendig ?.....	42
3.2.3 Induziert Hyaluronsäure die MMP-9-Expression durch Aktivierung von AP-1 ?...	43
3.2.4 Hyaluronsäure induziert NF- $\kappa$ B-Aktivität in embryonalen Fibroblasten .....	48
Die Inhibition der NF- $\kappa$ B-Aktivität verhindert die Hyaluronsäure-vermittelte Transkription von MMP-9.....	50
<b>3.3 Welcher Hyaluronsäure-Rezeptor vermittelt die Hyaluronsäure-induzierte Expression von MMP-9 ? .....</b>	<b>53</b>
3.3.1 CD44 .....	53
Die Bindung von Hyaluronsäure auf der Zelloberfläche von 3LL-Zellen ist hauptsächlich CD44-vermittelt.....	53
Die Blockierung der Hyaluronsäure-Bindungsfähigkeit von CD44 verhindert nicht die Hyaluronsäure-abhängige transkriptionelle Aktivierung von MMP-9 .....	54
Hyaluronsäure-Induktion von MMP-9 in CD44-defizienten Zellen .....	55
3.3.2 RHAMM .....	57
Polyklonale Antikörper, die gegen die „Repeat“-Region von RHAMM hergestellt worden sind, erkennen in murinen immortalisierten Zelllinien ein Protein von 95 kDa .....	57
RHAMM ist ein intrazelluläres Protein.....	59
RHAMM bindet an Hyaluronsäure <i>in vitro</i> , aber nicht an Heparin oder Chondroitin-Sulfat A .....	61
Hyaluronsäure-Induktion von MMP-9 in RHAMM-defizienten Zellen .....	62

3.3.3 Die Hyaluronsäure-vermittelte Expression von MMP-9 benötigt die Beteiligung eines Zellmembranrezeptors .....	64
<b>4 Diskussion</b> .....	<b>67</b>
<b>4.1 Allgemeines</b> .....	<b>67</b>
<b>4.2 Hyaluronsäure-vermittelte Signaltransduktion</b> .....	<b>68</b>
<b>4.3 Die Bedeutung von CD44 und RHAMM in der Hyaluronsäure-abhängigen Aktivierung von MMP-9</b> .....	<b>70</b>
4.3.1 Die Beteiligung von CD44 an der Hyaluronsäure-vermittelten Expression von MMP-9 .....	70
4.3.2 Die Funktion von RHAMM .....	71
<b>4.4 Wie wird die Umwandlung des extrazellulären Hyaluronsäure-Signals in zelluläre Prozesse umgewandelt ?</b> .....	<b>73</b>
<b>4.5 Die mögliche physiologische Relevanz der Hyaluronsäure vermittelten Synthese von MMP-9 in 3LL-Tumoren</b> .....	<b>76</b>
<b>5 Literatur</b> .....	<b>79</b>
<b>6 Abkürzungen</b> .....	<b>95</b>



## 1. Einleitung

### 1.1 Die physiologische Funktion der extrazellulären Matrix

Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen versorgen die Zellen eines Verbandes mit Informationen über ihre unmittelbare Umgebung. Über diese Interaktionen werden auch morphogenetische Änderungen, Differenzierung, Apoptose oder Migration der Zelle initiiert und reguliert. Eine Veränderung in der Zusammensetzung und Beschaffenheit der extrazellulären Matrix, sowie der Abbau oder die Aktivierung von Zelloberflächenproteinen durch Proteolyse kann schnell und irreversibel eine Reaktion in der Zelle hervorrufen (Alexander und Werb, 1989; Birkedal-Hansen, 1993; Adams und Watt, 1995).

Die extrazelluläre Matrix ist unterteilt in die Basalmembran oder -lamina und in das interstitielle Stroma (Bindegewebe) und wird von zwei Hauptkomponenten gebildet, den Glykosaminoglykanen und den faserförmigen Proteinen. Letztere besitzen entweder strukturelle Funktionen, wie z. B. Kollagen und Elastin, oder adhäsive Funktionen, wie z. B. Fibronectin und Laminin. Glykosaminoglykane sind langkettige Polymere, die gewöhnlich kovalent an Proteine gebunden die Proteoglykane bilden (Yurchenco und Schittny, 1990; Birk *et al.*, 1991). Im interstitiellen Stroma, das für die strukturelle Stabilität der Gewebe verantwortlich ist, bilden Glykosaminoglykane und Proteoglykane eine stark hydratisierte, gelartige Grundsubstanz, in welche die verschiedenen Proteine eingebettet sind. Die Basallamina besteht überwiegend aus Kollagen Typ IV, das mit Laminin, Perlekan und Entaktin ein mehrschichtiges, kompaktes Netzwerk ausbildet. Sie trennt die verschiedenen Gewebekompartimente voneinander ab und umgibt Blutgefäße, Muskeln und Nerven.

Ein ubiquitäres Glykosaminoglykan der extrazellulären Matrix ist Hyaluronsäure. Es handelt sich dabei um ein hochmolekulares, unverzweigtes Polymer, bestehend aus repetitiven ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ) Glucuronyl - ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) N-Acetyl-Glucosamin-Einheiten mit einem Molekulargewicht von  $10^6 - 10^7$  Da, das nicht kovalent mit Proteinen verbunden ist. Hyaluronsäure beeinflusst die Zell-Zell-Adhäsion und die räumliche Orientierung und Wanderung von Zellen, sowie deren Proliferation und Differenzierung (Laurent und Fraser, 1992). Dementsprechend ist Hyaluronsäure an zahlreichen biologischen Prozessen beteiligt, wie der Embryonalentwicklung (Gakunga *et al.*, 1997), der Migration normaler Zellen und Tumorzellen (Turley, 1992; Turley *et al.*, 1993; Masellis-Smith *et al.*, 1996), der Angiogenese (West *et al.*, 1985) oder der Aktivierung

von Immunzellen (DeGrendele *et al.*, 1996). Im Gewebe liegt Hyaluronsäure gewöhnlich als hochmolekulares Polymer vor. Jedoch findet man z. B. in Entzündungsstellen vermehrt niedermolekulare Degradationsprodukte von Hyaluronsäure infolge einer erhöhten Hyaluronidase-Aktivität des Gewebes (Saari *et al.*, 1991). Die Produkte, Hyaluronsäure-Oligosaccharide, sind in der Lage, in Endothelzellen Proliferation und die Ausbildung neuer Blutgefäße (West *et al.*, 1985) zu induzieren. In Immunzellen wie Makrophagen oder Dendritische Zellen führen sie zur Ausreifung der Zellen und zur Synthese proinflammatorischer Chemokine (McKee *et al.*, 1996; Haegel-Kronenberger *et al.*, 1998).

## **1.2 Proteolytische Enzyme der extrazellulären Matrix**

Die Umwandlung der extrazellulären Matrix stellt einen wesentlichen Schritt in zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen dar. Die Basallamina und das interstitielle Stroma sind normalerweise für Zellen impermeabel. Spezialisierte Zellen, wie z. B. migrierende Lymphozyten, oder invasiv wachsende Tumorzellen sind jedoch fähig, diese anatomischen Barrieren mit Hilfe proteolytischer Enzyme zu durchbrechen. Unter physiologischen Bedingungen, wie z. B. bei Entzündungsreaktionen, der Angiogenese, der Einnistung des Trophoblasten in den Uterus oder dem Knochenaufbau, ist die Synthese und der Abbau verschiedenster struktureller Proteine, Glykoproteine und Proteoglykane der extrazellulären Matrix streng kontrolliert. Bei pathologischen Prozessen, wie rheumatischer Arthritis oder der Invasion und Metastasierung neoplastischer Zellen, verläuft die Degradation der extrazellulären Matrix und der Basallamina jedoch unreguliert und zerstörerisch (Überblick in Liotta *et al.*, 1991; Mignatti und Rifkin, 1993).

Proteolytische Aktivität besitzen Cystein-Proteinasen, Aspartyl-Proteinasen, Serin-Proteinasen und Matrixmetalloproteinasen (Kane und Gottesman, 1990; Rochefort *et al.*, 1990). Jedoch sind im wesentlichen die Matrixmetalloproteinasen sowie die Serin-Proteinasen Plasmin und Urokinase-Typ-Plasminogen-Aktivator an den physiologischen und pathologischen Prozessen von Gewebeumwandlungen beteiligt (Suzuki *et al.*, 1990; Liotta *et al.*, 1991; Woessner *et al.*, 1991; Matrisian *et al.*, 1992).

### 1.2.1 Das Plasmin/Plasminogen-Aktivator-System

Plasmin besitzt eine breite Trypsin-ähnliche Substratspezifität und kann neben Fibrin-Koagulat zahlreiche Komponenten der extrazellulären Matrix, wie Fibronectin, Laminin oder das Proteingerüst der Proteoglykane hydrolysieren. Es wird als inaktives Enzym Plasminogen von zahlreichen Zelltypen sezerniert und von Plasminogen-Aktivatoren durch Proteolyse in seine aktive Form umgewandelt. Man unterscheidet zwei Arten von Plasminogen-Aktivatoren, den Urokinase-Typ, u-PA („urokinase-type plasminogen activator“), und den Gewebe-Typ, t-PA („tissue-type plasminogen activator“). T-PA wird eine wesentliche Funktion bei der Thrombolysen zugeschrieben, während u-PA hauptsächlich bei der Degradation der extrazellulären Matrix eine Rolle spielt (Überblick in Dano *et al.*, 1985; Mignatti und Rifkin, 1993). Durch Bindung des Plasmin-Plasminogen-Aktivator-Komplexes an den u-PA-Rezeptor (u-PAR), einem in der Zellmembran-verankerten Bindungsprotein für u-PA, wird die Aktivität von Plasmin auf der Zelloberfläche konzentriert. Zahlreiche experimentelle Modelle belegen eine kausale Relevanz von u-PA im Metastasierungsprozeß (Morimoto *et al.*, 1993; McGuire und Alexander, 1993; Quax *et al.*, 1994). In verschiedenen humanen Tumoren korreliert eine starke Expression von u-PA und u-PAR mit einer schlechten Prognose, z. B. bei Tumoren der Brust (Duffy *et al.*, 1990), der Blase (Hasui *et al.*, 1992) oder des Magens (Nekarda *et al.*, 1994).

### 1.2.2 Matrixmetalloproteinasen (MMP)

Die Familie der Matrixmetalloproteinasen (MMP) umfaßt zahlreiche Mitglieder von Zink- und Kalzium-abhängigen Endopeptidasen, die von Bindegewebszellen, wie Fibroblasten, Osteoklasten, Chondrozyten, Endothelzellen und inflammatorischen Zellen, einschließlich Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten, sezerniert werden. MMPs besitzen eine breite, oftmals überlappende Substratspezifität, und in Kombination sind sie fähig, sämtliche Proteinkomponenten der extrazellulären Matrix zu degradieren.

Entsprechend ihrer Substratspezifität und strukturellen Homologie können MMPs in fünf Gruppen unterteilt werden (Tab. 1). Kollagenasen hydrolysieren fibrilläres Kollagen Typ I, II und III. Gelatinasen schneiden natives Kollagen Typ IV und denaturiertes Kollagen. Außerdem können sie Zelloberflächenproteine, wie Galektin-3 und bFGF-Rezeptor („basic fibroblast growth factor receptor“, basischer Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptor) proteolytisch spalten (Ochieng *et al.*, 1994; Levy *et al.*, 1999). Stromelysine haben eine breite Substratspezifität und hydrolysieren zahlreiche Proteoglykane, Laminin, Fibronectin und verschiedene Kollagentypen.

Mit Ausnahme der Zellmembran-verankerten MT-MMPs („membrane-type-MMP“) werden MMPs als inaktive Formen sezerniert und bedürfen eines Aktivierungsprozesses, um enzymatisch aktiv zu werden.

**Tab. 1: Die Familie der Matrix-Metalloproteinase**  
(nach Yu *et al.*, 1997)

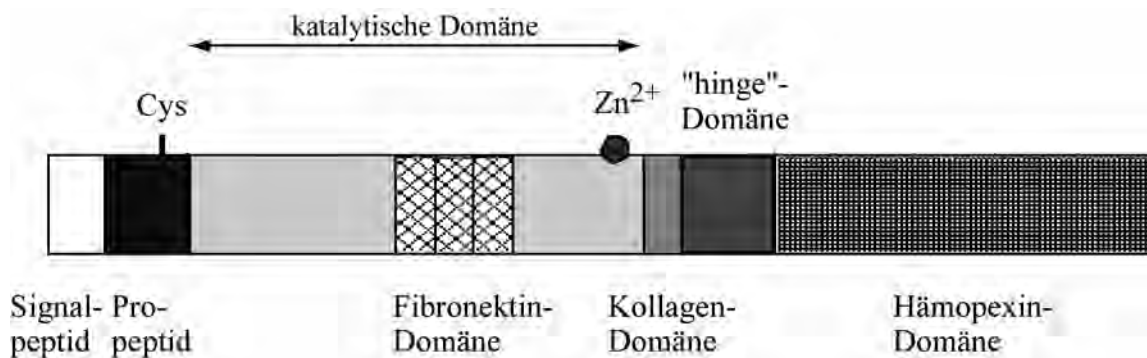
Gruppen	Enzym	MMP-Nomenklatur	Substrat
Kollagenasen	Interstitielle Kollagenase	MMP-1	Kollagen Typ I, II, III, VII, X, Gelatine, Proteingerüst der Proteoglykane, Pro-MMP-2, -9
	Neutrophile Kollagenase	MMP-8	
	Kollagenase-3	MMP-13	
Gelatinasen	Gelatinase A	MMP-2	Kollagen Typ I, IV, V, VII, X, Gelatine, Elastin, Laminin, Fibronectin, Proteingerüst der Proteoglykane, Galektin-3, bFGF-Rezeptor-1 Pro-MMP-2, -9, -13
	Gelatinase B	MMP-9	
Stromelysine	Stromelysin-1	MMP-3	Kollagen Typ IV, V, IX, X, Proteingerüst der Proteoglykane, Laminin, Fibronectin, Elastin, Pro-MMP-1, -8, -9, -13
	Stromelysin-2	MMP-10	
	Matrilysin	MMP-7	
	Stromelysin-3	MMP-11	
Elastase		MMP-12	Elastin, Fibrin/Fibrinogen, Laminin, Proteoglykane, $\alpha$ 1-Proteinase-Inhibitor
Membran-gebundene MMPs	MT1-MMP	MMP-14	Pro-MMP-2, -13
	MT2-MMP	?	n. b.
	MT3-MMP	MMP-15	Pro-MMP-2, -13
	MT4-MMP	?	n. b.

n. b., nicht bekannt



MMP-2 und MMP-9 kommen bei der Tumorinvasion und Angiogenese eine besondere Bedeutung zu aufgrund ihrer Reaktivität gegen Kollagen IV, den Hauptbestandteil der Basalmembran. (Stetler-Stevenson, 1990; Liotta *et al.*, 1991). So ist die Invasivität eines Tumors immer mit Defekten in der Basalmembran assoziiert (Barsky *et al.*, 1983).

Im adulten Organismus ist die Expression von MMP-9 auf migrierende Leukozyten (Murphy *et al.*, 1982), Makrophagen (Hibbs *et al.*, 1987), Keratinozyten während der Wundheilung (Oikarinen *et al.*, 1993; Salo *et al.*, 1994), Osteoklasten (Reponen *et al.*, 1994; Okada *et al.*, 1995), dem Trophoblasten während der Einnistung in den Uterus (Librach *et al.*, 1991; Reponen *et al.*, 1994) und auf das Gehirn (Backstrom, 1996) beschränkt. Während der Embryonalentwicklung wird MMP-9 nur im Gehirn und in den wachsenden Knochen exprimiert (Reponen *et al.*, 1994; Canete-Soler *et al.*, 1995a; Canete-Soler *et al.*, 1995b). MMP-9-defiziente Mäuse sind lebensfähig und fertil (Vu *et al.*, 1998; Itoh *et al.*, 1999). Nur ihre Knochenbildung ist durch eine abnormale endochondrale Ossifikation und Vaskularisierung in der Epiphyse beeinträchtigt; ansonsten zeigen sie während der embryonalen Entwicklung oder im adulten Organismus keine weiteren offensichtlichen Anomalien (Vu *et al.*, 1998).



**Abb. 1: Schematische Darstellung der Peptidstruktur von Pro-MMP-9**

Die Proteinstruktur der MMPs weist distinkte Domänen auf, die innerhalb der verschiedenen Mitglieder stark konserviert sind (Abb. 1). Die Signalpeptid-Domäne am N-Terminus ist für die Translokation in das endoplasmatische Retikulum verantwortlich. Die Propeptid-Domäne erhält die Proteinase in ihrem inaktiven Zustand, indem ein konservierter Cystein-Rest dieser Domäne mit dem Zink-Ion der katalytischen Domäne komplexiert ist. Eine Konformationsänderung, durch chaotrope Reagenzien, organische Quecksilber-Verbindungen oder proteolytische Spaltung hervorgerufen, unterbricht die Cystein-Zink-Interaktion und ermöglicht die Abspaltung der

Propeptid-Domäne durch Autoproteolyse. Diese Destabilisierung der nicht-kovalenten Verbindung zwischen dem Cystein-Rest der Propeptid-Domäne und dem Zink-Ion der katalytischen Domäne wird als „cysteine-switch“ bezeichnet (Springman *et al.*, 1990; Van Wart und Birkedal-Hansen, 1990; Park *et al.*, 1991). Über die C-terminale Hämopexin-Domäne binden die Kollagenasen natives Kollagen und positionieren es für die proteolytische Spaltung durch die katalytische Domäne (Murphy *et al.*, 1992; Bode, 1995). Die Hämopexin-Domäne und die katalytische Domäne sind über die „Hinge“-Region miteinander verbunden. Bei MMPs, die fibrilläres Kollagen hydrolysieren können, ist diese Region entscheidend an der Fähigkeit, fibrilläres Kollagen zu spalten, beteiligt (Hirose *et al.*, 1993). Im Unterschied zu den übrigen MMPs besitzen MMP-2 und MMP-9 eine Fibronectin-ähnliche Domäne (Wilhelm *et al.*, 1989). Ihre Aminosäuresequenz ist homolog zur Kollagenbindungsregion von Fibronectin und verleiht MMP-2 und MMP-9 ihre hohe Affinität gegenüber Kollagen Typ IV und denaturiertes Kollagen (Murphy *et al.*, 1994; Banyai *et al.*, 1994). Ausschließlich MMP-9 besitzt eine weitere Peptidsequenz mit bislang unbekannter Funktion, die Kollagen-Domäne. Diese ist innerhalb der „Hinge“-Region lokalisiert und homolog zur  $\alpha 2$ -Kette von Kollagen Typ V.

Die enzymatische Aktivität der MMPs wird durch endogene Inhibitoren, TIMPs („tissue inhibitor of MMPs“, Gewebe-spezifischer Inhibitor der MMPs) reguliert, von denen bis jetzt vier Formen bekannt sind. Es handelt sich dabei um Proteine mit einem Molekulargewicht von 21 - 28 kDa, die von den meisten Geweben gebildet und sezerniert werden. TIMPs binden an die katalytische Domäne der aktiven MMPs und blockieren so ihre Aktivität. Zusätzlich binden TIMP-1 bzw. TIMP-2 mit hoher Affinität auch an die Hämopexin-Domäne der latenten Formen von MMP-9 bzw. MMP-2 (Howard und Banda, 1991; Howard *et al.*, 1991; Murphy *et al.*, 1992; Baragi *et al.*, 1994). TIMPs interagieren mit MMPs in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1. Das quantitative Verhältnis zwischen aktivierten MMPs und TIMPs bestimmt die Netto-Aktivität der MMPs und ist somit eine wesentliche Determinante für den Abbau der extrazellulären Matrix (Liotta *et al.*, 1991; Liotta und Stetler-Stevenson, 1991).

### **1.3 Der Einfluß von Hyaluronsäure und der Hyaluronsäure-Rezeptoren in der Tumorgenese**

Im Vergleich zu normalen Geweben wird in Tumoren, z. B. in Brusttumoren, oftmals eine verstärkte Hyaluronsäure-Synthese bzw. ein erhöhter Gehalt an Hyaluronsäure gefunden (De la Torre, *et al.*, 1993). Hyaluronsäure ist dabei hauptsächlich in den Invasionszonen des Tumors an der Grenze zum gesunden Gewebe akkumuliert. Eine verstärkte Hyaluronsäure-Synthese ist häufig mit einer erhöhten Invasivität (Toole, 1979) oder Migrationsfähigkeit von Zellen (Turley, 1984) assoziiert.

Es wird angenommen, daß die Funktionen von Hyaluronsäure maßgeblich durch die Interaktion mit extrazellulären Hyaluronsäure-bindenden Proteinen oder Hyaluronsäure-Rezeptoren auf der Zelloberfläche vermittelt werden (Laurent und Fraser, 1992). Extrazelluläre Hyaluronsäure-bindende Proteine, wie Versikan, Aggrecan oder „link protein“, stabilisieren das Hyaluronsäure-Netzwerk und verbinden es mit anderen Komponenten der extrazellulären Matrix. Als Hyaluronsäure-Rezeptoren sind CD44, LYVE-1 und RHAMM bekannt.

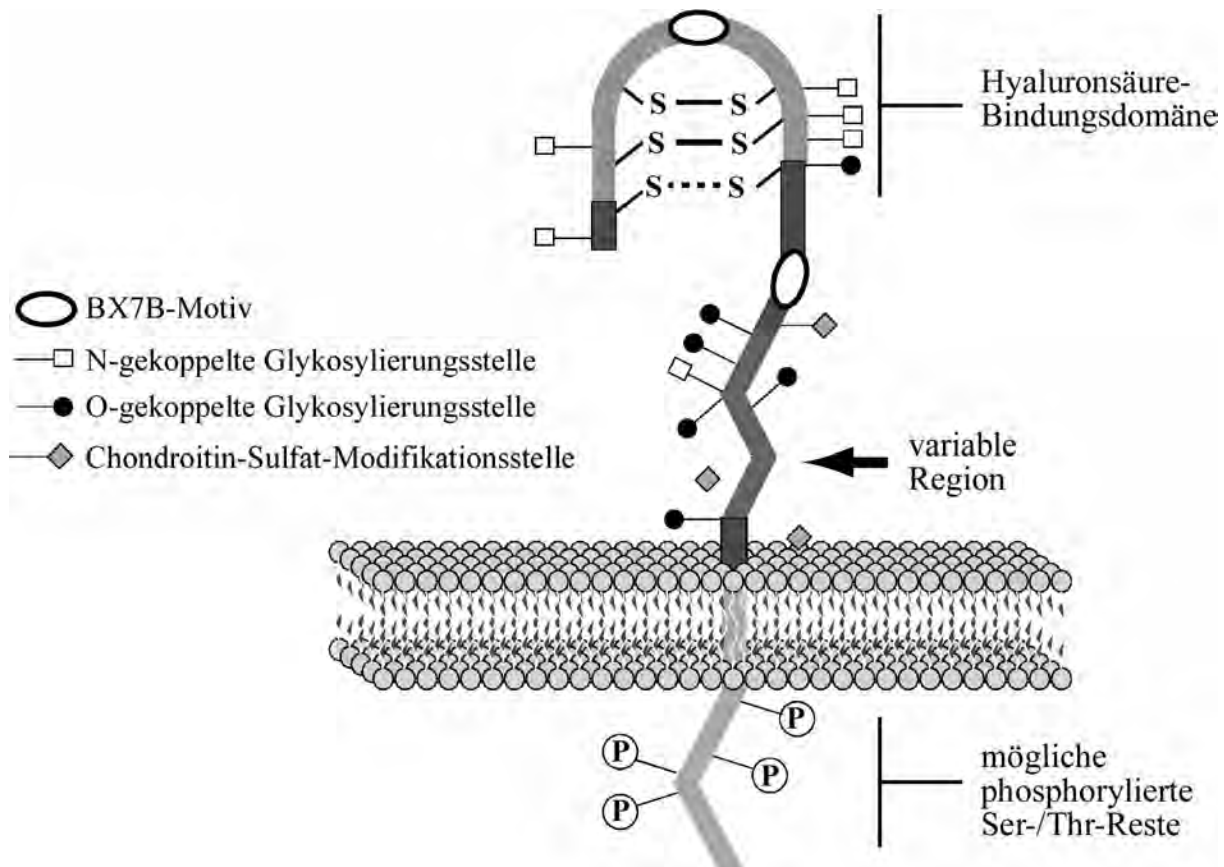
#### **1.3.1 CD44**

Mit CD44 wird eine Familie integraler Glykoproteine bezeichnet, die aufgrund differentieller Spleißvorgänge und post-translationaler Modifikationen aus einer ungewöhnlich großen Zahl von Isoformen besteht (Jalkanen *et al.*, 1988; Brown *et al.*, 1991).

Der extrazelluläre Bereich von CD44 weist zwei charakteristische Domänen auf (Abb. 2). An seinem distalen Ende befindet sich die Hyaluronsäure-Bindungsdomäne. Sie bildet eine globuläre Konformation aus und weist Homologien zur Hyaluronsäure-Bindungsregion anderer Hyaluronsäure-bindenden Proteine auf (Goldstein *et al.*, 1989; Stamenkovic *et al.*, 1989). Diese Domäne ist gekennzeichnet durch ein spezifisches Sequenzmotiv, das sogenannte BX<sub>7</sub>B-Motiv. Es enthält zwei positiv geladene Aminosäurereste, gewöhnlich Arginin oder Lysin, die durch sieben nicht-saure Aminosäurereste getrennt sind, und vermittelt die Interaktion mit der negativ-geladenen Hyaluronsäure (Yang *et al.*, 1993). Ein weiteres BX<sub>7</sub>B-Motiv, das auch für die Hyaluronsäure-Bindung von CD44 notwendig ist, befindet sich außerhalb der globulären Domäne (Abb. 2; Peach *et al.*, 1993).

Am proximalen Ende der extrazellulären Region ist die variable Region lokalisiert. Sie kann aufgrund des differentieller Gebrauchs alternativ gespleißter Exons aus verschiedenen

Aminosäuresequenzen bestehen (Tölg *et al.*, 1993; Sreaton *et al.*, 1993). Über seine zytoplasmatische Region ist CD44 mit Zytoskelett-assoziierten Komponenten, wie Aktin, Ankyrin oder den Proteinen der Ezrin-Radixin-Moesin-Familie verbunden (Lacy und Underhill, 1987; Kalomiris und Bourguignon, 1988; Bourguignon *et al.*, 1992, 1993; Lokeshwar *et al.*, 1994; Tsukita *et al.*, 1994).



**Abb. 2: Schematische Darstellung der Proteinstruktur von CD44**

Die ubiquitäre Form von CD44 ist die sogenannte Standardform (CD44s) und wird von zahlreichen Zelltypen exprimiert (Stamenkovic *et al.*, 1991). Die varianten Formen von CD44, deren variabler Bereich der extrazellulären Region aus unterschiedlichen Aminosäuresequenzen bestehen kann, findet man nur in bestimmten Zelltypen, wie z. B. Epithelzellen (Stamenkovic *et al.*, 1991), Keratinozyten (Picker *et al.*, 1989, Stamenkovic *et al.*, 1991) oder aktivierten Immunzellen (Arch *et al.*, 1992; Überblick in Lesley *et al.*, 1993).

CD44 bindet Hyaluronsäure mit hoher Affinität (Aruffo *et al.*, 1990). Die minimale Hyaluronsäure-Einheit, die noch an CD44 binden kann, ist ein Hexasaccharid, jedoch bindet CD44 längere Hyaluronsäure-Moleküle mit höherer Affinität (Underhill *et al.*, 1993). Daneben bindet CD44 mit geringerer Affinität auch andere Liganden, wie Kollagen Typ I und IV (Carter *et al.*, 1988), Fibronectin (Jalkanen *et al.*, 1992) oder Chondroitin-Sulfat (Aruffo *et al.*, 1990). Die Hyaluronsäure-Bindungsfähigkeit von CD44 wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst, wie z. B. durch das Glykosylierungsmuster (Hathcock *et al.*, 1993; Katoh *et al.*, 1995; Lesley *et al.*, 1995) oder die Dimerisierung bzw. Oligomerisierung von CD44 auf der Zelloberfläche (Galluzzo *et al.*, 1995; Sleeman *et al.*, 1996). Die Hyaluronsäure-Bindung von CD44 ist überwiegend für die Standardform beschrieben worden, aber auch die varianten CD44-Isoformen sind fähig, Hyaluronsäure zu binden. In verschiedenen Analysen konnte gezeigt werden, daß die Insertion zusätzlicher Exons nicht mit der Hyaluronsäure-Bindung interferiert (He *et al.*, 1992; Sleeman *et al.*, 1996).

CD44 ist an zahlreichen zellulären Funktionen beteiligt. Dazu gehören z. B. Zell-Zell-Aggregationen (Oppenheimer-Marks *et al.*, 1990; Lesley *et al.*, 1992), Aufbau und Organisation einer Zell-assoziierten Matrix (Underhill und Toole, 1980; Knudson *et al.*, 1996), die Migration von Zellen auf immobilisierter Hyaluronsäure (Thomas *et al.*, 1992, 1993; DeGrendele *et al.*, 1996) oder die Internalisierung von Hyaluronsäure (Culty *et al.*, 1992).

Vielfach konnte in experimentellen Modellen gezeigt werden, daß die Interaktion von CD44 mit Hyaluronsäure auf das lokale Wachstum und die Metastasierungsfähigkeit von Tumorzellen begünstigend wirken kann (Sy *et al.*, 1991; Bartolazzi *et al.*, 1994, 1995; Walter *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1995). Zudem wurde eine Korrelation zwischen einer verstärkten Expression von CD44s bzw. dem Erscheinen varianter Isoformen von CD44 und histologisch dokumentierter Tumoreigenschaften bzw. der Aggressivität humaner Tumore gefunden, z. B. in Tumoren des Magens (Heider *et al.*, 1993), des Pankreas (Chaudhry *et al.*, 1994; Rall und Rustgi, 1995), der Prostata (Lokeshwar *et al.*, 1995), in kolorektalen Tumoren (Wielenga *et al.*, 1993) und in Non-Hodgkin's Lymphomen (Pals *et al.*, 1989; Jalkanen *et al.*, 1991). Aufgründessen ist CD44 für die Tumorprognostik als Tumor- bzw. Metastasenmarker von Bedeutung (Heider *et al.*, 1993a; Heider *et al.*, 1993b; Wielenga *et al.*, 1993).

Kürzlich ist ein weiterer Hyaluronsäure-Rezeptor mit der Bezeichnung LYVE-1 („lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid receptor-1“, Lymphgefäßendothel-spezifischer Hyaluronsäure-Rezeptor 1) beschrieben worden (Banerji *et al.*, 1999). Dieser Rezeptor besitzt Homologie zur Hyaluronsäure-Bindungsdomäne von CD44 (Banerji *et al.*, 1999). Seine Expression ist exklusiv auf die inneren Gefäßwände lymphatischer Gefäße beschränkt (Banerji *et al.*, 1999).

### 1.3.2 RHAMM

RHAMM („receptor for hyaluronic acid-mediated motility“, Rezeptor für Hyaluronsäure-vermittelte Zellmotilität) ist ursprünglich als ein 56 - 58 kDa Hyaluronsäure-bindendes Protein identifiziert worden, das im Gewebekulturüberstand muriner Fibroblasten und Fibrosarkomzelllinien enthalten ist (Turley *et al.*, 1987). RHAMM wurde die Funktion zugeschrieben, durch Bindung an Hyaluronsäure die Migration Ras-transformierter Fibroblasten zu induzieren (Hardwick *et al.*, 1992; Turley *et al.*, 1993).

Die erste veröffentlichte cDNA-Sequenz für murines RHAMM enthält einen offenen Leserahmen, der für ein Polypeptid von 52 kDa kodiert (Hardwick *et al.*, 1992). Nachfolgende Studien, die auf dieser Nukleotidsequenz basierten, beschrieben zahlreiche unterschiedliche Molekulargewichte für RHAMM, die von 52 kDa bis 125 kDa (Hardwick *et al.*, 1992; Samuel *et al.*, 1993; Hall *et al.*, 1996) reichten. Später wurde offenkundig, daß die ursprüngliche cDNA-Sequenz für murines RHAMM nicht vollständig war. Die cDNA-Sequenz, die dann als Gesamtlängen-cDNA-Sequenz für murines RHAMM publiziert wurde, beinhaltet einen offenen Leserahmen, der für ein Polypeptid von 70 kDa kodiert (Hall *et al.*, 1995). In der abgeleiteten Peptidsequenz lassen sich zwei funktionelle Domänen erkennen. Am C-Terminus des Proteins sind zwei Hyaluronsäure-Bindungsdomänen lokalisiert (Yang *et al.*, 1994) Sie enthalten analog zu anderen bekannten Hyaluronsäure-bindenden Proteinen das BX<sub>7</sub>B-Motiv (Yang *et al.*, 1994). Eine außergewöhnliche Domäne ist die „repeat-region“, deren Funktion bis jetzt nicht bekannt ist. Sie besteht aus fünf repetitiven Tropomyosin-ähnlichen Sequenzmotiven, die für einen hydrophoben  $\alpha$ -helikalen Peptidbereich kodieren (Entwistle *et al.*, 1995). Interessanterweise enthält die Peptidsequenz keine Motive, von denen man die Sekretion oder Lokalisation des Proteins auf der Zelloberfläche ableiten könnte.

Ebenso wie für CD44 beschrieben, so ist auch die Überexpression von RHAMM mit malignen Prozessen verbunden. Die ektopische Überexpression einer mutmaßlichen Spleißvariante in immortalisierten murinen Fibroblasten führte zur Transformation und Metastasierungsfähigkeit

der transfizierten Zellen (Hall *et al.*, 1995). In B- und Plasmazellen von Patienten mit multiplen Myelomen findet man Überexpression von RHAMM; in B-Zellen gesunder Spender wird RHAMM hingegen nur gering exprimiert (Crainie *et al.*, 1999). In Brusttumoren korreliert die Überexpression von RHAMM mit der Tumorrogression (Wang *et al.*, 1998).

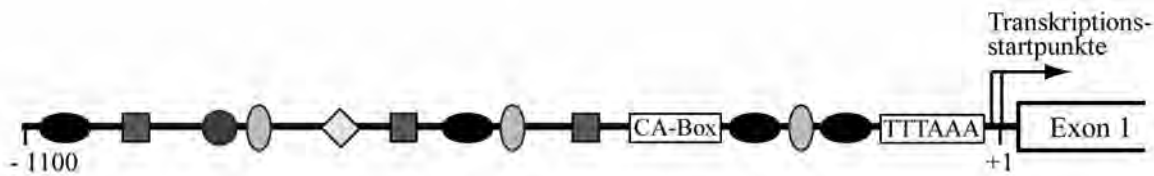
#### **1.4 Die Bedeutung von MMP-9 in der Tumorgenese**

Allgemein gilt, daß der Abbau der Basallamina und des interstitiellen Stromas durch proteolytische Enzyme die Einwanderung der Krebszellen in das benachbarte, normale Gewebe begünstigt.

Eine aberrante Expression von MMP-9 ist in zahlreichen humanen Tumoren gefunden worden, z. B. des Gehirns (Rao *et al.*, 1996), der Lunge (Urbanski *et al.*, 1992; Canete-Soler *et al.*, 1994), der Blase (Davies *et al.*, 1993), der Prostata (Hamdy *et al.*, 1994), in malignen Lymphomen (Kossakowska *et al.*, 1993) und Melanomen (Cottam *et al.*, 1992). In einigen dieser Tumore korreliert die Expressionsstärke von MMP-9 mit den histologisch dokumentierten Tumoreigenschaften, z. B. bei malignen Lymphomen (Kossakowska *et al.*, 1993), oder mit ihrer Aggressivität, z. B. bei Adenokarzinomen der Prostata (Hamdy *et al.*, 1994). Die Bedeutung von MMP-9 bei der Tumorgenese und Metastasierung wird unterstützt durch die Beobachtung, daß in humanen Karzinomen, z. B. der Lunge oder der Haut, in Dickdarntumoren, oder in malignen Lymphomen MMP-9-Protein hauptsächlich an der Grenze des invadierenden Tumors zum benachbarten Stroma lokalisiert ist. MMP-9 wird dabei sowohl von Tumorzellen als auch vom umgebenden Stroma, wie Fibroblasten oder Makrophagen, exprimiert (Pyke *et al.* 1992; Kossakowska *et al.*, 1993; Canete-Soler *et al.*, 1994; Zeng und Guillem, 1996; Borchers *et al.*, 1997).

## 1.5 Die Regulation der Expression von MMP-9

Die Aktivität von MMP-9 kann durch verschiedenartige Stimuli induziert werden. Zahlreiche Wachstumsfaktoren, wie IL-1, IL-4 (Interleukin-1, -4), TNF- $\alpha$  (Tumor-Nekrosis-Faktor- $\alpha$ ), EGF („epidermal growth factor“, epidermaler Wachstumsfaktor), TGF- $\alpha$  („tumor growth factor- $\alpha$ “, Tumorstromwachstumsfaktor- $\alpha$ ), Tumorstrompromotoren, wie TPA und Retinoide, und Onkogenprodukte, wie Ha-Ras oder c-Src, regulieren die Expression von MMP-9 (Überblick in Birkedal-Hansen *et al.*, 1993).



**Abb. 3: Schematische Darstellung von 1100 bp der 5'-flankierenden Region des murinen MMP-9-Gens**  
Die Konsensus-Sequenzen für Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren AP-1- (●), PEA-3- (■), Sp-1- (○), AP-2- (●) und NF- $\kappa$ B- (◇) sind eingezeichnet, sowie die Purin-Pyrimidin-Box und die TATA-Box (nach Munaut *et al.*, 1999).

Der Promotor des murinen MMP-9-Gen enthält vier mutmaßliche Konsensussequenzen für Bindungsstellen des Transkriptionsfaktors AP-1 (Aktivator-Protein-1) sowie potentielle Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B, Ets/PEA3 und Sp-1 (Masure *et al.*, 1993; Abb. 3). In *in vitro* Modellen konnte gezeigt werden, daß diese Bindungsstellen auch funktionell sind. So sind an der Ras-induzierten transkriptionellen Regulation des MMP-9-Gens in transformierten Fibroblasten die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B, SP-1, ets/PEA-3, AP-1 und Rb (Retinoblastom-Protein) beteiligt (Bernhard *et al.*, 1990; Bernhard *et al.*, 1994). Eine der proximalen AP-1-Bindungsstellen im 5'-flankierenden Bereich des MMP-9-Gens wird allgemein als notwendig, aber alleine nicht ausreichend, für die basale und Ras-, TPA- oder TNF- $\alpha$ -induzierte Aktivierung des MMP-9-Promotors angesehen (Sato und Seiki, 1993; Sato *et al.*, 1993; Gum *et al.*, 1996; Himmelstein *et al.*, 1997; Himmelstein *et al.*, 1998). Mutationsanalysen der 5'-flankierenden Region des MMP-9-Gens zeigten, daß grundsätzlich die Aktivität einzelner Transkriptionsfaktoren für die Aktivierung der Promotors nicht ausreicht. Vielmehr müssen verschiedene Transkriptionsfaktoren für die Promotoraktivierung zusammenwirken (Gum *et al.*, 1996; Himmelstein *et al.*, 1997; Ikebe *et al.*, 1998; Bond *et al.*, 1998; Farina *et al.*, 1999). Die



Existenz verschiedener funktioneller Elemente im MMP-9-Promotor legt nahe, daß die Expression von MMP-9 koordiniert durch die Integration verschiedener Signalwege reguliert wird. Zu den Signalwegen, die an der Wachstumsfaktor-, Ras- und TPA-induzierten MMP-9-Expression beteiligt sind, gehören auch die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK; Gum *et al.*, 1997). Die Inhibition der Aktivität von MEK-1 (Mitogen-aktivierte Proteinkinasekinase), p38MAPK oder JNK (Jun-N-terminale Kinase) führten zu einer signifikanten Reduktion der MMP-9-Induktion (Gum *et al.*, 1996; Simon *et al.*, 1998; Reddy *et al.*, 1999).

## 1.6 Fragestellung

MMP-2 und MMP-9 kommen bei der Tumordinvasion aufgrund ihrer Reaktivität gegen Kollagen Typ IV, den Hauptbestandteil der Basalmembran, eine besondere Bedeutung zu (Stetler-Stevenson, 1990; Liotta *et al.*, 1991). Die Expression dieser MMPs ist in gesunden Geweben relativ gering, unter physiologischen oder pathologischen Bedingungen, die mit Gewebeumwandlung und Zellmigration einhergehen, ist die Synthese dieser MMPs jedoch drastisch erhöht (Salo *et al.*, 1994). Nicht nur Wachstumsfaktoren sondern auch einzelne Komponenten der extrazellulären Matrix, wie Laminin, Fibronectin oder Kollagen, können die Expression von MMP-2 und MMP-9 induzieren (Turpeenniemi-Hujanen *et al.*, 1986; Azzam *et al.*, 1992; Seltzer *et al.*, 1994; Khan *et al.*, 1997; Xie *et al.*, 1998).

Hyaluronsäure findet man verstärkt in der Peripherie des Tumors an der Grenze zum normalen Gewebe und eine erhöhte Hyaluronsäure-Synthese ist häufig mit einer erhöhten Invasivität (Toole, 1979) oder Migrationsfähigkeit von Zellen (Turley, 1984) assoziiert.

In meiner Arbeit soll der Hypothese nachgegangen werden, ob die erhöhte Menge an Hyaluronsäure ursächlich in die Entstehung von invasiven Eigenschaften involviert ist. Im Rahmen der ersten Vorversuche entdeckte ich, daß Hyaluronsäure die Akkumulation gelatinolytischer Aktivität auslösen kann. Daher konzentrierte ich meine weitere Arbeit auf die Identifizierung der verantwortlichen Enzyme, der Art der Hyaluronsäure-abhängigen Regulation und die Signal-Intermediate zwischen Hyaluronsäure und den Effektormolekülen der gelatinolytischen Aktivität. Von besonderer Wichtigkeit war die Frage nach den für die Signalvermittlung verantwortlichen Hyaluronsäure-Rezeptoren.



## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### Bezugsquellen

Whatman 3MM-Papier	Schleicher und Schuell, Dassel
Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (30:0,8)	Roth, Karlsruhe
Agarose Typ II	Biozym, Hess. Oldendorf
Ammoniumperoxodisulfat	BioRad, München
Ampicillin	Gibco, Karlsruhe
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit (USA)
Bacto-Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit (USA)
Bacto-Trypton	Difco Laboratories, Detroit (USA)
$\beta$ -Mercaptoethanol	Gibco, Karlsruhe
BSA (bovines Serumalbumin)	Sigma, München
Chondroitin-Sulfat	Sigma, München
Coomassie Brilliant Blau R250	Serva, Heidelberg
Cetylpyrimidiniumchlorid	Sigma, München
dNTP	Promega, Heidelberg
ddNTP	Promega, Heidelberg
DMEM (synthetisches Kulturmedium)	Gibco, Karlsruhe
DMSO	Sigma, München
DOTAP (liposomales Transfektionsreagenz)	Boehringer, Mannheim
Ethidiumbromid	Sigma, München
FCS	Gibco, Karlsruhe
G418	Calbiochem, Bad Soden
Gelatine	Merck, Darmstadt
Glutamin	Gibco, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Hyaluronsäure aus Hahnenkämmen	Sigma, München
Magermilch-Pulver	Saliter, Obergünzburg
MOPS	Roth, Karlsruhe
Nonidet P40	Boehringer, Mannheim
Oligo-d(T) <sub>15</sub>	Boehringer, Mannheim
Oligo-d(T)-Zellulose	Biolabs, Schwalbach
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Karlsruhe
Phenol-Guanidiniumisothiocyanat-Lösung	PeqLab, Erlangen
PMSF, Phenylmethsulfonfyl-Fluorid	Sigma, München
Poly(dI/dC)	Boehringer, Mannheim
Proteinase K	Merck, Darmstadt
PVDF-Membran	Millipore, Eschborn
Quiagen-tip-500-Säulen	Quiagen, Düsseldorf
Röntgenfilme (HyperfilmMP)	Amersham Buchler, Braunschweig
RPMI 1640 (synthetisches Kulturmedium)	Gibco, Karlsruhe
Suramin	Bayer Leverkusen, Leverkusen

TEMED	Sigma, München
TPA	Sigma, München
Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Biorad, München
Trypsin	Gibco, Karlsruhe
Tween20	Serva, Heidelberg

Chemikalien in analytischer Reinheit wurden, soweit nicht gesondert aufgeführt, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma (München), Serva (Heidelberg) oder Fluka (Buchs, CH) bezogen.

### **Radiochemikalien**

Alle Radiochemikalien wurden von Amersham Buchler (Braunschweig) bezogen.

### **Enzyme**

Restriktionsenzyme wurden von den folgenden Firmen bezogen:

New England Biolabs, Frankfurt  
Boehringer, Mannheim  
Pharmacia, Freiburg  
Promega, Heidelberg

DNA-modifizierende Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen :

T4-Polynukleotid-Kinase	Promega, Heidelberg
M-MLV-Reverse Transkriptase	Gibco, Karlsruhe
Taq-DNA-Polymerase	Gibco, Karlsruhe

### **Induktoren und Inhibitoren**

Aktinomyzin D	Sigma, München
Emetin, Dihydrochlorid	Calbiochem, Bad Soden
Genistein	Calbiochem, Bad Soden
PD98059	Calbiochem, Bad Soden
SB203580	Calbiochem, Bad Soden
TPCK (N-Tosyl-L-Phenylalanin-Chlormethyl-ke-ton)	Calbiochem, Bad Soden
Tumornekrosefaktor $\alpha$	Sigma, München
TPA (12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Azetat)	Sigma, München
UO126	Sigma, München

### Allgemein verwendete Lösungen und Puffer

<b>Coomassie-Färbelösung</b>	40 % Methanol, 10 % Essigsäure, 0,25 % Coomassie Brilliant Blue R250
<b>Church-Hybridisierungspuffer FDP</b>	7 % SDS, 0,5 M NaHPO <sub>4</sub> pH 7,2 50% Formamid (deionisiert), 1x MOPS-Puffer, 1 % Ethidium-Bromid, 6,5 % Formaldehyd
<b>Ladepuffer für DNA-Agarosegele</b>	15 % Ficoll400, 60 mM EDTA, 30 % Glycerin, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau
<b>Ladepuffer für RNA-Formaldehyd-Gele</b>	1x MOPS-Puffer, 50 % Formamid, 6,5 % Formaldehyd, 10 µg/ml Ethidiumbromid, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % (w/v) Xylenblau
<b>2x SDS-Probenpuffer</b>	160 mM Tris pH 6,6, 4 % SDS, 16 % Glycerin, 0,57 M β-Mercaptoethanol, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau
<b>Laemmli-Gelelektrophorese-Puffer</b>	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS pH 8,3
<b>4x Laemmli-Probenpuffer</b>	250 mM Tris pH 6,8, 8 % SDS, 4 % Sukrose 0,1 % (w/v) Bromphenolblau
<b>STE-SDS</b>	20 mM Tris, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 7,4, 0,5% SDS
<b>SSC</b>	0,15 M NaCl, 0,015 M Tri-Natrium-Citrat
<b>5x TBE</b>	450 mM Tris, 450 mM Borsäure; 12,5 mM EDTA, pH 8,3
<b>TE</b>	10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 8,0
<b>PBS</b>	0,14 M NaCl, 2,7 mM KCl, 0,7 mM CaCl <sub>2</sub> , 0,6 mM MgCl <sub>2</sub>
<b>Western-Transferpuffer</b>	25 mM Tris, 0,192 M Glycin, 10 % Methanol

### Mausstämme

C57/BL6 Mäuse wurden von der Firma Charles River Deutschland (Sulzfeld) bezogen.

CD44-defiziente Mäuse (C57/BL6) wurden freundlicherweise von Dr. F. Hilberg zur Verfügung gestellt (Protin *et al.*, 1999).

RHAMM-defiziente Mäuse (C57/BL6) sind in diesem Institut generiert worden (J. Moll, M. Hofmann; in Vorbereitung).

## **Eukaryontische Zellen**

Alle Zelllinien wurden in befeuchteter Atmosphäre bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

### **3LL**

Murine Lungenkarzinomzelllinie, die von einem Lewis Lungenkarzinom aus C57BL-Mäusen etabliert worden ist, wurden in DMEM und 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin kultiviert (Bertram und Janik, 1980).

### **NIH3T3**

Murine immortalisierte Fibroblastenzelllinie von NIH Schweizer Mausembryonen. Die Zellen wurden kultiviert in 10 % FCS, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin.

(Bader *et al.*, 1969; Andersson *et al.*, 1979)

### **Murine embryonale Fibroblasten**

Aus Embryonen von Tag 13.5 bzw. 14.5 von C57BL6/J-Mäusen wurden primäre Fibroblasten gewonnen und in Kultur genommen. Das Kulturmedium enthielt DMEM mit 10 % FCS, 2 mM Glutamin, 0,1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin.

## **Prokaryontische Zellen**

### **E.coli K12/DH 5 $\alpha$**

Rekombinationsdefekte, suppressive Linie (F<sup>-</sup>; endA1; hsdR17 (rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>); supE44; thi-1; l-; recA1; gyrA96; relA1)

## Antikörper

<b>IM7.8.1</b>	monoklonal, IgG <sub>2b,κ</sub> aus Ratte, gerichtet gegen murines CD44 (Pharmingen, San Diego, USA; Budd <i>et al.</i> , 1987)
<b>KM81</b>	monoklonal, IgG <sub>2a</sub> oder F(ab') <sub>2</sub> aus Ratte, gerichtet gegen murines CD44 (ATCC TIB 241; Eurogentec Bel, S. A.; Budd <i>et al.</i> , 1987)
<b>7C92</b>	polyklonal, IgGs aus Kaninchen, gerichtet gegen die „repeat“-Region von murinem RHAMM (Hofmann <i>et al.</i> , 1998)
<b>anti-Kaninchen-HRP</b>	polyklonal, IgGs aus Ziege, Peroxidase-gekoppelt, gerichtet gegen alle Kaninchen IgG-Subklassen (Dako, Hamburg)
<b>anti-Kaninchen-TRITC</b>	polyklonal, IgGs aus Schwein, Rhodamin (TRITC)-gekoppelt, gerichtet gegen alle Kaninchen IgG-Subklassen (Dako, Hamburg)
<b>anti-Ratten-TRITC</b>	polyklonal, IgGs aus Ziege, Rhodamin (TRITC)-gekoppelt, gerichtet gegen alle Ratten IgG-Subklassen (Dako, Hamburg)

## DNAs

### Eukaryontische Expressionsvektoren

#### pRSVneo

Expressionsvektor, der die cDNA der Aminoglukotransferase unter der Kontrolle des SV40 „early promoter“ enthält (Gorman, 1985).

### Proben für Northern Blot Analysen

**GAPDH (Ratte):** PstI-Fragment des Plasmids pGAPDH (Fort *et al.*, 1985)

**v-fos (viral):** PstI-Fragment des Plasmids pUC9/v-fos (Rahmsdorf *et al.*, 1987)

**c-jun (Mensch):** SmaI/HindIII-Fragment des Plasmids ph-cJ-1 (Angel *et al.*, 1988a)

**MMP-13 (Maus):** PstI/SacII-Fragment aus pBl-muColl-1 (Gack *et al.*, 1994)

**MMP-9 (Maus):** EcoRI/HindIII-Fragment aus pBl-muMMP-9 (Schorpp-Kistner *et al.*, 1999)

**TIMP-1 (Maus)** PstI-Fragment aus pBl-TIMP-1 (Whitman *et al.*, 1987)

**u-PA (Maus)** PstI-Fragment des Plasmids pmUK<sup>+</sup> (Sommer *et al.*, 1987)

### Oligonukleotide für die RT-PCR-Analyse

Die Notation erfolgt gemäß der Konvention von 5' nach 3'. Die Zahlen in Klammern geben die Positionen der Oligonukleotide bezüglich der Sequenz des jeweiligen Gens an.

Positionsangaben der MMP-9-Oligonukleotide leiten sich von der von Masure *et. al.* (1993) veröffentlichten mRNA-Sequenz ab (Akzessionsnr.: Z27231 EMBL/Genbank/DDBJ; 1993).

Die Positionierung der MMP-13-Oligonukleotide bezieht sich auf die Sequenz MMPCOLLAG mRNA; *M. musculus* mRNA for (pro) collagenase [Akzessionsnr.: X 66473 EMBL/Genbank/DDBJ; 1993].

Den Positionsangaben der GAPDH-Oligonukleotide liegt die GAPDH-Sequenz von *Rattus norvegicus* [Akzessionsnr.: X2231 EMBL/Genbank/DDBJ; 1994] zugrunde.

<b>muMMP-9 314 sense</b> (314-333):	CGCTGTGGTGTCCCAGACGT (20-mer)
<b>muMMP-9 779 sense</b> (779-798):	CCTTGGTGTAGCACAAACAGC (20-mer)
<b>muMMP-9 870 sense</b> (870 - 889):	AAGGCAAACCCTGTGTGTTC (20-mer)
<b>muMMP-9 985 antisense</b> (968-985):	CTGGTCATAGTTGGCTGT (18-mer)
<b>muMMP-9 1342 antisense</b> (1321-1342):	ATACTGGATGCCGTCTATGTTCG (22-mer)
<b>muMMP-9 1722 antisense</b> (1722-1741):	AGTAAGGAAGGGGCCCTGTA (20-mer)
<b>muMMP-9 2129 sense</b> (2129-2149):	AATGAGGTGAACAAGGTGGACC (22-mer)
<b>muMMP-9 2497 antisense</b> (2477-2497):	AGTTGTCTTCTTGCTCGGATGC (22-mer)
<b>muMMP-13 296 sense</b> (296-317):	AGATGTGGAGTGCCTGATGTGG (22-mer)
<b>muMMP-13 901 antisense</b> (880-901):	GAGACTGGTAATGGCATCAAGG (22-mer)
<b>rGAPDH sense</b> (23-45):	AGACAGCCGCATCTTCTTGTGC (21-mer)
<b>rGAPDH antisense</b> (282-302):	CTCCTGGAAGATGGTGATGG (20-mer)

### Oligonukleotide für die Gel-Retardationsanalyse

#### HIV-1

5'-AGCTTGGGGACTTTCCAGCCG-3'  
 3'-ACCCCTGAAAGGTTCGGCCTAG-5'

#### muColl.I AP-1

5'-AGCTAAAGTGGTGACTCATCACTAT-3'  
 3'-TTTCACCACTGAGTATTGATATCGA-5'



## 2.2 Methoden

Für die photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurden die folgenden Konstanten in die Berechnung einbezogen:

**DNA :** OD<sub>260</sub> von 1,0 entspricht 50 µg doppelsträngiger DNA/ml

**RNA :** OD<sub>260</sub> von 1,0 entspricht 40 µg einzelsträngiger RNA/ml

**Oligonukleotide :** OD<sub>260</sub> von 1,0 entspricht 20 µg einzelsträngigem Oligonukleotid/ml

### 2.2.1 Behandlung von Nukleinsäuren

#### 2.2.1.1 Präparation von polyA<sup>+</sup> - RNA

Zellen wurden in 20 ml SDS-STE mit 400 µg/ml Proteinase K lysiert, im Ultra-Turrax homogenisiert und bei 37 °C für 30 - 60 min inkubiert. Anschließend wurde dem Lysat 100 - 300 mg Oligo-d(T)-Zellulose zugesetzt und die Suspension auf 500 mM NaCl eingestellt. Die Bindung der polyadenylierten mRNA an die Oligo-d(T)-Zellulose erfolgte ü. N. bei RT auf einem Kreiselrad ("roto torque"). Nach der Ankopplung der mRNA an die Oligo-d(T)-Zellulose wurde die RNA durch wiederholtes Pelletieren der Oligo-d(T)-Zellulose und anschließendes Resuspendieren in Wasch-Puffer (400 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7,4, 10 mM EDTA, 0,2 % SDS) gewaschen.

Nach drei Waschschrritten wurde die Oligo-d(T)-Zellulose-Suspension auf eine BioRad-EconoPac-Säule gegeben und auf der Fritte mit 20 ml Ladepuffer (100 mM NaCl; 20 mM Tris pH 7,4; 10 mM EDTA; 0,2 % SDS) gewaschen. Die RNA wurde dann mit 4,5 ml salzfreien Elutionspuffer (1 mM Tris pH 7,4; 0,1 mM EDTA; 0,2 % SDS) eluiert. Die Konzentration der unverdünnten RNA-Lösung wurde photometrisch bestimmt und die RNA anschließend mit 2 Volumen Ethanol bei -20 °C ü. N. gefällt. Nach der Präzipitation der RNA wurde diese zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, durch Zentrifugieren pelletiert (20 min bei 4 °C und 12000x g), getrocknet und in sterilem Wasser gelöst und auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt.

#### 2.2.1.2 Präparation von Gesamt-RNA

Die Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen oder Geweben wurde mit einer gebrauchsfertigen einphasigen Guanidiniumisothiocyanat-Phenol-Lösung der Firma PeqLab entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### 2.2.1.3 RNA-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde nach Lehrach (1978) mit Formaldehyd-Gelen durchgeführt. 1,2 % (w/v) Agarose, 6 % Formaldehyd wurden in 1x MOPS-Puffer (20 mM MOPS; 5 mM NaAcetat; 0,5 mM EDTA; pH 7,0) gelöst und in eine horizontale Gelkammer gegossen. Nach Erstarren der Agarose wurde die Gelkammer mit 1x MOPS-Puffer überschichtet. 3 - 5 µg polyA<sup>+</sup>-RNA oder 10 - 20 µg Gesamt-RNA in einem Volumen von

maximal 6 µl, wurden in 20 - 30 µl FDP gelöst und bei 65 °C für 10 min denaturiert. Die Proben wurden anschließend auf Eis abgekühlt, mit 4 µl RNA-Ladepuffer versetzt und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

#### **2.2.1.4 Northern Blot**

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die RNA durch UV-Licht bei 302 nm Wellenlänge visualisiert und fotografiert. Das Gel wurde in sterilem H<sub>2</sub>O gewaschen und für den Kapillartransfer montiert (Thompson, 1980). Dabei wurde die RNA ü. N. mit 20x SSC auf Hybond N<sup>+</sup>-Nylonmembranen (Amersham Buchler, Braunschweig) transferiert und immobilisiert. Nach dem Transfer wurde die Membran erst in 5x SSC gewaschen und anschließend wurde die RNA auf der Nylonmembran durch Bestrahlen mit 120 nJoule UV-Licht der Wellenlänge 254 nm in einem "Stratalinker" (Stratagene) kovalent fixiert.

#### **2.2.1.5 Hybridisierung von Northern Blots**

Der Filter wurde in eine Hybridisierungsröhre plaziert und 15 - 20 min in 2x SSC/1 % SDS bei 60 °C im Hybridisierschrank (Bachofer, Reutlingen) hydriert. Die Lösung wurde anschließend verworfen und durch Hybridisierungspuffer ersetzt. Die Vorhybridisierung erfolgte für ca. 1 h und die Hybridisierung gewöhnlich ü. N. bei 65 °C. In beiden Fällen wurde Church-Puffer (0,5 M NaPO<sub>4</sub> pH 7,2; 7 % SDS) verwendet. Der Blot wurde nach der Hybridisierung eine Stunde mit 2x SSC/1 % SDS, und anschließend zweimal für 30 min mit 1x SSC/1 % SDS gewaschen. Zuletzt wurde der Filter in eine Folie eingeschweißt und auf einem Röntgenfilm bei -80 °C exponiert.

#### **2.2.1.6 Verfahren zum Abtrennen einer radioaktiv markierten Probe vom Northern Blot**

Sollte derselbe Filter noch mit einer anderen Hybridisierungsprobe hybridisiert werden, war es notwendig die vorherige Probe zu entfernen. Dazu wurde der Filter ca. 15 min in kochender 0,1x SSC/1 % SDS-Lösung inkubiert und anschließend auf einem Röntgenfilm exponiert, um sicherzustellen, daß durch die Waschprozedur die RNA-Probe vollständig entfernt wurde.

#### **2.2.1.7 Erststrang-cDNA-Synthese**

0,5 bis 3 µg Gesamt-RNA oder 1 µg polyA<sup>+</sup>-RNA und 200 pmol Oligo-d(T)<sub>18</sub>-Primer wurden in 12 µl sterilem H<sub>2</sub>O für 10 min auf 70 °C erhitzt und nachfolgend in Eiswasser abgekühlt. Zur RNA wurden 4 µl 5x Reverse Transkriptionspuffer [94 mM Tris pH 6,9; 23 mM MgCl<sub>2</sub>; 435 mM KCl; 750 µM β-NAD; 50 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>], 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl dNTPs (40 mM dNTPs) hinzugegeben. Durch Zugabe von 1 µl M-MMLV-Reverser Transkriptase (200 units) wurde dann die cDNA-Synthese gestartet. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte bei 42 °C für eine Stunde. Der Ansatz wurde nach thermischer Inaktivierung der Reversen Transkriptase (10 min, 70 °C) mit sterilem H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt, aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

## **2.2.2 DNA-Präparation**

### **2.2.2.1 Plasmidpräparation im Minimaßstab**

Von einer 2 ml ü. N.-Bakterienkultur wurden 1,5 ml in ein 2 ml- Reaktionsgefäß überführt und bei RT für 5 min, 5000x g sedimentiert. Das Medium wurde verworfen. Die Bakterien wurden in 100 µl Lysozymlösung (50 mM Glucose; 10 mM EDTA; 25 mM Tris pH 8,0; 2 mg/ml Lysozym) resuspendiert und anschließend mit 200 µl alkalischer SDS-Lösung (0,2 M NaOH, 1 % SDS) versetzt. Nach vorsichtigem Durchmischen wurden dann 150 µl 3 M NaAcetat zugegeben und abermals vorsichtig gemischt. Die Reaktionsgefäße wurden für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend für 20 min bei 10000x g, 4 °C, zentrifugiert. In diesem Schritt werden die Zellmembranen und die genomische DNA der Bakterien sedimentiert, die Plasmid-DNA bleibt dabei in Lösung. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 1 ml Ethanol wurde die Plasmid-DNA 30 min auf Eis gefällt und anschließend durch Zentrifugation (10 min, 4 °C, 10000x g) pelletiert. Die Plasmid-DNA wurde zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris pH 8,0 , 1 mM EDTA) gelöst.

### **2.2.2.2 Plasmidpräparation im großen Maßstab (Qiagen-Methode)**

Für die Präparation großer Mengen reiner Plasmid-DNA wurden Ionenaustauschersäulen der Firma Quiagen verwendet. Die Präparation folgte in allen Schritten dem von Qiagen empfohlenen Protokoll: Bakterien einer 200 ml ü. N.-Kultur wurden durch Zentrifugation sedimentiert. Die Bakterien wurden anschließend in 10 ml Puffer P1 (50 mM Tris pH 8,0; 10 mM EDTA; 100-mg/ml RNaseA) resuspendiert und mit weiteren 10 ml Puffer P2 (0,2 M NaOH; 1 % SDS) lysiert. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei RT wurde die Bakteriensuspension durch Zugabe von 10 ml Puffer P3 (2,55 M KAcetat) neutralisiert und das Gemisch zentrifugiert (4 °C, 20000x-g, 30 min). Der Überstand aus diesem Zentrifugationsschritt wurde dann auf eine mit Puffer QBT (750 mM NaCl; 50 mM MOPS; 15 % Ethanol; pH 7,0; 0,1 % TritonX-100) äquilibrierte Ionenaustauschersäule gegeben. Nach Adsorption der DNA an die Säulenmatrix wurde die DNA zweimal mit 10 ml Puffer QC (1 M NaCl; 50 mM MOPS; 15 % Ethanol; pH 7,0) gewaschen und dann mit 5 ml Puffer QF (1,2 M NaCl; 50 mM MOPS; 15 % Ethanol; pH 8,0) eluiert. Nach einer Isopropanolfällung wurde die Plasmid-DNA zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend in sterilem TE-Puffer aufgenommen.

### **2.2.2.3 DNA-Gelelektrophorese**

Zur elektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente wurden 1 - 2 %ige Agarose-TAE-Gele eingesetzt. Die Agarose wurde dafür in 1x TAE-Puffer (20 mM Tris Base; 10 mM Essigsäure; 1 mM EDTA; pH 8,3) durch Erhitzen gelöst, anschließend mit Ethidiumbromid (f.c. 1 µg/ml) versetzt und in eine horizontale Gelkammer gegossen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde die DNA unter UV-Licht visualisiert und fotografiert.

#### **2.2.2.4 DNA-Fragment-Präparation**

Die Präparation von DNA-Fragmenten nach vorhergehender Auftrennung im Agarosegel wurde mit Hilfe eines DNA-Isolations-Kits (BioZym) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt: Die doppelsträngige DNA wurde nach Aufschmelzen der Agarose an eine Silicamatrix gebunden. Nach zwei anschließenden Waschschritten wurde die DNA mit 20 µl H<sub>2</sub>O eluiert.

#### **2.2.2.5 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden**

Für Hybridisierungen der RNA-Blots wurden doppelsträngige cDNA-Proben nach dem "Random-primed-Oligolabeling"-Verfahren mit 50 µCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP radioaktiv markiert (Feinberg und Vogelstein, 1983). Die radioaktive Markierung der DNA-Proben erfolgte mittels eines „Random Primer Labeling Kit“ von der Firma Amersham Buchler (Braunschweig) entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Abtrennung nicht eingebauter Radionukleotide erfolgte als Ausschlußchromatographie mit Hilfe einer G-50-Sephadex-Säule in 1x TNE (10 mM-Tris; 50 mM NaCl; 1 mM EDTA; pH 8). Vor der Zugabe der radioaktiv markierten DNA-Probe zur Hybridisierungslösung wurde die Probe 5 min bei 100 °C denaturiert.

#### **2.2.2.6 Radioaktive Markierung von Oligonukleotid-DNA mit Polynukleotid-Kinase**

Diese Art der Markierung wurde für doppelsträngige Oligonukleotid-DNA angewandt, die in Gel-Retardations-Experimenten eingesetzt wurden. 2 pmol Oligonukleotide wurden mit 1,5 µl 10x Reaktionspuffer (700 mM Tris-HCl pH 7,6; 100 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 M KCl; 5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol), 5 µl [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-ATP (5 pmoles; 2 µCi) und 1 µl T4-Polynukleotid-Kinase (8 U/µl) in einem Volumen von 15 µl bei 37 °C für 60 min inkubiert. Zur Denaturierung der enzymatischen Aktivität wurde die Reaktionslösung 10 min bei 65 °C wärmebehandelt. Die Abtrennung der nicht eingebauten Radionukleotide erfolgte entsprechend 2.2.2.5.

#### **2.2.2.7 PCR-Amplifikation bekannter cDNA-Sequenzen**

5 - 10 µl einer Erststrangreaktion (siehe 2.2.1.7) wurden mit je 10 pmol 3'- und 5'-Amplifikationsprimern in 1x PCR-Puffer, 25µM dNTPs, 1,5 - 3,0 mM MgCl<sub>2</sub> und 5 U Taq-DNA-Polymerase in einer 50 µl-Reaktion amplifiziert. Die Amplifikationsreaktion wurde in einem Thermozykler (Gene Amp PCR System 9600 oder Gene Amp PCR System 2400 von Perkin Elmer) mit folgenden Parametern durchgeführt:

Denaturierung : 30 sec bei 94 °C  
Hybridisierung der spezifischen Primer : 30 sec bei 60 - 65 °C  
Extension : 1 bis 2 min bei 72 °C

Nach dem Ende der Reaktion wurden 25 µl des Ansatzes auf einem Agarosegel analysiert.

## 2.2.3 Proteinchemische Methoden

### 2.2.3.1 Herstellung von Proteinextrakten aus Zellen

Adhärente Zellen (ca.  $5 \times 10^7$ ) wurden mit PBS ( $-\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ) gewaschen und in 1 ml 2x-SDS-Probenpuffer lysiert. Zur mechanischen Zerkleinerung von Makromolekülen, wie genomischer DNA oder RNA, wurde das Zellysate ca. 20 Sekunden sonifiziert. Unspezifische Proteasen wurden durch Hitzebehandlung (5 min, 95 °C) inaktiviert. Das Zell-Lysat wurde bei -20 °C aufbewahrt.

### 2.2.3.2 Präparation von Gesamtzellextrakten

NIH3T3-Zellen (ca.  $6 \times 10^5$  in einer 10 cm Petrischale) wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, mit einem Gummischaber vom Kulturgefäßboden abgelöst und mit 1 ml PBS in ein 2-ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden pelletiert (4000 rpm, 5 min, 4 °C) und in ca. 40 µl NE-Puffer (250 mM Tris pH 7,8; 60 mM KCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 1 mM PMSF) suspendiert. Durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen in flüssigem Stickstoff/Eiswasser-Bad wurden die Zellmembranen aufgebrochen. Die Zelltrümmer wurden durch Ultrazentrifugation 15 min, ca. 115000x g bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und für Gel-Retardationsanalysen verwendet.

### 2.2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

5 µl einer Proteinlösung wurden mit 200 µl einer 1:5 mit H<sub>2</sub>O verdünnten „Protein assay“-Lösung der Firma BioRad gemischt und die Absorption bei 600 nm in einem Spektralphotometer (Multiskan PLUS MK II) gemessen. Zur Eichung wurden serielle Verdünnungen von Serumalbumin hergestellt. Die Berechnung der Proteinkonzentrationen der Proben erfolgte anhand der Regressionsgeraden der Eichkurve.

### 2.2.3.4 Prä-Inkubation von Kaninchenserum mit Fusionsproteinen

Zur Bindung spezifischer Antikörper wurde das Kaninchenserum 7C92 mit verschiedenen Fusionsproteinen vorinkubiert. 10 µl des Kaninchensersums wurden 1:500 in PBS verdünnt und mit je 10 µg des jeweiligen Fusionsproteins (GST, GST-“repeat-region“, GST-RHABD) gemischt. Nach Inkubation auf Eis ü. N. wurde die Mischung zentrifugiert (10000x g, 4 °C, 15 min.) und der Überstand nochmals für die gleiche Zeitdauer mit dem gleichen Protein inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde die Antikörperlösung auf 5 % Magerpulver und 0,3 % Tween20 eingestellt und direkt für die Western-Analyse verwendet.

### 2.2.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Die Proteingele wurden nach dem Protokoll von Laemmli gegossen. Es wurden Gele mit den Größen 16 x 22 cm verwendet. Die Acrylamidkonzentration betrug im allgemeinen 7,5 %. Desweiteren setzte sich das Trenngel aus 375 mM Tris pH 8,8; 0,1 % SDS; 0,1 % APS; 0,025 %-TEMED zusammen. Das Sammelgel bestand gewöhnlich aus 5 % Acrylamid; 125 mM-Tris pH 6,8; 0,1 % SDS; 0,1 % APS; 0,025 % TEMED. Nach der Polymerisation des Geles wurde die Gelapparatur zusammgebaut und mit Laemmli-Gelelektrophorese-Puffer überschichtet. Die Proben wurden in die Taschen des Geles geladen. Die Gelelektrophorese

erfolgte bei RT mit einer Stromstärke von 25 - 35 mA. Nach Beendigung des Laufs wurden die aufgetrennten Proteine entweder mit einer Coomassie-Färbelösung gefärbt oder auf eine PVDF-Membran transferiert.

### **2.2.3.6 Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von Proteinen**

Proteine, die in SDS-Polyacryamid-Gelelektrophorese aufgetrennt worden sind, wurden durch Coomassie-Färbelösung sichtbar gemacht. Dazu wurde das Gel 30 min in 0,5 ml/cm<sup>2</sup> Gelfläche Färbelösung und danach in Entfärbelösung (40 % Methanol, 10 % Essigsäure) inkubiert, bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Anschließend wurde das Gel im Wasserstrahlvakuum getrocknet.

### **2.2.3.7 Immunoblot-Analyse von Proteinen („Western Blot“)**

Proteine, die in SDS-Polyacryamid-Gelelektrophorese aufgetrennt worden sind, wurden in einer Naßtransferzelle (Trans-Blot, BioRad, München) auf eine PVDF-Membran transferiert. Dazu wurde die Membran zuvor für 1 min mit 100 % Methanol aktiviert und in H<sub>2</sub>O hydriert. Das Proteingel wurde mit Western-Transferpuffer äquilibriert und auf die PVDF-Membran aufgelegt. Gel und Membran wurden dann zwischen sechs Lagen, in Transferpuffer getränktem Whatman 3MM-Papier montiert. Dieser „Sandwich-Aufbau“ wurde zwischen zwei Nylonschwämmen in der, mit Transferpuffer gefüllten, Transferkammer fixiert. Der Transfer erfolgte gewöhnlich bei 400 mM für mehrere Stunden bis ü. N. bei 4 °C.

Nach dem Transfer wurde die Membran kurz mit TBS (25 mM Tris-Base; 125 mM NaCl; pH 8,1) gespült. Unspezifische Proteinbindungsstellen wurden mit Blockierungspuffer (4-5 %-fettfreiem Milchkpulver in TBS-T (TBS + 0,5 % Tween)) für 1 - 3 h abgesättigt. Anschließend wurde der Blot zusammen mit der Erstantikörperlösung in eine Plastikhülle verschweißt und 1 - 3 h bei RT, bzw. ü. N. bei 4 °C, mit dem Erstantikörper hybridisiert. Polyklonale Antiseren wurden gewöhnlich in einer Verdünnung von 1:500, monoklonale Antikörper in einer Konzentration von 5 µg/ml bzw. entsprechend den Angaben des Herstellers, in Blockierungspuffer eingesetzt. Überschüssige und unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen für jeweils 6 min mit Blockierungspuffer entfernt. Die Hybridisierung des HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers erfolgte analog zur Erstantikörperhybridisierung, allerdings nur für 1 h. Ungebundene Antikörper wurden durch mehrmaliges Waschen mit Blockierungspuffer entfernt. Anschließend wurde der Blot noch mehrfach in TBS geschwenkt. Antikörperspezifische Signale wurden durch ECL-Detektion (Amersham Buchler, Braunschweig) sichtbar gemacht.

### **2.2.3.8 Immunofluoreszenz-Analyse**

Adhärente Zellen wurden auf „Plastic-Chamber Slides“ der Firma Nunc kultiviert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und für 10 min bei RT in einer 4 %igen Paraformaldehydlösung fixiert. Das Fixativ wurde durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Zur Permeabilisierung der Zellwände bei intrazellulärer Färbung wurden die Zellen mit 10 % Saponin-PBS für 10 min bei RT behandelt. Anschließend wurde das Detergens mit PBS herausgewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen wurden die Zellen für 10 min bei RT mit 5 % FCS-PBS inkubiert. Die Zellen wurden dann mit der Primärantikörperlösung für 1 h auf Eis inkubiert. Monoklonale Antikörper wurden gewöhnlich mit einer Konzentration von 5 µg/ml und polyklonale Antiseren in einer Verdünnung von 1:500 in 5 % FCS-PBS eingesetzt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden überschüssige Antikörper durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfernt und anschließend die Inkubation mit dem Sekundärantikörper angesetzt. Die Einwirkung des Sekundärantikörpers, gewöhnlich TRITC-konjugierte IgG-Antikörper in einer Verdünnung von 1:3000 in FCS-PBS, erfolgte abgedunkelt auf Eis für 30 min. Die Zellen wurden ebenfalls mit PBS gewaschen und für die mikroskopische Analyse vorbereitet. Verwendet wurde ein Immunfluoreszenz-Mikroskop der Firma Zeiss.

#### **2.2.3.9 Glykosaminoglykan-Bindungsnachweis**

Die Bindung von Glykosaminoglykanen an RHAMM-Protein wurde im wesentlichen durchgeführt wie von Sleeman *et al.* (1997) beschrieben. Ca.  $2 \times 10^7$  Zellen wurden in 1 ml 0,5 %-NP-40-PBS lysiert und in Gegenwart von 2 mM PMSF 30 min auf Eis inkubiert. Unlösliche Zellfragmente wurden durch Zentrifugation (12000x g, 4 °C, 10 min) pelletiert. Jeweils 100 µl Aliquots des Überstandes wurden mit 50 µg Glykosaminoglykan bei RT für 1 h inkubiert. Als Negativkontrolle wurde das Zell-Lysat mit dem gleichen Volumen H<sub>2</sub>O inkubiert. Zur Positivkontrolle wurde unbehandeltes Lysat verwendet. Anschließend wurde Cetylpyrimidinium-Chlorid in einer Endkonzentration von 1 % (v/v) hinzugefügt, vermischt und weitere 60 min inkubiert. CPC-Glykosaminoglykan-Protein-Komplexe wurden durch Zentrifugation (12000x g, 10 min, RT) pelletiert, dreimal mit 1 ml 1 % CPC/30 mM NaCl gewaschen. Abschließend wurde das Präzipitat in 50 µl 2x Laemmli-Puffer suspendiert und einer Western-Blot-Analyse unterzogen.

#### **2.2.3.10 Durchflußzytometrische Analyse**

Adhärente Zellen (ca.  $10^5$  Zellen/Ansatz) wurden mit 5 mM EDTA in PBS (ohne Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup>) von der Zellkulturschale abgelöst, in ein Reaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in PBS (-Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup>) gewaschen. Die Zellen wurden dann in der Erstantikörperlösung (in 3 %-FCS-PBS) resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Die eingesetzte Antikörpermenge entsprach der Konzentration, die auch bei der Western-Blot-Hybridisierung verwendet wurde. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen mit der Sekundärantikörperlösung für 30 min auf Eis inkubiert. Für Bindungsstudien mit Fluoreszein-markierter Hyaluronsäure (HA-FITC; freundlicherweise erhalten von Dr. J. C. Simon, Universitäts-Hautklinik Freiburg) wurden die Zellen mit HA-FITC (100 µg/ml) für 1 h auf Eis inkubiert. Für Hyaluronsäure-Blockierungsexperimente wurden die Zellen vor der Behandlung mit HA-FITC für 45 min, 4 °C, mit den jeweiligen Antikörpern (20 µg/ml) vorinkubiert, kurz pelletiert und der Überstand verworfen.

Daran schloß der letzte Waschschrift an, bevor die Zellen in 3 %-FCS-PBS resuspendiert und im FACS (FACStar Plus; Firma Becton Dickinson) analysiert wurden.

### 2.2.3.11 Zymographische Analyse gelatinolytischer Aktivität

Konditionierter Zellüberstand wurde mit 12,5 % Trichloressigsäure (Endkonzentration) für 40 - 50 min auf Eis präzipitiert. Das Präzipitat wurde durch einen Zentrifugationsschritt (15 min, 14000 rpm, 4 °C) pelletiert, zweimal mit eiskaltem 95 % Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Das Pellet wurde dann in 15 - 30 µl nicht reduzierenden 4x Laemmli Probenpuffer aufgenommen.

In ein 8 - 10 % SDS-Polyacrylamid-Gel wurde Gelatine mit einer Endkonzentration von 1 mg/ml kopolymerisiert. Die Proteine wurden unter nicht reduzierenden Bedingungen in 65 mM Tris; 80 mM Glycin; 0,1 % SDS elektrophoretisch aufgetrennt. Um eine Überhitzung der Proteingele zu verhindern, erfolgte der Lauf unter Wasserkühlung. Nach Beendigung der Gel-Elektrophorese wurde SDS aus dem Gel durch zweimaliges 30 minütiges Waschen in 2,5 % TritonX-100 herausgewaschen und Triton X-100 durch mehrmaliges Waschen mit sterilem H<sub>2</sub>O entfernt. Das Gel wurde in Reaktionspuffer (50 mM Tris pH 7,5; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; 1 µM ZnCl) überführt und ü. N. bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Gel mit Coomassie Färbelösung angefärbt und nach Sicht entfärbt mit 40 % Methanol/10 % Essigsäure.

### 2.2.3.12 Nachweis DNA-bindender Proteine durch Gel-Retardationsanalyse

#### („Bandshift Analysis“)

Die „Bandshift“-Reaktionen wurden in einem Volumen von 20 µl je Ansatz durchgeführt. Dazu wurden 5 - 8 µg Proteinextrakt mit 1 µg poly(dI/dC), 2 µg BSA, 12 mM HEPES-KOH pH 7,8, 60 mM KCl, 62,5 mM Tris-HCl pH 7,8, 0,6 mM EDTA, 6 % Glycerin und 5 mM DTT für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden ca. 10 fmol <sup>32</sup>P-markiertes Oligonukleotid (ca. 40000 cpm) zugegeben und weitere 30 min inkubiert. Die Ansätze wurden auf ein 16 x 22 cm großes natives 5 %iges Polyacrylamidgel in 0,25x TBE aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 100 V in 0,25x TBE für 3 - 4 h. Das Gel wurde anschließend im Wasserstrahlvakuum getrocknet und gegen einen Röntgenfilm exponiert.

## 2.2.4 Handhabung von Bakterien

### 2.2.4.1 Präparation elektrokompetenter Bakterien (Dower, 1988)

300 ml SOB-Medium (2 % Bacto-Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>) wurden mit 1 ml einer Übernachtskultur von E.coli DH5α angeimpft und bei 18 - 20 °C unter Schütteln bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3 - 0,4 inkubiert. Nach Erreichen dieser Zelldichte wurden sie für 3 min bei 37 °C in einem Wasserbad wärmebehandelt und anschließend für 20 min bei 18 - 20 °C inkubiert. Die Bakterienlösung wurde dann auf vorgekühlte 50 ml-Reaktionsgefäße verteilt, mit 3500x g, 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterienpellets in 50 ml eisgekühltem Wasser resuspendiert. Es folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt. Der Waschschritt wurde dreimal wiederholt, wobei mit jeder Resuspendierung die Pellets gepoolt wurden. Zum Abschluß wurde das gesamte Pellet in 800 µl eisgekühltem H<sub>2</sub>O suspendiert, mit 7 % (f. c.) DMSO versetzt, auf 40 µl-Aliquots verteilt und mit Flüssigstickstoff schockgefroren.



#### **2.2.4.2 Transformation elektrokompenter Bakterien**

1 - 2  $\mu\text{l}$  des Ligationsansatzes oder 100 ng eines Vektors wurden zu 40  $\mu\text{l}$  aufgetauter, kompetenter Bakterien pipettiert, vorsichtig gemischt und für 1 min auf Eis inkubiert. Das DNA-Zell-Gemisch wurde in eine Küvette transferiert und diese in einem Küvettenhalter des E.coli-Pulsers (BioRad) plaziert. Unverzöglich wurde der Impuls (18 kV/cm) ausgelöst. Die Küvette wurde aus dem E.coli-Pulser entnommen und sofort mit 1 ml SOC-Medium (SOB-Medium plus 20 mM Glukose) aufgefüllt. Für die phänotypische Expression des Resistenzmarkergens auf dem Plasmid wurden die Bakterien 30 min bei 37 °C geschüttelt und anschließend auf Agarplatten, die mit 100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin versetzt waren, ausgestrichen.

#### **2.2.5 Zellkultur**

##### **2.2.5.1 Stabile Transfektion von 3LL-Zellen**

Die Transfektion der Zellen mit pRSVneo erfolgte mittels eines liposomalen Transfektionsreagenzes (DOTAP, Boehringer Mannheim) gemäß den Anleitungen des Herstellers. Im einzelnen wurden in einem sterilen Reaktionsröhrchen 15  $\mu\text{g}$  DNA in HEPES-Puffer (20 mM, pH 7,4) auf eine Konzentration von 60 ng/ $\mu\text{l}$  verdünnt (Endvolumen 250  $\mu\text{l}$ ). In einem zweiten Reaktionsröhrchen wurden 150  $\mu\text{l}$  DOTAP mit HEPES-Puffer zu einem Endvolumen von 500  $\mu\text{l}$  gemischt. Die DNA-Lösung wurde dann zur DOTAP-Lösung gegeben und vorsichtig miteinander vermischt. Die Transfektionsmischung wurde 15 min bei RT inkubiert und anschließend mit 10 ml DMEM durchmischt. Das Kulturmedium der Zellen (50 % konfluent, in 10 cm-Petrischale) wurde entfernt und jeweils 5 ml Transfektionslösung tropfenweise zum Kulturgefäß gegeben. Die Zellen wurden ca. 4 h mit der Transfektionsmischung kultiviert. Anschließend wurde das Medium durch frisches Kulturmedium (10 % FCS-DMEM) ersetzt. Nach 10 h wurden die Zellen auf jeweils zwei 15 cm-Petrischalen verteilt und mit Selektionsmedium (600  $\mu\text{g/ml}$  G418 in 10 % FCS-DMEM) kultiviert. Alle zwei Tage wurde dem Kulturmedium G418 in einer Endkonzentration von 600  $\mu\text{g/ml}$  zugesetzt. Nach etwa zehn Tagen wurden einzelne Klone isoliert und expandiert.

##### **2.2.5.2 Präparation muriner embryonaler Fibroblasten**

13 - 14 Tage schwangere C57/BL6-Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet. Das Abdomen wurde mit 70 % Ethanol desinfiziert und nachfolgend geöffnet. Der Uterus wurde entfernt und die Embryonen isoliert. Den Embryonen wurden die extra-embryonalen Membranen sowie Darm, Leber, Lungen und Kopf entfernt und in ein neues Gefäß überführt. Die Zellmasse wurde mit einigen ml einer 0,25 % Trypsin-Lösung überschichtet, mit einem Skalpell erst grob und dann durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren weiter zerkleinert. Nach einem Inkubationsschritt bei 37 °C für ca. 30 min, wurde die Zellmasse über ein Zellsieb (Falcon; 40  $\mu\text{m}$  Siebgröße) in ein Reaktionsgefäß mit Kulturmedium passiert. Die vereinzelt Zellen wurden dann in 15 cm-Petrischalen ausgesät und kultiviert.

### **2.2.5.3 *in vivo* Passage von 3LL-Zellen**

In einem Volumen von 100  $\mu$ l wurden ca.  $10^6$  Mykoplasmen-freie Zellen intramuskulär in ein Hinterbein einer adulten C57/BL6-Maus injiziert. Sobald der Tumor einen Durchmesser von ca. 1 cm erreicht hatte, wurde das Tier durch zervikale Dislokation getötet und der Tumor unter aseptischen Bedingungen präpariert. Die Vereinzelnung der Tumorzellen erfolgte entsprechend dem Protokoll für die Präparation der embryonalen Fibroblasten.

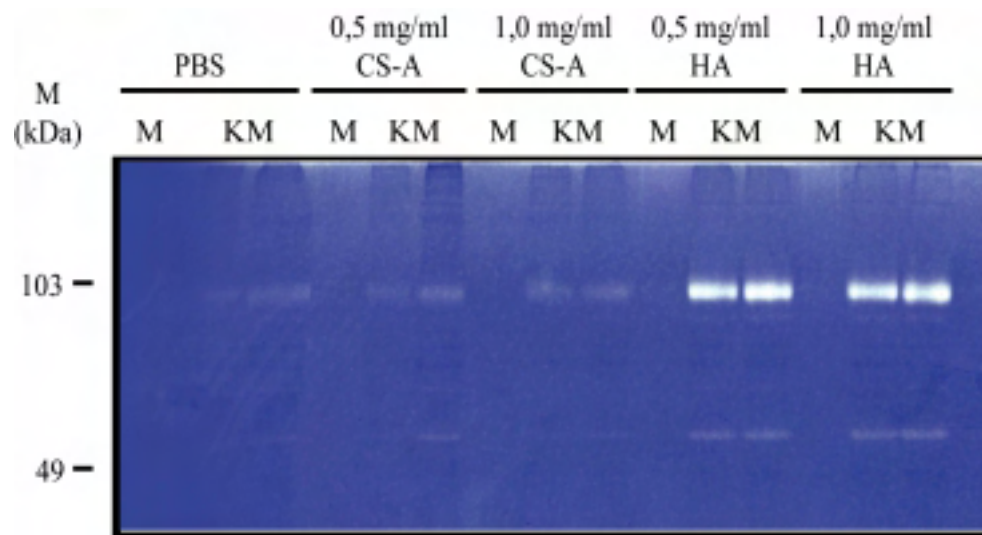
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Hyaluronsäure induziert die Expression von MMP-9 in der murinen metastatischen 3LL Lewis Lungenkarzinomzelllinie

##### 3.1.1 In 3LL-Zellen läßt sich gelatinolytische Aktivität nach Hyaluronsäure-Behandlung nachweisen

Auf der Suche nach möglichen Effektormolekülen von Hyaluronsäure habe ich untersucht, ob Hyaluronsäure die Synthese von MMPs beeinflussen kann.

Dabei habe ich zuerst in einer zymographischen Analyse gefunden, daß Hyaluronsäure (HA) in der metastatischen murinen Lewis Lungenkarzinomzelllinie (3LL) gelatinolytische Aktivität induziert. Die zymographische Analyse ist eine sehr sensitive Methode zum Nachweis gelatinolytischer Aktivität. Das entscheidende Experiment ist in Abbildung 4 dokumentiert.



**Abb. 4: In 3LL-Zellen wird gelatinolytische Aktivität durch Hyaluronsäure, nicht aber durch Chondroitin-Sulfat induziert**

3LL-Zellen wurden unter serumfreien Bedingungen für 48 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen Hyaluronsäure (HA) bzw. Chondroitin-Sulfat A (CS-A) inkubiert. Die Zellkulturüberstände (KM) wurden gesammelt, konzentriert und unter nicht-reduzierenden Bedingungen in einem Gelatine-SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Gelatinolytische Aktivität ist nach Coomassie-Färbung und anschließender Entfärbung des Gels als ungefärbter Lysishof zu erkennen. Als Kontrolle wurde konditioniertes Medium un behandelter Zellen bzw. Medium alleine verwendet (M, Medium alleine; KM, konditioniertes Medium).

Im Gewebekulturüberstand Hyaluronsäure-behandelter 3LL-Zellen zeigten sich zwei Banden gelatinolytischer Aktivität (Abb. 4). Die Wanderungsstrecken entsprechen Molekulargewichten von ca. 100 und 55 kDa. Die überwiegende Enzymaktivität zeigt sich in der Bande von ca. 100 kDa, während bei 55 kDa nur schwache Aktivität detektierbar ist. Aufgrund der Molekulargewichte läßt die Bande bei 100 kDa auf die Proform von MMP-9 und die Bande bei 55 kDa auf MMP-7 schließen.

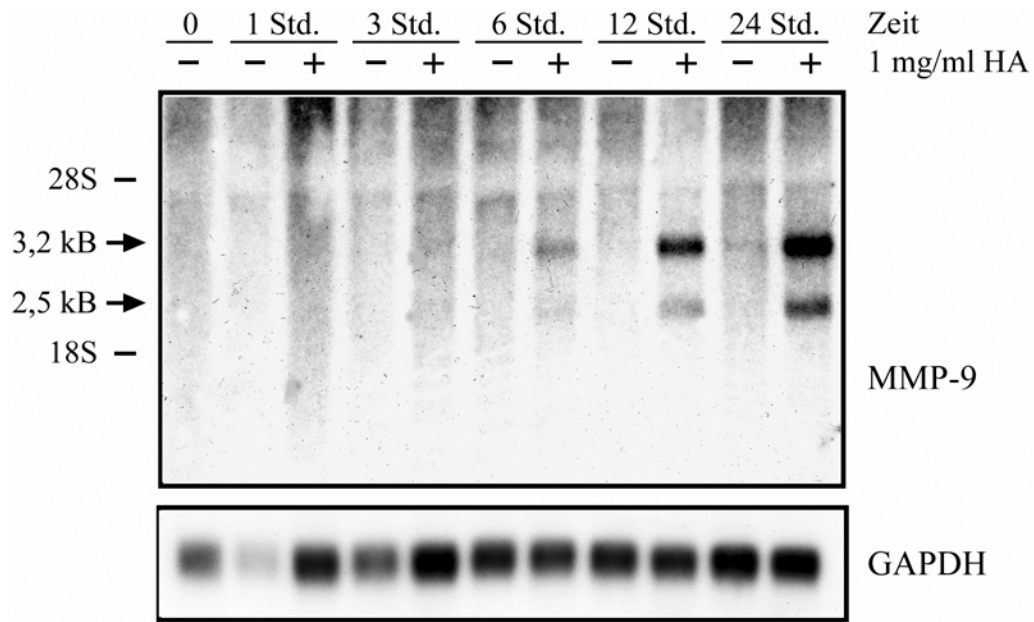
Anzumerken ist, daß keine gelatinolytische Aktivität im Bereich der Molekulargewichte zwischen 82 und 72 kDa zu erkennen ist, wie es bei der Sezernierung von MMP-2 zu erwarten gewesen wäre.

Die verwendete Hyaluronsäure-Präparation stammt aus Hahnenkämmen und ihr Molekulargewicht reicht von 80 bis >600 kDa. Hyaluronsäure ist gewöhnlich mit Chondroitin-Sulfat kontaminiert. Chondroitin-Sulfat A induziert jedoch keine gelatinolytische Aktivität (Abb. 4), weshalb ausgeschlossen werden kann, daß die gelatinolytische Aktivität auf die Verunreinigung von Chondroitin-Sulfat in der Hyaluronsäure-Präparation zurückzuführen ist. Die Enzymaktivität wird somit spezifisch durch Hyaluronsäure induziert.

Um auszuschließen, daß die Induktion der gelatinolytischen Aktivität durch Endotoxine, die möglicherweise in der Hyaluronsäure-Präparation enthalten sind, hervorgerufen wird, wurde der Endotoxin-Gehalt der Hyaluronsäure-Präparation bestimmt. Die Untersuchung ergab einen Endotoxin-Gehalt von 0,139 EU/ml (entsprechend 13,9 pg EC6 USP-Standard von *E. coli*/ml) in einer 1 mg/ml Hyaluronsäurelösung. Diese Endotoxin-Konzentration hat keinen Einfluß auf die Expression von MMP-9 in 3LL-Zellen (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurde die gelöste Hyaluronsäure vor dem experimentellen Einsatz autoklaviert, um darin enthaltene Proteine und Peptide zu denaturieren und inaktivieren.

### **Hyaluronsäure induziert die Expression von MMP-9-mRNA**

Die hauptsächliche gelatinolytische Aktivität manifestiert sich bei einem Molekulargewicht von 100 kDa. Um festzustellen, ob diese Aktivität auf Neusynthese (Transkription) beruht, und sicherzustellen, daß es sich tatsächlich um MMP-9 handelt, wurde die RNA Hyaluronsäure-behandelter Zellen per Northern-Blot analysiert.



**Abb. 5: Hyaluronsäure induziert in 3LL-Zellen die Expression von MMP-9-mRNA.**

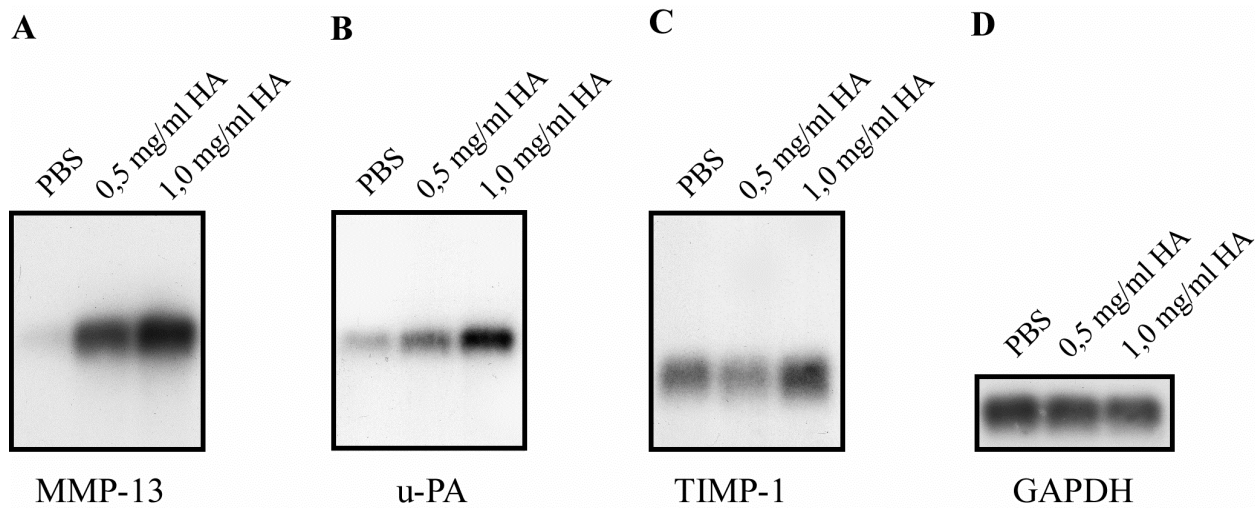
3LL-Zellen wurden mit 1 mg/ml Hyaluronsäure (HA) behandelt bzw. blieben unbehandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und poly(A)<sup>+</sup>-RNA isoliert. Jeweils 4 µg poly(A)<sup>+</sup>-RNA sind für eine Northern-Analyse eingesetzt worden. Die Menge spezifischer mRNA für MMP-9 wurde durch Hybridisierung des Filters mit einer <sup>32</sup>P-markierten MMP-9-spezifischen Sonde bestimmt. Zur Überprüfung der geladenen RNA-Mengen wurde die Membran mit einer spezifischen cDNA-Probe gegen GAPDH rehybridisiert.

Während in unbehandelten 3LL-Zellen keine MMP-9-mRNA detektierbar war, ließ sich nach Hyaluronsäure-Behandlung MMP-9-spezifische mRNA nachweisen (Abb. 5). MMP-9-mRNAs haben eine Größe von 2,5 und 3,2 kB; die unterschiedlichen MMP-9-Transkripte sind auf dem differentiellen Gebrauch von Polyadenylierungssignalen zurückzuführen (Masure *et al.*, 1993). Der früheste Zeitpunkt, an dem MMP-9-mRNA in der Northern-Blot-Analyse nachgewiesen werden konnte, war nach sechs Stunden. Bis zum Zeitpunkt von 12 Stunden nahm die Signalstärke MMP-9-spezifischer mRNA zu und hielt bis 24 Stunden nach Stimulation an. Die Northern-Blot-Analyse zeigt somit, daß Hyaluronsäure tatsächlich zu einer gesteigerten Expression von MMP-9 in 3LL-Zellen führt, möglicherweise durch Stimulation der Transkription (siehe Abb. 10).

### 3.1.2 Induziert Hyaluronsäure in 3LL-Zellen auch die Expression anderer proteolytischer Enzyme ?

Die Expression verschiedener Matrixmetalloproteinasen ist assoziiert mit der Aggressivität des Tumors *in vivo* und in *in vitro* (Mignatti *et al.*, 1986; Stetler-Stevenson, 1990; Matrisian *et al.*, 1991). Auch für die Serinproteinase Urokinase-Typ Plasminogenaktivator (u-PA) besteht eine Korrelation zwischen Expression und der Invasivität eines Tumors (Testa und Quigley, 1990, Ossowski *et al.*, 1991). Aus diesem Grund wurde analysiert, ob Hyaluronsäure neben MMP-9 die Expression weiterer Matrixmetalloproteinasen oder von u-PA reguliert.

Da in der zymographischen Analyse nur Proteinasen mit gelatinolytischer Aktivität nachgewiesen werden konnten (Abb. 4), wurde in einer Northern-Blot-Analyse untersucht, ob Hyaluronsäure in 3LL-Zellen die Expression von MMP-2, MMP-3, MMP-10, MMP-13 oder u-PA reguliert.



**Abb. 6: Expression von MMP-13, u-PA und TIMP-1 in 3LL-Zellen nach Hyaluronsäure-Behandlung**

3LL-Zellen wurden unter serumfreien Bedingungen mit verschiedenen Konzentrationen Hyaluronsäure (HA) inkubiert bzw. blieben unbehandelt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und poly(A)<sup>+</sup>-RNA präpariert. Für die Northern-Analyse wurden je 4 µg poly(A)<sup>+</sup>-RNA eingesetzt. Die Filter wurden jeweils mit einer spezifischen cDNA-Sonde gegen MMP-13 (A), u-PA (B), TIMP-1 (C), und zur Kontrolle für gleiche RNA-Mengen mit einer GAPDH-spezifischen Sonde hybridisiert (D).

Die Northern-Blot-Analyse ergab, daß Hyaluronsäure die Expression einer weiteren Matrixmetalloproteinase, MMP-13, induziert (Abb. 6 A). MMP-3, MMP-10 und MMP-2 werden nicht von 3LL-Zellen exprimiert, und ihre Expression konnte auch nicht durch Hyaluronsäure induziert werden (Daten nicht gezeigt).

U-PA wird bereits von unstimulierten 3LL-Zellen exprimiert, und die Stimulation mit Hyaluronsäure führte zu einer Erhöhung der mRNA-Menge (Abb. 6 B).

### **3.1.3 Hyaluronsäure hat keinen Einfluß auf die Expression von TIMP-1**

TIMP-1 ist ein wichtiger Inhibitor der Aktivität von MMP-9 (Baragi *et al.*, 1994). TIMPs werden von den meisten Geweben synthetisiert und sezerniert. Ebenso wie MMPs wird die Expression von TIMPs durch verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren reguliert. Das quantitative Verhältnis zwischen aktivierten MMPs und TIMPs bestimmt die Netto-Aktivität der MMPs und ist somit eine wesentliche Determinante für den Abbau der extrazellulären Matrix (Liotta *et al.*, 1991; Liotta und Stetler-Stevenson, 1991).

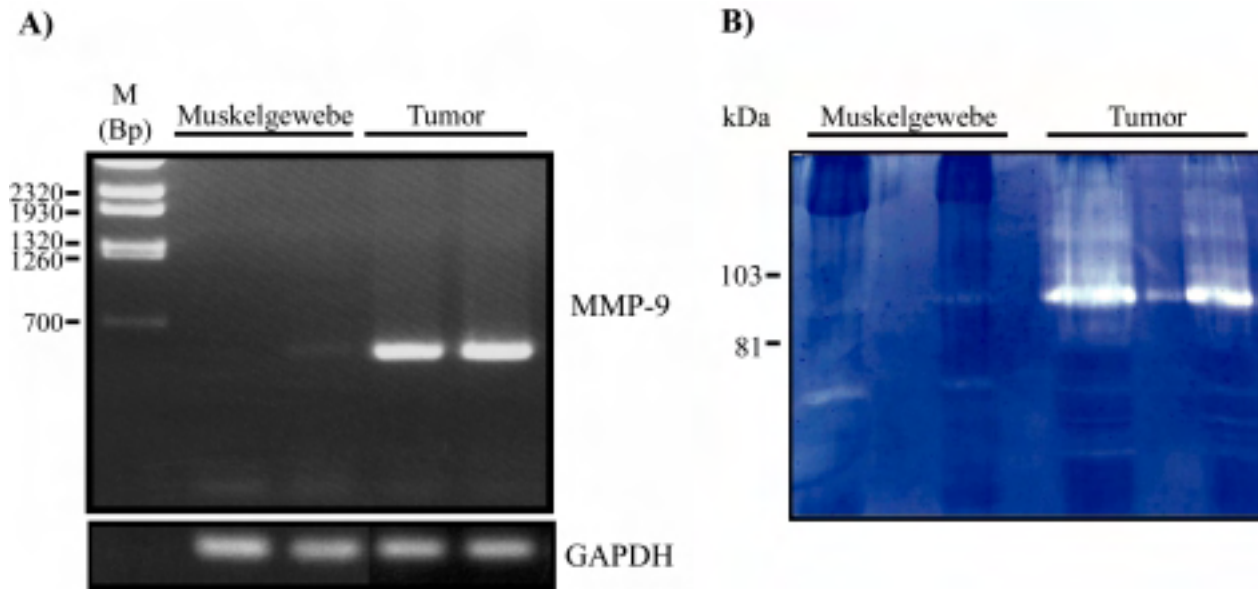
Um die Frage zu klären, ob Hyaluronsäure einen Einfluß auf die Expression von TIMP-1 und somit auf die Aktivität von MMP-9 hat, wurde in einer RNA-Analyse untersucht, ob Hyaluronsäure die Expression von TIMP-1 reguliert. Es zeigte sich jedoch, daß 3LL-Zellen TIMP-1 konstitutiv exprimieren (Abb. 6 C), und Hyaluronsäure-Stimulation führte nicht zu einer veränderten mRNA-Menge von TIMP-1.

Somit induziert Hyaluronsäure in 3LL-Zellen die Expression von MMP-9, MMP-13 und u-PA; die Expression von TIMP-1, eines endogenen Inhibitors der MMPs, wird jedoch nicht beeinflusst.

### **3.1.4 In 3LL-Tumoren ist MMP-9-Aktivität nachweisbar**

Die verwendete 3LL-Zelllinie ist tumorigen und besitzt einen stark-metastatischen Phänotyp, wie in einer experimentellen Metastasierungsstudie bestätigt werden konnte (Ergebnisse nicht gezeigt).

Um eine Aussage zu erhalten, ob die Zellkultur-Bedingungen auch die Verhältnisse im Tumor repräsentieren, wurde in einer RT-PCR-Analyse untersucht, ob Tumore, die sich nach intramuskulärer Inokulation von 3LL-Zellen in syngenen C57/BL6-Mäusen bildeten, Expression von MMP-9 zeigten.



**Abb. 7: 3LL-Tumormaterial zeigt gelatinolytische Aktivität**

(A) Aus jeweils zwei verschiedenen Muskelgeweben und 3LL-Tumoren wurde Gesamt-RNA präpariert und in einer RT-PCR-Analyse auf Anwesenheit MMP-9-spezifischer mRNA untersucht. Für die Erststrang-cDNA-Synthese sind jeweils 2 µg Gesamt-RNA eingesetzt worden. Die anschließende Amplifikationsreaktion zur Detektion MMP-9-spezifischer Transkripte wurde mit 35 Zyklen (30 sec 94 °C, 30 sec 57 °C, 20 sec 72 °C) durchgeführt. Die verwendeten Primer (muMMP-9-779se, muMMP-9-1342as) sind spezifisch für Exon 5 und 9 des murinen MMP-9-Gens. Zur Kontrolle, gleiche Mengen Gesamt-RNA in der Erststrang-cDNA-Synthese eingesetzt zu haben, diente die Amplifikationsreaktion (21 Zyklen; 30 sec 94 °C, 30 sec 58 °C, 20 sec 72 °C) mit GAPDH-spezifischen Primern. In der linken Spur wurde als Größenstandard  $\lambda$ -DNA, mit BstEII verdaut, aufgetragen.

(B) In einer zymographischen Analyse wurden jeweils gleiche Proteinmengen von jeweils zwei verschiedenen Muskelgeweben bzw. 3LL-Tumoren auf gelatinolytische Aktivität getestet.

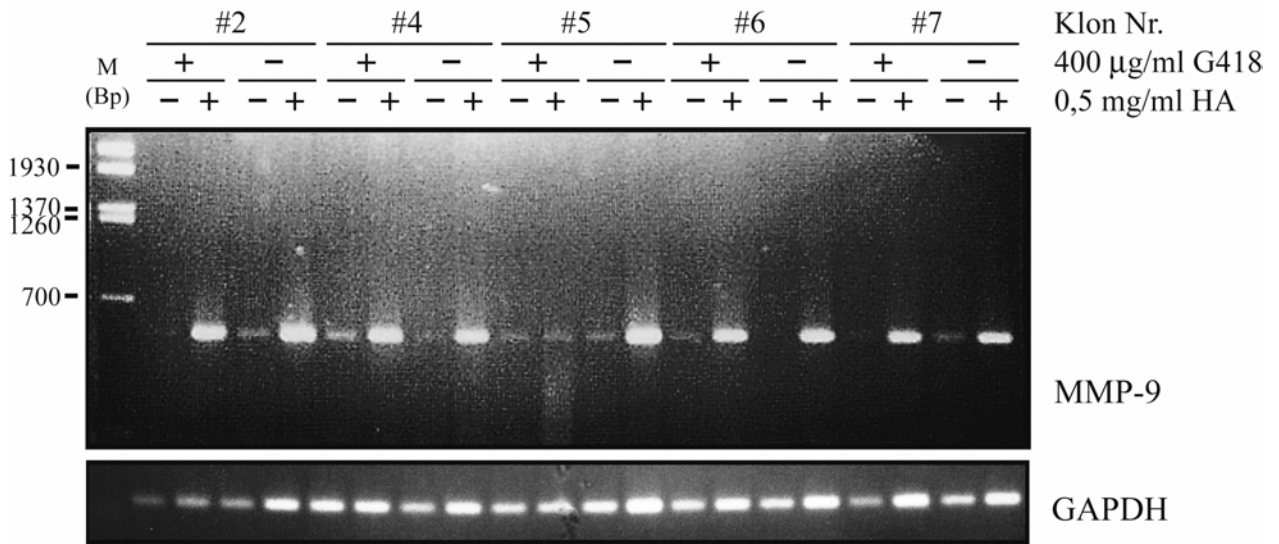
In den Tumorproben waren MMP-9-Transkripte feststellbar, hingegen ließ sich in normalem Muskelgewebe keine Expression von MMP-9 nachweisen (Abb. 7 A).

Zusätzlich wurde getestet, in welcher Form MMP-9-Protein in den Tumorgeweben vorliegt. In einer zymographischen Analyse wurden Proteinextrakte aus Tumormaterial und zur Kontrolle aus normalem Muskelgewebe untersucht. In Übereinstimmung mit der RT-PCR-Analyse war in normalem Muskelgewebe keine Enzymaktivität detektierbar (Abb. 7 B). Die Tumorproben hingegen zeigten starke gelatinolytische Aktivität bei ca. 92 kDa. Auffällig ist, daß im Unterschied zu *in vitro* kultivierten 3LL-Zellen in den Tumorproben überwiegend die aktive 92 kDa-Form von MMP-9 vorkommt.



**Nach *in vivo* Passage sind 3LL-Tumorzellen in der Lage, auf Hyaluronsäure mit der Synthese von MMP-9 zu reagieren**

Es war zu beobachten, daß sich nach längerer *in vitro* Kultivierung die Hyaluronsäure-gesteuerte Expression von MMP-9 in 3LL-Zellen verlor. Durch *in vivo* Passage der Zellen in syngeneten Mäusen konnte diese Eigenschaft rekonstituiert werden (Daten nicht gezeigt). Da die Tumormasse nicht ausschließlich aus 3LL-Tumorzellen besteht, sondern auch aus Stromazellen, wie z. B. Fibroblasten oder Endothelzellen, lag die Vermutung nahe, daß nicht die 3LL-Tumorzellen, sondern Nicht-Tumorzellen, an der Synthese von MMP-9 beteiligt sein könnten. In 3LL-Zellen wurden daher ein Resistenzmarker, hier die Neomycin-Aminoglukotransferase, stabil exprimiert. Nach einer *in vivo* Passage sollten anschließend *in vitro* unter Selektionsbedingungen nur die transfizierten 3LL-Zellen überleben, während die nicht-transfizierten Stromazellen zugrunde gingen.



**Abb. 8: Die Selektion der Tumorzellen mit G418 führt nicht zum Verlust der Hyaluronsäure-abhängigen Expression von MMP-9**

Zellen aus 3LL-Tumoren verschiedener Klone, die stabil die Aminoglukotransferase exprimieren, wurden nach einer Passage *in vivo* aufgeteilt. Ein Teil jedes Klones wurde mit bzw. ohne 400 µg/ml G418 im Medium für zwei Wochen behandelt. Anschließend wurden jeweils 10<sup>6</sup> Zellen in eine 3 cm Petrischale ausgesät, für 12 Stunden ohne Serum gehungert und anschließend mit 0,5 mg/ml Hyaluronsäure (HA) induziert. Nach 12 Stunden wurden die Zellen geerntet und Gesamt-RNA präpariert. Jeweils 2 µg Gesamt-RNA wurden revers transkribiert und in einer RT-PCR-Analyse auf Anwesenheit von MMP-9-mRNA untersucht. Die Amplifikationsreaktion zur Detektion MMP-9-spezifischer Transkriptionsprodukte wurde mit 35 Zyklen (30 sec 94 °C, 30 sec 57 °C, 20 sec 72 °C) durchgeführt. Die verwendete Primerkombination (muMMP-9-779se/1342as) ist spezifisch für Exon 5 bzw. 9 des murinen MMP-9-Gens. Zur Kontrolle, gleiche Mengen Gesamt-RNA für die Erststrang-cDNA-Synthese eingesetzt zu haben, diente die Amplifikationsreaktion mit GAPDH-spezifischen Primern (21 Zyklen; 30 sec 94 °C, 30 sec 58 °C, 20 sec 72 °C). In der linken Spur wurde als Größenstandard λ-DNA, mit BstEII verdaut, aufgetragen.

Hierzu wurden jeweils  $5 \times 10^5$  Zellen der verschiedenen Expressionsklone in einem Volumen von 50  $\mu$ l intramuskulär in C57BL6/J-Mäuse injiziert. Nachdem der entstandene Tumor einen Durchmesser von ca. 1 cm erreicht hatte, wurden die Tumorzellen reisoliert und *in vitro* kultiviert. Die Zellen eines jeden Klons wurden aufgeteilt und für zwei Wochen in Anwesenheit bzw. als Kontrolle in Abwesenheit des Neomyzinderivates G418 kultiviert. Anschließend wurde mittels einer RT-PCR-Analyse untersucht, ob die Zellen noch die Hyaluronsäure-induzierte Expression von MMP-9-mRNA zeigten.

In allen Zellklonen war eine geringe basale Expression von MMP-9-mRNA detektierbar, jedoch führte die Stimulation mit Hyaluronsäure zu einer deutlich erhöhten MMP-9-mRNA-Menge, und zwar unabhängig davon, ob die Zellen in Gegenwart oder Abwesenheit des Neomyzinderivates kultiviert worden waren (Abb. 8). In sämtlichen Zellklonen führte die Selektion mit G418 nicht zum Verlust der Hyaluronsäure-abhängigen Expression von MMP-9. In den Zellen, die in Abwesenheit von G418 wuchsen, konnte nach Hyaluronsäure-Stimulation im Vergleich zu G418-behandelten Zellen keine signifikant stärkere Akkumulation von MMP-9-Transkripten festgestellt werden, was zu erwarten gewesen wäre, wenn auch zusätzlich Stromazellen für die Expression der MMP-9 (mit-)verantwortlich gewesen wären.

Dieses Ergebnis legt den Schluß nahe, daß Hyaluronsäure tatsächlich in den 3LL-Zellen die Expression von MMP-9 induziert.

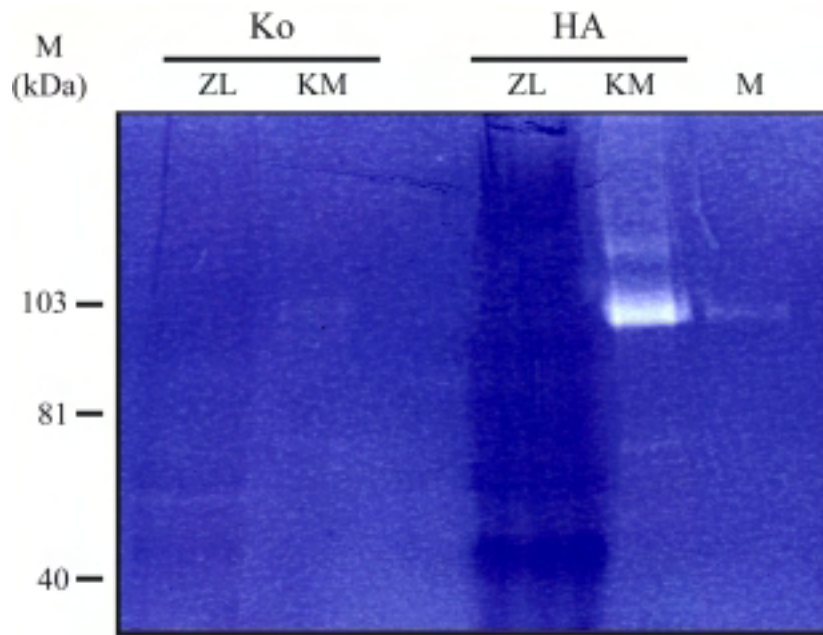
Die Hyaluronsäure-vermittelte Expression von MMP-9 ist nicht nur eine Eigenart von 3LL-Zellen. Murine embryonale Fibroblasten sind ein weiterer Zelltyp, der diese Eigenschaft auch besitzt (Abb. 19).

### **3.1.5 In 3LL-Zellen ist MMP-9 nicht mit der Zelloberfläche assoziiert**

Im Unterschied zum 3LL-Tumorgewebe ist im Überstand von *in vitro* kultivierten 3LL-Zellen nach Induktion durch Hyaluronsäure nur die proteolytisch-inaktive, nicht aber die aktive Form von MMP-9 nachweisbar.

Die Zelloberflächen-assozierte Lokalisation proteolytischer Enzyme erleichtert die Proteolyse der extrazellulären Matrix in den Regionen mit Zell-Matrix-Kontakten. Beispielsweise findet man MMP-2 über einen MT-1-MMP\*TIMP-2\*Pro-MMP-2-Komplex oder durch Interaktionen mit Integrinen an der Zellmembran lokalisiert (Strongin *et al.*, 1995; Brooks *et al.*, 1996). Trotz der strukturellen Homologien von MMP-2 und MMP-9 sind für MMP-9 nur wenige Beispiele von Zellmembran-assoziierter Lokalisation bekannt. So kann sowohl die latente als auch die aktive Form von MMP-9 über einen Komplex mit TIMP-1 an der Zelloberfläche lokalisiert sein (Toth *et al.*, 1997). In zwei weiteren Veröffentlichungen (Yu und Stamenkovic, 1998;

Bourguignon *et al.*, 1998) wurde beschrieben, daß die proteolytisch aktive Form von MMP-9 mit der Zelloberfläche durch einen CD44-vermittelten Mechanismus assoziiert sein kann. Zur Untersuchung der Frage, ob in 3LL-Zellen die aktive Form von MMP-9 an der Zelloberfläche lokalisiert ist, wurde in einem Zymogramm Zell-Lysat und konditioniertes Medium Hyaluronsäure-stimulierter Zellen auf gelatinolytische Aktivität untersucht.



**Abb. 9: In 3LL-Zellen ist die gelatinolytische Aktivität nicht Zell-assoziiert**

3LL-Zellen wurden in serumfreien Medium für 24 Stunden mit 0,5 mg/ml HA bzw. ohne Zusatz behandelt. Anschließend wurde das konditionierte Medium gesammelt, konzentriert und in nicht-reduzierenden Probenpuffer suspendiert. Die Zellen wurden in nicht-reduzierenden Probenpuffer lysiert. Konzentriertes Medium (KM) und Zell-Lysat (ZL) wurden einer zymographischen Analyse zum Nachweis gelatinolytischer Aktivität unterzogen. Kulturmedium + 0,5 mg/ml HA (M) diente als Negativkontrolle.

Gelatinolytische Aktivität mit einem Molekulargewicht von ca. 102 kDa ließ sich nur im Kulturüberstand Hyaluronsäure-stimulierter Zellen, nicht aber im Gesamtzell-Lysat behandelter oder unbehandelter Zellen nachweisen (Abb. 9). Somit kann davon ausgegangen werden, daß in 3LL-Zellen gelatinolytische Aktivität nicht mit der Zelloberfläche assoziiert ist.

## **3.2 Analyse des Signaltransduktionsweges, über den Hyaluronsäure die Aktivierung des MMP-9-Gens vermittelt**

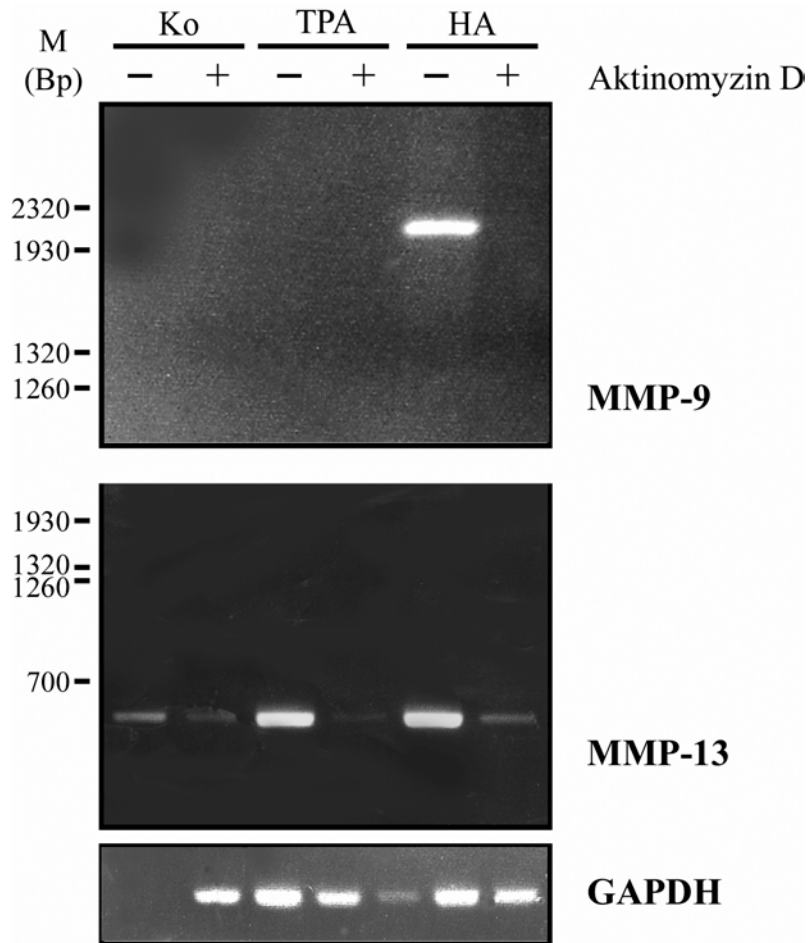
### **3.2.1 Hyaluronsäure vermittelt die transkriptionelle Aktivierung des MMP-9-Gens und nicht die Stabilisierung der MMP-9-mRNA**

Eine Beobachtung der Northern-Blot-Analyse (Abb. 5) war, daß die Hyaluronsäure-induzierte Zunahme der MMP-9-mRNA-Menge erst nach sechs Stunden detektierbar war, dann aber bis zu 24 Stunden anhielt. Die Hyaluronsäure-abhängige Expression von MMP-9 verläuft also nicht transient. In murinen embryonalen Fibroblasten nimmt die Expression von MMP-9 durch Hyaluronsäure den gleichen zeitlichen Verlauf (Daten nicht gezeigt). Diese Fibroblasten zeigen eine zuverlässige und ausgeprägte Hyaluronsäure-induzierte MMP-9-Expression. Unter der Annahme, daß die Expression von MMP-9 durch Hyaluronsäure-Behandlung in beiden Zelltypen durch die gleichen Mechanismen reguliert wird, wurden teilweise die weiteren Untersuchungen mit Fibroblasten durchgeführt.

Um eine Aussage darüber zu erhalten, ob die MMP-9-Induktion durch Hyaluronsäure auf transkriptionelle Aktivierung oder aber auf einer Stabilisierung der mRNA beruht, wurden embryonale Fibroblasten mit dem RNA-Polymerase-Inhibitor Aktinomyzin D behandelt und die Expression von MMP-9 durch Hyaluronsäure nach Inhibition der Transkription untersucht.

Die TPA (12-O-Tetradekanoyl-Phorbol-13-Azetat)-vermittelte Aktivierung des MMP-13-Gens ist transkriptionsabhängig (Angel *et al.*, 1987a) und diente zur Kontrolle der Versuchsbedingungen.

Der Einfluß von Aktinomyzin D auf die Hyaluronsäure-induzierte Expression von MMP-9 wurde anhand einer RT-PCR-Analyse untersucht. Wie in Abbildung 10 dargestellt, sind nach Inhibition der Transkription durch Aktinomyzin D keine MMP-9-spezifischen Transkripte in Hyaluronsäure-behandelten Zellen nachweisbar. Auch die TPA-induzierte MMP-13-Expression ist durch Aktinomyzin D inhibiert.



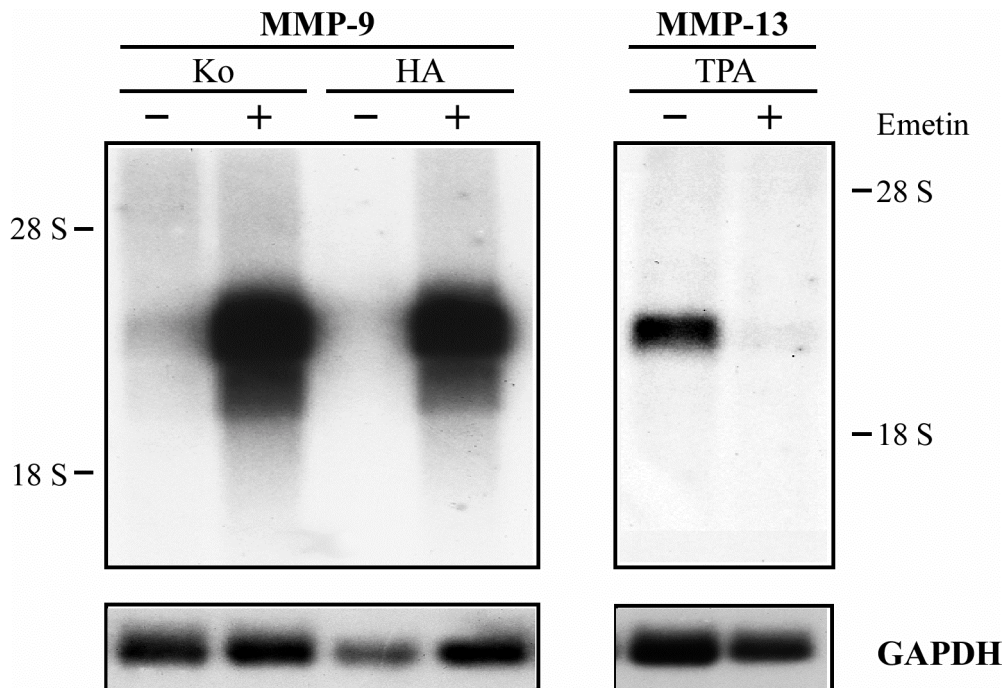
**Abb. 10: Die Hyaluronsäure-induzierte Expression von MMP-9 ist transkriptions-abhängig**

Fibroblasten wurden für 30 min mit Aktinomyzin D (2 µg/ml) inkubiert und anschließend mit 0,5 mg/ml Hyaluronsäure oder 80 ng/ml TPA induziert bzw. nicht behandelt (Ko). Nach neun Stunden wurden die Zellen geerntet und Gesamt-RNA isoliert. In einer nachfolgenden RT-PCR-Analyse wurde das Vorhandensein MMP-9- bzw. MMP-13-spezifischer mRNA bestimmt. Jeweils 1 µg Gesamt-RNA wurden revers transkribiert und 1/10 der Reaktion für die Amplifikationsreaktionen eingesetzt. Zur Amplifikation MMP-9-spezifischer mRNA (35 Zyklen; 30 sec 94 °C, 30 sec 60 °C, 20 sec 72 °C) wurden Primer (muMMP-9-314se/1342as) verwendet, die spezifisch für Exon 2 bzw. 9 des MMP-9-Gens sind. Die Amplifikation MMP-13-spezifischer mRNA wurde mit Primern durchgeführt, die spezifisch den Bereich von Pos. 296 bis Pos. 901 der cDNA-Sequenz für murines MMP-13 flankieren (33 Zyklen; 30 sec 94 °C, 30 sec 61 °C, 30 sec 72 °C). Als Kontrolle diente die Amplifikationsreaktion mit GAPDH-spezifischen Primern (21 Zyklen; 30 sec 94 °C, 30 sec 58 °C, 20 sec 72 °C).

Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß die Akkumulation MMP-9-spezifischer mRNA nach Hyaluronsäure-Behandlung hauptsächlich auf eine transkriptionelle Aktivierung des MMP-9-Gens zurückzuführen ist.

### 3.2.2 Ist für die Hyaluronsäure-induzierte MMP-9-Expression *de novo* Proteinbiosynthese notwendig ?

Zur Beantwortung der Frage, ob für die Hyaluronsäure-abhängige Expression von MMP-9 die Neusynthese von Transkriptionsfaktoren oder post-translationale Modifikationen von Transkriptionsfaktoren, die bereits in nicht-stimulierten Zellen vorliegen, notwendig ist, wurde geprüft, ob diese Aktivierung von *de novo* Proteinbiosynthese abhängig ist. Dafür wurde in 3LL-Zellen in Gegenwart des Translationsinhibitors Emetin die Expression von MMP-9-mRNA nach Hyaluronsäure-Behandlung untersucht. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit TPA behandelt, da die TPA-vermittelte Expression von MMP-13 Protein-Neusynthese erfordert (Angel *et al.*, 1987a, b).



**Abb. 11: Die Blockierung der Translation führt zu einer starken Akkumulation von MMP-9-Transkripten**

3LL-Zellen wurden mit 50  $\mu\text{M}$  Emetin für 45 min vorbehandelt bzw. blieben unbehandelt, und anschließend mit 0,5 mg/ml HA, 80 ng/ml TPA bzw. nicht (Ko) induziert. Nach 10 Stunden wurden die Zellen geerntet und poly(A)<sup>+</sup>-RNA isoliert. Jeweils 4  $\mu\text{g}$  poly(A)<sup>+</sup>-RNA wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Filter wurden dann mit einer radioaktiv-markierten cDNA-Sonde spezifisch für MMP-9 bzw. MMP-13 hybridisiert. Zur Überprüfung der geladenen RNA-Mengen wurden die Filter mit einer spezifischen cDNA-Sonde gegen GAPDH rehybridisiert.

Die Northern-Blot-Analyse zeigte (Abb. 11), daß Emetin wie erwartet die TPA-induzierte Transkription von MMP-13 blockiert. Interessanterweise führte die Inhibition der Proteinsynthese durch Emetin zu einer dramatischen Akkumulation MMP-9-spezifischer mRNA (Abb. 11). Auf dem Autoradiogramm ist das Emetin-induzierte Signal bereits nach so kurzer Expositionszeit zu erkennen, daß das Hyaluronsäure-abhängige Signal noch nicht zu sehen ist; die Induktion durch Emetin ist folglich um ein Vielfaches stärker als durch Hyaluronsäure.

Im Fall der von *de novo* Proteinbiosynthese unabhängigen Induktion von MMP-9 durch Hyaluronsäure würde man einen additiven Effekt in Hyaluronsäure-stimulierten, Emetin-behandelten Zellen im Unterschied zu unstimulierten Zellen erwarten. Im anderen Fall bliebe die Menge MMP-9-spezifischer mRNA gleich. Aufgrund der außergewöhnlich starken Akkumulation von MMP-9-mRNA nach Emetin-Behandlung sind Hyaluronsäure-abhängige Effekte jedoch nicht auszumachen.

Ein Experiment, das unter gleichen Versuchsbedingungen mit einem anderen Proteinsynthese-Inhibitor, nämlich Zykloheximid, durchgeführt worden ist, ergab das gleiche Resultat (Daten nicht gezeigt).

Aus dem vorangegangenen Ergebnis kann nicht eindeutig geschlossen werden, ob *de novo* Proteinbiosynthese für die Hyaluronsäure-abhängige Aktivierung des MMP-9-Gens notwendig ist, d. h. ob die Induktion auf Modifikation bereits vorhandener Transkriptionsfaktoren oder deren Neusynthese beruht.

### **3.2.3 Induziert Hyaluronsäure die MMP-9-Expression durch Aktivierung von AP-1 ?**

Der Promotor des murinen MMP-9-Gens enthält verschiedene Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen, darunter auch vier Konsensussequenzen für AP-1-Komplexe (Masure *et al.*, 1993). Die Ras-, TPA- oder TNF- $\alpha$ -induzierte Aktivierung des MMP-9-Promotors wird über verschiedene Signaltransduktionswege vermittelt, in jedem Fall ist jedoch die Beteiligung von AP-1 notwendig (Sato und Seiki, 1993). AP-1 ist ein Sammelbegriff für Homodimere aus Proteinen der *jun* (*c-jun*, *junB*, *junD*) und ATF/CREB (ATF-2, ATF- $\alpha$ ) Genfamilie bzw. für Heterodimere aus Proteinen der *jun*-Genfamilie assoziiert mit Proteinen der ATF/CREB- oder *fos* (*c-fos*, *fosB*, *fra-1*, *fra-2*) Genfamilie (Bohmann *et al.*, 1987; Angel *et al.*, 1988; Bos *et al.*, 1988; Rauscher *et al.*, 1988a, b; Hirai *et al.*, 1989; Ryder *et al.*, 1989; Zerial *et al.*, 1989; Cohen *et al.*, 1989; Benbrook und Jones, 1990; Hai und Curran, 1991).

Die Zusammensetzung der verschiedenen AP-1 Komplexe bestimmt ihre Stabilität und ihre Affinität für verschiedene Bindestellen (Ryseck und Bravo, 1991). So sind zwei der AP-1-Konsensussequenzen im murinen MMP-9-Promotor sogenannte TRE-Sequenzmotive („TPA responsive element“), an die präferentiell cJun/cFos-Heterodimere binden, während es sich bei den beiden anderen Konsensussequenzen um CRE-Motive („cAMP responsive element“) handelt, die hauptsächlich von Heterodimeren der Jun- und ATF/CREB-Proteinfamilie erkannt werden.

AP-1-Aktivität kann auf verschiedenen Ebenen kontrolliert werden, durch transkriptionelle Aktivierung der *jun*- und *fos*- Gene oder durch post-translationale Modifikationen, die sowohl die DNA-Bindungsaffinität als auch das Transaktivierungspotential beeinflussen können.

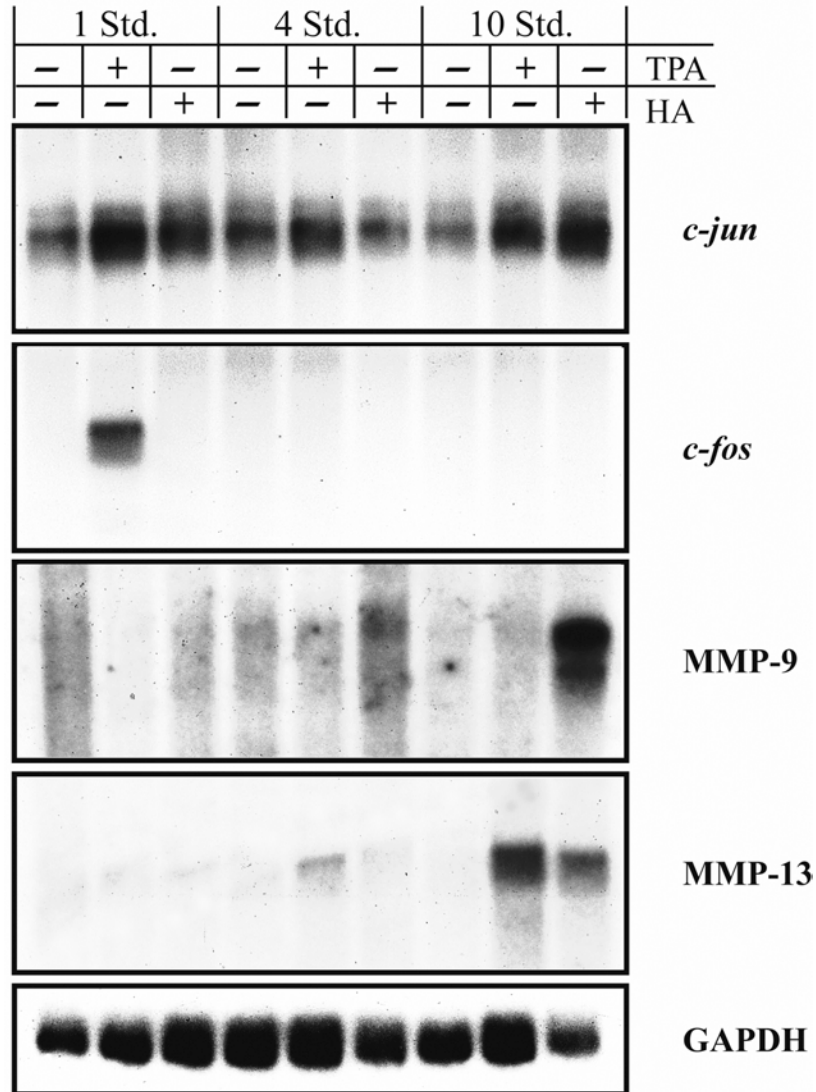
Die Aktivierung der *jun*- und *fos*- Gene als Antwort auf externe Stimuli erfolgt sehr schnell und ist von Protein-Neusynthese unabhängig (Angel *et al.*, 1988a; Ryseck *et al.*, 1988; Lamph *et al.*, 1988).

Um eine Aussage darüber machen zu können, ob Hyaluronsäure die Expression von MMP-9 über einen Mechanismus vermittelt, an dem AP-1 beteiligt ist, wurde zuerst in einer RNA-Analyse untersucht, ob Hyaluronsäure die Expression von *c-fos* und *c-jun* induzieren kann.

Wie aus Abbildung 12 hervorgeht, induziert Hyaluronsäure nicht die Expression von *c-fos*. Während des gesamten Versuchsverlauf ist keine *c-fos*-spezifische mRNA nach Hyaluronsäure-Behandlung detektierbar. Um nachzuweisen, daß in diesen Zellen *c-fos* überhaupt induzierbar ist, wurden sie als Positivkontrolle mit TPA behandelt; dies führte erwartungsgemäß zu einer raschen Induktion der *c-fos*-mRNA-Expression. *C-jun*-spezifische mRNA ist über den gesamten Versuchszeitraum sowohl in stimulierten als auch in unbehandelten 3LL-Zellen nachzuweisen. TPA-Behandlung führte nach einer Stunde zu einer verstärkten Akkumulation von *c-jun*-mRNA (Abb. 12). In Hyaluronsäure-behandelten Zellen ist nach 10 Stunden im Unterschied zu nicht-stimulierten Zellen ein verstärktes Signal an *c-jun*-spezifischer mRNA zu erkennen. Es ist unwahrscheinlich, daß diese transkriptionelle Aktivierung von *c-jun* für die Transkription von MMP-9 entscheidend ist, denn zu diesem Zeitpunkt ist bereits MMP-9-mRNA-Synthese festzustellen.

Zur Kontrolle der Versuchsbedingungen wurden die RNA-Filter mit MMP-9- bzw. MMP-13-spezifischen Proben hybridisiert. Hervorzuheben ist, daß TPA in 3LL-Zellen keine Transkription von MMP-9 induziert (Abb. 12).





**Abb. 12: Hyaluronsäure induziert nicht die Expression von *c-jun* und *c-fos* in 3LL-Zellen**

3LL-Zellen wurden mit 0,5 mg/ml HA bzw. 80 ng/ml TPA induziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und poly(A)<sup>+</sup>-RNA präpariert. Jeweils 4 µg poly(A)<sup>+</sup>-RNA wurden zur einer Analyse eingesetzt. Die Menge an spezifischer mRNA für *c-jun*, *c-fos*, MMP-9 bzw. MMP-13 wurde jeweils durch Hybridisierung mit einer <sup>32</sup>P-markierten cDNA-Sonde bestimmt. Zur Kontrolle der geladenen RNA-Mengen wurde der Filter mit einer spezifischen cDNA-Sonde gegen GAPDH rehybridisiert.

Somit konnte gezeigt werden, daß Hyaluronsäure in 3LL-Zellen weder die Expression von *c-jun* noch von *c-fos* induziert.

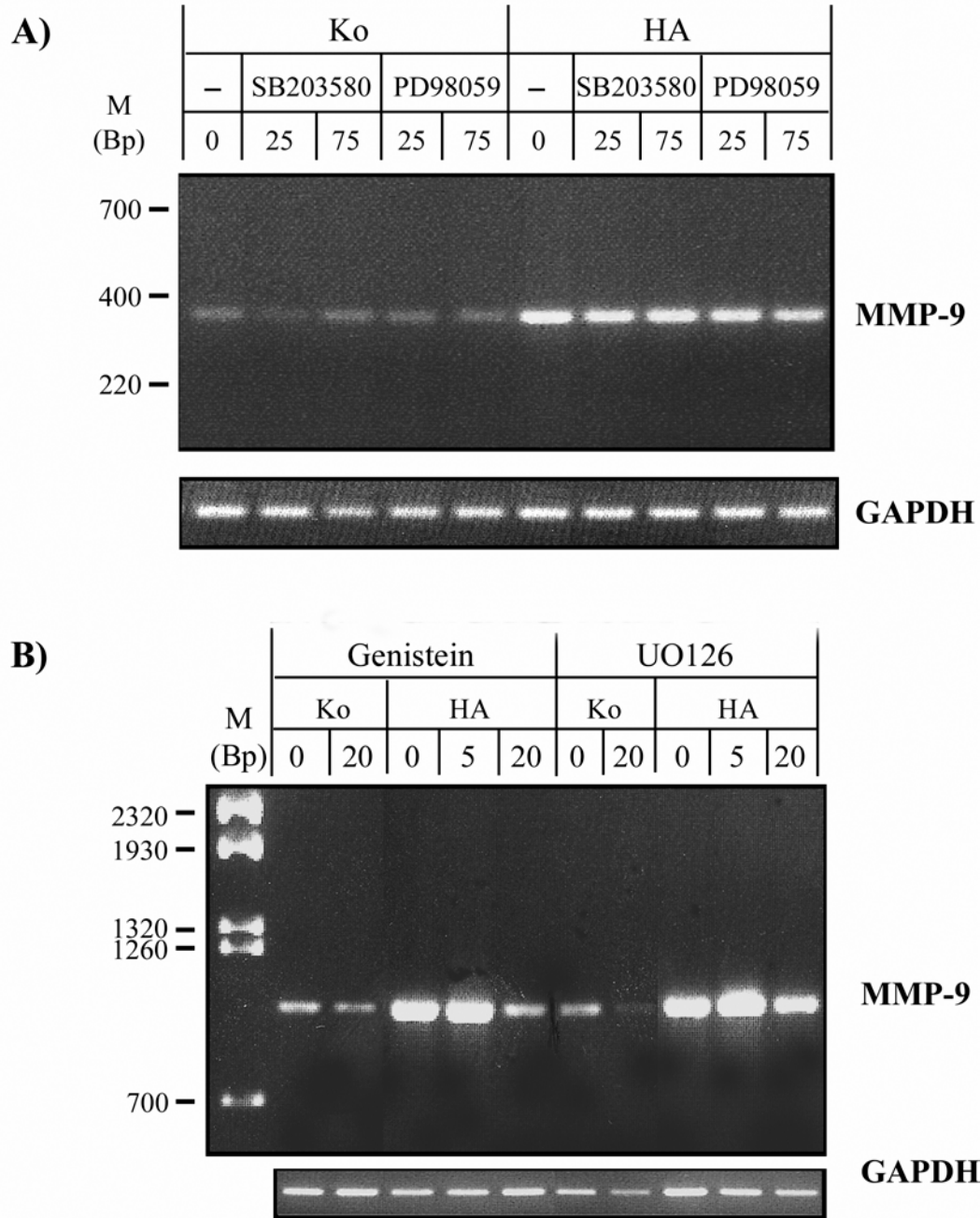
Die Aktivität des AP-1-Proteins wird nicht nur durch transkriptionelle Aktivierung seiner einzelnen Untereinheiten reguliert, sondern auch durch deren post-translationale Modifikationen.

Die Klasse der MAP-Kinasen („mitogen activated protein kinase“) kann nach Stimulation einer Reihe von Zelloberflächen-Rezeptoren sehr schnell c-Jun, c-Fos oder ATF-2 phosphorylieren und damit zu einer Erhöhung der Transaktivierungspotentiale dieser Proteine führen (Rozek und Pfeifer, 1993; Herr *et al.* 1994). Die transkriptionelle Aktivität von c-Jun wird beispielsweise durch JNKs (Jun-N-terminale Kinasen) bzw. ERKs („extracellular signal regulated protein kinase“; Pulverer *et al.*, 1991, 1993; Hibi *et al.*, 1993; Dérijard *et al.*, 1994; Kyriakis *et al.*, 1994) vermittelt. An der transkriptionellen Aktivierung von ATF-2 sind JNKs (Dérijard *et al.*, 1994; Gupta *et al.*, 1995) und p38MAPK (Seko *et al.*, 1997) beteiligt.

Um eine mögliche Beteiligung der MAP-Kinasen p38MAPK oder ERK1 und ERK2 an der Signaltransduktion der Hyaluronsäure-vermittelten MMP-9-Expression zu prüfen, wurde der Einfluß spezifischer Inhibitoren dieser Kinasen auf die Expression von MMP-9 durch Hyaluronsäure analysiert.

Die verwendeten Inhibitoren gegen p38MAPK (SB203580; Simon *et al.*, 1998), MEK (PD98059; Simon *et al.*, 1996, UO126; Favata *et al.*, 1998), blockierten nicht die Hyaluronsäure-vermittelte Expression von MMP-9 (Abb. 13 A, B). Einzig der Proteinkinase-Inhibitor Genistein unterdrückte bei einer Konzentration von 20 µM die Hyaluronsäure-induzierte Transkription des MMP-9-Gens (Abb. 13 B).

Zur Kontrolle der Wirksamkeit der Kinase-Inhibitoren wurde parallel in 3LL-Zellen die Inhibition der TPA-induzierten MMP-13 Expression analysiert. Die verwendeten Inhibitoren waren in der Lage, die TPA-vermittelte MMP-13-Expression zu unterdrücken (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 13: Genistein, nicht aber UO126, PD98059 oder SB203580, inhibiert die Hyaluronsäurevermittelte Transkription von MMP-9**

(A) 3LL-Zellen wurden mit SB203580 (25 bzw. 75  $\mu$ M), PD98058 (25 bzw. 75  $\mu$ M) oder ohne Inhibitor für 45 min inkubiert, und anschließend mit 0,5 mg/ml Hyaluronsäure stimuliert oder blieben unbehandelt (Ko). Nach neun Stunden wurden die Zellen geerntet und Gesamt-RNA präpariert. In einer nachfolgenden RT-PCR-Analyse wurde auf Anwesenheit von MMP-9-mRNA untersucht. Die Amplifikationsreaktion (35 Zyklen: 30 sec 94 °C, 30 sec 61 °C, 20 sec 72 °C) wurde mit Primern (muMMP-9-2129se/2497as), die spezifisch für Exon 13 sind, durchgeführt.

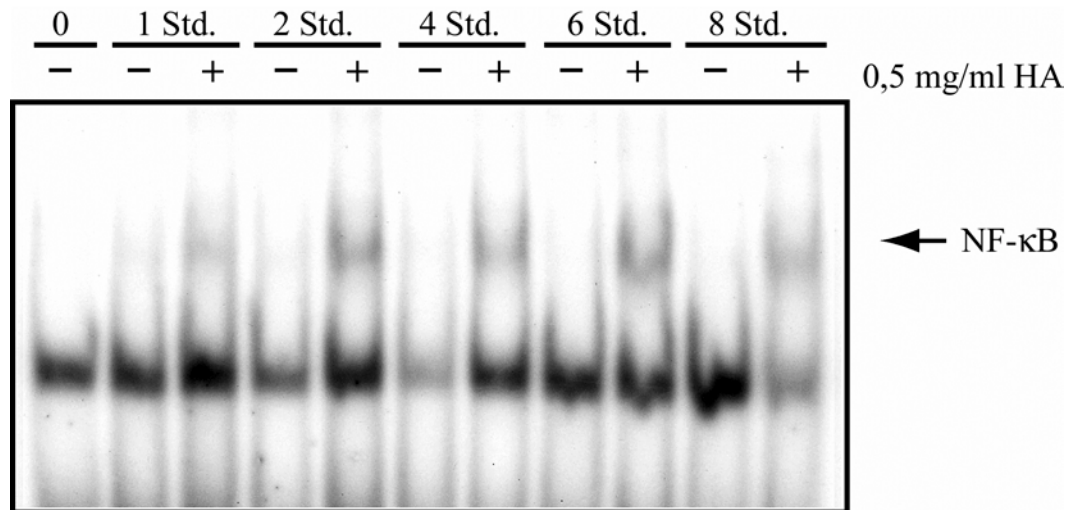
(B) 3LL-Zellen wurden mit Genistein (5 bzw. 20  $\mu$ M), UO126 (5 bzw. 20  $\mu$ M) oder ohne Inhibitor für 45 min inkubiert und anschließend mit 0,5 mg/ml Hyaluronsäure stimuliert oder blieben unbehandelt (Ko). Neun Stunden später wurden die Zellen geerntet und Gesamt-RNA isoliert. Die Menge an spezifischer mRNA für MMP-9 wurde in einer nachfolgenden RT-PCR-Analyse bestimmt. Die Amplifikationsreaktion wurde mit 35 Zyklen (30 sec 94 °C, 30 sec 60 °C, 20 sec 72 °C) und Primern (muMMP-9-314se/1342as), die spezifisch für Exon 2 und 9 sind. Als Kontrolle diente die Amplifikationsreaktion mit GAPDH-spezifischen Primern (21 Zyklen: 30 sec 94 °C, 30 sec 58 °C, 20 sec 72 °C) (A, B).

Die Ergebnisse der Inhibitor-Experimente sind in Übereinstimmung mit Western-Analysen, in denen eine Aktivierung der MAP-Kinasen p38MAPK, ERK1, ERK2 und JNK/SAPK nach Hyaluronsäure-Stimulation nicht nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Es ist jedoch zu vermuten, daß Phosphotyrosinkinasen, andere als die MAP-Kinasen, und deren Aktivität durch Genistein inhibierbar ist, an der Hyaluronsäure-vermittelten Signaltransduktion beteiligt sind.

#### **3.2.4 Hyaluronsäure induziert NF- $\kappa$ B-Aktivität in embryonalen Fibroblasten**

Da es aufgrund der o. a. Resultate unwahrscheinlich ist, daß AP-1-Aktivität für die Hyaluronsäure-vermittelte transkriptionelle Aktivierung des MMP-9-Gens notwendig ist, habe ich untersucht, ob Hyaluronsäure durch Aktivierung von NF- $\kappa$ B die Expression von MMP-9 induziert. Der Promoter des murinen MMP-9-Gens enthält eine NF- $\kappa$ B-Bindungskonsensussequenz, die auch funktionell ist. Inflammatorische Zytokine, wie TNF- $\alpha$  oder IL-1 $\alpha$ , oder TPA induzieren die Expression von MMP-9 über einen Mechanismus, an dem NF- $\kappa$ B beteiligt ist (Himmelstein *et al.*, 1997; Bond *et al.*, 1998; Ikebe *et al.*, 1998). Ferner konnte gezeigt werden, daß Hyaluronsäure NF- $\kappa$ B aktivieren kann (Oertli *et al.*, 1998).

Zuerst wurde geprüft, ob Hyaluronsäure-Behandlung die Aktivierung von NF- $\kappa$ B induzieren kann. Dafür wurde mit Hilfe der Gel-Retardationsanalyse die NF- $\kappa$ B DNA-Bindeaktivität nach Hyaluronsäure-Behandlung primärer muriner Fibroblasten bestimmt.

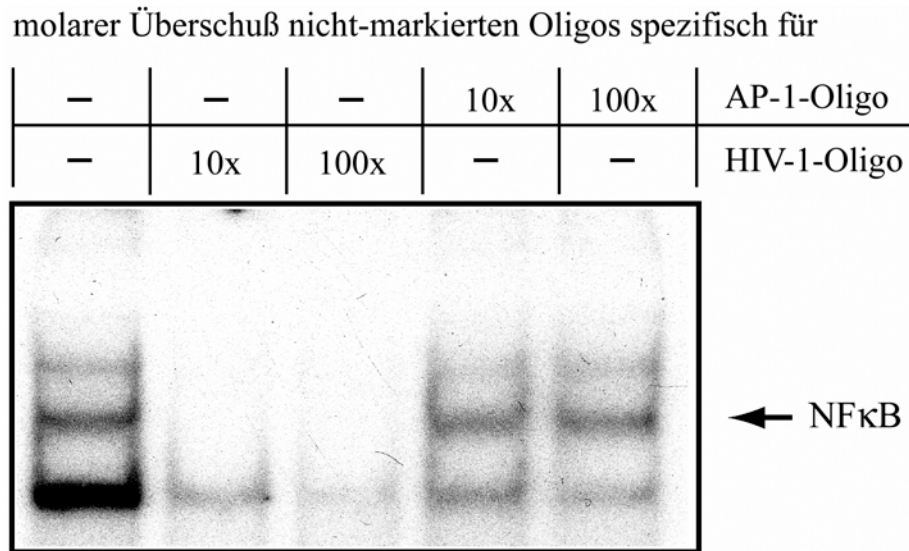


**Abb. 14: Hyaluronsäure induziert in primären Fibroblasten NF- $\kappa$ B-Aktivität**

Konfluente embryonale Fibroblasten wurden mit 0,5 mg/ml Hyaluronsäure behandelt bzw. blieben unbehandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und Gesamtzellextrakte hergestellt. Die DNA-Bindungsfähigkeit von NF- $\kappa$ B wurde in einer Gel-Retardationsanalyse bestimmt, dafür wurden jeweils 8  $\mu$ g Proteinextrakt mit  $^{32}$ P-markiertem, doppelsträngigem HIV-1-Oligonukleotid inkubiert und auf einem nativen 5 % Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt.

In unstimulierten und Hyaluronsäure-stimulierten Zellen findet man konstitutive DNA-Bindeaktivität von p50-Homodimeren (Abb. 14). p50-Homodimere sind dafür bekannt, reprimierend auf die Transkription von NF- $\kappa$ B-abhängigen Zielgenen zu wirken (Franzoso *et al.*, 1992; Kang *et al.*, 1992). Die Behandlung der Zellen mit Hyaluronsäure führte zusätzlich zu einer DNA-Bindeaktivität von NF- $\kappa$ B, die eine Stunde nach Hyaluronsäure-Stimulation erkennbar war und über den gesamten Versuchsverlauf anhielt.

Die DNA-Bindungseigenschaften der Komplexe sind spezifisch für NF- $\kappa$ B, da durch Konkurrenz mit einem Überschuss an nicht-markierten HIV-1-Oligonukleotiden in der Reaktionslösung die Bindung der radioaktiv-markierten HIV-1-Oligonukleotide unterdrückt werden konnte, jedoch nicht mit einem Überschuss an unmarkierten AP-1-Oligonukleotiden (Abb. 15).



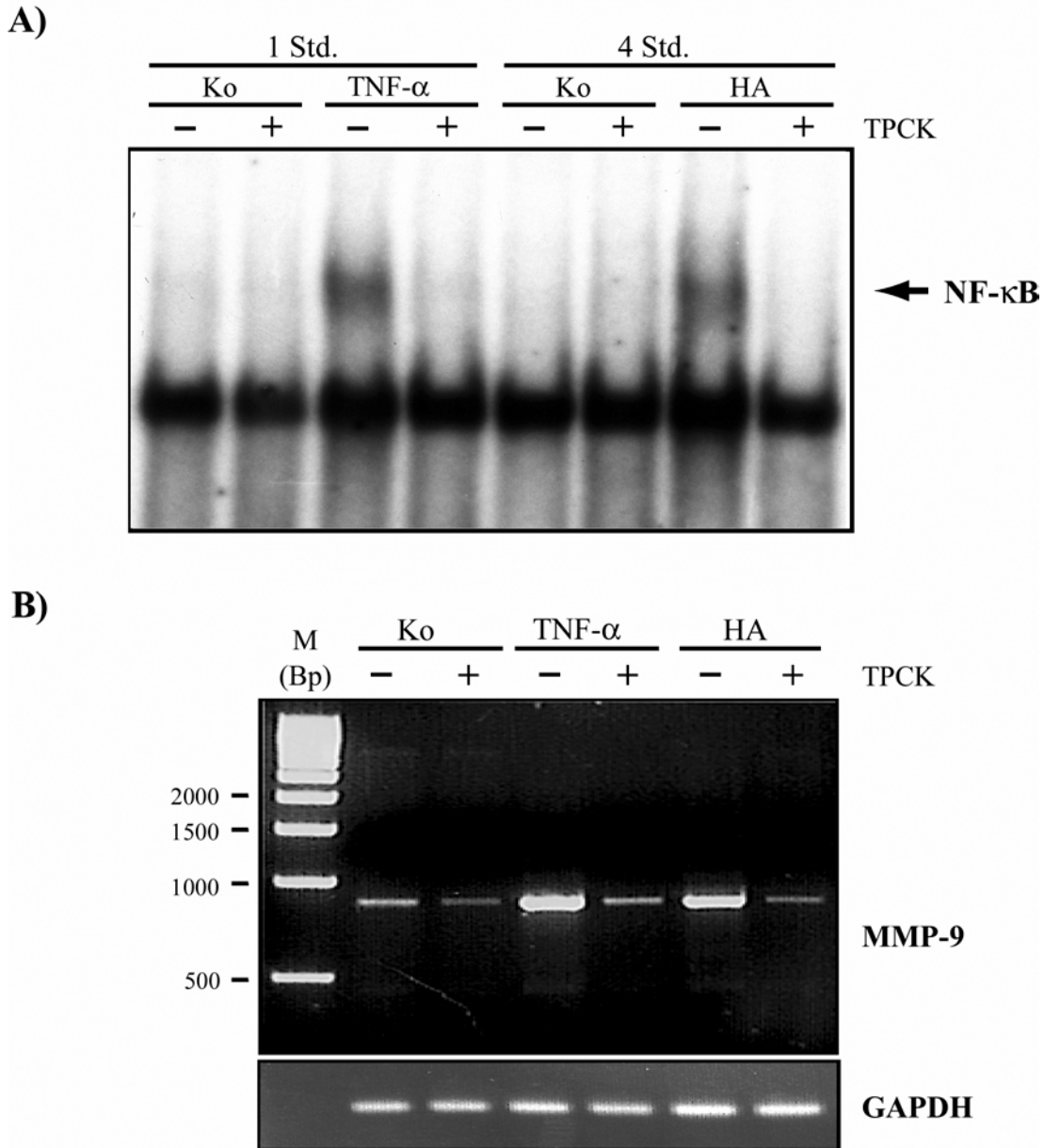
**Abb. 15: Die Hyaluronsäure-induzierte Protein-DNA-Bindung ist spezifisch für das HIV-1 Oligonukleotid**

Jeweils 5 µg Gesamtzellextrakt von Hyaluronsäure-stimulierten Fibroblasten (Abb. 11.) wurden mit einem 10 bzw. 100 molaren Überschuß an nicht-markierten HIV-1- bzw. AP-1-Oligonukleotiden für 10 min vorbehandelt und anschließend mit <sup>32</sup>P-markiertem, HIV-1-Oligonukleotid inkubiert. Die Ansätze wurde dann auf einem nativen 5 % Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und durch Autoradiographie dokumentiert.

**Die Inhibition der NF-κB-Aktivität verhindert die Hyaluronsäure-vermittelte Transkription von MMP-9**

Die o. a. Ergebnisse zeigten, daß Hyaluronsäure-Behandlung in primären Fibroblasten NF-κB-DNA-Bindungsaktivität induzieren kann. Die Relevanz dieser Aktivierung für die Hyaluronsäure-vermittelte MMP-9-Expression sollte daher bestimmt werden.

Primäre Fibroblasten wurden mit dem Proteosomen-Inhibitor TPCK (N-Tosyl-L-Phenylalanin-Chlormethyl-Keton), einem Inhibitor von NF-κB, vorbehandelt und anschließend mit Hyaluronsäure induziert. Zur Kontrolle der Versuchsbedingungen wurden parallel Zellen mit TNF-α stimuliert (Lowenthal *et al.*, 1989; Anisowicz *et al.*, 1991). Mit Hilfe der Gel-Retardationsanalyse sollte getestet werden, ob TPCK die Aktivierung von NF-κB blockieren kann. Analog dazu wurde in einer RT-PCR-Analyse untersucht, ob die Inhibition der NF-κB-DNA-Bindeaktivität einen Einfluß auf die Hyaluronsäure-vermittelte MMP-9-Transkription hat.



**Abb. 16: Der Proteosomen-Inhibitor TPCK hemmt die Hyaluronsäure-vermittelte NF- $\kappa$ B-Aktivität und die transkriptionelle Aktivierung von MMP-9**

Fibroblasten wurden mit 10  $\mu$ M TPCK für 30 min vorbehandelt bzw. blieben unbehandelt und anschließend mit 0,5 mg/ml Hyaluronsäure oder 20 ng/ml TNF- $\alpha$  induziert bzw. blieben unstimuliert (Ko).

A) Nach einer (TNF- $\alpha$ -Behandlung) bzw. vier Stunden (Hyaluronsäure-Stimulation) wurden die Zellen geerntet. Für die Gelretardationsanalyse wurden jeweils 8  $\mu$ g Gesamtzellproteinextrakt mit  $^{32}$ P-markiertem, doppelsträngigem HIV-1-Oligonukleotid inkubiert und auf einem nativen 5 % Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt.

B) Nach neun Stunden wurden die Zellen geerntet und Gesamt-RNA hergestellt. Jeweils 1  $\mu$ g Gesamt-RNA wurde revers transkribiert und 1/10 der Reaktion für die Untersuchung MMP-9-spezifischer Expression in einer nachfolgenden Amplifikationsreaktion eingesetzt (35 Zyklen; 30 sec 94 °C, 30 sec 58 °C, 1 min 72 °C). Die verwendeten Primer (muMMP-9-870se/1722as) sind spezifisch für Exon 6 und 10 des murinen MMP-9-Gens. Zur Kontrolle diente die Amplifikationsreaktion (21 Zyklen: 30 sec 94 °C, 30 sec 58 °C, 20 sec 72 °C) mit GAPDH-spezifischen Primern. In der linken Spur wurde ein 500-Bp-DNA-Marker geladen.

Die Behandlung der Fibroblasten mit TPCK hemmte die Hyaluronsäure- bzw. TNF- $\alpha$ -vermittelte Aktivierung der NF- $\kappa$ B-DNA-Bindung, während die konstitutive DNA-Bindungsaktivität von p50-Homodimeren durch TPCK nicht beeinflusst wurde (Abb. 16 A).

In unstimulierten Zellen war eine geringe basale Expression von MMP-9-mRNA detektierbar. Hyaluronsäure-Behandlung führte in den Zellen zu einer vermehrten Akkumulation MMP-9-spezifischer mRNA. Dagegen war in Zellen, die mit TPCK behandelt wurden, die Hyaluronsäure-vermittelte Steigerung der MMP-9-Transkription unterdrückt (Abb. 16 B). Das gleiche war auch in den TNF- $\alpha$ -behandelten Zellen zu beobachten; TPCK verhinderte die Induktion von MMP-9 (Abb. 16 B).

Dieses Resultat demonstriert, daß TPCK sowohl die Hyaluronsäure-abhängige NF- $\kappa$ B-Aktivierung als auch die MMP-9-Expression supprimiert, was den Schluß nahelegt, daß Hyaluronsäure über einen Mechanismus, an dem NF- $\kappa$ B beteiligt ist, die transkriptionelle Aktivierung von MMP-9 vermittelt.

Für die Aktivierung der Transkription des MMP-9-Gens durch Hyaluronsäure ist also NF- $\kappa$ B-, jedoch keine AP-1-Aktivität, notwendig.



### **3.3 Welcher Hyaluronsäure-Rezeptor vermittelt die Hyaluronsäure-induzierte Expression von MMP-9 ?**

Die Beeinflussung von Vorgängen im Zellkern über die extrazelluläre Matrix erfordert nicht nur die Existenz von Signalwegen zwischen Zellmembran und Kern, sondern auch die Beteiligung spezifischer Zelloberflächenrezeptoren. Ich habe deshalb untersucht, ob einer der bekannten Hyaluronsäure-Rezeptoren, CD44 oder RHAMM, an der Vermittlung der Hyaluronsäure-abhängigen transkriptionellen Aktivierung von MMP-9 beteiligt ist.

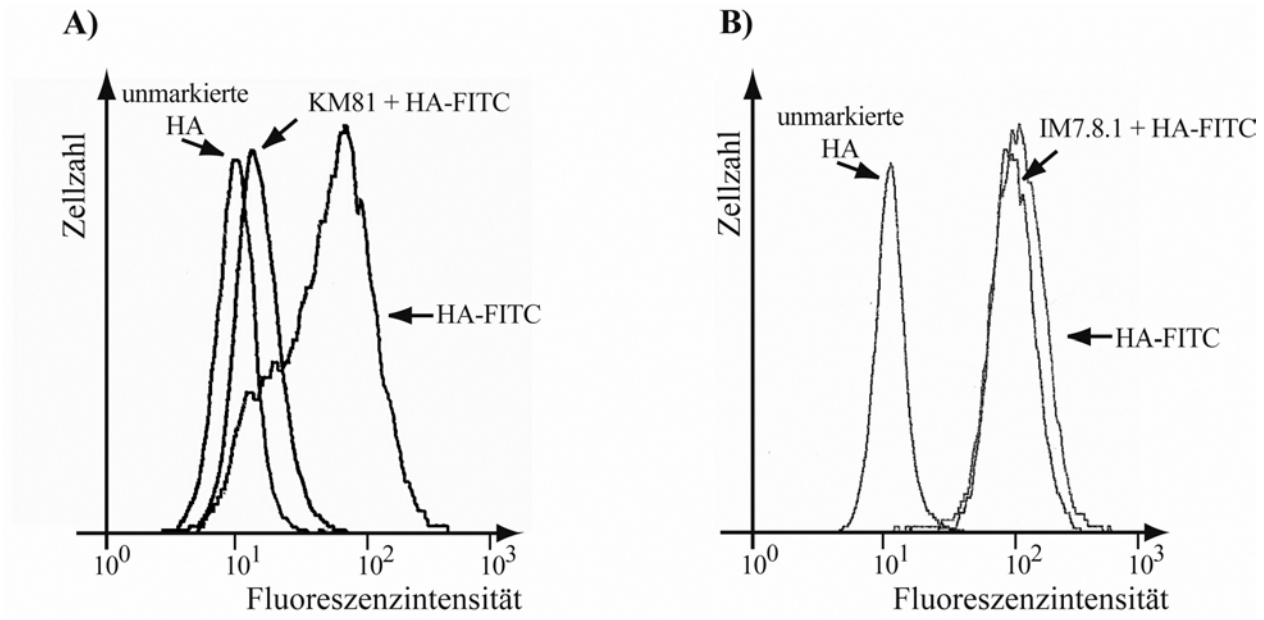
#### **3.3.1 CD44**

##### **Die Bindung von Hyaluronsäure auf der Zelloberfläche von 3LL-Zellen ist hauptsächlich CD44-vermittelt**

Die beschriebenen Funktionen von CD44 als Hyaluronsäure-Rezeptor und Vermittler migratorischer Prozesse, veranlaßten mich, die Bedeutung dieses Rezeptors bei der Hyaluronsäure-vermittelten Expression von MMP-9 zu untersuchen.

3LL-Zellen exprimieren sowohl CD44 als auch RHAMM (Fieber, 1996). In 3LL-Zellen wird überwiegend die Standardform von CD44 und zu einem geringen Teil werden Isoformen mit den varianten Exons v9 und v10 exprimiert.

3LL-Zellen binden lösliche Hyaluronsäure auf ihrer Zelloberfläche. FACS-Analysen zeigten, daß die Bindung von Hyaluronsäure an der Oberfläche von 3LL-Zellen CD44-abhängig ist, da die Bindung löslicher Fluoreszein-markierter Hyaluronsäure durch den CD44-spezifischen Antikörper KM81, der mit der Hyaluronsäure-Bindung interferiert (Zheng *et al.*, 1995), blockiert werden konnte (Abb. 17 A). Zur Kontrolle wurden 3LL-Zellen mit dem CD44-spezifischen Antikörper IM7.8.1, welcher nicht die Hyaluronsäure-Bindung von CD44 beeinflusst, inkubiert (Abb. 17 B).



**Abb. 17: Blockierung der Bindung FITC-markierter löslicher Hyaluronsäure an 3LL-Zellen durch anti-CD44-Antikörper**

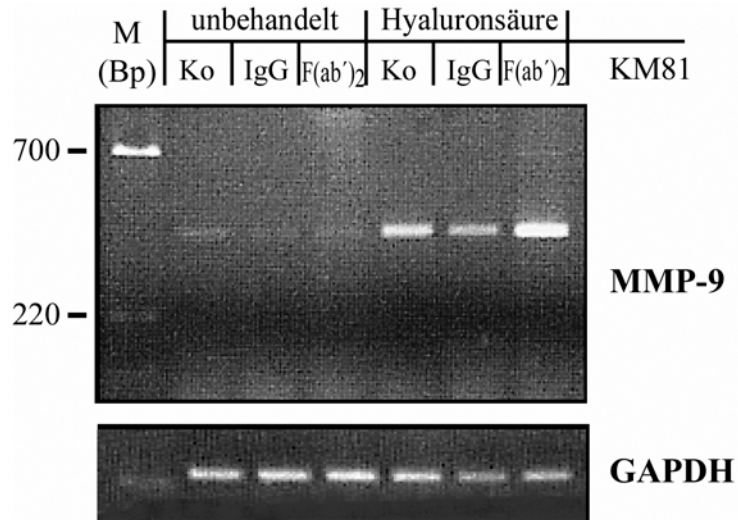
3LL-Zellen wurden mit FITC-markierter Hyaluronsäure (HA-FITC, 100µg/ml) inkubiert. Für die Blockierung der Hyaluronsäure-Bindung wurden die Zellen vor ihrer Markierung mit HA-FITC mit jeweils 20 µg/ml KM81 (A) bzw. IM7.8.1 (B) inkubiert. Als Negativkontrolle diente die Eigenfluoreszenz der Zellen nach Inkubation mit unmarkierter Hyaluronsäure (100 µg/ml).

Nach diesen Ergebnissen lag es nahe zu testen, ob Hyaluronsäure durch Interaktion mit CD44 die Expression von MMP-9-mRNA induziert.

### **Die Blockierung der Hyaluronsäure-Bindungsfähigkeit von CD44 verhindert nicht die Hyaluronsäure-abhängige transkriptionelle Aktivierung von MMP-9**

Zunächst wurde analysiert, ob durch Blockierung der Hyaluronsäure-Bindungsdomäne von CD44 die Hyaluronsäure-abhängige Expression von MMP-9 verhindert wird. Dafür wurden 3LL-Zellen in Suspension mit dem anti-CD44-Antikörper KM81 vorinkubiert, in Petrischalen ausgesät und anschließend mit Hyaluronsäure induziert.

Die nachfolgende RT-PCR-Analyse (Abb. 18) ergab, daß eine Blockierung der Hyaluronsäure-Bindung von CD44 nicht die Hyaluronsäure-vermittelte Expression von MMP-9 unterdrückt. Die Vorbehandlung der Zellen mit den KM81-Antikörpern in Abwesenheit exogen zugeführter Hyaluronsäure induzierte nicht die Synthese von MMP-9-mRNA.



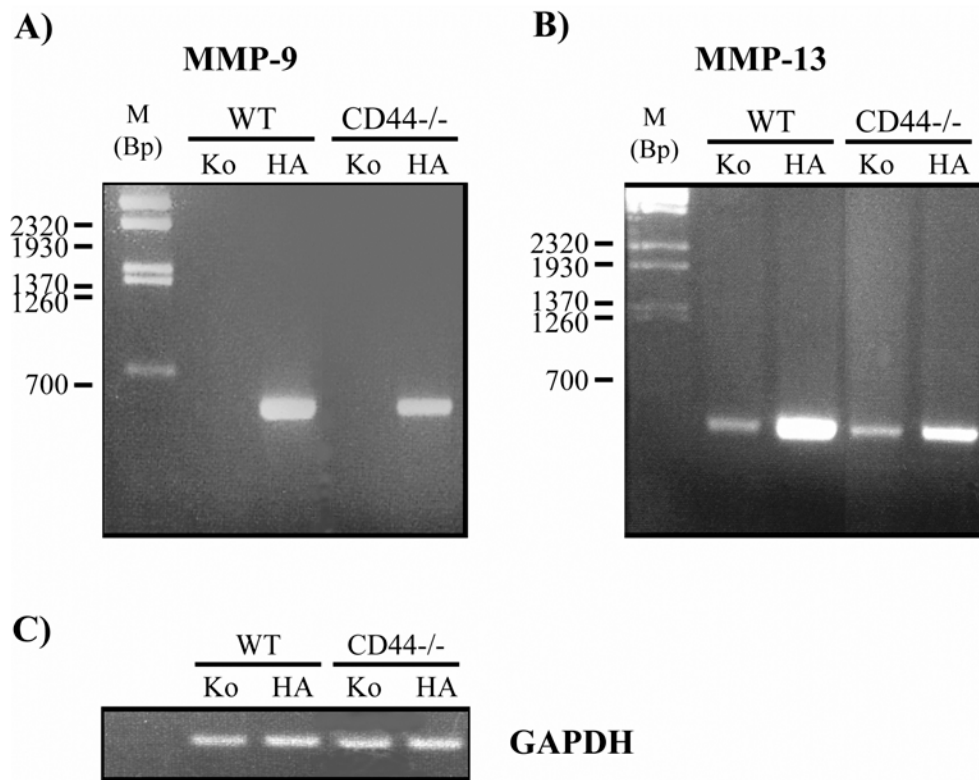
**Abb. 18: Blockierung der Hyaluronsäure-Bindungsfähigkeit von CD44 unterdrückt nicht die Hyaluronsäure-vermittelte Expression von MMP-9**

Jeweils  $2 \times 10^6$  3LL-Zellen wurden mit  $100 \mu\text{g}$  KM81 (IgG) bzw.  $50 \mu\text{g}$  KM81 (F(ab')<sub>2</sub>) in 1 ml DMEM für 45 min auf Eis inkubiert und in 3 cm Petrischale ausgesät. Zu den Zellen wurden jeweils 1 ml DMEM bzw. HA-DMEM (f.c.  $0,5 \text{ mg/ml}$ ) zugefügt und die Zellen für 12 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und Gesamt-RNA isoliert. Jeweils  $1 \mu\text{g}$  Gesamt-RNA wurde revers transkribiert und 1/10 der Reaktion wurden für die Untersuchung MMP-9-spezifischer Transkription in einer nachfolgenden Amplifikationsreaktion verwandt (35 Zyklen; 30 sec  $94^\circ\text{C}$ , 30 sec  $57^\circ\text{C}$ , 20 sec  $72^\circ\text{C}$ ). Die verwendete Primerkombination (muMMP-9-779se/1342as) ist spezifisch für Exon 5 bzw. 9 des murinen MMP-9-Gens. Zur Kontrolle diente die Amplifikationsreaktion (21 Zyklen: 30 sec  $94^\circ\text{C}$ , 30 sec  $58^\circ\text{C}$ , 20 sec  $72^\circ\text{C}$ ) mit GAPDH-spezifischen Primern.

**Hyaluronsäure-Induktion von MMP-9 in CD44-defizienten Zellen**

Um explizit die Rolle von CD44 bei der Hyaluronsäure-induzierten Expression des MMP-9-Gens zu untersuchen, wurden Fibroblasten von CD44-defizienten Embryonen mit denen aus Wildtyp-Embryonen in Bezug auf die Hyaluronsäure-Induzierbarkeit von MMP-9 verglichen. Ich benutzte dazu eine Mauskolonie, in der eine  $\beta$ -Galaktosidase/Neomycin-Resistenz-Reporter-Kassette in den Abschnitt des CD44-Allels, der für das Signalpeptid kodiert, durch homologe Rekombination im Leseraster inseriert worden ist (Protin *et al.*, 1999). Dies verhindert die Synthese aller CD44-Isoformen. CD44-defiziente Mäuse sind lebensfähig und zeigen keine offensichtlichen Anomalien während der embryonalen Entwicklung oder im adulten Tier (Protin *et al.*, 1999).

Ein Vergleich von CD44-defizienten Fibroblasten mit Wildtyp-Fibroblasten zeigte, daß beide Fibroblastenlinien auf Hyaluronsäure gleich gut mit MMP-9-Expression reagierten (Abb. 19 A). Auch die Induktion der Expression von MMP-13 durch Hyaluronsäure war in CD44-defizienten Zellen nicht verhindert, gleichwohl sie in CD44-defizienten Zellen geringer ausfiel als in Wildtyp-Zellen (Abb. 19 B).



**Abb. 19: In CD44-defizienten embryonalen Fibroblasten ist die Hyaluronsäure-vermittelte Transkription von MMP-9 nicht verhindert**

Primäre Fibroblasten von Wildtyp- und CD44-defizienten Embryonen wurden mit 0,5 mg/ml Hyaluronsäure (HA) behandelt bzw. blieben unbehandelt (Ko). Nach 12 Stunden wurden die Zellen geerntet und Gesamt-RNA hergestellt. Jeweils 1 µg Gesamt-RNA wurde revers transkribiert und 1/10 der Reaktion in nachfolgenden Amplifikationsreaktionen zur Untersuchung MMP-9- (A) bzw. MMP-13-spezifischer mRNA (B) verwandt. (A) Für die Amplifikation MMP-9-spezifischer Transkripte wurden Primer verwendet, die spezifisch für Exon 5 und 9 des murinen MMP-9-Gens sind (muMMP-9-779se/1342as; 35 Zyklen; 30 sec 94 °C, 30 sec 57 °C, 20 sec 72 °C). (B) Die Analyse MMP-13-spezifischer mRNA wurde mit Primern durchgeführt, die spezifisch den Bereich der cDNA-Sequenz des murinen MMP-13-Gens von Pos. 296 bis 901 amplifizieren (33 Zyklen; 30 sec 94 °C, 30 sec 61 °C, 30 sec 72 °C). Als Größenstandard wurde λ-DNA, mit BstEII verdaut, aufgetragen (A, B). (C) Zur Kontrolle diente die Amplifikationsreaktion (21 Zyklen: 30 sec 94 °C, 30 sec 58 °C, 20 sec 72 °C) mit GAPDH-spezifischen Primern.

Diese Ergebnisse bestätigen demnach die Experimente an 3LL-Zellen, in denen die Hyaluronsäure-induzierte Expression von MMP-9 nicht durch Blockierung der Hyaluronsäure-Bindungsdomäne von CD44 unterdrückt werden konnte.

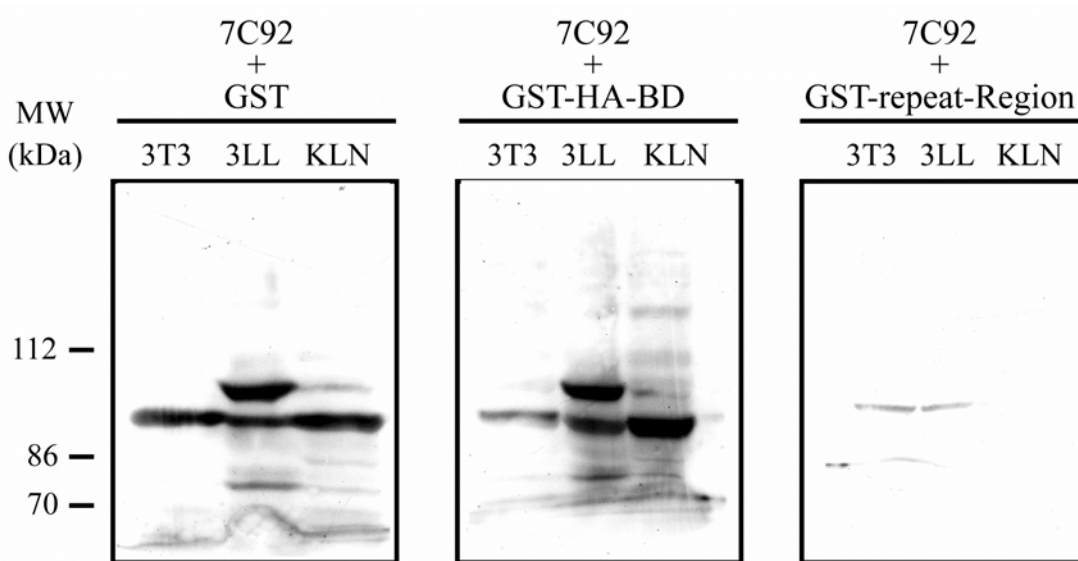
Hieraus läßt sich schlußfolgern, daß CD44 an dem Mechanismus, über den Hyaluronsäure die Expression von MMP-9 in 3LL-Zellen und primären Fibroblasten induziert, nicht beteiligt ist.

### 3.3.2 RHAMM

Wegen der o. a. Ergebnissen habe ich mich dem zweiten publizierten Hyaluronsäure-Rezeptor, RHAMM, zugewandt. RHAMM wurde als Rezeptor beschrieben, der durch Bindung an Hyaluronsäure Signaltransduktionsprozesse induzieren und Zellmigration initiieren kann (Hall *et al.*, 1994; Hall *et al.*, 1996).

In den nachfolgenden Experimenten wurde untersucht, ob RHAMM in die Vermittlung der Hyaluronsäure-abhängigen Aktivierung des MMP-9 involviert ist.

**Polyklonale Antikörper, die gegen die „Repeat“-Region von RHAMM hergestellt worden sind, erkennen in murinen immortalisierten Zelllinien ein Protein von 95 kDa**



**Abb. 20: Antiserum gegen murines RHAMM erkennt ein Protein von 95 kDa in NIH3T3-, KLN205- und 3LL-Zellen bzw. in 3LL-Zellen eine zusätzliche Bande mit einem Molekulargewicht von 105 kDa.**

Gesamtzell-Lysat von NIH3T3-, KLN205- und 3LL-Zellen wurden auf einem 8 % SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde dann mit dem Antiserum 7C92 inkubiert, das zuvor mit einem der folgenden Proteine behandelt worden war: GST-Protein (GST), GST-„repeat-region“ und GST-HABD.

In unserem Labor wurden polyklonale Antikörper (7C92) gegen das Fusionsprotein aus GST und der „Repeat“-Region von murinem RHAMM hergestellt (Hofmann *et al.*, 1998). In einer Western-Analyse erkannte das Antiserum in Zell-Lysaten von NIH3T3-, KLN205 und 3LL-Zellen ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 95 kDa und in 3LL-Zellen

zusätzlich ein Protein von ca. 105 kDa (Abb. 20). Die Färbung mit dem Antiserum ist spezifisch, da es nach Depletierung der spezifischen Reaktivität gegen die „repeat“-Region die Bande bei 95 und 105 kDa nicht färbt. Die Inkubation des Antiserums mit dem GST-Protein oder einem heterologen GST-Fusionsprotein, hier der Hyaluronsäure-Bindungsdomäne von RHAMM, führte dagegen nicht zur Depletierung der spezifischen Reaktivität (Abb. 20).

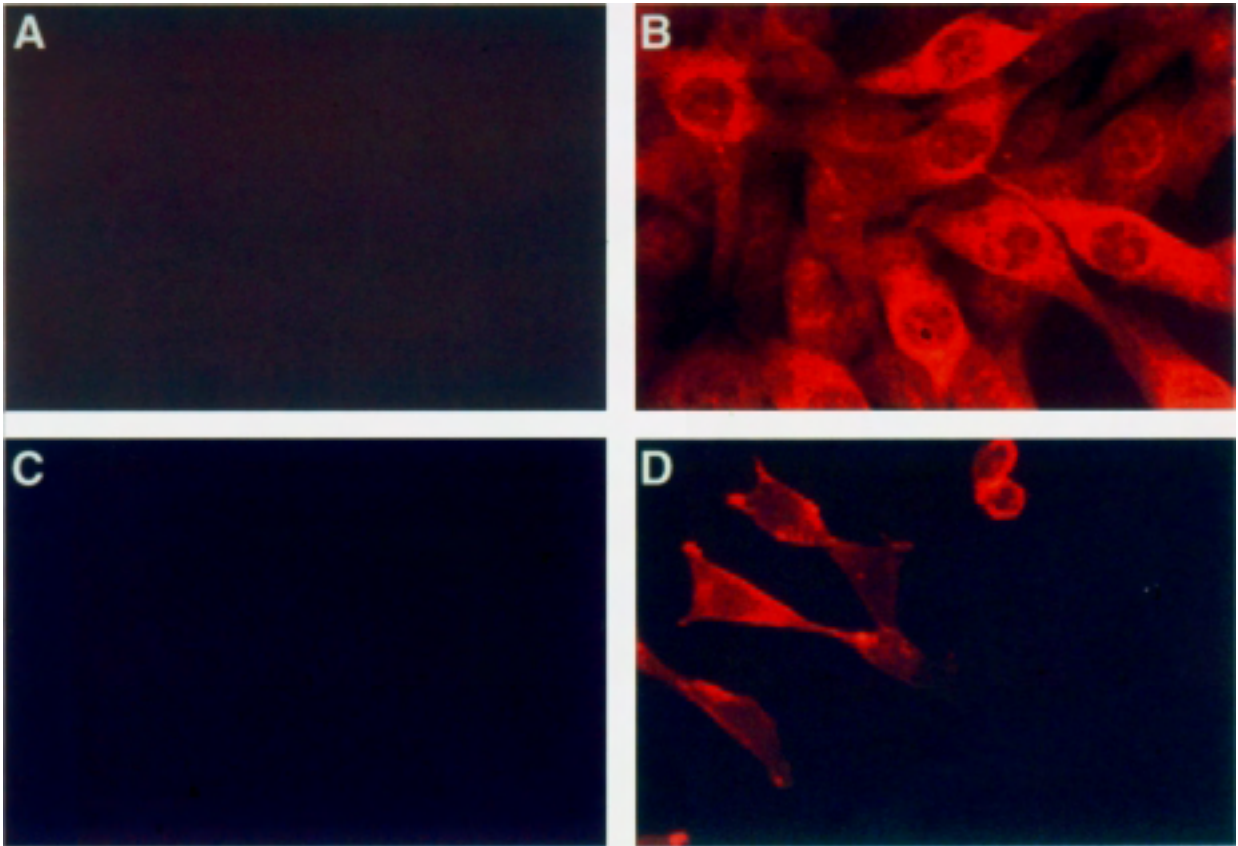
Ein weiterer Beleg für die Spezifität des Antiserums ist die Beobachtung, daß in Western-Analysen von Proteinextrakten verschiedener Gewebe RHAMM-defizienter Mäuse die spezifische Bande von 95 kDa nicht erscheint (J. Moll, persönliche Mitteilung).

Die Ergebnisse dieser Western-Analyse widersprechen den bisherigen Veröffentlichungen über das Molekulargewicht von murinem RHAMM-Protein, das mit 70 - 72 kDa angegeben war (Entwistle *et al.*, 1995). Es zeigte sich jedoch, daß die Nukleotidsequenz, die als Gesamtlängen-cDNA für murines RHAMM beschrieben war (Entwistle *et al.*, 1995), nicht vollständig war. Die tatsächliche Gesamtlängen-cDNA-Sequenz des murinen RHAMM-Gens ist gegenüber der bisher veröffentlichten Nukleotidsequenz am 5'-Ende um 440 Bp erweitert und enthält einen offenen Leserahmen, der für ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 95 kDa kodiert (Hofmann *et al.*, 1998). Die erweiterte Nukleotidsequenz wird von zusätzlichen Exons kodiert, die sich an die genomischen Sequenz von murinem RHAMM anschließen (Fieber *et al.*, 1999).

Außerdem konnte gezeigt werden, daß in 3LL-Zellen durch genomisches Rearrangement die Anzahl der repetitiven Einheiten innerhalb der „repeat“-Region verändert ist. In diesen Zellen wird eine variante Form von RHAMM exprimiert, deren „repeat“-Region von acht statt fünf repetitiven Einheiten kodiert wird. Entsprechend erhöht sich das Molekulargewicht auf 105 kDa (Hofmann *et al.*, 1998).

### RHAMM ist ein intrazelluläres Protein

Die abgeleitete Peptidsequenz der Gesamtlängen-cDNA-Nukleotidsequenz für murines RHAMM (Hofmann *et al.*, 1998) enthält keine Sequenzmotive, die eine Lokalisation von RHAMM-Protein auf der Zelloberfläche annehmen ließe. In einer Immunofluoreszenz-Analyse wurde daher die subzelluläre Lokalisation von RHAMM in NIH3T3-Zellen untersucht.



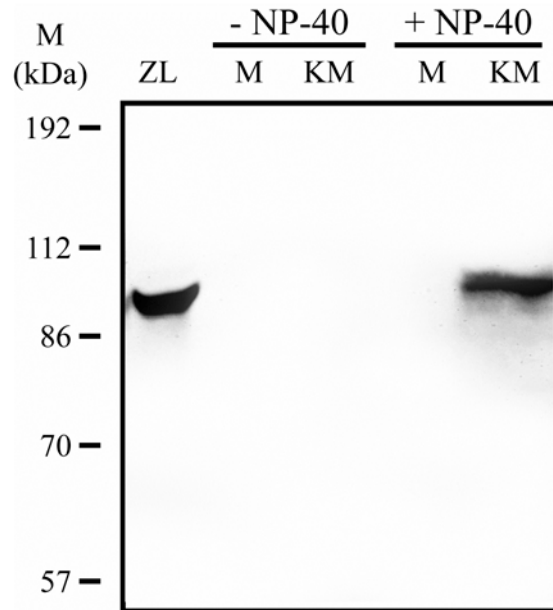
#### Abb. 21: Nachweis von RHAMM-Protein in NIH3T3-Zellen durch Immunofluoreszenz-Analyse

Nicht-permeabilisierte (A) oder permeabilisierte NIH3T3-Zellen (B) wurden mit dem Antiserum 7C92 gefärbt. Als Negativkontrolle wurden permeabilisierte Zellen mit Prä-Immunsereum inkubiert (C). Als Positivkontrolle für Zelloberflächenfärbung wurde CD44 mit dem monoklonalen Antikörper KM81 markiert.

Intakte und permeabilisierte Zellen wurden mit demselben Antikörper gefärbt, der auch in der Westen-Blot-Analyse (Abb. 20) verwendet worden war. Intakte Zellen zeigten keine Färbung (Abb. 21 A). Mit dem Antikörper wurden nur permeabilisierte Zellen angefärbt, wobei die Färbung über das gesamte Zytoplasma verteilt war (Abb. 21 B). Zellen, die mit Prä-Immunsereum inkubiert worden waren, dienten als Kontrolle für die Spezifität des RHAMM-Antiserums

(Abb. 21 C). Als Beispiel für Oberflächenfärbung wurden die Zellen mit einem CD44-spezifischen Antikörper markiert (Abb. 21 D).

In der Immunofluoreszenz-Analyse konnte für RHAMM-Protein ausschließlich intrazelluläre, aber keine Zellmembran-assoziierte Lokalisation ausgemacht werden.



**Abb. 22: RHAMM-Protein ist nicht im konditionierten Medium exponentiell wachsender NIH3T3-Fibroblasten nachweisbar**

Konditioniertes Medium (KM) von Zellen, die entweder unbehandelt blieben oder mit NP-40 behandelt wurden, wurde gesammelt und konzentriert. Jeweils die Hälfte des Zellüberstandes wurde einer Western-Analyse zum Nachweis von RHAMM-Protein unterzogen. Als Negativkontrolle diente Medium (M), das auf die gleiche Weise behandelt worden war. Gesamtzell-Lysat von NIH3T3-Fibroblasten (ZL) dient als Positivkontrolle für intaktes RHAMM-Protein.

RHAMM ist ursprünglich aus Überständen muriner Fibroblasten und Fibrosarkomzellen isoliert worden (Turley *et al.*, 1987). Daher lag der Schluß nahe, daß in der Immunofluoreszenz-Analyse RHAMM-Protein nicht auf der Zelloberfläche nachweisbar war, weil es von den Zellen in das Gewebekulturmedium sezerniert oder von der Zelloberfläche proteolytisch abgespalten werden kann. Aus diesem Grunde wurde in einer Western-Analyse das konditionierte Medium exponentiell wachsender NIH3T3-Zellen auf die Anwesenheit des RHAMM-Proteins untersucht. Im Zellüberstand unbehandelter NIH3T3-Zellen war RHAMM nicht nachweisbar (Abb. 22). RHAMM-Protein war nur im Überstand von Zellen detektierbar, die vorher mit dem Detergens NP-40 lysiert worden waren (Abb. 22). Gesamtzell-Lysat von NIH3T3-Zellen diente hier als



Kontrolle für intaktes RHAMM-Protein und Kulturmedium als Negativkontrolle. Das gesamte in der Western-Analyse detektierte RHAMM-Protein ist intrazellulär lokalisiert.

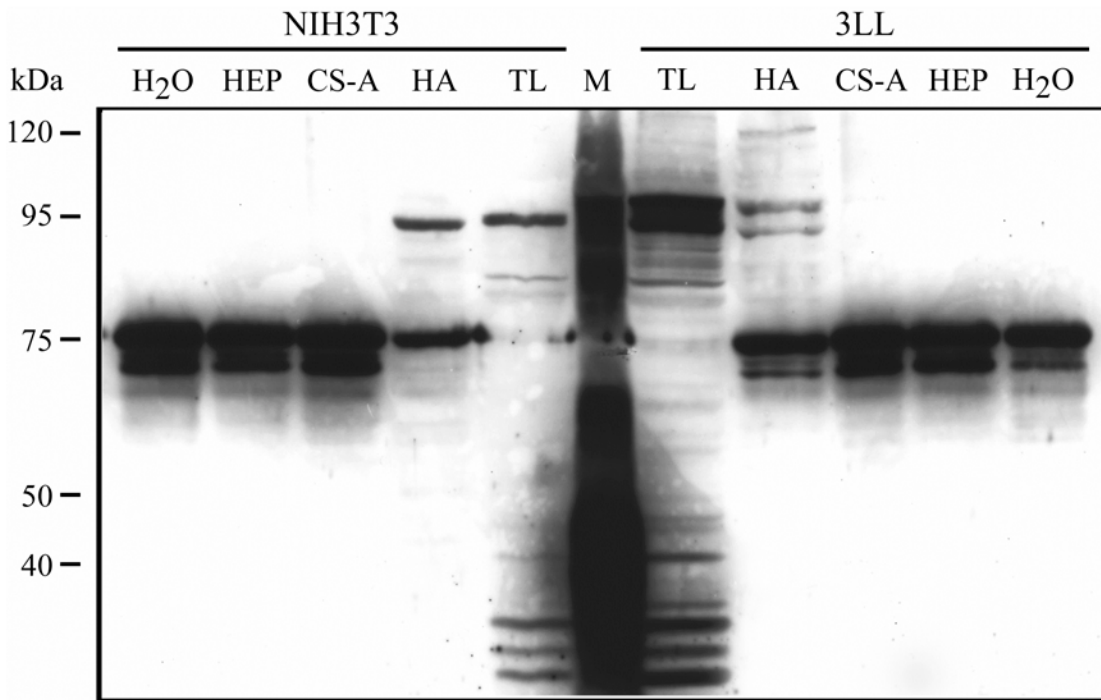
Die o. a. Resultate legen nahe, daß das RHAMM-Protein kein extrazelluläres Protein, sondern im Zytoplasma lokalisiert ist.

### **RHAMM bindet an Hyaluronsäure *in vitro*, aber nicht an Heparin oder Chondroitin-Sulfat-A**

Mit der Beobachtung der intrazellulären Lokalisation von RHAMM stellte sich die Frage, ob das Protein überhaupt Hyaluronsäure binden kann. In einer Bindungsstudie wurde die Fähigkeit von RHAMM, an Hyaluronsäure und andere Glykosaminoglykane, wie Chondroitin-Sulfat-A und Heparin zu binden, untersucht.

In diesem Bindungstest, der den physiologischen Bedingungen weitgehend entspricht, werden Zellextrakte mit dem zu testenden Glykosaminoglykan inkubiert. Die Protein-Glykosaminoglykan-Komplexe werden mittels des kationischen Detergenses Cetylpyrimidiniumchlorid (CPC) präzipitiert und in einer anschließenden Western-Analyse untersucht.

Wie in Abbildung 23 dargestellt ist, wird RHAMM durch Hyaluronsäure präzipitiert. In 3LL-Zellen binden sowohl die 95 kDa große als auch die 105 kDa Form von RHAMM an Hyaluronsäure. RHAMM bindet jedoch nicht an Chondroitin-Sulfat und Heparin, da in den Präzipitationen mit diesen Glukosaminoglykanen keine spezifischen Signale erscheinen. Ein Protein von 75 kDa interagiert mit CPC, da es auch in den Kontrollreaktionen ohne Zugabe von Glukosaminoglykanen detektierbar ist. RHAMM bindet nicht an DNA, da es nicht durch genomische DNA präzipitiert werden konnte (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 23: Murines RHAMM-Protein bindet an Hyaluronsäure, nicht aber an Heparin oder Chondroitin-Sulfat-A**

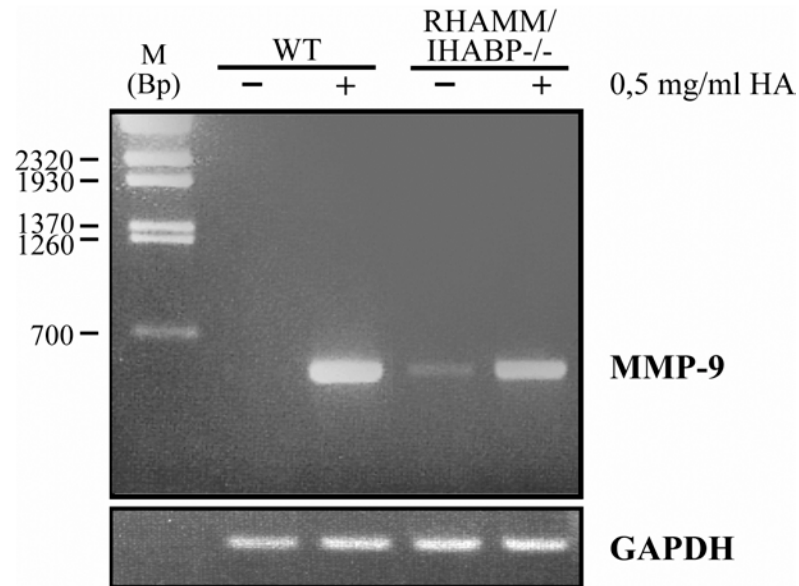
Gesamtzell-Lysat von NIH3T3- und 3LL-Zellen wurden mit Hyaluronsäure (HA), Heparin (HEP), Chondroitin-Sulfat-A (CS-A) bzw. als Negativkontrolle ohne Zusatz (H<sub>2</sub>O) inkubiert. Die Protein-Glukosaminoglykan-Komplexe wurden dann mit CPC präzipitiert. Präzipitate und Gesamtzell-Lysate wurden auf einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. RHAMM-Protein wurde mit dem Antiserum 7C92 nachgewiesen.

Aus dem Ergebnis der Bindungsstudie kann geschlossen werden, daß RHAMM trotz seiner intrazellulären Lokalisation Hyaluronsäure-Bindungseigenschaften hat.

### **Hyaluronsäure-Induktion von MMP-9 in RHAMM-defizienten Zellen**

Die zytoplasmatische Lokalisation von murinem RHAMM schließt die Möglichkeit nahezu aus, daß RHAMM in der Funktion eines Zelloberflächenrezeptors an der Hyaluronsäure-vermittelten MMP-9-Expression beteiligt ist.

RHAMM-defiziente Mäuse, die in unserem Labor generiert worden sind, sind lebensfähig und zeigen keine offensichtlichen Anomalien (J.Moll, persönliche Mitteilung). Diese Tiere ermöglichen es, direkt die Rolle von RHAMM bei der Hyaluronsäure-abhängigen Regulation des MMP-9-Gens zu analysieren. Zu diesem Zweck wurden embryonale Fibroblasten gewonnen und hinsichtlich der Aktivierbarkeit des MMP-9-Gens durch Hyaluronsäure mit Fibroblasten von Wildtyp-Mäusen verglichen.



**Abb. 24: In RHAMM-defizienten embryonalen Fibroblasten ist die Hyaluronsäure-vermittelte Expression von MMP-9 nicht aufgehoben**

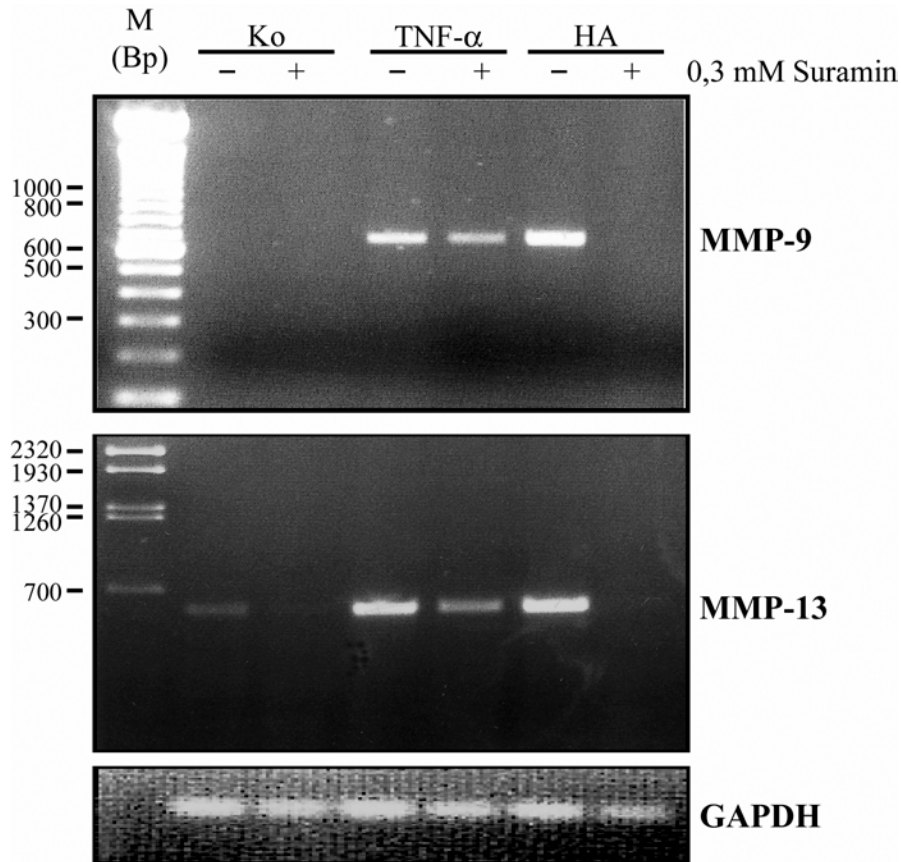
Primäre Fibroblasten von Wildtyp- und RHAMM-defizienten Embryonen wurden mit 0,5 mg/ml Hyaluronsäure behandelt bzw. blieben unbehandelt. Nach 12 Stunden wurden die Zellen geerntet und Gesamt-RNA hergestellt. Jeweils 1 µg Gesamt-RNA wurde revers transkribiert und 1/10 der Reaktion wurden für die Untersuchung MMP-9-spezifischer Expression in einer nachfolgenden Amplifikationsreaktion verwandt (35 Zyklen; 30 sec 94 °C, 30 sec 57 °C, 20 sec 72 °C). Die verwendeten Primer (muMMP-9-779se/1342as) sind spezifisch für Exon 5 und 9 des murinen MMP-9-Gens. Zur Kontrolle diente die Amplifikationsreaktion (21 Zyklen: 30 sec 94 °C, 30 sec 58 °C, 20 sec 72 °C) mit GAPDH-spezifischen Primern. In der linken Spur wurde als Größenstandard λ-DNA, mit BstEII verdaut, aufgetragen.

RHAMM-defiziente Fibroblasten zeigten nach Hyaluronsäure-Behandlung eine ähnlich starke Akkumulation von MMP-9-mRNA wie die Wildtyp-Fibroblasten (Abb. 24). Die Aktivierbarkeit durch Hyaluronsäure ist also in RHAMM-defizienten Fibroblasten nicht blockiert.

Dieses Ergebnis läßt die Schlußfolgerung zu, daß RHAMM nicht für die Hyaluronsäure-abhängige Expression von MMP-9 notwendig ist.

### 3.3.3 Die Hyaluronsäure-vermittelte Expression von MMP-9 benötigt die Beteiligung eines Zellmembranrezeptors

Da aus den vorangegangenen Experimenten folgt, daß die bekannten Hyaluronsäure-Rezeptoren CD44 und RHAMM nicht für die Vermittlung der Hyaluronsäure-induzierten Aktivierung von MMP-9 notwendig sind, stellte sich die Frage, ob die Induktion durch Hyaluronsäure überhaupt unter Beteiligung eines Zellmembranrezeptors verläuft.



**Abb. 25: Hyaluronsäure vermittelt die Expression von MMP-9 durch Wechselwirkung mit einem Membranrezeptor**

Embryonale Fibroblasten wurden mit oder ohne 0,3 mM Suramin für 45 min vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen mit 0,5 mg/ml HA oder 500 ng/ml TNF- $\alpha$  induziert, bzw. nicht induziert (Ko). Nach 12 Stunden wurden die Zellen geerntet und Gesamt-RNA isoliert. Jeweils 1  $\mu$ g Gesamt-RNA wurde revers transkribiert und 1/10 der Reaktion wurden für die Untersuchung MMP-9-spezifischer Transkription in einer nachfolgenden Amplifikationsreaktion verwandt (35 Zyklen; 30 sec 94 °C, 30 sec 61 °C, 20 sec 72 °C). Die verwendeten Primer (muMMP-9-779 se/1342 as) sind spezifisch für Exon 3 und 7 des murinen MMP-9-Gens. Für die Analyse MMP-13-spezifischer Transkripte wurden Primer eingesetzt, die spezifisch den Bereich der cDNA-Sequenz des murinen Gens für MMP-13 von Pos. 296 bis 901 amplifizieren (33 Zyklen; 30 sec 94 °C, 30 sec 61 °C, 30 sec 72 °C). Als Kontrolle diente die Amplifikationsreaktion mit GAPDH-spezifischen Primern (21 Zyklen: 30 sec 94 °C, 30 sec 58 °C, 20 sec 72 °C).

Zu ihrer Klärung wurden embryonale Fibroblasten mit Suramin, einem Inhibitor von Ligand-Rezeptor-Interaktionen, behandelt. In einer nachfolgenden RT-PCR-Analyse wurde dann untersucht, ob die Suramin-Behandlung die Expression von MMP-9 durch Hyaluronsäure unterdrückt.

Tatsächlich blockierte Suramin die Hyaluronsäure-induzierte Expression von MMP-9 und MMP-13 (Abb. 25). Als Kontrolle für eine Blockierung der Liganden-Rezeptor-Interaktion durch Suramin-Behandlung wurde parallel in den Zellen die TNF- $\alpha$ -induzierte Transkription von MMP-13 analysiert. Die Behandlung der Zellen mit Suramin reduziert signifikant die TNF- $\alpha$ -vermittelte Expression von MMP-13.

Dieses Ergebnis macht es wahrscheinlich, daß Hyaluronsäure über die Interaktion mit einem Membranrezeptor die transkriptionelle Aktivierung von MMP-9 vermittelt.



## 4. Diskussion

### 4.1 Allgemeines

Tumore zeigen oftmals eine verstärkte Akkumulation und Synthese von Hyaluronsäure, insbesondere entlang der Invasionszonen des Tumors an der Grenze zum gesunden Gewebe. Eine verstärkte Hyaluronsäure-Synthese soll mit einer erhöhten Invasivität (Toole, 1979) oder Migrationsfähigkeit von Zellen (Turley, 1984) korreliert sein. Gleichzeitig sind invasive Eigenschaften der Tumore mit der Fähigkeit, proteolytische Enzyme zu synthetisieren, assoziiert. Die proteolytische Degradation von Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Kontakten durch Proteinasen ermöglicht das Auswandern der Tumorzellen aus dem Tumorverband. Neben zahlreichen Wachstumsfaktoren können auch einzelne Komponenten der extrazellulären Matrix, wie Laminin, Fibronectin oder Kollagen, durch Interaktion mit Integrinen die Expression proteolytischer Enzyme, z. B. von MMP-2 und MMP-9, induzieren (Turpeenniemi-Hujanen *et al.*, 1986; Azzam *et al.*, 1992; Seltzer *et al.*, 1994; Khan *et al.*, 1997; Xie *et al.*, 1998).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob Hyaluronsäure ursächlich in die Entstehung invasiver Eigenschaften involviert sein kann. Es konnte zunächst gezeigt werden, daß Hyaluronsäure in einer murinen metastatischen Lungenkarzinomzelllinie die Expression von MMP-13 und MMP-9 induziert. In der vorliegenden Arbeit habe ich mich dann auf die Regulation von MMP-9 durch Hyaluronsäure konzentriert, da dieser Matrixmetalloproteinase in zahlreichen experimentellen und funktionellen Studien eine wesentliche Bedeutung bei der Invasivität und Metastasierung von Tumorzellen zugeschrieben worden ist (Bernhard *et al.*, 1990; Urbanski *et al.*, 1992; Cottam *et al.*, 1992; Davies *et al.*, 1993; Kossakowska *et al.*, 1993; Canete-Soler *et al.*, 1994; Bernhard *et al.*, 1994 Rao *et al.*, 1996). Die Hyaluronsäure-vermittelte MMP-9-Synthese beruht auf transkriptionelle Aktivierung, in deren Vermittlung der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B involviert ist. Dagegen konnte ich keinen Hinweis auf eine Beteiligung von AP-1 feststellen. Die Verbindung zwischen dem extrazellulären Hyaluronsäure-Signal und den intrazellulären Signaltransduktionswegen wird durch einen Zellmembran-Rezeptor vermittelt, wie aus dem Suramin-Experiment hervorgeht. Die bekannten Hyaluronsäure-Rezeptoren CD44 oder RHAMM sind jedoch für die Hyaluronsäure-vermittelte MMP-9-Aktivierung nicht notwendig.

## 4.2 Hyaluronsäure-vermittelte Signaltransduktion

Der Promotor des murinen MMP-9-Gen weist vier mutmaßliche Konsensussequenzen für Bindungsstellen des Transkriptionsfaktors AP-1 sowie potentielle Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B, Ets/PEA3, Rb und Sp-1 auf (Masure *et al.*, 1993). Zahlreiche Veröffentlichungen über die transkriptionelle Regulation von MMP-9 durch Onkogen-Produkte, Tumorpromotoren oder Wachstumsfaktoren belegten eine Beteiligung von AP-1 an der Regulation von MMP-9. So war zu vermuten, daß auch Hyaluronsäure die transkriptionelle Aktivierung von MMP-9 über einen AP-1-abhängigen Mechanismus vermittelt. Die Annahme wurde ferner durch die Beobachtung gestützt, daß Hyaluronsäure in Nieren-Epithelzellen AP-1-Aktivität induzieren kann (Oertli *et al.*, 1998). Allerdings konnte in 3LL-Zellen nach Hyaluronsäure-Behandlung weder eine transkriptionelle Aktivierung der AP-1-Komponenten *c-jun* und *c-fos* festgestellt werden, noch eine Aktivierung von MAP-Kinasen, die durch Phosphorylierung der AP-1-Proteine deren Transaktivierungspotentiale erhöhen können. Es zeigte sich aber, daß Hyaluronsäure NF- $\kappa$ B-Aktivität induzieren kann. Diese Aktivierung ist möglicherweise für die Expression von MMP-9 notwendig, da deren Inhibition durch TPCK, einen Serin-Protease-Inhibitor (Schoellmann und Shaw, 1963), die Hyaluronsäure-abhängige MMP-9-Transkription blockiert. TPCK hemmt unter anderem die Proteosomen-abhängige Degradation der Inhibitor- $\kappa$ B-Proteine. Auf diese Weise bleibt die inhibitorische Funktion der I $\kappa$ B-Proteine auf NF- $\kappa$ B erhalten, was dazu führt, daß der Transkriptionsfaktor im Zytoplasma verbleibt und seine nukleäre transkriptionelle Aktivierung nicht ausüben kann (Henkel *et al.*, 1993). Aufgrund der breiten Spezifität von TPCK kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß möglicherweise ein paralleler Signaltransduktionsweg, der für die Hyaluronsäure-vermittelte Aktivierung von MMP-9 notwendig ist, blockiert wird. Durch exogene Überexpression eines konstitutiv-aktiven I $\kappa$ B $\alpha$  ließe sich eindeutig feststellen, ob NF- $\kappa$ B-Aktivierung für die Hyaluronsäure-abhängige Expression von MMP-9 benötigt wird. Auffällig ist, daß nach Hyaluronsäure-Behandlung NF- $\kappa$ B-Aktivität bereits nach einer Stunde, MMP-9-spezifische mRNA aber erst nach sechs Stunden zu detektieren ist. Dies läßt die Möglichkeit zu, daß MMP-9 nicht das unmittelbare Zielgen von NF- $\kappa$ B ist, sondern daß NF- $\kappa$ B die Synthese eines Faktors induziert, der sezerniert wird und über einen autokrinen Wirkmechanismus für die transkriptionelle Aktivierung von MMP-9 verantwortlich ist.

Die Beobachtung, daß die Inhibition der Proteinbiosynthese durch Emetin in 3LL-Zellen zu einer dramatischen Akkumulation von MMP-9-mRNA führte, läßt mehrere Erklärungen zu.



MMP-9-mRNA würde konstitutiv synthetisiert und besäße dabei eine extrem kurze Halbwertszeit, die von einem ständig nachzuliefernden Protein bestimmt wird. Durch Blockierung der Proteinsynthese würde dann die MMP-9-mRNA stabilisiert. Auch wäre denkbar, daß in nicht-stimulierten Zellen kurzlebige, negativ regulierende Transkriptionsfaktoren die transkriptionelle Aktivierung von MMP-9 blockieren, die nach Hemmung der *de novo* Proteinsynthese wegfallen würden. Für die zweite Alternative spricht, daß ich zeigen konnte, daß die Induktion von MMP-9 nach Hyaluronsäure durch Inhibition der Transkription verhindert wird. Eine Hyaluronsäure-vermittelte Signaltransduktion könnte mit diesen negativen Regulationsmechanismen interferieren. Um solche potentielle Elemente zu finden, habe ich die Hyaluronsäure-vermittelte Promotor-Aktivierung von MMP-9 in 3LL-Zellen mittels transienter Transfektionen eines Promotorkonstruktes, in dem 1200 Bp der 5'-flankierenden Region des murinen MMP-9-Gens ein Reportergen kontrollieren und u. a. die Konsensussequenzen für AP-1 und NF- $\kappa$ B enthält, untersucht (siehe auch Abb. 3). Es gelang mir jedoch mit dem verwendeten Promotorkonstrukt nicht, durch Zugabe von Hyaluronsäure eine transkriptionelle Aktivierung des Reportergens zu erreichen. Möglicherweise ist NF- $\kappa$ B alleine nicht ausreichend für die Aktivierung des MMP-9-Promotors und das verwendete Promotorfragment beinhaltet nicht die cis-wirkenden Elemente, die für die Hyaluronsäure-vermittelte Aktivierung erforderlich sind. Oder aber die Aktivierung des endogenen MMP-9-Gens durch Hyaluronsäure wird durch Chromatineffekte entscheidend reguliert.

Für verschiedene Proteinbiosynthese-Inhibitoren konnte gezeigt werden, daß sie Signaltransduktionswege induzieren können. Beispielsweise aktivieren Anisomyzin oder Zykloheximid die Jun-N-terminale Kinase JNK/SAPK. Dieser Effekt wurde nicht mit Emetin beobachtet (Iordanov *et al.*, 1997). Möglich wäre, daß auch Emetin Signaltransduktionswege stimuliert, die zu der beobachteten starken Synthese von MMP-9-mRNA führte.

### **4.3 Die Bedeutung von CD44 und RHAMM in der Hyaluronsäure-abhängigen Aktivierung von MMP-9**

CD44 und RHAMM sind zur Zeit die einzigen bekannten Hyaluronsäure-Rezeptoren, denen Funktionen bei der Tumorgenese und dem Metastasierungsprozeß zugeschrieben worden sind (Übersicht in Naor *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998).

#### **4.3.1 Die Beteiligung von CD44 an der Hyaluronsäure-vermittelten Expression von MMP-9**

In zahlreichen Veröffentlichungen ist CD44 mit Prozessen in Zusammenhang gebracht worden, in denen Proliferation und Zellmigration wesentliche Merkmale sind, z. B. während der Embryonalentwicklung (Gakunga *et al.*, 1997), bei Immunreaktionen (DeGrendele *et al.*, 1996) und in der Tumorgenese (Übersicht in Naor *et al.*, 1997). So ist z. B. die Migration Antigen-stimulierter dendritischer Zellen CD44-abhängig; die Auswanderung aktivierter Langerhans Zellen aus der Epidermis kann durch anti-CD44-Antikörper blockiert werden (Weiß *et al.*, 1997). Die Fos- oder EGF-stimulierte Migrationsfähigkeit immortalisierter Fibroblasten kann durch Verhinderung der Expression von CD44 signifikant reduziert werden (Lamb *et al.*, 1997).

Die beschriebenen Funktionen von CD44, vor allem in Bezug auf Hyaluronsäure-Bindung und Beteiligung an migratorischen Prozessen, ließen CD44 als möglichen Vermittler der Hyaluronsäure-abhängigen Expression von MMP-9 erscheinen. Dementsprechend konnte gezeigt werden, daß die Bindung löslicher Hyaluronsäure auf der Oberfläche von 3LL-Zellen CD44-abhängig ist. Sowohl in 3LL-Zellen, in denen durch anti-CD44-Antikörper die Hyaluronsäure-Bindung von CD44 blockiert wurde, als auch in CD44-defizienten Fibroblasten war jedoch die Hyaluronsäure-induzierte Expression von MMP-9 nicht beeinträchtigt. Der Schluß ist daher gerechtfertigt, daß CD44 nicht für die Vermittlung der Hyaluronsäure-induzierten gelatinolytischen Aktivität benötigt wird.

Die Feststellung, daß CD44-defiziente Mäuse keinen abnormalen Phänotyp zeigen (Protin *et al.*, 1999), hingegen transgene Mäuse, in denen die Expression von CD44 in der Dermis und dem Epithelium der Kornea reprimiert ist, distinkte morphologische Veränderungen der basalen Keratinozyten und der Kornea aufweisen (Kaya *et al.*, 1997), läßt vermuten, a) daß CD44 in der Haut und der Kornea für die Katabolisierung von Hyaluronsäure wichtig ist, und b) daß in CD44-defizienten Mäusen die Funktionen von CD44 durch einen (oder mehrere) unbekannt(e)n Hyaluronsäure-Rezeptor(en) ersetzt werden.

### 4.3.2 Die Funktion von RHAMM

Der zweite publizierte Hyaluronsäure-Rezeptor, RHAMM, wurde als Rezeptor beschrieben, der durch Bindung an Hyaluronsäure Signaltransduktionsprozesse induzieren und Zellmigration initiieren kann (Hall *et al.*, 1994; Hall *et al.*, 1996).

Polyklonale Antikörper, die in unserem Labor gegen die „repeat“-Region von murinem RHAMM hergestellt worden sind, detektierten in einer Western-Blot-Analyse mit Zellysaten der murinen Zelllinien NIH3T3, KLN205 und 3LL ein Protein mit einem Molekulargewicht von 95 kDa, und zusätzlich in 3LL-Zellen ein Protein mit 105 kDa. Immunfluoreszenz-Analysen, die mit demselben Antiserum durchgeführt wurden, zeigten in permeabilisierten Zellen Färbung intrazellulärer Strukturen, während intakte Zellen nicht markiert wurden. Auch im Gewebekulturüberstand von NIH3T3-Zellen ließ sich RHAMM-Protein nicht nachweisen. Keine dieser Analysen ergab somit einen Hinweis auf eine Zellmembran-assoziierte Lokalisation von RHAMM, und unsere Daten stehen damit im Widerspruch zu bisherigen Veröffentlichungen.

RHAMM-Protein wurde ursprünglich als ein 56 - 58 kDa großes Hyaluronsäure-bindendes Protein aus dem Gewebekulturüberstand muriner Fibroblasten und Fibrosarkomzelllinien isoliert (Turley *et al.*, 1987). Später wurde sein Molekulargewicht mit 70 bzw. 72 kDa angegeben (Entwistle *et al.*, 1995). Ferner sind noch zahlreiche unterschiedliche Molekulargewichte, von 52 bis 125 kDa, für murines RHAMM-Protein beschrieben worden (Hardwick *et al.*, 1992; Samuel *et al.*, 1993; Hall *et al.* 1996). In Immunfluoreszenz-Analysen färbten die ursprünglichen RHAMM-spezifischen Antikörper, die gegen das 56 - 58 kDa große Protein hergestellt worden waren, neben Zellmembran-assoziierten Strukturen auch intrazelluläre Proteine an. So war in transformierten Fibroblasten eine intrazelluläre Lokalisation von RHAMM-Protein, zumeist perinukleär oder mit Aktinfasern assoziiert, zu beobachten. Aktives Ras oder Zugabe von Hyaluronsäure führten zu einer verstärkten Anfärbung Zellmembran-assoziiierter Strukturen (Turley *et al.*, 1990; Hardwick *et al.*, 1992; Entwistle *et al.*, 1995). Es ist folglich anzunehmen, daß diese Antikörper eine heterogene Familie immunologisch verwandter Proteine erkennen, von denen ein oder mehrere Proteine mit der Zellmembran assoziiert sein könnten.

Die cDNA-Sequenzen, die dem 56 - 58 kDa großen (Hardwick *et al.*, 1992) bzw. dem 70 - 72 kDa RHAMM-Protein (Entwistle *et al.*, 1995) zugrunde lagen, erwiesen sich als unvollständig. Die vervollständigte cDNA-Sequenz hat einen offenen Leserahmen von ca. 2,3 kB und kodiert ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 95 kDa (Hofmann *et al.*, 1998). In

3LL-Zellen ist durch genomisches Rearrangement die Anzahl der repetitiven Einheiten innerhalb der „repeat“-Region von fünf auf acht verändert, wodurch sich das Molekulargewicht dieser Form auf 105 kDa erhöht (Hofmann *et al.*, 1998). Die Ergebnisse unserer Western-Blot-Analysen sind somit in guter Übereinstimmung mit den Molekulargewichten der abgeleiteten Peptidsequenz.

Die aktuelle vollständige cDNA-Sequenz für murines RHAMM enthält keine Sequenzmotive, die eine Zelloberflächen-assoziierte Lokalisation von RHAMM annehmen ließe. In Übereinstimmung hiermit zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit, daß RHAMM ein intrazelluläres Protein mit einem Molekulargewicht von 95 bzw. 105 kDa ist.

Wie in dem Glykosaminoglykan-Bindungsnachweis dargestellt wurde, bindet natives RHAMM-Protein spezifisch an Hyaluronsäure, aber nicht an Heparin oder Chondroitin-Sulfat. Dieses Resultat widerspricht einer Veröffentlichung, in der gezeigt wurde, daß Heparin an ein rekombinant exprimiertes GST-Fusionsprotein, das die Hyaluronsäure-Bindungsdomäne von RHAMM enthält, binden kann (Yang *et al.*, 1994b). Die kontroversen Beobachtungen können in den unterschiedlichen, angewandten Methoden zum Nachweis der Bindung an Glykosaminoglykane begründet liegen. Ein bakteriell exprimiertes Fusionsprotein, das für eine Transblot-Analyse denaturiert und an einer Membran immobilisiert wird, nimmt möglicherweise andere Eigenschaften als das native Protein in einer gepufferter Lösung an. Die in der vorliegenden Arbeit angewandte Methode imitiert annähernd physiologische Bedingungen.

Die zytoplasmatische Lokalisation von murinem RHAMM schloß bereits aus, daß RHAMM als Zelloberflächensensor an der Vermittlung der Hyaluronsäure-abhängigen MMP-9-Expression beteiligt ist. Darüber hinaus zeigten RHAMM-defiziente Fibroblasten nach Hyaluronsäure-Behandlung eine ähnlich starke Akkumulation von MMP-9-mRNA wie Wildtyp-Fibroblasten. Dies legt den Schluß nahe, daß RHAMM weder als Oberflächenmolekül noch als intrazelluläres Molekül für die Aktivierung von MMP-9 durch Hyaluronsäure notwendig ist. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß eines der noch nicht näher charakterisierten Hyaluronsäure-bindenden Proteine, die als Zellmembran-assoziierte Strukturen beschrieben worden sind (Turley *et al.*, 1990; Hardwick *et al.*, 1992), entscheidend die Signaltransduktion der MMP-9-Expression durch Hyaluronsäure vermittelt.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß keiner der bis jetzt charakterisierten Hyaluronsäure-Rezeptoren, CD44 und RHAMM, für die Hyaluronsäure-abhängige Expression von MMP-9 in 3LL-Zellen und Fibroblasten notwendig ist, da weder in CD44-defizienten noch in RHAMM-defizienten Zellen die Expression von MMP-9 durch Hyaluronsäure beeinträchtigt ist.

#### **4.4 Wie wird die Umwandlung des extrazellulären Hyaluronsäure-Signals in zelluläre Prozesse vermittelt ?**

Hyaluronsäure beeinflusst nukleäre Prozesse unter Beteiligung von Zellmembranrezeptoren über zahlreiche Signaltransduktionswege, z. B. über Aktivierung von MAP-Kinasen (Wang *et al.*, 1998; Khaldoyanidi *et al.*, 1999) oder durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx (Bourguignon *et al.*, 1993; Galluzzo *et al.*, 1995). Neben der Möglichkeit der Zellmembranrezeptor-abhängigen Signaltransduktion wäre auch eine intrazelluläre Wirkungsweise von Hyaluronsäure vorstellbar. So ist schon seit längerem bekannt, daß Hyaluronsäure in spezialisierten Zellen durch Rezeptor-vermittelte Endozytose internalisiert und lysosomal degradiert wird. Dieser Vorgang ist für Hepatozyten, Sinovialzellen, Makrophagen, transformierte Fibroblasten oder Chondrozyten beschrieben worden (Truppe *et al.*, 1977; Culty *et al.*, 1992; Collis *et al.*, 1998; Aguiar *et al.*, 1999). So resorbieren Hepatozyten Hyaluronsäure aus dem Blutkreislauf über einen Mechanismus, der durch HA-LEC vermittelt wird (Zhou *et al.*, 1999). Die Katabolisierung der Hyaluronsäure in Chondrozyten ist CD44-abhängig und dient der Erhaltung der Knorpelmatrix (Aguiar *et al.*, 1999).

Hyaluronsäure ist in allen zellulären Kompartimenten gefunden worden: im Zellkern (Furukawa *et al.*, 1977), in den Zellfortsätzen migrierender Zellen (Collis *et al.*, 1998) oder diffus über das gesamte Zytoplasma verteilt (Entwistle *et al.*, 1996). Als intrazelluläre Proteine mit Hyaluronsäure-Bindungseigenschaften wurden Cdc37 (Grammatikakis *et al.*, 1995), HABP (34 kDa „hyaluronic acid binding protein“; Das *et al.*, 1997) oder RHAMM (Hofmann *et al.*, 1998) beschrieben. Cdc37 und HABP sind Funktionen bei der Regulation des Zellzyklusses bzw. beim Spleißen von prä-mRNA zugeschrieben worden (Grammatikakis *et al.*, 1995; Das *et al.*, 1997). Kürzlich konnte gezeigt werden, daß RHAMM mit Mikrotubuli und Aktinfilamenten interagiert und möglicherweise an der Organisation des Zytoskeletts beteiligt ist (Aßmann *et al.*, 1999). Neben einer Rezeptor-vermittelten Endozytose von Hyaluronsäure, wäre es auch denkbar, daß Hyaluronsäure durch Pinozytose in Abhängigkeit von ihrer Konzentration im extrazellulären Milieu internalisiert würde. Diese Form der Resorption wäre Rezeptor-unabhängig und nur von der extrazellulären Hyaluronsäure-Konzentration abhängig. Ob für die Hyaluronsäure-induzierte

Aktivierung von MMP-9 die Internalisierung von Hyaluronsäure notwendig ist, und inwieweit Hyaluronsäure durch Interaktion mit intrazellulären Hyaluronsäure-bindenden Proteinen das Genexpressionsmuster von Zellen regulieren kann, bedarf der Klärung.

Es ist sehr wahrscheinlich, daß für die Hyaluronsäure-abhängige transkriptionelle Aktivierung von MMP-9 eine Wechselwirkung mit einem Zellmembran-Rezeptor notwendig ist. Die Beobachtung, daß durch Suramin, einem Inhibitor von Ligand-Rezeptor-Interaktionen, die Hyaluronsäure-vermittelte Induktion von MMP-9 verhindert werden konnte, ist ein Indiz für diese Annahme. Suramin, ein polysulfoniertes Naphtylaminderivat des Harnstoffs, bindet und inhibiert eine Reihe von Enzymen und Proteinen unter anderem durch kompetitive Interferenz von Protein-Glykosaminoglykan-Bindungen. Beispielsweise kann Suramin kompetitiv die Bindung Heparin-bindender Wachstumsfaktoren, wie PDGF („platelet derived growth factor“, von Blutplättchen gebildeter Wachstumsfaktor) oder bFGF, an ihren Rezeptor blockieren (zusammengefaßt in Stein, 1993). Möglicherweise interagiert Suramin mit Heparin-bindenden Proteinen auf der Zelloberfläche und unterbindet die Anlagerung von Hyaluronsäure an den Rezeptor und infolgedessen die transkriptionelle Aktivierung von MMP-9. Unter der zuvor genannten Annahme der Beteiligung eines autokrinen Wirkungsmechanismus, würde Suramin die Bindung des sezernierten Faktors an seinen Rezeptor und so die Aktivierung des MMP-9-Gens unterdrücken.

Die in den Untersuchungen verwendete Hyaluronsäure-Präparation stammt aus Hahnenkämmen und hat ein Molekulargewicht von 80 - >600 kDa. Andere Hyaluronsäure-Präparationen mit einem vergleichbaren Molekulargewicht, z. B. aus humanen Nabelschnüren, zeigten den gleichen Effekt, während Healon<sup>®</sup>, eine rein hochmolekulare Hyaluronsäure-Präparation (MW >600 kDa), die Expression von MMP-9 nicht beeinflusste (nicht gezeigt). In anderen Modellen ist gezeigt worden, daß Degradationsprodukte von Hyaluronsäure für die physiologischen Effekte verantwortlich sind, z. B. für die Proliferation von Endothelzellen oder die Ausreifung von Immunzellen, wie Makrophagen oder dendritischen Zellen (McKee *et al.*, 1996; Haegel-Kronenberger *et al.*, 1998). Daher liegt die Vermutung nahe, daß abhängig vom Zelltyp, nur Hyaluronsäure-Moleküle mit bestimmter Größe biologische Aktivität besitzen.

ICAM-1 galt lange Zeit als membranständiger Hyaluronsäure-Rezeptor. Hyaluronsäure-Bindungseigenschaften waren ICAM-1 zugeschrieben worden, da der Rezeptor mittels

Hyaluronsäure-Affinitätschromatographie aus Rattenleberendothelzellen isoliert worden war (McCourt *et al.*, 1994). In einer späteren Publikation wurde allerdings festgestellt, daß ICAM-1 unspezifisch an das Hyaluronsäure-Affinitäts-Sepharoseträgermaterial gebunden hatte, und die Hyaluronsäure-Bindung von ICAM-1 wurde als Artefakt erkannt (McCourt und Gustafson, 1997). Die Hyaluronsäure-Rezeptoren, LYVE-1 und HA-LEC („endocytic hyaluronan receptor (HA) of liver sinusoidal endothelial cells (LECs)“; endozytischer Hyaluronsäure-Rezeptor spezifisch für Endothelzellen der Lebersinoide), die erst kürzlich charakterisiert worden sind, waren während der experimentellen Arbeit noch nicht bekannt und sind deshalb nicht in die Untersuchung mit einbezogen worden. HA-LEC und LYVE-1 weisen ein spezifisches Expressionsmuster auf und es ist nicht bekannt, ob sie in Tumorzellen oder Fibroblasten ausgeprägt werden.

Die Beobachtung, daß 3LL-Zellen nach Inkubation mit anti-CD44-Antikörpern, die mit der Hyaluronsäure-Bindung interferieren, nur noch eine geringe Hyaluronsäure-Bindung zeigen, und diese niedrige Bindungsfähigkeit für die Aktivierung von MMP-9 ausreicht, läßt vermuten, daß der verantwortliche Rezeptor nur in geringem Umfang auf der Zelloberfläche exprimiert ist und/oder eine niedrige Bindekapazität gegenüber der mittel- bis hochmolekularen Hyaluronsäure besitzt.

Für die Isolierung und Charakterisierung dieses noch unbekanntes Hyaluronsäure-Rezeptors sind molekularbiologische und/oder proteinbiochemische Ansätze denkbar:

A) Die meisten Hyaluronsäure-bindenden Proteine weisen innerhalb ihrer Hyaluronsäure-Bindungsdomäne eine signifikante, strukturelle Homologie auf. Basierend auf der Vorstellung, daß der unbekanntes Hyaluronsäure-Rezeptor ebenso eine homologe Bindungsdomäne enthält, könnte man eine cDNA-Bibliothek von 3LL-Zellen und/oder CD44-defizienten Fibroblasten auf positive Klone mit signifikanter Homologie zu den „link“-Domänen der bekannten murinen Hyaluronsäure-Bindungsproteinen testen. Diese Methode wurde für die Identifikation von humanen LYVE-1 angewandt (Banerji *et al.*, 1999).

B) Unter der Annahme, daß der unbekanntes Hyaluronsäure-Rezeptor nur gering auf der Zelloberfläche exprimiert ist und/oder eine niedrige Affinität gegenüber Hyaluronsäure aufweist, müßte ein proteinbiochemischer Ansatz im besonderen Maße sowohl sensitiv als auch spezifisch sein. Eine Erhöhung der Spezifität wäre zu erreichen, indem man zuerst feststellt, welche Molekülgröße der Hyaluronsäure die biologische Aktivität vermittelt. Partiiell verdaute Hyaluronsäure könnte über Säulenausschlußchromatographie nach Molekülgrößen fraktioniert

werden. Hyaluronsäure aus der Fraktion mit der höchsten Affinität würde dann derart modifiziert, daß eine kovalente Fixierung der modifizierten Gruppen mit dem Protein durch z. B. UV-Bestrahlung ermöglicht würde. Dieses Verfahren wurde für die Isolation von HA-LEC angewandt (Yannariello-Brown *et al.*, 1992) und wäre, durch radioaktive Markierung der modifizierten Gruppen, anfangs geeignet Hyaluronsäure-bindende Proteine nachzuweisen. Durch Verwendung biotinylierter, modifizierter Hyaluronsäure könnte man eine Anreicherung der gesuchten Proteine erzielen. Die Identität der Proteine könnte dann über massenspektrometrische Methoden und Mikrosequenzierung ermittelt werden.

## **4.5 Die mögliche physiologische Relevanz der Hyaluronsäure vermittelten**

### **Synthese von MMP-9 in 3LL-Tumoren**

In zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Modellen konnte eine positive Korrelation zwischen MMP-9-Aktivität und Tumorinvasivität sowie Metastasierung gezeigt werden (Bernhard *et al.*, 1990; Urbanski *et al.*, 1992; Cottam *et al.*, 1992; Davies *et al.*, 1993; Kossakowska *et al.*, 1993; Canete-Soler *et al.*, 1994; Bernhard *et al.*, 1994 Rao *et al.*, 1996). MMP-9 wird in Tumoren sowohl von Tumorzellen als auch vom umgebenden Stroma, wie Fibroblasten oder Makrophagen, exprimiert (Pyke *et al.* 1992; Kossakowska *et al.*, 1993; Canete-Soler *et al.*, 1994; Zeng und Guillem, 1996; Borchers *et al.*, 1997). In MMP-9-defizienten Mäusen findet man im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine drastische Reduktion der Metastasierungsfähigkeit von Lewis-Lungen-Karzinomen (LLC). Da überdies im LLC-Tumor, nicht aber in *in vitro* kultivierten LLC-Zellen, gelatinolytische Aktivität nachgewiesen werden konnte, wurde vermutet, daß *in vivo* nicht die LLC-Zellen, sondern die Tumor-assoziierte Fibroblasten oder Makrophagen MMP-9 synthetisieren (Itoh *et al.*, 1999).

Die 3LL-Zellen, die ich in meinen Untersuchungen verwendet habe, können auch nachdem sie aus dem Tumor in Kultur gebracht worden sind, MMP-9 nach Hyaluronsäure-Stimulation synthetisieren, was durch positive Selektion Neomycin-resistenter 3LL-Tumor-Zellen gezeigt werden konnte. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß *in vivo* auch die Stromazellen des Tumorverbandes MMP-9 synthetisieren. *In situ* Hybridisierungen von 3LL-Tumormaterial mit einer MMP-9-spezifischen Probe könnten darüber Klarheit schaffen. Es ist aber wahrscheinlich, daß die Stromazellen an der enzymatischen Aktivierung von MMP-9 beteiligt sind, denn im Unterschied zu *in vitro* kultivierten Tumorzellen kommt in den 3LL-Tumoren ausschließlich die aktive Form von MMP-9 vor. Es wäre demzufolge denkbar, daß die



Tumorzellen in den Stromazellen die Synthese proteolytischer Enzyme induzieren, die für die Aktivierung MMP-9 notwendig sind.

Die Beobachtung, daß 3LL-Zellen nach längerer *in vitro* Kultivierung die Eigenschaft der transkriptionellen Aktivierung von MMP-9 durch Hyaluronsäure, verlieren, sie jedoch durch Passage *in vivo* wieder erlangen, läßt vermuten, daß im 3LL-Tumor eine Selektion zugunsten der Tumorzellen mit diesem Merkmal stattfindet. Im Tumor herrschen andere Wachstumsbedingungen als *in vitro* vor, z. B. in Bezug auf die extrazelluläre Umgebung, Versorgung mit Nährstoffen, Wachstumsfaktoren oder Sauerstoff. Es wäre durchaus vorstellbar, daß die *in vivo* Verhältnisse im Tumor für die Transkription von Genen oder post-translationale Modifikation von Proteinen verantwortlich sind, die unter anderem für die Hyaluronsäure-vermittelte Expression von MMP-9 notwendig sind, und die sich durch *in vitro*-Kultivierung verlieren. So binden bestimmte Zellklone von CHO-Zellen („chinese hamster ovary cells“, Chinesische Hamster-Ovarien-Zellen) im soliden Tumor Hyaluronsäure, unter normalen Kulturbedingungen geht diese Fähigkeit verloren. Durch Reduktion der Glukose-Konzentration im Kulturmedium kann die Hyaluronsäure-Bindungsfähigkeit wieder induziert werden. Die Hyaluronsäure-Bindung ist CD44-vermittelt und wird vom Glykosylierungsmuster von CD44 bestimmt. (Zheng *et al.*, 1997). Die Hyaluronsäure-Bindungsfähigkeit von induzierbaren und nicht-induzierbaren 3LL-Zellen ist gleich gut. In 3LL-Zellen, die nicht mehr mit der Expression von MMP-9 nach Hyaluronsäure-Behandlung reagieren konnten, konnte diese Eigenschaft auch nicht durch reduzierte Glukose-Bedingungen wieder erlangt werden (Daten nicht gezeigt). Möglichenfalls sind daher andere Faktoren, als beispielsweise die Versorgung mit Glukose, für die Rekonstitution der Hyaluronsäure-vermittelten Synthese von MMP-9 in 3LL-Tumoren verantwortlich.

Hyaluronsäure kann in Tumorzellen die Synthese proteolytischer Enzyme, wie MMP-9, MMP-13 und u-PA, induzieren. Mit diesem Versuchsansatz werden zum ersten Mal Hinweise darauf gegeben, daß Hyaluronsäure an der Entstehung invasiver Eigenschaften beteiligt sein kann.



## 5. Literaturverzeichnis

- Adams, J. C. und Watt, F. M.** (1993) Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development*, **117**, 1183-1198.
- Aguilar, D. J., Knudson, W. und Knudson, C. B.** (1999) Internalization of the hyaluronan receptor CD44 by chondrocytes. *Exp. Cell. Res.*, **252**, 292-302.
- Alexander, C. M. und Werb, Z.** (1989) Proteinases and extracellular matrix remodeling. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **1**, 974-982.
- Andersson, P., Goldfarb, M. P. und Weinberg, R. A.** (1979) A defined subgenomic fragment of in vitro synthesized Moloney sarcoma virus DNA can induce cell transformation upon transfection. *Cell*, **16**, 63-75.
- Angel, P., Allegretto, E. A., Okino, S. T., Hattori, K., Boyle, W. J., Hunter, T. und Karin, M.** (1988a) Oncogene *jun* encodes a sequence-specific trans-activator similar to AP-1. *Nature*, **332**, 166-171.
- Angel, P., Baumann, I., Stein, B., Delius, H., Rahmsdorf, H. J. und Herrlich, P.** (1987a) 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5'-flanking region. *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 2256-2266.
- Angel, P., Hattori, K., Smeal, T. und Karin, M.** (1988b) The *jun* proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell*, **55**, 875-885.
- Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R. J., Rahmsdorf, H. J., Jonat, C., Herrlich, P. und Karin, M.** (1987b) Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell*, **49**, 729-739.
- Anisowicz, A., Messineo, M., Lee, S. W. und Sager, R.** (1991) An NF- $\kappa$ B-like transcription factor mediates IL-1/TNF- $\alpha$  induction of *gro* in human fibroblasts. *J. Immunol.*, **147**, 520-527.
- Arch, R., Wirth, K., Hofmann, M., Ponta, H., Matzku, S., Herrlich, P. und Zöller, M.** (1992) Participation in normal immune responses of a metastasis-inducing splice variant of CD44 [see comments]. *Science*, **257**, 682-685.
- Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C. B. und Seed, B.** (1990) CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell*, **61**, 1303-1313.
- Abmann, V., Jenkinson, D., Marshall, J. F. und Hart, I. R.** (1999) The intracellular hyaluronan receptor RHAMM/IHABP interacts with microtubules and actin filaments. *J. Cell. Sci.*, **112**, 3943-3954.
- Azzam, H. S. und Thompson, E. W.** (1992) Collagen-induced activation of the M(r) 72,000 type IV collagenase in normal and malignant human fibroblastoid cells. *Cancer Res.*, **52**, 4540-4544.
- Backstrom, J. R., Lim, G. P., Cullen, M. J. und Tokes, Z. A.** (1996) Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is synthesized in neurons of the human hippocampus and is capable of degrading the amyloid-beta peptide (1-40). *J. Neurosci.*, **16**, 7910-7919.
- Bader, J. P. und Steck, T. L.** (1969) Analysis of the ribonucleic acid of murine leukemia virus. *J. Virol.*, **4**, 454-459.
- Banerji, S., Ni, J., Wang, S. X., Clasper, S., Su, J., Tammi, R., Jones, M. und Jackson, D. G.** (1999) LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J. Cell. Biol.*, **144**, 789-801.

- Banyai, L., Tordai, H. und Patthy, L.** (1994) The gelatin-binding site of human 72 kDa type IV collagenase (gelatinase A). *Biochem. J.*, **298**, 403-407.
- Baragi, V. M., Fliszar, C. J., Conroy, M. C., Ye, Q. Z., Shipley, J. M. und Welgus, H. G.** (1994) Contribution of the C-terminal domain of metalloproteinases to binding by tissue inhibitor of metalloproteinases. C-terminal truncated stromelysin and matrilysin exhibit equally compromised binding affinities as compared to full-length stromelysin. *J. Biol. Chem.*, **269**, 12692-12697.
- Barsky, S. H., Siegal, G. P., Jannotta, F. und Liotta, L. A.** (1983) Loss of basement membrane components by invasive tumors but not by their benign counterparts. *Lab. Invest.*, **49**, 140-147.
- Bartolazzi, A., Jackson, D., Bennett, K., Aruffo, A., Dickinson, R., Shields, J., Whittle, N. und Stamenkovic, I.** (1995) Regulation of growth and dissemination of a human lymphoma by CD44 splice variants. *J. Cell Sci.*, **108**, 1723-1733.
- Bartolazzi, A., Peach, R., Aruffo, A. und Stamenkovic, I.** (1994) Interaction between CD44 and hyaluronate is directly implicated in the regulation of tumor development. *J. Exp. Med.*, **180**, 53-66.
- Benbrook, D. M. und Jones, N.C.** (1990) Heterodimer formation between CREB and JUN proteins. *Oncogene*, **5**, 295-302.
- Bernhard, E. J., Gruber, S. B. und Muschel, R. J.** (1994) Direct evidence linking expression of matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/collagenase) to the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **91**, 4293-4297.
- Bernhard, E. J., Muschel, R. J. und Hughes, E. N.** (1990) Mr 92,000 gelatinase release correlates with the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells. *Cancer Res.*, **50**, 3872-3877.
- Bertram, J. S. und Janik, P.** (1980) Establishment of a cloned line of Lewis Lung Carcinoma cells adapted to cell culture. *Cancer Lett.*, **11**, 63-73.
- Birk, D. E., Silver, F. H., Trelstad, R. L.** (1991) Matrix assembly. In *Cell Biology of Extracellular Matrix*, Hay, E. D. (ed.), 2nd ed., pp. 221-254. New York: Plenum Press.
- Birkedal-Hansen, H., Moore, W. G., Boddien, M. K., Windsor, L. J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A. und Engler, J. A.** (1993) Matrix metalloproteinases: a review. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.*, **4**, 197-250.
- Bode, W.** (1995) A helping hand for collagenases: the haemopexin-like domain. *Structure.*, **3**, 527-530.
- Bohmann, D., Bos, T. J., Admon, A., Nishimura, T., Vogt, P. K. und Tjian, R.** (1987) Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science*, **238**, 1386-1392.
- Bond, M., Fabunmi, R. P., Baker, A. H. und Newby, A. C.** (1998) Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines: an absolute requirement for transcription factor NF-kappa B. *FEBS Lett.*, **435**, 29-34.
- Borchers, A. H., Steinbauer, H., Schafer, B. S., Kramer, M., Bowden, G. T. und Fusenig, N. E.** (1997) Fibroblast-directed expression and localization of 92-kDa type IV collagenase along the tumor-stroma interface in an in vitro three-dimensional model of human squamous cell carcinoma. *Mol. Carcinog.*, **19**, 258-266.
- Bos, T. J., Bohmann, D., Tsuchie, H., Tjian, R. und Vogt, P. K.** (1988) v-jun encodes a nuclear protein with enhancer binding properties of AP-1. *Cell*, **52**, 705-712.

- Bourguignon, L. Y., Gunja-Smith, Z., Iida, N., Zhu, H. B., Young, L. J., Muller, W. J. und Cardiff, R. D.** (1998) CD44v(3,8-10) is involved in cytoskeleton-mediated tumor cell migration and matrix metalloproteinase (MMP-9) association in metastatic breast cancer cells. *J. Cell. Physiol.*, **176**, 206-215.
- Bourguignon, L.Y., Lokeshwar, V.B., Chen, X. und Kerrick, W.G.** (1993) Hyaluronic acid-induced lymphocyte signal transduction and HA receptor (GP85/CD44)-cytoskeleton interaction. *J. Immunol.*, **151**, 6634-6644.
- Bourguignon, L. Y., Lokeshwar, V. B., He, J., Chen, X. und Bourguignon, G. J.** (1992) A CD44-like endothelial cell transmembrane glycoprotein (GP116) interacts with extracellular matrix and ankyrin. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 4464-4471.
- Brooks, P. C., Stromblad, S., Sanders, L. C., von Schalscha, T. L., Aimes, R. T., Stetler-Stevenson, W. G., Quigley, J. P. und Cheresch, D. A.** (1996) Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell*, **85**, 683-693.
- Brown, T. A., Bouchard, T., St. John, T., Wayner, E. und Carter, W. G.** (1991) Human keratinocytes express a new CD44 core protein (CD44E) as a heparan-sulfate intrinsic membrane proteoglycan with additional exons. *J. Cell Biol.*, **113**, 207-221.
- Budd, R. C., Cerottini, J. C. und MacDonald, H. R.** (1987) Phenotypic identification of memory cytolytic T lymphocytes in a subset of Lyt-2+ cells. *J. Immunol.*, **138**, 1009-1013.
- Canete-Soler, R., Gui, Y. H., Linask, K. K. und Muschel, R. J.** (1995) MMP-9 (gelatinase B) mRNA is expressed during mouse neurogenesis and may be associated with vascularization. *Brain. Res. Dev. Brain. Res.*, **88**, 37-52.
- Canete-Soler, R., Gui, Y. H., Linask, K. K. und Muschel, R. J.** (1995) Developmental expression of MMP-9 (gelatinase B) mRNA in mouse embryos. *Dev. Dyn.*, **204**, 30-40.
- Canete-Soler, R., Litzky, L., Lubensky, I. und Muschel, R. J.** (1994) Localization of the 92 kd gelatinase mRNA in squamous cell and adenocarcinomas of the lung using in situ hybridization. *Am. J. Pathol.*, **144**, 518-527.
- Carter, W. G. und Wayner, E. A.** (1988) Characterization of the class III collagen receptor, a phosphorylated, transmembrane glycoprotein expressed in nucleated human cells. *J. Biol. Chem.*, **263**, 4193-4201.
- Chaudhry, A., Gobl, A., Eriksson, B., Skogseid, B. und Oberg, K.** (1994) Different splice variants of CD44 are expressed in gastrinomas but not in other subtypes of endocrine pancreatic tumors. *Cancer. Res.*, **54**, 981-986.
- Cohen, D. R., Ferreira, P. C., Gentz, R., Franza, B. R., Jr. und Curran, T.** (1989) The product of a fos-related gene, fra-1, binds cooperatively to the AP-1 site with Jun: transcription factor AP-1 is comprised of multiple protein complexes. *Genes and Dev.*, **3**, 173-184.
- Collis, L., Hall, C., Lange, L., Ziebell, M., Prestwich, R. und Turley, E. A.** (1998) Rapid hyaluronan uptake is associated with enhanced motility: implications for an intracellular mode of action. *FEBS Lett.*, **440**, 444-449.
- Cottam, D. W., Rennie, I. G., Woods, K., Parsons, M. A., Bunning, R. A. und Rees, R. C.** (1992) Gelatinolytic metalloproteinase secretion patterns in ocular melanoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **33**, 1923-1927.

- Crainie, M., Belch, A. R., Mant, M. J. und Pilarski, L. M. (1999)** Overexpression of the receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM) characterizes the malignant clone in multiple myeloma: identification of three distinct RHAMM variants. *Blood*, **93**, 1684-1696.
- Culty, M., Nguyen, H. A. und Underhill, C. B. (1992)** The hyaluronan receptor (CD44) participates in the uptake and degradation of hyaluronan. *J. Cell Biol.*, **116**, 1055-1062.
- Dano, K., Andreasen, P. A., Grondahl-Hansen, J., Kristensen, P., Nielsen, L. S. und Skriver, L. (1985)** Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv. Cancer Res.*, **44**, 139-266.
- Das, S., Deb, T. B., Kumar, R. und Datta, K. (1997)** Multifunctional activities of human fibroblast 34-kDa hyaluronic acid-binding protein. *Gene*, **190**, 223-225.
- Davies, B., Waxman, J., Wasan, H., Abel, P., Williams, G., Krausz, T., Neal, D., Thomas, D., Hanby, A. und Balkwill, F. (1993)** Levels of matrix metalloproteases in bladder cancer correlate with tumor grade and invasion. *Cancer Res.*, **53**, 5365-5369.
- De la Torre, M., Wells, A. F., Bergh, J. und Lindgren, A. (1993)** Localization of hyaluronan in normal breast tissue, radial scar, and tubular breast carcinoma. *Hum. Pathol.*, **24**, 1294-1297.
- DeGrendele, H. C., Estess, P., Picker, L. J. und Siegelman, M. H. (1996)** CD44 and its ligand hyaluronate mediate rolling under physiologic flow: a novel lymphocyte-endothelial cell primary adhesion pathway. *J. Exp. Med.*, **183**, 1119-1130.
- Derijard, B., Hibi, M., Wu, I. H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M. und Davis, R. J. (1994)** JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell*, **76**, 1025-1037.
- Dower, W. J., Miller, J. F. und Ragsdale, C. W. (1988)** High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 6127-6145.
- Duffy, M. J., Reilly, D., O'Sullivan, C., O'Higgins, N., Fennelly, J. J. und Andreasen, P. (1990)** Urokinase-plasminogen activator, a new and independent prognostic marker in breast cancer. *Cancer Res.*, **50**, 6827-6829.
- Entwistle, J., Hall, C.L. und Turley, E. A. (1996)** HA receptors: regulators of signalling to the cytoskeleton. *J. Cell. Biochem.*, **61**, 569-577.
- Entwistle, J., Zhang, S., Yang, B., Wong, C., Li, Q., Hall, C. L., A, J., Mowat, M., Greenberg, A. H. und Turley, E. A. (1995)** Characterization of the murine gene encoding the hyaluronan receptor RHAMM. *Gene*, **163**, 233-238.
- Farina, A. R., Tacconelli, A., Vacca, A., Maroder, M., Gulino, A. und Mackay, A. R. (1999)** Transcriptional up-regulation of matrix metalloproteinase-9 expression during spontaneous epithelial to neuroblast phenotype conversion by SK-N-SH neuroblastoma cells, involved in enhanced invasivity, depends upon GT-box and nuclear factor kappaB elements. *Cell. Growth and Differ.*, **10**, 353-367.
- Favata, M. F., Horiuchi, K. Y., Manos, E. J., Daulerio, A. J., Stradley, D. A., Feeser, W. S., Van Dyk, D. E., Pitts, W. J., Earl, R. A., Hobbs, F., Copeland, R. A., Magolda, R. L., Scherle, P. A. und Trzaskos, J. M. (1998)** Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J. Biol. Chem.*, **273**, 18623-18632.
- Feinberg, A. P. und Vogelstein, B. (1983)** A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, **132**, 6-13.
- Fieber, C., Plug, R., Sleeman, J., Dall, P., Ponta, H. und Hofmann, M. (1999)** Characterisation of the murine gene encoding the intracellular hyaluronan receptor IHABP (RHAMM). *Gene*, **226**, 41-50.

- Fieber, C.** (1996) Analyse der gewebespezifischen Expression der Hyaluronsäure-Rezeptoren CD44, RHAMM, ICAM-1 and BEHAB in der Maus (*mus musculus*) *Diplomarbeit*, ausgeführt am Institut für Genetik des Forschungszentrums Karlsruhe.
- Fort, P., Marty, L., Piechaczyk, M., el Sabrouly, S., Dani, C., Jeanteur, P. und Blanchard, J. M.** (1985) Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase multigenic family. *Nucleic Acids Res.*, **13**, 1431-1442.
- Franzoso, G., Bours, V., Park, S., Tomita-Yamaguchi, M., Kelly, K. und Siebenlist, U.** (1992) The candidate oncoprotein Bcl-3 is an antagonist of p50/NF- $\kappa$ B-mediated inhibition. *Nature*, **359**, 339-342.
- Furukawa, K. und Terayama, H.** (1977) Isolation and identification of glycosaminoglycans associated with purified nuclei from rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, **499**, 278-289.
- Gack, S., Vallon, R., Schaper, J., R  ther, U. und Angel, P.** (1994) Phenotypic alterations in *fos*-transgenic mice correlate with changes in Fos/Jun-dependent collagenase type I expression. Regulation of mouse metalloproteinases by carcinogens, tumor promoters, cAMP, and Fos oncoprotein. *J. Biol. Chem.*, **269**, 10363-10369.
- Gakunga, P., Frost, G., Shuster, S., Cunha, G., Formby, B. und Stern, R.** (1997) Hyaluronan is a prerequisite for ductal branching morphogenesis. *Development*, **124**, 3987-3997.
- Galluzzo, E., Albi, N., Fiorucci, S., Merigiola, C., Ruggeri, L., Tosti, A., Grossi, C. E. und Velardi, A.** (1995) Involvement of CD44 variant isoforms in hyaluronate adhesion by human activated T cells. *Eur. J. Immunol.*, **25**, 2932-2939.
- Goldstein, L. A., Zhou, D. F., Picker, L. J., Minty, C. N., Bargatze, R. F., Ding, J. F. und Butcher, E. C.** (1989) A human lymphocyte homing receptor, the hermes antigen, is related to cartilage proteoglycan core and link proteins. *Cell*, **56**, 1063-1072.
- Gorman, C.** (1985) High efficiency gene transfer into mammalian cells In: *A Practical Approach*, Glover, D. M. (ed.), *DNA Cloning*: pp. 143-190 Oxford: IRL Press
- Grammatikakis, N., Grammatikakis, A., Yoneda, M., Yu, Q., Banerjee, S. D. und Toole, B.P.** (1995) A novel glycosaminoglycan-binding protein is the vertebrate homologue of the cell cycle control protein, Cdc37. *J. Biol. Chem.*, **270**, 16198-16205.
- Gum, R., Lengyel, E., Juarez, J., Chen, J. H., Sato, H., Seiki, M. und Boyd, D.** (1996) Stimulation of 92-kDa gelatinase B promoter activity by ras is mitogen-activated protein kinase kinase 1-independent and requires multiple transcription factor binding sites including closely spaced PEA3/ets and AP-1 sequences. *J. Biol. Chem.*, **271**, 10672-10680.
- Gum, R., Wang, H., Lengyel, E., Juarez, J. und Boyd, D.** (1997) Regulation of 92 kDa type IV collagenase expression by the jun aminoterminal kinase- and the extracellular signal-regulated kinase- dependent signaling cascades. *Oncogene*, **14**, 1481-1493.
- Gupta, S., Campbell, D., Derijard, B. und Davis, R. J.** (1995) Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science*, **267**, 389-393.
- Haegel-Kronenberger, H., de la Salle, H., Bohbot, A., Oberling, F., Cazenave, J. P. und Hanau, D.** (1998) Adhesive and/or signaling functions of CD44 isoforms in human dendritic cells. *J. Immunol.*, **161**, 3902-3911.
- Hai, T. und Curran, T.** (1991) Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **88**, 3720-3724.
- Hall, C. L., Lange, L. A., Prober, D. A., Zhang, S. und Turley, E. A.** (1996) pp60(c-src) is required for cell locomotion regulated by the hyaluronanreceptor RHAMM. *Oncogene*, **13**, 2213-2224.

- Hall, C.L., Wang, C., Lange, L. A. und Turley, E. A.** (1994) Hyaluronan and the hyaluronan receptor RHAMM promote focal adhesion turnover and transient tyrosine kinase activity. *J. Cell Biol.*, **126**, 575-588.
- Hall, C. L., Yang, B., Yang, X., Zhang, S., Turley, M., Samuel, S., Lange, L. A., Wang, C., Curpen, G. D., Savani, R. C., Greenberg, A. H., und Turley E. A.** (1995) Overexpression of the hyaluronan receptor RHAMM is transforming and is also required for H-ras transformation. *Cell*, **82**, 19-26.
- Hamdy, F. C., Fadlon, E. J., Cottam, D., Lawry, J., Thurrell, W., Silcocks, P. B., Anderson, J. B., Williams, J. L. und Rees, R. C.** (1994) Matrix metalloproteinase 9 expression in primary human prostatic adenocarcinoma and benign prostatic hyperplasia. *Br. J. Cancer*, **69**, 177-182.
- Hardwick, C., Hoare, K., Owens, R., Hohn, H. P., Hook, M., Moore, D., Cripps, V., Austen, L., Nance, D. M. und Turley, E. A.** (1992) Molecular cloning of a novel hyaluronan receptor that mediates tumor cell motility [published erratum appears in J Cell Biol 1992 Aug;118(3):753]. *J. Cell Biol.*, **117**, 1343-1350.
- Hasui, Y., Marutsuka, K., Suzumiya, J., Kitada, S., Osada, Y. und Sumiyoshi, A.** (1992) The content of urokinase-type plasminogen activator antigen as a prognostic factor in urinary bladder cancer. *Int. J. Cancer.*, **50**, 871-873.
- Hathcock, K. S., Hirano, H., Murakami, S. und Hodes, R. J.** (1993) CD44 expression on activated B cells. Differential capacity for CD44-dependent binding to hyaluronic acid. *J. Immunol.*, **151**, 6712-6722.
- He, Q., Lesley, J., Hyman, R., Ishihara, K. und Kincade, P. W.** (1992) Molecular isoforms of murine CD44 and evidence that the membrane proximal domain is not critical for hyaluronate recognition. *J. Cell Biol.*, **119**, 1711-1719.
- Heider, K. H., Dammrich, J., Skroch-Angel, P., Müller-Hermelink, H. K., Vollmers, H. P., Herrlich, P. und Ponta, H.** (1993a) Differential expression of CD44 splice variants in intestinal-and diffuse-type human gastric carcinomas and normal gastric mucosa. *Cancer Res.*, **53**, 4197-4203.
- Heider, K. H., Hofmann, M., Hors, E., van den Berg, F., Ponta, H., Herrlich, P. und Pals, S. T.** (1993b) A human homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44 is expressed in colorectal carcinomas and adenomatous polyps. *J. Cell Biol.*, **120**, 227-233.
- Henkel, T., Machleidt, T., Alkalay, I., Krönke, M., Ben-Neriah, Y. und Baeuerle, P. A.** (1993) Rapid proteolysis of I $\kappa$ B- $\alpha$  is necessary for activation of transcription factor NF- $\kappa$ B. *Nature*, **365**, 182-183.
- Herr, I., van Dam, H. und Angel, P.** (1994) Binding of promoter-associated AP-1 is not altered during induction and subsequent repression of the *c-jun* promoter by TPA and UV irradiation. *Carcinogenesis*, **15**, 1105-1113.
- Hibbs, M. S., Hoidal, J. R. und Kang, A. H.** (1987) Expression of a metalloproteinase that degrades native type V collagen and denatured collagens by cultured human alveolar macrophages. *J. Clin. Invest.*, **80**, 1644-1650.
- Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A. und Karin, M.** (1993) Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes and Dev.*, **7**, 2135-2148.
- Himmelstein, B. P., Lee, E. J., Sato, H., Seiki, M. und Muschel, R. J.** (1997) Transcriptional activation of the matrix metalloproteinase-9 gene in an H-ras and v-myc transformed rat embryo cell line. *Oncogene*, **14**, 1995-1998.



- Hirai, S. I., Ryseck, R. P., Mechta, F., Bravo, R. und Yaniv, M.** (1989) Characterization of junD: a new member of the jun proto-oncogene family. *Embo J.*, **8**, 1433-1439.
- Hirose, T., Patterson, C., Pourmotabbed, T., Mainardi, C. L. und Hasty, K. A.** (1993) Structure-function relationship of human neutrophil collagenase: identification of regions responsible for substrate specificity and general proteinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 2569-2573.
- Hofmann, M., Fieber, C., Aßmann, V., Göttlicher, M., Sleeman, J. P., Plug, R., Howells, N., von Stein, O., Ponta, H. und Herrlich, P.** (1998) Identification of IHABP, a 95 kDa intracellular hyaluronate binding protein. *J. Cell Sci.*, **111**, 1673-1684.
- Howard, E. W. und Banda, M. J.** (1991) Binding of tissue inhibitor of metalloproteinases 2 to two distinct sites on human 72-kDa gelatinase. Identification of a stabilization site. *J. Biol. Chem.*, **266**, 17972-17977.
- Howard, E. W., Bullen, E. C. und Banda, M. J.** (1991) Preferential inhibition of 72- and 92-kDa gelatinases by tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *J. Biol. Chem.*, **266**, 13070-13075.
- Ikebe, T., Takeuchi, H., Jimi, E., Beppu, M., Shinohara, M. und Shirasuna, K.** (1998) Involvement of proteasomes in migration and matrix metalloproteinase-9 production of oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer*, **77**, 578-585.
- Iordanov, M. S., Pribnow D., Magun, J. L., Dinh, T., Pearson, J. A., Chen, S. L. und Magun, B. E.** (1997) Ribotoxic stress response: Activation of the stress-activated protein kinase JNK1 by inhibitors of the peptidyl transferase reaction and by sequence-specific RNA damage to the  $\alpha$ -sarcin/ricin loop in the 28S rRNA. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 3373-3381.
- Itoh, T., Tanioka, M., Matsuda, H., Nishimoto, H., Yoshioka, T., Suzuki, R. und Uehira, M.** (1999) Experimental metastasis is suppressed in MMP-9-deficient mice. *Clin. Exp. Metastasis*, **17**, 177-181.
- Jalkanen, S. und Jalkanen, M.** (1992) Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J. Cell Biol.*, **116**, 817-825.
- Jalkanen, S., Jalkanen, M., Bargatze, R., Tammi, M. und Butcher, E. C.** (1988) Biochemical properties of glycoproteins involved in lymphocyte recognition of high endothelial venules in man. *J. Immunol.*, **141**, 1615-1623.
- Jalkanen, S., Joensuu, H., Soderstrom, K. O. und Klemi, P.** (1991) Lymphocyte homing and clinical behavior of non-Hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Invest.*, **87**, 1835-1840.
- Kalomiris, E. L. und Bourguignon, L. Y.** (1988) Mouse T lymphoma cells contain a transmembrane glycoprotein (GP85) that binds ankyrin. *J. Cell Biol.*, **106**, 319-327.
- Kane, S. E. und Gottesman, M. M.** (1990) The role of cathepsin L in malignant transformation. *Semin. Cancer Biol.*, **1**, 127-136.
- Kang, S. M., Tran, A. C., Grilli, M. und Lenardo, M. J.** (1992) NF- $\kappa$  B subunit regulation in nontransformed CD4+ T lymphocytes. *Science*, **256**, 1452-1456.
- Katoh, S., Zheng, Z., Oritani, K., Shimozato, T. und Kincade, P. W.** (1995) Glycosylation of CD44 negatively regulates its recognition of hyaluronan. *J. Exp. Med.*, **182**, 419-429.
- Kaya, G., Rodriguez, I., Jorcano, J. L., Vassalli, P. und Stamenkovic, I.** (1997) Selective suppression of CD44 in keratinocytes of mice bearing an antisense CD44 transgene driven by a tissue-specific promoter disrupts hyaluronate metabolism in the skin and impairs keratinocyte proliferation. *Genes and Dev.*, **11**, 996-1007.
- Khaldoyanidi, S., Moll, J., Karakhanova, S., Herrlich, P. und Ponta, H.** (1999) Hyaluronate-enhanced hematopoiesis: two different receptors trigger the release of interleukin-1beta and interleukin-6 from bone marrow macrophages. *Blood*, **94**, 940-949.

- Khan, K. M. F. und Falcone, D.J.** (1997) Role of laminin in matrix induction of macrophage urokinase-type plasminogen activator and 92-kDa metalloproteinase expression. *J. Biol. Chem.*, **272**, 8270-8275.
- Knudson, W., Aguiar, D. J., Hua, Q. und Knudson, C. B.** (1996) CD44-anchored hyaluronan-rich pericellular matrices: an ultrastructural and biochemical analysis. *Exp. Cell. Res.*, **228**, 216-228.
- Kossakowska, A. E., Urbanski, S. J., Watson, A., Hayden, L. J. und Edwards, D. R.** (1993) Patterns of expression of metalloproteinases and their inhibitors in human malignant lymphomas. *Oncol. Res.*, **5**, 19-28.
- Kyriakis, J. M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E. A., Ahmad, M. F., Avruch, J. und Woodgett, J. R.** (1994) The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature*, **369**, 156-160.
- Lacy, B. E. und Underhill, C. B.** (1987) The hyaluronate receptor is associated with actin filaments. *J. Cell Biol.*, **105**, 1395-1404.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lamb, R. F., Hennigan, R. F., Turnbull, K., Katsanakis, K. D., MacKenzie, E. D., **Birnie, G. D. und Ozanne, B. W.** (1997) AP-1-mediated invasion requires increased expression of the hyaluronan receptor CD44. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 963-976.
- Lamph, W. W., Wamsley, P., Sassone-Corsi, P. und Verma, I. M.** (1988) Induction of proto-oncogene JUN/AP-1 by serum and TPA. *Nature*, **334**, 629-631.
- Laurent, T. C. und Fraser, J. R.** (1992) Hyaluronan. *Faseb J.*, **6**, 2397-2404.
- Lehrach, H., Frischauf, A. M., Hanahan, D., Wozney, J., Fuller, F., Crkvenjakov, R., Boedtker, H. und Doty, P.** (1978) Construction and characterization of a 2.5-kilobase procollagen clone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **75**, 5417-5421.
- Lesley, J., English, N., Perschl, A., Gregoroff, J. und Hyman, R.** (1995) Variant cell lines selected for alterations in the function of the hyaluronan receptor CD44 show differences in glycosylation. *J. Exp. Med.*, **182**, 431-437.
- Lesley, J., He, Q., Miyake, K., Hamann, A., Hyman, R. und Kincade, P. W.** (1992) Requirements for hyaluronic acid binding by CD44: a role for the cytoplasmic domain and activation by antibody. *J. Exp. Med.*, **175**, 257-266.
- Lesley, J., Hyman, R. und Kincade, P. W.** (1993) CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv. Immunol.*, **54**, 271-335.
- Levy, M. T., McCaughan, G. W., Abbott, C. A., Park, J. E., Cunningham, A. M., Muller, E., Rettig, W. J. und Gorrell, M. D.** (1999) Fibroblast activation protein: a cell surface dipeptidyl peptidase and gelatinase expressed by stellate cells at the tissue remodelling interface in human cirrhosis. *Hepatology*, **29**, 1768-1778.
- Librach, C. L., Werb, Z., Fitzgerald, M. L., Chiu, K., Corwin, N. M., Esteves, R. A., Grobelyny, D., Galardy, R., Damsky, C. H. und Fisher, S. J.** (1991) 92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. *J. Cell Biol.*, **113**, 437-449.
- Liotta, L. A., Steeg, P. S. und Stetler-Stevenson, W. G.** (1991a) Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell*, **64**, 327-336.
- Liotta, L. A. und Stetler-Stevenson, W. G.** (1991) Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res.*, **51**, 5054s-5059s.
- Liotta, L. A., Stetler-Stevenson, W. G. und Steeg, P. S.** (1991b) Cancer invasion and metastasis: positive and negative regulatory elements. *Cancer Invest.*, **9**, 543-551.

- Lokeshwar, B. L., Lokeshwar, V. B. und Block, N. L.** (1995) Expression of CD44 in prostate cancer cells: association with cell proliferation and invasive potential. *Anticancer Res.*, **15**, 1191-1198.
- Lokeshwar, V. B., Fregien, N. und Bourguignon, L. Y.** (1994) Ankyrin-binding domain of CD44(GP85) is required for the expression of hyaluronic acid-mediated adhesion function. *J. Cell Biol.*, **126**, 1099-1109.
- Lowenthal, J. W., Ballard, D. W., Bogerd, H., Bohnlein, E. und Greene, W. C.** (1989) Tumor necrosis factor-alpha activation of the IL-2 receptor-alpha gene involves the induction of kappa B-specific DNA binding proteins. *J. Immunol.*, **142**, 3121-3128.
- Masellis-Smith, A., Belch, A. R., Mant, M. J., Turley, E. A. und Pilarski, L. M.** (1996) Hyaluronan-dependent motility of B cells and leukemic plasma cells in blood, but not of bone marrow plasma cells, in multiple myeloma: alternate use of receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM) and CD44. *Blood*, **87**, 1891-1899.
- Masure, S., Nys, G., Fiten, P., Van Damme, J. und Opdenakker, G.** (1993) Mouse gelatinase B. cDNA cloning, regulation of expression and glycosylation in WEHI-3 macrophages and gene organisation. *Eur. J. Biochem.*, **218**, 129-141.
- Matrisian, L. M.** (1992) The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays*, **14**, 455-463.
- McCourt, P.A., Ek, B., Forsberg, N. und Gustafson, S.** (1994) Intercellular adhesion molecule-1 is a cell surface receptor for hyaluronan. *J. Biol. Chem.*, **269**, 30081-30084.
- McCourt, P. A. und Gustafson, S.** (1997) On the adsorption of hyaluronan and ICAM-1 to modified hydrophobic resins. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **29**, 1179-1189.
- McGuire, P. G. und Alexander, S. M.** (1993) Urokinase production by embryonic endocardial-derived cells: regulation by substrate composition. *Dev. Biol.*, **155**, 442-451.
- McKee, C. M., Lowenstein, C. J., Horton, M. R., Wu, J., Bao, C., Chin, B. Y., Choi, A. M. und Noble, P. W.** (1997) Hyaluronan fragments induce nitric-oxide synthase in murine macrophages through a nuclear factor kappaB-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.*, **272**, 8013-8018.
- McKee, C. M., Penno, M. B., Cowman, M., Burdick, M. D., Strieter, R. M., Bao, C. und Noble, P. W.** (1996) Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. *J. Clin. Invest.*, **98**, 2403-2413.
- Mignatti, P. und Rifkin, D. B.** (1993) Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol. Rev.*, **73**, 161-195.
- Mignatti, P., Robbins, E. und Rifkin, D. B.** (1986) Tumor invasion through the human amniotic membrane: requirement for a proteinase cascade. *Cell*, **47**, 487-498.
- Morimoto, K., Mishima, H., Nishida, T. und Otori, T.** (1993) Role of urokinase type plasminogen activator (u-PA) in corneal epithelial migration. *Thromb. Haemost.*, **69**, 387-391.
- Murphy, G., Nguyen, Q., Cockett, M. I., Atkinson, S. J., Allan, J. A., Knight, C. G., Willenbrock, F. und Docherty, A. J.** (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.
- Murphy, G., Reynolds, J. J., Bretz, U. und Baggiolini, M.** (1982) Partial purification of collagenase and gelatinase from human polymorphonuclear leucocytes. Analysis of their actions on soluble and insoluble collagens. *Biochem. J.*, **203**, 209-221.

- Murphy, G., Willenbrock, F., Ward, R. V., Cockett, M. I., Eaton, D. und Docherty, A. J.** (1992) The C-terminal domain of 72 kDa gelatinase A is not required for catalysis, but is essential for membrane activation and modulates interactions with tissue inhibitors of metalloproteinases [published erratum appears in *Biochem. J.* (1992) 284 (Pt 3):935]. *Biochem. J.*, **283**, 637-641.
- Naor, D., Sinovov, R. V. und Ish-Shalom, D.** (1997) CD44: Structure, Function, and Association with the Malignant Process. In *Advances in Cancer Research*. Vande Woude, G. F. und Klein, G. (eds.), , San Diego, Vol. 71, pp. 243-318.
- Nekarda, H., Schmitt, M., Ulm, K., Wenninger, A., Vogelsang, H., Becker, K., Roder, J. D., Fink, U. und Siewert, J. R.** (1994) Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in completely resected gastric cancer. *Cancer Res.*, **54**, 2900-2907.
- Noble, P. W., McKee, C. M., Cowman, M. und Shin, H. S.** (1996) Hyaluronan fragments activate an NF-kappa B/I-kappa B alpha autoregulatory loop in murine macrophages. *J. Exp. Med.*, **183**, 2373-2378.
- Ochieng, J., Fridman, R., Nangia-Makker, P., Kleiner, D. E., Liotta, L. A., Stetler-Stevenson, W. G. und Raz, A.** (1994) Galectin-3 is a novel substrate for human matrix metalloproteinases-2 and -9. *Biochemistry*, **33**, 14109-14114.
- Oertli, B., Beck-Schimmer, B., Fan, X. und Wuthrich, R. P.** (1998) Mechanisms of hyaluronan-induced up-regulation of ICAM-1 and VCAM-1 expression by murine kidney tubular epithelial cells: hyaluronan triggers cell adhesion molecule expression through a mechanism involving activation of nuclear factor-kappa B and activating protein-1. *J. Immunol.*, **161**, 3431-3437.
- Oikarinen, A., Kylmaniemi, M., Autio-Harmainen, H., Autio, P. und Salo, T.** (1993) Demonstration of 72-kDa and 92-kDa forms of type IV collagenase in human skin: variable expression in various blistering diseases, induction during re-epithelialization, and decrease by topical glucocorticoids. *J. Invest. Dermatol.*, **101**, 205-210.
- Okada, Y., Naka, K., Kawamura, K., Matsumoto, T., Nakanishi, I., Fujimoto, N., Sato, H. und Seiki, M.** (1995) Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenase = gelatinase B) in osteoclasts: implications for bone resorption. *Lab. Invest.*, **72**, 311-322.
- Oppenheimer-Marks, N., Davis, L. S. und Lipsky, P. E.** (1990) Human T lymphocyte adhesion to endothelial cells and transendothelial migration. Alteration of receptor use relates to the activation status of both the T cell and the endothelial cell. *J. Immunol.*, **145**, 140-148.
- Ossowski, L., Clunie, G., Masucci, M. T. und Blasi, F.** (1991) In vivo paracrine interaction between urokinase and its receptor: effect on tumor cell invasion. *J. Cell Biol.*, **115**, 1107-1112.
- Pals, S. T., Horst, E., Ossekoppele, G. J., Figdor, C. G., Scheper, R. J. und Meijer, C. J.** (1989) Expression of lymphocyte homing receptor as a mechanism of dissemination in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, **73**, 885-888.
- Park, A. J., Matrisian, L. M., Kells, A. F., Pearson, R., Yuan, Z. Y. und Navre, M.** (1991) Mutational analysis of the transin (rat stromelysin) autoinhibitor region demonstrates a role for residues surrounding the "cysteine switch". *J. Biol. Chem.*, **266**, 1584-1590.
- Peach, R. J., Hollenbaugh, D., Stamenkovic, I. und Aruffo, A.** (1993) Identification of hyaluronic acid binding sites in the extracellular domain of CD44. *J. Cell. Biol.*, **122**, 257-264.

- Picker, L. J., De los Toyos, J., Telen, M. J., Haynes, B. F. und Butcher, E. C.** (1989) Monoclonal antibodies against the CD44 [In(Lu)-related p80], and Pgp-1 antigens in man recognize the Hermes class of lymphocyte homing receptors. *J. Immunol.*, **142**, 2046-2051.
- Protin, U., Schweighoffer, T., Jochum, W. und Hilberg, F.** (1999) CD44-deficient mice develop normally with changes in subpopulations and recirculation of lymphocyte subsets. *J. Immunol.*, **163**, 4917-4923.
- Pulverer, B. J., Hughes, K., Franklin, C. C., Kraft, A. S., Leever, S. J. und Woodgett, J. R.** (1993) Co-purification of mitogen-activated protein kinases with phorbol ester-induced c-Jun kinase activity in U937 leukaemic cells. *Oncogene*, **8**, 407-415.
- Pulverer, B. J., Kyriakis, J. M., Avruch, J., Nikolakaki, E. und Woodgett, J. R.** (1991) Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature*, **353**, 670-674.
- Pyke, C., Ralfkiaer, E., Huhtala, P., Hurskainen, T., Dano, K. und Tryggvason, K.** (1992) Localization of messenger RNA for Mr 72,000 and 92,000 type IV collagenases in human skin cancers by in situ hybridization. *Cancer Res.*, **52**, 1336-1341.
- Quax, W. J. und Broekhuizen, C. P.** (1994) Development of a new Bacillus carboxyl esterase for use in the resolution of chiral drugs. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **41**, 425-431.
- Rahmsdorf, H. J., Schönthal, A., Angel, P., Litfin, M., Rütger, U. und Herrlich, P.** (1987) Posttranscriptional regulation of c-fos mRNA expression. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 1643-1659.
- Rall, C. J. und Rustgi, A. K.** (1995) CD44 isoform expression in primary and metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.*, **55**, 1831-1835.
- Rao, J. S., Yamamoto, M., Mohaman, S., Gokaslan, Z. L., Fuller, G. N., Stetler-Stevenson, W. G., Rao, V. H., Liotta, L. A., Nicolson, G. L. und Sawaya, R. E.** (1996) Expression and localization of 92 kDa type IV collagenase/gelatinase B (MMP-9) in human gliomas. *Clin. Exp. Metastasis*, **14**, 12-18.
- Rauscher, F. J. d., Sambucetti, L. C., Curran, T., Distel, R. J. und Spiegelman, B. M.** (1988a) Common DNA binding site for Fos protein complexes and transcription factor AP-1. *Cell*, **52**, 471-480.
- Rauscher, F. J. d., Voullas, P. J., Franza, B. R., Jr. und Curran, T.** (1988b) Fos and Jun bind cooperatively to the AP-1 site: reconstitution in vitro. *Genes and Dev.*, **2**, 1687-1699.
- Reddy, K. B., Krueger, J. S., Kondapaka, S. B. und Diglio, C. A.** (1999) Mitogen-activated protein kinase (MAPK) regulates the expression of progelatinase B (MMP-9) in breast epithelial cells. *Int. J. Cancer*, **82**, 268-273.
- Reponen, P., Sahlberg, C., Munaut, C., Thesleff, I. und Tryggvason, K.** (1994) High expression of 92-kDa type IV collagenase (gelatinase) in the osteoclast lineage during mouse development. *Ann. N Y Acad. Sci.*, **732**, 472-475.
- Rocheftort, H., Capony, F. und Garcia, M.** (1990) Cathepsin D: a protease involved in breast cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev.*, **9**, 321-331.
- Rozeck, D. und Pfeifer, G. P.** (1993) In vivo protein-DNA interactions at the c-jun promoter: preformed complexes mediate the UV response. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 5490-5499.
- Ryder, K., Lanahan, A., Perez-Albuern, E. und Nathans, D.** (1989) jun-D: a third member of the jun gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **86**, 1500-1503.
- Ryseck, R. P. und Bravo, R.** (1991) c-JUN, JUN B, and JUN D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of FOS proteins. *Oncogene*, **6**, 533-542.
- Ryseck, R. P., Hirai, S. I., Yaniv, M. und Bravo, R.** (1988) Transcriptional activation of *c-jun* during the G0/G1 transition in mouse fibroblasts. *Nature*, **334**, 535-537.

- Saari, H., Konttinen, Y. T. und Nordstrom, D.** (1991) Effect of joint mobilization on serum hyaluronate. *Ann. Med.*, **23**, 29-32.
- Salo, T., Makela, M., Kylmaniemi, M., Autio-Harminen, H. und Larjava, H.** (1994) Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 during early human wound healing. *Lab.-Invest.*, **70**, 176-182.
- Samuel, S. K., Hurta, R. A., Spearman, M. A., Wright, J. A., Turley, E. A. und Greenberg, A. H.** (1993) TGF-beta 1 stimulation of cell locomotion utilizes the hyaluronan receptor RHAMM and hyaluronan. *J. Cell. Biol.*, **123**, 749-758.
- Sato, H., Kita, M. und Seiki, M.** (1993) v-Src activates the expression of 92-kDa type IV collagenase gene through the AP-1 site and the GT box homologous to retinoblastoma control elements. A mechanism regulating gene expression independent of that by inflammatory cytokines. *J. Biol. Chem.*, **268**, 23460-23468.
- Sato, H. und Seiki, M.** (1993) Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. *Oncogene*, **8**, 395-405.
- Schoellmann, G. und Shaw, E.** (1963) Direct evidence for the presence of histidine in the active center of chymotrypsin. *Biochemistry*, **2**, 252.
- Schorpp-Kistner, M., Wang, Z. Q., Angel, P. und Wagner, E. F.** (1999) JunB is essential for mammalian placentation. *Embo J.*, **18**, 934-948.
- Screaton, G. R., Bell, M. V., Bell, J. I. und Jackson, D. G.** (1993) The identification of a new alternative exon with highly restricted tissue expression in transcripts encoding the mouse Pgp-1 (CD44) homing receptor. Comparison of all 10 variable exons between mouse, human, and rat. *J. Biol. Chem.*, **268**, 12235-12238.
- Seko, Y., Takahashi, N., Tobe, K., Kadowaki, T. und Yazaki, Y.** (1997) Hypoxia and hypoxia/reoxygenation activate p65PAK, p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), and stress-activated protein kinase (SAPK) in cultured rat cardiac myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **239**, 840-844.
- Seltzer, J. L., Lee, A. Y., Akers, K. T., Sudbeck, B., Southon, E. A., Wayner, E. A. und Eisen, A. Z.** (1994) Activation of 72-kDa type IV collagenase/gelatinase by normal fibroblasts in collagen lattices is mediated by integrin receptors but is not related to lattice contraction. *Exp. Cell. Res.*, **213**, 365-374.
- Simon, C., Goepfert, H. und Boyd, D.** (1998) Inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase by SB 203580 blocks PMA-induced Mr 92,000 type IV collagenase secretion and in vitro invasion. *Cancer Res.*, **58**, 1135-1139.
- Simon, C., Juarez, J., Nicolson, G. L. und Boyd, D.** (1996) Effect of PD 098059, a specific inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase, on urokinase expression and in vitro invasion. *Cancer Res.*, **56**, 5369-5374.
- Sleeman, J., Rudy, W., Hofmann, M., Moll, J., Herrlich, P. und Ponta, H.** (1996a) Regulated clustering of variant CD44 proteins increases their hyaluronate binding capacity. *J.-Cell.-Biol.*, **135**, 1139-1150.
- Sleeman, J. P., Arming, S., Moll, J. F., Hekele, A., Rudy, W., Sherman, L.S., Kreil, G., Ponta, H. und Herrlich, P.** (1996b) Hyaluronate-independent metastatic behavior of CD44 variant-expressing pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res.*, **56**, 3134-3141.
- Sleeman, J. P., Kondo, K., Moll, J., Ponta, H. und Herrlich, P.** (1997) Variant exons v6 and v7 together expand the repertoire of glycosaminoglycans bound by CD44. *J. Biol. Chem.*, **272**, 31837-31844.

- Sommer, J., Gloor, S. M., Rovelli, G. F., Hofsteenge, J., Nick, H., Meier, R. und Monard, D.** (1987) cDNA sequence coding for a rat glia-derived nexin and its homology to members of the serpin superfamily. *Biochemistry*, **26**, 6407-6410.
- Springman, E. B., Angleton, E. L., Birkedal-Hansen, H. und Van Wart, H. E.** (1990) Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **87**, 364-368.
- Stamenkovic, I., Amiot, M., Pesando, J. M. und Seed, B.** (1989) A lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the cartilage link protein family. *Cell*, **56**, 1057-1062.
- Stamenkovic, I., Aruffo, A., Amiot, M. und Seed, B.** (1991) The hematopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronate-bearing cells. *Embo J.*, **10**, 343-348.
- Stein, C.A.** (1993) Suramin: a novel antineoplastic agent with multiple potential mechanisms of action. *Cancer Res.*, **53**, 2239-2248.
- Stetler-Stevenson, W. G.** (1990) Type IV collagenases in tumor invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.*, **9**, 289-303.
- Strongin, A. Y., Collier, I., Bannikov, G., Marmer, B. L., Grant, G. A. und Goldberg, G. I.** (1995) Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J. Biol. Chem.*, **270**, 5331-5338.
- Suzuki, K. und Ohno, S.** (1990) Calcium activated neutral protease-structure-function relationship and functional implications. *Cell. Struct. Funct.*, **15**, 1-6.
- Sy, M. S., Guo, Y. J. und Stamenkovic, I.** (1991) Distinct effects of two CD44 isoforms on tumor growth in vivo. *J. Exp. Med.*, **174**, 859-866.
- Testa, J. E. und Quigley, J. P.** (1990) The role of urokinase-type plasminogen activator in aggressive tumor cell behavior. *Cancer Metastasis Rev.*, **9**, 353-367.
- Thomas, L., Byers, H. R., Vink, J. und Stamenkovic, I.** (1992) CD44H regulates tumor cell migration on hyaluronate-coated substrate. *J. Cell. Biol.*, **118**, 971-977.
- Thomas, L., Etoh, T., Stamenkovic, I., Mihm, M. C., Jr. und Byers, H. R.** (1993) Migration of human melanoma cells on hyaluronate is related to CD44 expression. *J.-Invest.-Dermatol.*, **100**, 115-120.
- Tölg, C., Hofmann, M., Herrlich, P. und Ponta, H.** (1993) Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 1225-1229.
- Toole, B. P., Biswas, C. und Gross, J.** (1979) Hyaluronate and invasiveness of the rabbit V2 carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **76**, 6299-6303.
- Toth, M., Gervasi, D. C. und Fridman, R.** (1997) Phorbol ester-induced cell surface association of matrix metalloproteinase-9 in human MCF10A breast epithelial cells. *Cancer Res.*, **57**, 3159-3167.
- Truppe, W., Basner, R., von Figura, K. und Kresse, H.** (1977) Uptake of hyaluronate by cultured cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **78**, 713-719.
- Tsukita, S., Oishi, K., Sato, N., Sagara, J. und Kawai, A.** (1994) ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *J. Cell. Biol.*, **126**, 391-401.
- Turley, E. A.** (1984) Proteoglycans and cell adhesion. Their putative role during tumorigenesis. *Cancer Metastasis Rev.*, **3**, 325-339.
- Turley, E. A.** (1992) Hyaluronan and cell locomotion. *Cancer Metastasis Rev.*, **11**, 21-30.

- Turley, E. A., Belch, A. J., Poppema, S. und Pilarski, L. M.** (1993) Expression and function of a receptor for hyaluronan-mediated motility on normal and malignant B lymphocytes. *Blood*, **81**, 446-453.
- Turley, E. A., Brassel, P. und Moore, D.** (1990) A hyaluronan-binding protein shows a partial and temporally regulated codistribution with actin on locomoting chick heart fibroblasts. *Exp. Cell. Res.*, **187**, 243-249.
- Turley, E. A., Moore, D. und Hayden, L. J.** (1987) Characterization of hyaluronate binding proteins isolated from 3T3 and murine sarcoma virus transformed 3T3 cells. *Biochemistry*, **26**, 2997-3005.
- Turpeenniemi-Hujanen, T., Thorgeirsson, U. P., Rao, C. N. und Liotta, L. A.** (1986) Laminin increases the release of type IV collagenase from malignant cells. *J. Biol. Chem.*, **261**, 1883-1889.
- Underhill, C. B., Nguyen, H. A., Shizari, M. und Culty, M.** (1993) CD44 positive macrophages take up hyaluronan during lung development. *Dev. Biol.*, **155**, 324-336.
- Underhill, C.B. und Toole, B. P.** (1980) Physical characteristics of hyaluronate binding to the surface of simian virus 40-transformed 3T3 cells. *J. Biol. Chem.*, **255**, 4544-4549.
- Urbanski, S. J., Edwards, D. R., Maitland, A., Leco, K. J., Watson, A. und Kossakowska, A. E.** (1992) Expression of metalloproteinases and their inhibitors in primary pulmonary carcinomas. *Br. J. Cancer*, **66**, 1188-1194.
- Van Wart, H. E. und Birkedal-Hansen, H.** (1990) The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **87**, 5578-5582.
- Vu, T. H., Shipley, J. M., Bergers, G., Berger, J. E., Helms, J. A., Hanahan, D., Shapiro, S. D., Senior, R. M. und Werb, Z.** (1998) MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell*, **93**, 411-422.
- Walter, J., Schirmacher, V. und Mosier, D.** (1995) Induction of CD44 expression by the Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP1 is associated with lymphoma dissemination [published erratum appears in *Int J Cancer* 1995 Oct 9;63(2):318]. *Int.-J.-Cancer*, **61**, 363-369.
- Wang, C., Thor, A. D., Moore, D. H., 2nd, Zhao, Y., Kerschmann, R., Stern, R., Watson, P. H. und Turley, E. A.** (1998) The overexpression of RHAMM, a hyaluronan-binding protein that regulates ras signaling, correlates with overexpression of mitogen-activated protein kinase and is a significant parameter in breast cancer progression. *Clin. Cancer. Res.*, **4**, 567-576.
- Weiss, J. M., Sleeman, J., Renkl, A. C., Dittmar, H., Termeer, C. C., Taxis, S., Howells, N., Hofmann, M., Kohler, G., Schöpf, E., Ponta, H., Herrlich, P. und Simon, J. C.** (1997) An essential role for CD44 variant isoforms in epidermal Langerhans cell and blood dendritic cell function. *J. Cell. Biol.*, **137**, 1137-1147.
- West, D. C., Hampson, I. N., Arnold, F. und Kumar, S.** (1985) Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science*, **228**, 1324-1326.
- Whitman, M., Kaplan, D., Roberts, T. und Cantley, L.** (1987) Evidence for two distinct phosphatidylinositol kinases in fibroblasts. Implications for cellular regulation. *Biochem. J.*, **247**, 165-174.
- Wielenga, V.J., Heider, K.H., Offerhaus, G.J., Adolf, G.R., van den Berg, F.M., Ponta, H., Herrlich, P. und Pals, S.T.** (1993) Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res.*, **53**, 4754-4756.



- Wilhelm, S. M., Collier, I. E., Marmer, B. L., Eisen, A. Z., Grant, G. A. und Goldberg, G. I.** (1989) SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages [published erratum appears in *J Biol Chem* 1990 Dec 25;265(36):22570]. *J. Biol. Chem.*, **264**, 17213-17221.
- Woessner, J. F., Jr.** (1991) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *Faseb J.*, **5**, 2145-2154.
- Xie, B., Laouar, A. und Huberman, E.** (1998) Fibronectin-mediated cell adhesion is required for induction of 92-kDa type IV collagenase/gelatinase (MMP-9) gene expression during macrophage differentiation. The signaling role of protein kinase C-beta. *J. Biol. Chem.*, **273**, 11576-11582.
- Yang, B., Yang, B. L., Savani, R. C. und Turley, E. A.** (1994) Identification of a common hyaluronan binding motif in the hyaluronan binding proteins RHAMM, CD44 and link protein. *Embo J.*, **13**, 286-296.
- Yang, B., Zhang, L. und Turley, E. A.** (1993) Identification of two hyaluronan-binding domains in the hyaluronan receptor RHAMM. *J. Biol. Chem.*, **268**, 8617-8623.
- Yannariello-Brown, J., Frost, S. J. und Weigel, P. H.** (1992) Identification of the Ca(2+)-independent endocytic hyaluronan receptor in rat liver sinusoidal endothelial cells using a photoaffinity cross-linking reagent. *J. Biol. Chem.*, **267**, 20451-20456.
- Yu, A. E., Hewitt, R. E., Connor, E. W. und Stetler-Stevenson, W. G.,** (1997) Matrix metalloproteinases: novel targets for directed cancer therapy. *Clin. Pharm.*, **11**, 229-244
- Yu, Q. und Stamenkovic, I.** (1999) Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes and Dev.*, **13**, 35-48.
- Yurchenco, P.D. und Schittny, J.C.** (1990) Molecular architecture of basement membranes. *Faseb J.*, **4**, 1577-1590.
- Zeng, Z. S. und Guillem, J. G.** (1996) Colocalisation of matrix metalloproteinase-9-mRNA and protein in human colorectal cancer stromal cells. *Br. J. Cancer*, **74**, 1161-1167.
- Zerial, M., Toschi, L., Ryseck, R. P., Schuermann, M., Muller, R. und Bravo, R.** (1989) The product of a novel growth factor activated gene, fos B, interacts with JUN proteins enhancing their DNA binding activity. *Embo J.*, **8**, 805-813.
- Zhang, L., Underhill, C. B. und Chen, L.** (1995) Hyaluronan on the surface of tumor cells is correlated with metastatic behavior. *Cancer Res.*, **55**, 428-433.
- Zheng, Z., Katoh, S., He, Q., Oritani, K., Miyake, K., Lesley, J., Hyman, R., Hamik, A., Parkhouse, R. M., Farr, A. G. und Kincade, P. W.** (1995) Monoclonal antibodies to CD44 and their influence on hyaluronan recognition. *J. Cell. Biol.*, **130**, 485-495.
- Zheng, Z., Cummings, R. D., Pummill, P. E. und Kincade, W.** (1997) Growth as a solid tumor or reduced glucose concentrations in culture reversibly induce CD44-mediated hyaluronan recognition by chinese hamster ovary cells. *J. Clin. Invest.*, **100**, 1217-1229.
- Zhou, B., Oka, J. A., Singh, A. und Weigel, P. H.** (1999) Purification and subunit characterization of the rat liver endocytic hyaluronan receptor. *J. Biol. Chem.*, **274**, 33831-33834.



## 6. Abkürzungen

A	Adenosin	I	Liter
Abb.	Abbildung	MCS	Multiple cloning site
ATP	Adenosintri-phosphat	min	Minute(n)
bp	Basenpaar	M-MLV	Molony Murine Leukemia Virus
BSA	Rinderserumalbumin	MOPS	Morpholino-Propan-sulfonsäure
C	Cytosin	mRNA	"messenger"RNA
°C	Grad Celsius	N	normal (Konzentration ionisierbarer Gruppen)
CD	"Cluster of designation"	NAD	Nicotinamid-adenin-dinukleotid
cDNA	„complementary DNA“	NTP	Nukleotidtriphosphat
Ci	Curie	OD	Optische Dichte
CPC	Cetylpyrimidiniumchlorid	ORF	„open reading frame“, offener Leserahmen
cpm	„counts per minute“, Zerfälle pro Minute	p	Plasmid
CTP	Cytidintriphosphat	PA	Polyacrylamid
Da	Dalton	PBS	Phosphat-gepufferte Saline
deion.	deionisiert	PS	Petrischale
DEPC	Diethylpyrocarbonat	PMSF	Phenylmethsulfonyl-Fluorid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
DMSO	Dimethylsulfoxid	RNA	Ribonukleinsäure
DNA	Deoxyribonukleinsäure	RNase	Ribonuklease
DNase	Deoxyribonuklease	RNasin	RNase-Inhibitor
dNTP	Deoxyribonukleosid-triphosphat	rRNA	ribosomale RNA
DTT	Dithiotreitol	RT	Raumtemperatur
E260	Extinktion bei 260 nm	RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase-Ketten-Reaktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	S	Svedberg-Einheit
et al.	„et alii“, und andere	SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
FACS	„Fluorescence Activated Cell Sorting“	SSC	Standard Saline Citrat
f. c.	„final concentration“ (Endkonzentration)	T	Thymidin
FCS	Fötales Kälberserum	TEMED	N,N,N',N'-tetramethyl-ethylendiamin
FDP	Formamid Denaturation Buffer	TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat	TPA	12-O-Tetradekanoyl-Phorbol-13-Azetat
g	Gramm	Tris	Tri-(hydroxymethyl)aminomethan
g	relative Beschleunigung	TRITC	„Texas-Red“-Isothiocyanat
G	Guanosin	tRNA	„transfer“-RNA
GST	Glutathion-S-Transferase	TTP	Thymidintriphosphat
GTP	Guanosintri-phosphat	U	Uridin
h	Stunde	UDP	Uridindiphosphat
HRP	horse radish peroxidase	ü. N.	über Nacht
HA	Hyaluronsäure	U/min	Umdrehungen pro Minute
Ig	Immunglobulin	U/ $\mu$ l	Enzymeinheiten/ $\mu$ l
IL	Interleukin	V	Volt
kB	Kilo Basenpaare (= 1000 Bp)	Vol.	Volumen
kDa	Kilo Dalton (1000 Dalton)	W	Watt
Ko	Kontrolle		