

ATG TTT GTA GAG CGA ATG ATA TGC CAT TAA
||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
TAC AAA CAT CTC GCT TAC TAT ACG GTA ATT

*Wer die Natur beherrschen will,
muss ihr gehorchen.*

Francis Bacon

MMPACE – ein hefezellbasierter Bioassay zur Hochdurchsatz-Testung spezifischer Inhibitoren gegen humane Matrix-Metalloproteasen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes

von
Dipl.-Biol. Björn Diehl

Saarbrücken
2008

Tag des Kolloquiums:	12. Dezember 2008	
Dekan:	PROF. DR. ULI MÜLLER	
Prüfungsausschuss:	PROF. DR. MANFRED J. SCHMITT	(1. Berichterstatter)
	PROF. DR. FRIEDRICH GIFFHORN	(2. Berichterstatter)
	PROF. DR. JÖRN WALTER	(Vorsitzender)
	DR. GERT-WIELAND KOHRING	

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abkürzungsverzeichnis.....	6
Abstract	8
1. Einleitung	9
1.1. MMPs	9
1.1.1. Extrazelluläre Matrix	9
1.1.2. Allgemeine Eigenschaften	11
1.1.3. Struktur	12
1.1.4. Regulation	15
1.1.5. Rolle in pathologischen Prozessen	18
1.1.6. MMP-Inhibitoren	19
1.2. Hefen in der Biotechnologie	21
1.2.1. Zellwandverankerung	25
1.3. Ziele der Arbeit	27
2. Material und Methoden.....	28
2.1. Organismen-Stämme	28
2.1.1. Bakterien	28
2.1.2. Hefen	28
2.2. Plasmide.....	29
2.2.1. Zwischenklonierung, Templates & Sequenzierung	29
2.2.2. Expressionsplasmide.....	30
2.3. Arbeitsmaterialien.....	32
2.4. Nährmedien und Kulturbedingungen.....	34
2.4.1. Bakterien	34
2.4.2. Hefen	35
2.5. DNA Manipulation	43
2.5.1. Plasmid-Isolierung aus <i>Escherichia coli</i>	43
2.5.1.1. Alkalische Lyse.....	43
2.5.1.2. MiniPrep	44
2.5.2. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	45
2.5.2.1. Isolierung genomischer DNA aus Hefen	47
2.5.2.2. Oligonukleotide.....	47

2.5.2.3. AccepTor™-Klonierung	49
2.5.3. DNA-Restriktion.....	51
2.5.4. Agarose-Gelelektrophorese.....	52
2.5.5. DNA-Isolierung aus Agarosegelen	53
2.5.6. Ligation	53
2.6. Transformationsmethoden	54
2.6.1. Bakterien	54
2.6.1.1. Elektroporation	54
2.6.1.2. Chemisch kompetente Zellen	55
2.6.2. Hefen	55
2.7. Protein-Detektion.....	60
2.7.1. Probenvorbereitung	60
2.7.1.1. Konzentrierung zellfreier Kulturüberstände	60
2.7.1.2. Zellaufschluss mittels Ultraschall.....	61
2.7.1.3. Aktivierung der MMPs mittels APMA.....	61
2.7.2. SDS-PAGE	62
2.7.2.1. Zymographie.....	65
2.7.2.2. Coomassie-Färbung	66
2.7.2.3. Western-Analyse	67
2.7.3. Aktivitätstests.....	69
2.7.3.1. Esterase	69
2.7.3.2. MMPs	70
2.7.3.3. Proteinbestimmung zur Ermittlung der spezifischen Aktivität.....	73
2.8. Indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie	74
3. Ergebnisse	76
3.1. Auswahl des Wirtsorganismus	76
3.1.1. Herstellung der Expressionsplasmide	77
3.1.2. Transformation und Expression.....	91
3.1.3. Erweiterte Untersuchungen zur <i>Pichia</i> -Expression	98
3.2. Immobilisierung der MMPs.....	101
3.2.1. Herstellung der Expressionsplasmide	102
3.2.2. Expression und Aktivitäts-Messung.....	105
3.2.2.1. Esterase-Aktivitäts-Assay.....	105
3.2.2.2. Bestimmung der Esterase-Aktivität	107
3.2.2.3. Zellwandverankerung der MMPs.....	109
3.3. MMP-Aktivitäts-Assay	112
3.3.1. Auswahl.....	112

3.3.2. Optimierung des MMPACE-Assays	114
3.3.3. Quantitative Bestimmung der MMP-Gehalte	123
3.4. Validierung des Inhibitor-Testsystems	126
4. Diskussion und Ausblick	128
Heterologe Expression	129
Zellwandverankerung	132
Aktivitätsassay	137
Schritt-für-Schritt-Anleitung	149
Vorteile gegenüber herkömmlichen Verfahren	151
Ausblick	154
5. Zusammenfassung	157
6. Literatur	159
Veröffentlichungen & Patente.....	183
Danksagung	184

Abkürzungsverzeichnis

α -MF	α -Mating Factor
<i>amdS</i>	Acetamidase-Gen
Amp	Ampicillin
<i>Amp^R</i>	Ampicillin-Resistenz-Gen (β -Laktamase)
AOX	Alkohol-Oxidase
APMA	4-Aminophenylmercuriumacetat
APS	Ammoniumperoxosulfat
ARS	Autonom Replizierende Sequenz
ATCC	American Type Culture Collection
BCA	2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure
BMG	Buffered Minimal Glycerol
BMM	Buffered Minimal Methanol
Brij 35	Polyoxyethylen(23)laurylether
BSA	Rinderserumalbumin
bp	Basenpaare
d/o	Drop-out
DEAE	Diethylaminoethyl
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMM	Edinburgh Minimal Medium
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
(e)GFP	(enhanced) Green Fluorescence Protein
GLB	Gel Loading Buffer
GRAS	Generally Recognized As Safe
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HRP	Horse Radish Peroxidase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
<i>Kan^R</i>	Kanamycin-Resistenz-Gen
kb	Kilobasenpaare
LB	Luria Bertani Broth
Luminol	3-Aminophthalhydrazid

Mb	Megabasepaare
MCS	Multiple Cloning Site
MMP	Matrix-Metalloprotease
NK	Negativ-Kontrolle
nmf	no message in thiamine
OD ₆₀₀	Optische Dichte (bei $\lambda = 600$ nm)
PAS	Periodic Acid Schiff Reaction
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglykol
PGK	Phosphoglyceratkinase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RFU	Relative Fluorescence Units
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
SC	synthetic complete
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfate
SDS-PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulfate Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SS	Signalsequenz
TBE	Tris Borsäure EDTA
TBS	Tris Buffered Saline
TIMP	Tissue Inhibitor of Matrix metalloproteinases
TPI	Triosephosphat-Isomerase
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
TTC	Tris Triton X-100 Calciumchlorid
Tween 20	Poly(oxy-1,2-ethandiyl)-monododekansäure-sorbitylester
UdS	Universität des Saarlandes
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galactopyranosid
YCB	Yeast Carbon Base
YNB	Yeast Nitrogen Base
YPD	Yeastextract Pepton Dextrose
YPG	Yeastextract Pepton Galactose

Abstract

A wide range of diseases, such as diabetes mellitus, arthritis and, most of all, cancer, goes along with malfunctions in the regulation of matrix metalloproteinases, especially MMP-2 and MMP-9. The invention and validation of novel inhibitors is often slowed down by the high costs of MMP purification from human tumor cell lines or primary fibroblasts. In view of this background, an innovative cell based MMP bioassay was invented to enable a high throughput screening for potential MMP inhibitors. This method is based on the heterologous expression and immobilization of MMP-2 and MMP-9 on the cell surface of yeast. To identify an appropriate expression host, the human gelatinases were expressed as secretory proteins in the yeasts *Kluyveromyces lactis*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Zygosaccharomyces bailii*. *P. pastoris* appeared to be the only organism capable of producing both MMPs in sufficiently high quality. Comparative studies on cell surface expression considering *S. cerevisiae* cell wall proteins revealed Sed1p as being a novel and highly efficient carrier system for cell surface display in *P. pastoris* that exceeded immobilization efficiency of *S. cerevisiae* by the factor 6.7. A commercial gelatinase assay was adapted to match the requirements of a cell based system, thus providing an efficient tool for quantification of MMP inhibitor activities via a simple, standardized bioassay.

Diverse Krankheitsbilder, wie Diabetes mellitus, Arthritis oder Krebs, gehen häufig mit einer fehlerhaften Regulation von Matrix-Metalloproteasen, insbesondere MMP-2 und MMP-9, einher. Die Validierung neuartiger Hemmstoffe wird vor allem durch den hohen Kostenaufwand bei der Isolierung der benötigten MMPs aus Tumor-Zelllinien oder Fibroblasten erschwert. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit ein zellbasierter MMP-Bioassay für ein Hochdurchsatz-Screening nach potentiellen Inhibitoren etabliert, der auf der heterologen Expression und Immobilisierung von MMP-2 und MMP-9 auf der Zellwand von Hefen basiert. Zur Identifikation eines geeigneten Expressionswirts wurden die humanen Gelatinasen in den Hefen *K. lactis*, *P. pastoris*, *S. cerevisiae*, *S. pombe* und *Z. bailii* zur Sekretion gebracht. Dabei war *P. pastoris* als einziger Organismus in der Lage, beide MMPs in ausreichend hoher Qualität als biologisch aktive Enzyme zu produzieren. Im Rahmen vergleichender Experimente zur Zellwand-Expression in *P. pastoris* konnte mit Sed1p aus *S. cerevisiae* ein hoch effizientes, neuartiges Zelloberflächen-Expressionssystem für *P. pastoris* identifiziert werden, das die für *S. cerevisiae* maximal erreichbare Immobilisierungs-Effizienz um den Faktor 6,7 übertrifft. Die Anpassung eines kommerziell erhältlichen Gelatinase-Assays an die Anforderungen eines zellbasierten Systems ermöglichte einen quantitativen Vergleich der Hemmstoff-Wirkungen durch ein einfaches, standardisiertes Messverfahren.

1. Einleitung

1.1. MMPs

Die Flexibilität komplexer Gewebe im Zusammenhang mit essentiellen Modifikationsprozessen, wie z. B. Morphogenese, Wundheilung oder Angiogenese, hängt in entscheidender Weise von der Möglichkeit ab, die Zusammensetzung und Struktur der Extrazellulären Matrix aktuellen Bedürfnissen anzupassen. Diese regulatorischen Prozesse werden von Matrix-Metalloproteasen (MMPs) und deren natürlichen Inhibitoren gesteuert. Bei MMPs handelt es sich um zinkabhängige proteolytische Enzyme, die bei neutralem pH aktiv sind. Sie werden in der Regel in einer inaktiven Form als Zymogen von den Zellen sezerniert und nachträglich proteolytisch aktiviert (STERNLICHT & WERB, 2001).

1.1.1. Extrazelluläre Matrix

Mehrzellige Gewebe bestehen aus einem komplexen interzellulären Bereich, der in seiner Gesamtheit als Extrazelluläre Matrix (EZM) bezeichnet wird. Sie besteht hauptsächlich aus den Proteinkomponenten: Kollagen als verantwortlichem Element für Zugfestigkeit und Stabilität, hoch viskosen Proteoglykanen für die Druckstabilität, und Multiadhäsionsmatrixproteinen, die die einzelnen Bestandteile der Matrix untereinander und mit den Zellen verbinden (vgl. Abb. 1). Die Zusammensetzung dieser Elemente definiert die Eigenschaften des Gewebes bezüglich seiner physikalischen Struktur. Alle Bestandteile der Extrazellulären Matrix werden dabei innerhalb von Zellen gebildet und exocytotisch in den Interzellularraum abgegeben.

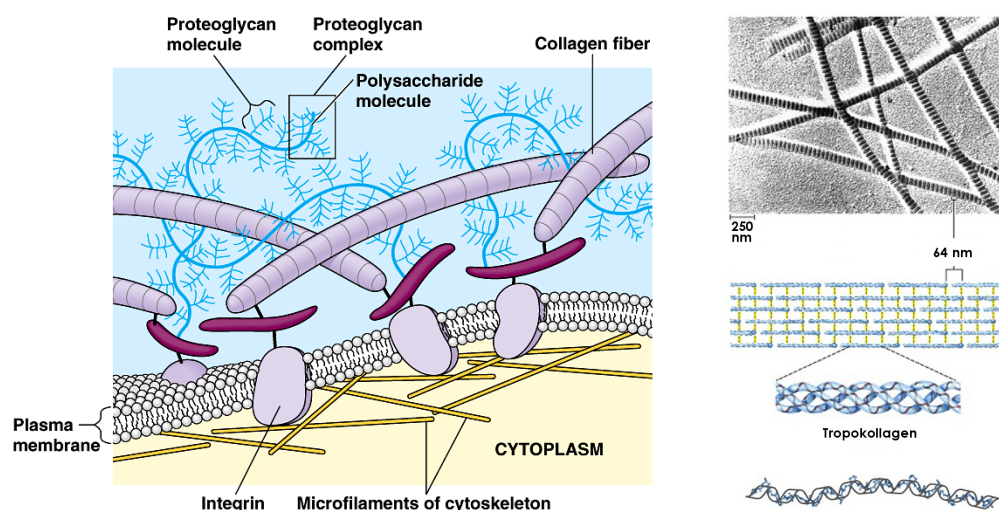


Abb. 1: Die Extrazelluläre Matrix besteht aus Kollagen als verantwortlichem Element für Zugfestigkeit und Stabilität, hoch viskosen Proteoglykanen für Druckstabilität, und Multiadhäsionsmatrixproteinen, die die einzelnen Bestandteile der Matrix untereinander und mit den Zellen verbinden (CAMPBELL & REECE, 2004).

Kollagen ist das am häufigsten vorkommende Protein im Tierreich. Seine Grundeinheit besteht aus einer langen Polypeptidkette, die in einer linksgängigen Helix angeordnet ist. Jeder Strang ist dabei etwa 300 nm lang und besteht aus exakt 1050 Aminosäuren, wobei Glycin, Prolin und Hydroxyprolin überdurchschnittlich stark vertreten sind. Das sich häufig wiederholende Aminosäuremotiv Gly-Pro-X bzw. Gly-X-Hyp ermöglicht ein Zusammenlagern von jeweils drei dieser Helices zu einer sehr eng gepackten rechtsgängigen Triplehelix, dem Tropokollagen. Eine um jeweils 67 nm versetzte, laterale Anordnung vieler Tropokollagen-Moleküle führt über intermolekulare kovalente Querverbindungen zur Bildung von Kollagenfibrillen, die sich ihrerseits wiederum zu Kollagenfasern zusammenlagern. Derzeit sind 27 unterschiedliche Kollagen-Typen bekannt, die sich bezüglich ihrer Faserbildung und Funktion voneinander abgrenzen (KUBOTA & NAGATA, 2004). 90 % des Gesamt-Kollagens entfallen hierbei auf die Typen I-IV, wobei Typ I hauptsächlich im Bereich der Knochen, Typ II im Knorpel, Typ III bei der Wundheilung und Typ IV als Bestandteil der Basallamina vorkommt.

Proteoglykane kommen in jeder Ausprägungsform der EZM vor. Sie bestehen aus einem Core-Protein und einer Vielzahl lateraler Polysaccharidmoleküle, den Glykosaminglykanen (z. B. Heparansulfate, Dermatan-sulfate, Keratansulfate oder Hyaluronsäure). Durch die hohe Anzahl negativer Ladungen innerhalb der Seitenketten sind Proteoglykane stark hydratisiert, wodurch sie maßgeblich für die gelartige Beschaffenheit und das Volumen der Extrazellulären Matrix verantwortlich sind. Hyaluronsäure ist dabei das einzige extrazelluläre Polysaccharid, das nicht kovalent an ein Protein gebunden vorkommen kann. Aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften mit einer hohen Anzahl anionischer Reste auf ihrer Oberfläche ist sie in der Lage, sehr große Mengen Wasser zu binden, was wesentlich zur Ausbildung einer Toleranz des Gewebes gegenüber Kompressionskräften beiträgt.

Multiadhäsionsmatrixproteine dienen als Verbindungseinheiten der unterschiedlichen EZM-Bestandteile. Sie enthalten hochaffine Bindedomänen für mehrere EZM-Strukturtypen und dienen hauptsächlich der Zell-Matrix-Verbindung. Regulatorische Funktion kommt ihnen bei der Zellmigration und gewissen Signalübertragungswegen zu. Dazu zählen unter anderem Laminin, Fibronectin und die Integrine.

Noch vor einigen Jahrzehnten wurde der EZM lediglich eine Funktion als ‚Zellleim‘ oder Wasserspeicher zugeschrieben. Das wissenschaftliche Verständnis um ihre Bedeutung hat sich in den letzten Jahren jedoch entschieden gewandelt. Entgegen der ursprünglichen Vorstellung von statischen Zellverbindungen handelt es sich bei der EZM um einen Ort hoch-dynamischer Auf- und Abbauprozesse, die einerseits einer engen Zellregulation unterliegen, andererseits aber auch selbst Einfluss auf Zellen und Gewebe nehmen.

Diese Regulation betrifft zum einen Anpassungen der physikalischen Gewebestruktur durch Kontrolle von Zelladhäsion und Zellmigration, z. B. bei der Bildung neuer Blutgefäße oder

Nervenbahnen oder bei Wundheilungsprozessen (vgl. Abb. 2 a-c). Zum anderen werden durch die Modulation von Signalmolekülen intrazelluläre Prozesse wie Zelldifferenzierung, Zellteilung oder Apoptose gesteuert (vgl. Abb. 2 d-e). In allen Fällen wird die Kontrolle der Regulationsmechanismen in entscheidender Weise von MMPs und deren natürlichen Inhibitoren (TIMPs – tissue inhibitors of matrixmetalloproteinases) übernommen. Diese ermöglichen einen kontrollierten Abbau der EZM-Elemente in einem für die jeweilige Anpassung adäquaten Rahmen (PAGE-MCCAW *et al.*, 2007).

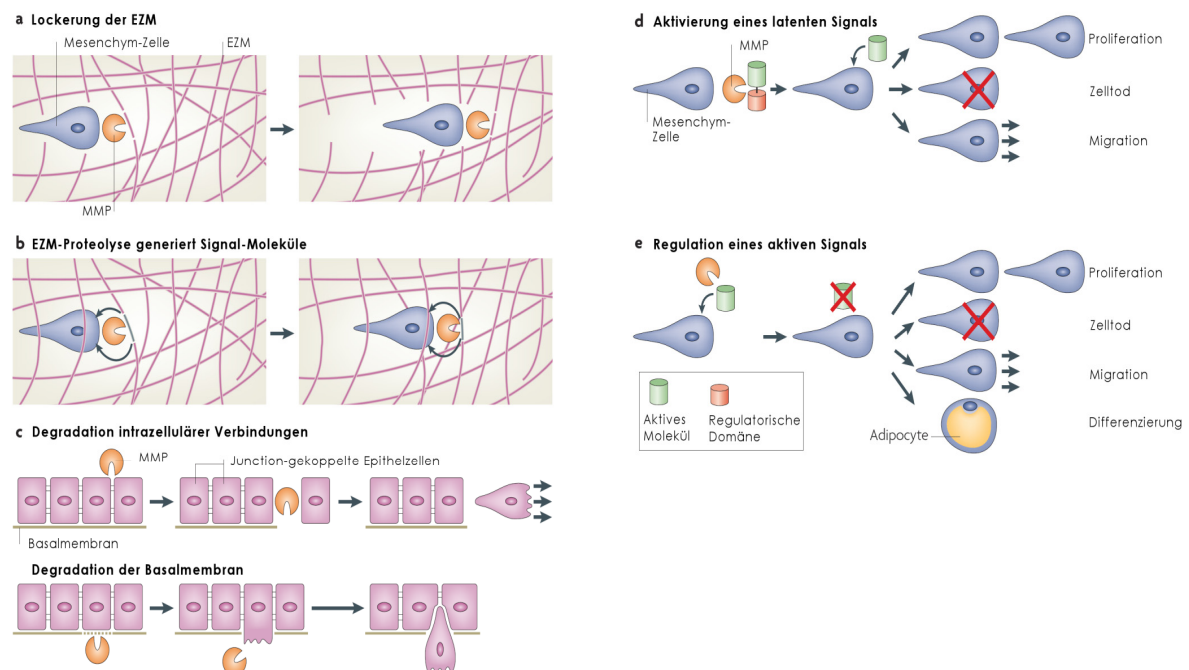


Abb. 2: Regulatorische MMP-Funktionen. (a) MMPs vergrößern den Raum für Gewebemodulation durch Abbau von EZM-Strukturen. (b) Alternativ können durch MMP-vermittelte Proteolyse spezifische Abbauprodukte mit autokriner oder parakriner Signalwirkung generiert werden. (c) MMPs ermöglichen eine Regulation der Epithelgewebe-Architektur durch Abbau interzellulärer Verbindungen oder Basalmembranen. (d) MMPs können latente Signalmoleküle modulieren und so diverse Zellszenarien induzieren. (e) Signalmoleküle werden durch MMPs deaktiviert oder moduliert und können so zu Änderungen der Proliferation, Zellmigration und Zelldifferenzierung oder zum Zelltod führen (PAGE-MCCAW *et al.*, 2007).

1.1.2. Allgemeine Eigenschaften

MMPs sind zinkabhängige Endopeptidasen, die in ihrer Gesamtheit in der Lage sind, alle Bestandteile der Extrazellulären Matrix abzubauen. Sie zeigen dabei überlappende, aber distinkte Substratspezifitäten (AMÄLINEI *et al.*, 2007).

Seit der Entdeckung der ersten Matrix-Metalloprotease MMP-1 in Haut-, Darm- und Kiemengewebe von Kaulquappen durch GROSS & LAPIERE im Jahre 1962 wurde in nahezu allen Abteilungen mehrzelliger Lebewesen eine Vielzahl unterschiedlicher MMPs beschrieben. Die Liste umfasst derzeit vor allem klassische Modellorganismen der biologischen Forschung. Die Stamm- und sogar Organismenreich-übergreifende Verteilung

lässt jedoch den Schluss zu, dass die Evolution mehrzelliger Lebens zwingend mit der Entwicklung Matrix-modulierender Enzyme einher gegangen zu sein scheint. So wurden für das Reich der *Metazoa* neben den humanen auch MMPs u. a. in der Klasse der *Echinoidea* (LEPAGE & GACHE, 1990), bei *Drosophila melanogaster* (LLANO *et al.*, 2000), *Caenorhabditis elegans* (WADA *et al.*, 1998) und *Hydra spec.* (LEONTOVICH *et al.*, 2000) nachgewiesen. Auch im Pflanzenreich wurden bei *Glycine max* (LIU *et al.*, 2001) und *Arabidopsis thaliana* (MAIDMENT *et al.*, 1999) Matrix-Metalloproteasen identifiziert. Interessanterweise verfügt sogar die einzellige Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* über zwei MMP-Gene. Die Enzyme vermitteln dort bei der Paarung der Gameten unter anderem die Auflösung der Zellwand als Vorstufe der Zellfusion (KINOSHITA *et al.*, 1992; KUBO *et al.*, 2001). Der Mensch besitzt nach derzeitigem Kenntnisstand 23 verschiedene MMPs; sieben davon sind membrangebunden, alle anderen sekretorische Enzyme (AMĂLINEI *et al.*, 2007; SOMERVILLE *et al.*, 2003).

Obwohl man ihre Aufgaben lange Zeit ausschließlich in der proteolytischen Degradation von Matrix-Komponenten sah, haben spätere *in vivo*-Studien gezeigt, dass MMPs in der Lage sind, zahlreiche Nicht-EZM-Proteine als Substrate zu erkennen und zu spalten. Die gerichtete Spaltung großer unlöslicher Matrix-Elemente und assoziierter Moleküle führt zur Bildung von bioaktiven Fragmenten und Wachstumsfaktoren und zur Veränderung der Matrix-Struktur an sich. Da diese Substrate eine große Bandbreite an physiologischen Bereichen abdecken, sind MMPs sowohl in eine Vielzahl an homöostatischen Funktionen, wie Wachstum, Gewebereparatur oder Immunität, als auch bei pathologischen Prozessen, wie Krebs, Arthritis, Fibrosen oder Entzündungen, involviert (FU *et al.*, 2008; GILL & PARKS, 2008; MOTT & WERB, 2004).

1.1.3. Struktur

Biochemisch betrachtet gehören MMPs zur Gruppe der Hydrolasen und dort im engeren Sinne zu den Endopeptidasen (vgl. Abb. 3). Neben den Serin-, Cystein- und Asparagin-Endopeptidasen stellen die Metalloproteasen innerhalb dieser eine eigene Gruppe, die sich durch das Vorkommen eines zentralen Metallions (z. B. Zn^{2+}) im katalytisch aktiven Zentrum der Enzyme auszeichnet. Innerhalb der Metalloproteasen werden weitere fünf Superfamilien unterschieden. Aufgrund von Topologie- und Sequenzhomologien vereinigten STÖCKER *et al.* (1995) die Astacine, Serralysine, Adamalysine und Matrixine (Matrixmetalloproteasen) in der Gruppe der Metzincine. Die Klassifizierung stützt sich dabei vornehmlich auf Homologien im katalytischen Zentrum, wobei die Namensgebung auf die stark konservierten Elementen eines Methionin-Restes und des Zinc-Bindemotivs (HEXXHXXGXXH) zurückgeht (BODE *et al.*, 1993; STÖCKER *et al.*, 1995).

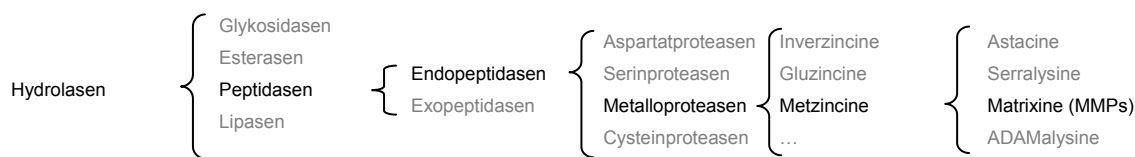


Abb. 3: Biochemische Einordnung der Matrix-Metalloproteasen

Matrixmetalloproteasen sind Multidomänen-Proteine, die aufgrund der Zusammensetzung der einzelnen Domänen in unterschiedliche Klassen eingeteilt werden. Abb. 4 gibt eine Einteilung der humanen MMPs nach SOMERVILLE *et al.* (2003) an. In der Regel bestehen MMPs (neben dem für die Sekretion verantwortlichen Signalpeptid) aus drei Hauptdomänen:

Eine N-terminale Prodomäne mit einem als "Cystein-Switch" bezeichneten, stark konservierten Abschnitt (PRCG(V/N)PD), der über einen Cystein-Rest das aktive Zink-Ion der katalytischen Domäne komplexiert und somit das Enzym im inaktiven Zustand hält. Eine proteolytische Entfernung dieser Region erfolgt bei fast allen MMPs nach der Sekretion in den extrazellulären Raum und ist wesentlicher Bestandteil bei der regulatorischen Kontrolle der Protease. Ausnahmen bilden hierbei nur MMP-11, MMP-28 und die membranverankerten MMPs, die über ein intramolekulares Furin-Erkennungsmotiv verfügen, wodurch sie intrazellulär zum aktiven Enzym prozessiert werden können.

Es folgt eine katalytische Domäne, die das Zink-Ion im aktiven Zentrum trägt und den Ort der eigentlichen Enzymkatalyse darstellt. Das Zink-Ion bindet dabei an 1(-3) freie Wassermoleküle und drei Histidin-Reste (DÍAZ *et al.*, 2006; VISSE & NAGASE, 2003). Das für die proteolytische Reaktion wichtige Wassermolekül wird dabei von einem flankierenden Glu-Rest in Position gehalten. Das aktive Zentrum besteht aus drei das Zink-Ion umgebenden Substrat-Binde-Bereichen, die die Substratspezifität jedes MMPs definieren. Die für die vorliegende Arbeit relevanten Matrix-Metalloproteasen 2 und 9 verfügen innerhalb der katalytischen Domäne noch zusätzlich über drei sich wiederholende Fibronectin-Typ II-Domänen. Diese beinhalten jeweils zwei intramolekulare Disulfid-Brücken und dienen der spezifischen Substrat-Bindung.

Über eine Hinge-Region schließt sich C-terminal eine Hemopexin-Domäne an, deren Aufgabe ebenfalls in der Substrat-Erkennung und -Bindung liegt. Sie besteht aus einer vierblättrigen β -Propeller-Struktur, wobei jedes Blatt aus vier antiparallelen β -Strands und einer α -Helix aufgebaut ist. Das erste und das letzte Blatt sind dabei über eine Disulfid-Brücke miteinander verbunden. Bei einigen MMPs kann diese Domäne fehlen (MMP-7, MMP-26, MMP-23) oder C-terminal durch eine Membrananker-Region (GPI- oder

Transmembran-Anker) ergänzt sein (NAGASE & WOESSNER, 1999; STERNLICHT & WERB, 2001; vgl. Abb. 5).

Analog zu zellmembranverankerten MMPs werden sekretorische MMPs wahrscheinlich nicht ungerichtet in den Perizellularraum abgegeben, sondern in definierten Bereichen konzentriert, um effektiv Substrate abbauen zu können. Die Fixierung der Proteasen erfolgt dabei über diverse Zelloberflächen-Komponenten, wie z. B. Integrine, Zelloberflächen-Proteoglykane oder Cholesterol (Fu *et al.*, 2008).

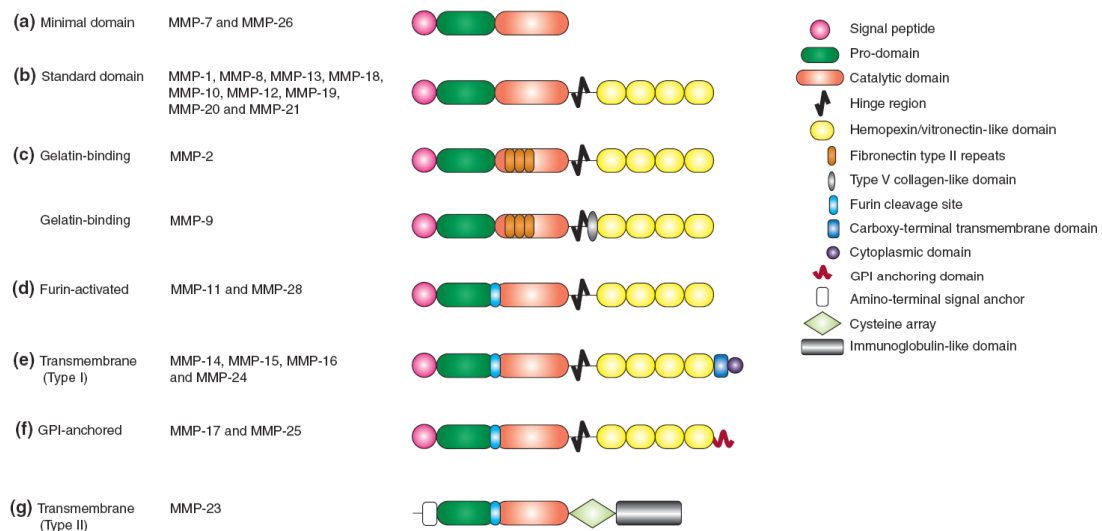


Abb. 4: Matrixmetalloproteasen sind Multidomänen-Proteine, die aufgrund der Zusammensetzung der einzelnen Domänen in unterschiedliche Klassen eingeteilt werden. Einteilung der humanen MMPs nach SOMERVILLE *et al.* (2003)

Die experimentellen Arbeiten im Rahmen dieser Dissertation konzentrierten sich ausschließlich auf die humanen Matrix-Metalloproteasen MMP-2 (Gelatinase A, 72 kDa, Typ-IV-Kollagenase) und MMP-9 (Gelatinase B, 92 kDa). Vergleichende Röntgenstrukturanalysen beider MMPs zeigten konservierte Sekundär-Strukturen der Fibronectin-Domänen. Der einzige Unterschied zeigt sich bei der zweiten Fibronectin-Domäne, die bei MMP-9 keinerlei Kontakt zur katalytischen Domäne aufweist, bei MMP-2 jedoch über einen maßgeblichen Bereich mit dieser interagiert. Auch die Konformationen der Proteinabschnitte im Bereich des Cystein-Switchs der Prodomäne und des aktiven Zentrums sind hoch konserviert, was bei einem eventuell gewünschten Design von Inhibitoren speziell gegen nur eine Gelatinase eine zu überwindende Hürde darstellt. Beide Gelatinasen zeigen eine im Vergleich zu anderen MMPs vergleichsweise große (S1'-)Inhibitor-Binde-Tasche, die bei beiden nur an Aminosäure-Position 424 eine Abweichung zeigt. MMP-2 trägt hier ein Thr⁴²⁴, das in MMP-9 durch ein Arg⁴²⁴ ersetzt ist (ELKINS *et al.*, 2002; MORGUNOVA *et al.*, 1999).

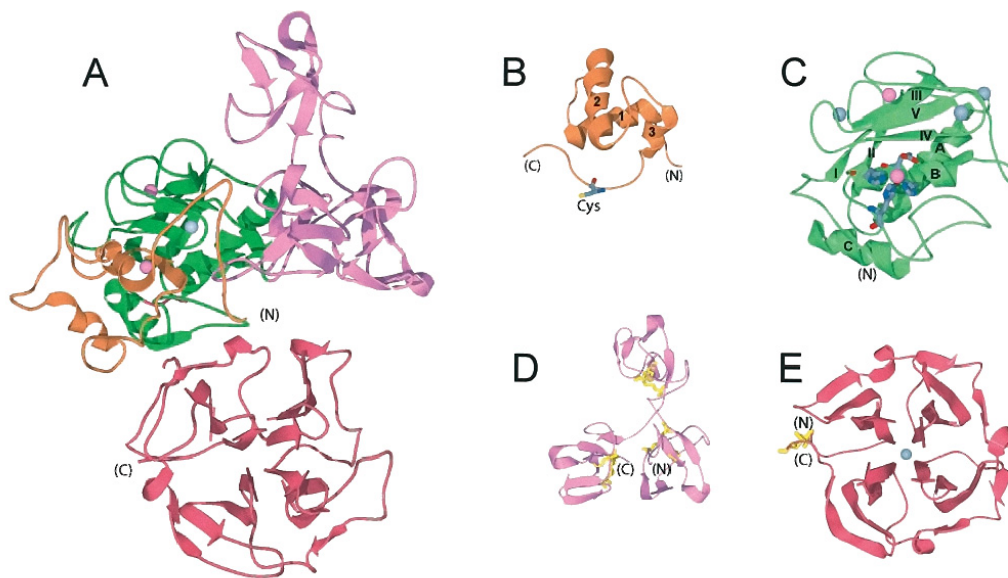


Abb. 5: 3D-Struktur von MMPs. (A) proMMP2. orange = Propeptid, grün = katalytische Domäne, rosa = Fibronectin-Typ II-Domäne, rot = Hemopexin-Domäne, (B) Propetid mit Cystein-Switches, (C) katalytische Domäne von MMP-1 mit Histidinen, die das katalytische Zink koordinieren, und Glutamat des aktiven Zentrums, (D) drei Fibronectin-Typ II-Domänen von MMP-2 mit intramolekularen Disulfid-Brücken (gelb), (E) Hemopexin-Domäne von MMP-1 mit intramolekularer Disulfidbrücke (gelb) zwischen Blatt 1 und 4 (VISSE & NAGASE, 2003)

1.1.4. Regulation

Durch die große Bandbreite potentieller EZM-Substrate und die daraus resultierende, zentrale regulatorische Funktion der Matrix-Metalloproteasen unterliegen MMPs selbst einer komplexen Regulation auf den Ebenen von Replikation, Transkription, Translation, Sekretion, Aktivierung, Inhibition und Degradation (PAGE-MCCAW *et al.*, 2007; STERNLICHT & WERB, 2001; vgl. Abb. 6).

Die Transkription von Matrix-Metalloprotease-Genen unterliegt einer strengen Kontrolle durch zahlreiche stimulatorische oder supressive Faktoren, die mehrfache Signalwege beeinflussen. So können z. B. Phorbol-Ester, Integrin-abgeleitete Signale, EZM-Proteine, Cytokine, Wachstumsfaktoren oder Zellstress die Expression vieler MMPs beeinflussen (STERNLICHT & WERB, 2001). Einzige Ausnahme auf dieser Regulationsebene stellt MMP-2 dar, die eine konstitutive Basalexpression zeigt, welche jedoch auch hochreguliert werden kann (FINI *et al.*, 1995).

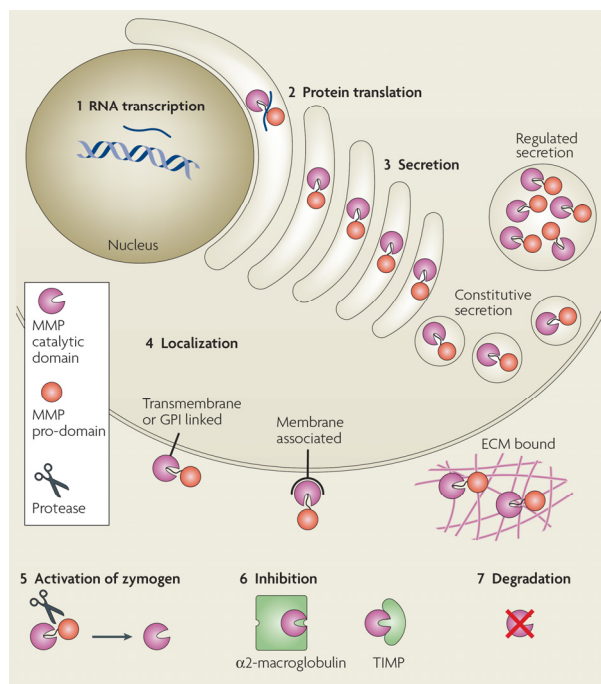


Abb. 6: MMP-Regulationsmechanismen. MMPs unterliegen einer Vielzahl von Regulationsmechanismen auf den Ebenen von Replikation, Transkription, Translation, Sekretion, Aktivierung, Inhibition und Degradation (PAGE-MCCAW *et al.*, 2007).

Auf post-transkriptionaler Ebene können Kontroll-Mechanismen auf Stufen der mRNA-Stabilisierung oder des -Splicings rekrutiert werden (VINCENTI, 2001). Die Sekretion der MMPs erfolgt in der Regel konstitutiv; lediglich für MMP-8 und MMP-9 wurde in Spezialfällen eine signalvermittelte Induktion der Sekretion beobachtet (HASTY *et al.*, 1990).

Essentielle Stufen bei der Regulation von MMPs sind die Umsetzung der latenten *pro*MMPs in ihre aktive Form und Möglichkeiten ihrer späteren Inaktivierung (FU *et al.*, 2008).

Die Aktivierung von MMPs erfolgt immer durch das Aufbrechen des Cystein-Switchs (VAN WART & BIRKEDAL-HANSEN, 1990). Dies erfordert nicht zwingend die proteolytische Entfernung der Proregion, sondern lediglich eine Unterbrechung der Thiol-Zink-Interaktion. Für MMP-9 konnten BANNIKOV *et al.* (2002) enzymatisch aktive *pro*MMP-Formen in Plazenta-Gewebe nachweisen. Werden solche allosterischen Aktivierungen mit nicht-natürlichen Substraten durchgeführt, kommt es oftmals zu einer autolytischen Abspaltung der Proregion. Initiale Schritte bei der Aktivierung von MMPs können dabei z. B. von Substraten, Proteasen oder anderen MMPs ausgehen (FU *et al.*, 2008). Ausnahmen bei dieser Regulationsebene stellen Furin-aktivierte MMPs dar, die intrazellulär durch Proproteinkonvertasen aktiviert und bereits in ihrer aktiven Form sezerniert werden.

Eine Inaktivierung der MMPs findet auf ebenso vielfältige Weise statt. Ihre natürlichen Inhibitoren werden als TIMPs (tissue inhibitors of matrix metalloproteinases) bezeichnet. Hierbei handelt es sich um die vier Glykoproteine TIMP-1, -2, -3 und -4 mit einer Größe von 21-28 kDa, die spezifische Matrix-Metalloproteasen stöchiometrisch im Verhältnis 1:1

binden und diese reversibel durch Blockierung des aktiven Zentrums hemmen können (vgl. Abb. 7). Eine Bindung ist dabei nicht auf aktive MMPs beschränkt; latente Enzyme können sogar im Komplex mit TIMPs in eine aktive Form überführt werden (STERNLICHT & WERB, 2001). Bei den in der vorliegenden Arbeit behandelten Enzymen wird die natürliche Hemmung von MMP-2 durch TIMP-2, die von MMP-9 durch TIMP-1 übernommen. Es ist wahrscheinlich, dass neben TIMPs auch andere Proteine als natürliche MMP-Inhibitoren fungieren; z. B. konnte RECK, ein membrangebundenes Glykoprotein als Inhibitor für MMP-2, MMP-9 und MMP-14 identifiziert werden (OH *et al.*, 2001).

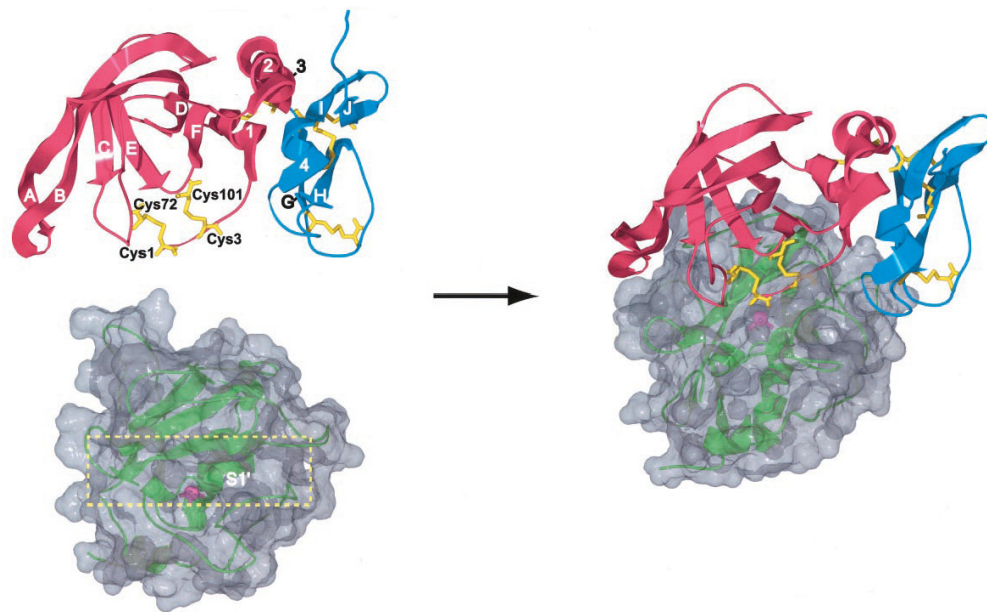


Abb. 7: Inhibition von MMP-14 durch TIMP-2. TIMP-2 ist als Bänderdiagramm dargestellt. α -Helices sind von 1-4, β -Strands von A-J beschriftet. Die katalytische Domäne von MMP-14 ist als Bänderdiagramm mit transparenter Oberfläche dargestellt. Die Lage der katalytischen Region ist gelb eingrahmt; darin sind die S1'-Inhibitor-Bindetasche sowie das zentrale Zn^{2+} -Ion (violett) angezeigt. Der Komplex zeigt eine um die X-Achse gedrehte katalytische Domäne, bei der die Chelatierung des Zn^{2+} -Ions durch das N-terminale Cystein von TIMP-2 sichtbar ist (VISSE & NAGASE, 2003).

Die Komplexität der extrazellulären Regulation der MMP-Aktivität wird am Beispiel des 'Aktivierungsmechanismus' von MMP-2 deutlich; dieser wird durch ein Zusammenspiel von TIMP-2 und MMP-14 (= MT1-MMP) verwirklicht. Bei vergleichsweise niedrigen TIMP-2-Konzentrationen bindet der Inhibitor mit seinem N-Terminus die katalytische Domäne von MMP-14. Eine gleichzeitige Fixierung der Hemopexin-Domäne eines MMP-2-Proteins über den C-Terminus bringt dieses in räumliche Nähe zu benachbarten MMP-14-Enzymen, die ihrerseits die proteolytische Aktivierung des MMP-2 vollziehen. Bei hoher TIMP-2-Konzentration unterbleibt eine Aktivierung durch die vollständige Hemmung aller MMP-14-Proteine (LICHTE *et al.*, 1996; vgl. Abb. 8). MMP-2 kann ihrerseits unter gewissen Umständen wiederum in der Lage sein, andere MMPs, z. B. MMP-9, zu aktivieren (FRIDMAN *et al.*, 1995).

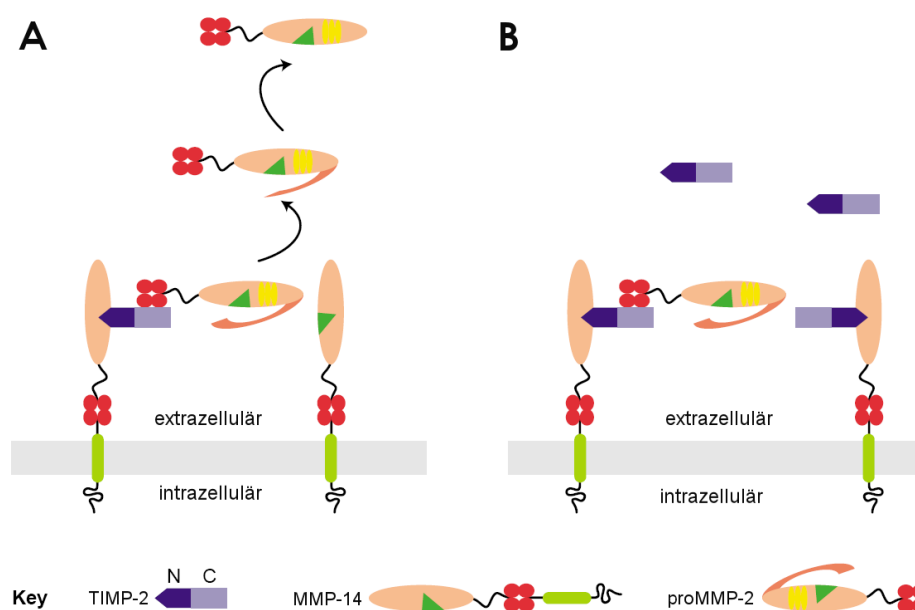


Abb. 8: Mechanismus der proMMP2-Aktivierung. (A) Bei niedrigen TIMP 2-Konzentrationen bindet der Inhibitor mit seinem N-Terminus an der katalytischen Domäne von MMP-14. Eine gleichzeitige Fixierung der Hemopexin-Domäne eines MMP-2-Proteins über den C-Terminus bringt dieses in räumliche Nähe zu benachbarten MMP-14-Enzymen, die die proteolytische Aktivierung von MMP-2 vollziehen. (B) Bei hoher TIMP-2-Konzentration unterbleibt eine Aktivierung durch die vollständige Hemmung aller MMP-14-Proteine (LAFLEUR *et al.*, 2003).

1.1.5. Rolle in pathologischen Prozessen

Neben ihrer Funktion bei Entwicklungs- und Anpassungsprozessen kommt den Matrix-Metalloproteasen eine zentrale Rolle bei pathologischen Veränderungen zu. Zum Gegenstand in der onkologischen Forschung wurden MMPs erstmals in den Siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts, als erkannt wurde, dass das Auftreten maligner Tumore sehr häufig mit einer fehlerhaften – meist überdurchschnittlich erhöhten – Produktion und Aktivierung von MMPs korreliert (STERNLICHT & WERB, 2001). Seither wurde eine Vielzahl weiterer Studien veröffentlicht, die einen signifikanten Zusammenhang zwischen Krebs und dem verstärkten Auftreten von MMPs belegen.

Tumorstadium und Metastasierung stellen eine komplexe Kaskade verschiedenster Ereignisse dar, von denen die proteolytische Auflösung der Extrazellulären Matrix (EZM) einen essentiellen initialen Schritt darstellt. MMPs sind hieran maßgeblich beteiligt, wobei deren proteolytische Aktivität natürlicherweise durch spezifische Inhibitoren reguliert wird (s. o.). Die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen hängt entscheidend von dem koordinierten Wechselspiel zwischen proteolytischen MMPs und Zell/Matrix- bzw. Zell/Zell-Kontakt-vermittelnden Proteinen ab. Gerade dieses Gleichgewicht ist in Tumorzellen häufig

empfindlich gestört und geht oft mit einer Überexpression und/oder verstärkten Aktivität der MMPs einher.

Insbesondere Vertreter der Gelatinase-Familie (MMP-2 und MMP-9) sind hierbei überproportional häufig vertreten, da sie zu einer schnellen Invasion, Metastasierung und Proliferation entarteter Zellen beitragen, indem sie die Angiogenese und damit die Bildung tumoreigener Blutgefäße fördern (MASSON *et al.*, 2005; RAUVALA *et al.*, 2006; TURPEENNIEMI-HUJANEN, 2005; ZHENG *et al.*, 2006). Abnormale Aktivitäten von MMP-2 und MMP-9 können mit diversen Krebsarten, wie Bauchspeicheldrüsen-, Brust-, Darm-, Eierstock-, Leber- und Hautkrebs sowie Tumoren im Bereich des zentralen Nervensystems oder des Magens in Verbindung gebracht werden (FORSYTH *et al.*, 1999; GERG *et al.*, 2008; GIANNOPOULOS *et al.*, 2008; HOFMANN *et al.*, 1999; SCHMALFELDT *et al.*, 2001; TÊTU *et al.*, 1998; ZENG *et al.*, 1999; ZHENG *et al.*, 2006).

Neben ihrer zentralen Rolle bei Entwicklung und Metastasierung von Krebserkrankungen finden sich weitere nicht-canceröse Krankheitsbilder, die eng mit Fehlfunktionen bei der Regulation von Matrix-Metalloproteasen, insbesondere MMP-2 und MMP-9 verknüpft sind. Zu diesen zählen neben Herzkreislauf-Erkrankungen (DORMÁN *et al.*, 2007), neurologischen Erkrankungen (AGRAWAL *et al.*, 2008) oder Alzheimer (NALIVAEVA *et al.*, 2008) vor allem Diabetes mellitus, wo Gelatinasen in außergewöhnlich hohen Konzentrationen im Blutgefäßgewebe vorkommen (KADOGLU *et al.*, 2005), und Arthritis, bei der sie in betroffenen Gelenken hochreguliert sind (ITOH *et al.*, 2002).

Auch Krankheitsbilder, die durch Pathogene hervorgerufen werden, können durch MMP-Fehlfunktionen gefördert werden. Beispielsweise steigert eine Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* die MMP-9-Expression in der Lunge (RIVERA-MARRERO *et al.*, 2002). Der Übergang des West-Nil-Virus vom Blut in das Gehirn wird ebenfalls von MMP-9 ermöglicht (WANG *et al.*, 2008). Neuere Untersuchungen haben auch einen Zusammenhang der Pathogenität des HIV-Erregers mit MMPs begründet (MASTROIANNI & LIUZZI, 2007).

1.1.6. MMP-Inhibitoren

Die Entwicklung und Validierung neuartiger Inhibitoren gegen diese Gruppe tumorrelevanter Proteine ist ein wichtiges Anliegen der klinischen Grundlagenforschung. Durch ihre Fähigkeit, die Entwicklung von Krebs sowohl im frühem als auch im spätem Stadium zu fördern, kommt der Entwicklung geeigneter MMP-Hemmstoffe eine wachsende Bedeutung in der heutigen Onkologie zu. Da MMPs im gesunden und ausgewachsenen Körper in der Regel nur schwach oder gar nicht aktiv sind (STERNLICHT & WERB, 2001), wurde dem

Einsatz MMP-spezifischer Inhibitoren anfangs eine hohe Toleranz und Verträglichkeit prognostiziert.

In der Entwicklung von MMP-Hemmstoffen wird eine Vielzahl an Angriffspunkten adressiert, die unter anderem Blockierung der mRNA-Synthese, Chelatierung des aktiven Zink-Ions und Bindung an das aktive Zentrum einschließen. Die hohen Erwartungen bei den Erprobungen der ersten Generation von MMP-Inhibitoren wurden rasch durch das Auftreten gravierender Nebenwirkungen, vor allem des Muskel-Skelett-Syndroms, getrübt. Bei einigen Patienten nahmen die Gelenkschmerzen, Ödeme, Hautverfärbungen und Mobilitätseinschränkungen solche Ausmaße an, dass sie um einen vorzeitigen Abbruch der Testreihe baten (PETERSON, 2004; PETERSON, 2006). Die Ursachen dafür lagen vornehmlich im breiten Wirkungsspektrum der Inhibitoren begründet, die nicht nur MMPs, sondern darüber hinaus auch Adamalysine und andere zinkabhängige Enzyme beeinflussten (FINGLETON, 2008). Erschwerend kam ihre nur schwache Selektivität innerhalb der MMPs hinzu, was vor allem durch die hoch konservierte Struktur der S1'-Inhibitor-Bindetasche im aktiven Zentrum hervorgerufen wird. Allerdings zeigen MMPs in diesem Bereich auch spezifische Unterschiede, die Ansatzpunkte bei der weiteren Entwicklung von Inhibitoren darstellen (OVERALL & KLEIFELD, 2006; RUSH & POWERS, 2004).

Bisher wurden etwa 60 MMP-Inhibitoren in der klinischen Erprobung bei diversen Krankheiten, wie z. B. Krebs, Arthritis oder Herz-Kreislauf-Krankheiten, eingesetzt. Allerdings hat nur das Präparat Periostat® der Firma COLLAGENEX PHARMACEUTICALS eine Zulassung als Breitbandantibiotikum erhalten und wird dabei zur MMP-Hemmung bei dentalen Operationen eingesetzt. Hierbei handelt es sich um ein Tetracyclin-Analog, das in die mRNA-Synthese von MMPs eingreift und auch unter dem Namen ‚Doxycyclin‘ bekannt ist. Fünf Hemmstoffe befinden sich derzeit noch auf der Stufe der klinischen Erprobung. Die Produkte Rebimastat (BRISTOL MYERS SQUIBB) und Neovastat (AETERNA LABORATORIES) befinden sich in Phase 3, COL-3, Dermostat (COLLAGENEX) und S-3304 (SHIONOGI) in Phase 2 der klinischen Erprobung (CORBITT *et al.*, 2007; TU *et al.*, 2008).

Darüber hinaus wird auch einigen natürlichen MMP-Hemmstoffen großes Potential bei therapeutischen Ansätzen zugeschrieben. Genistein aus *Glycine max* ist in der Lage, die Expression von TIMP-1 zu steigern, was zu einer verminderten Invasionsfähigkeit bei Brustkrebs-Zelllinien führt. Bei dem aus Zitrusfrüchten isolierten Nobelitin deuten Untersuchungen darauf hin, dass eine effektive Behandlung von Gehirn- und gastrointestinalen Tumoren möglich ist. Ebenso birgt Cucurmin aus *Curcuma spec.* großes Potential bei der Bekämpfung gastrointestinaler Krebsarten. Weitere Naturstoffe mit anticancerogener Wirkung sind z. B. Xanthorrhizol aus *Curcuma spec.*, Catechin und Theaflavin aus *Camellia sinensis*. LEE *et al.* (2008) konnten nachweisen, dass ein wässriger Extrakt aus *Buddleja officinalis* die Glukose-induzierte Expression von MMPs in

Nabelschnurepithelien reduziert, wodurch ein Potential bei der Behandlung von Diabetes mellitus-Patienten gegeben ist. Die medizinische Wirkung fast aller diese Stoffe basiert zumindest zum Teil auf Inhibierung der Matrix-Metalloproteasen MMP-2 und MMP-9 (LEE *et al.*, 2008; MANNELLO, 2006), wodurch die zentrale Rolle der Gelatinasen bei den Therapieansätzen nochmals verdeutlicht wird. Abb. 9 zeigt die katalytische Domäne von MMP-9 im Komplex mit einem Inhibitor.

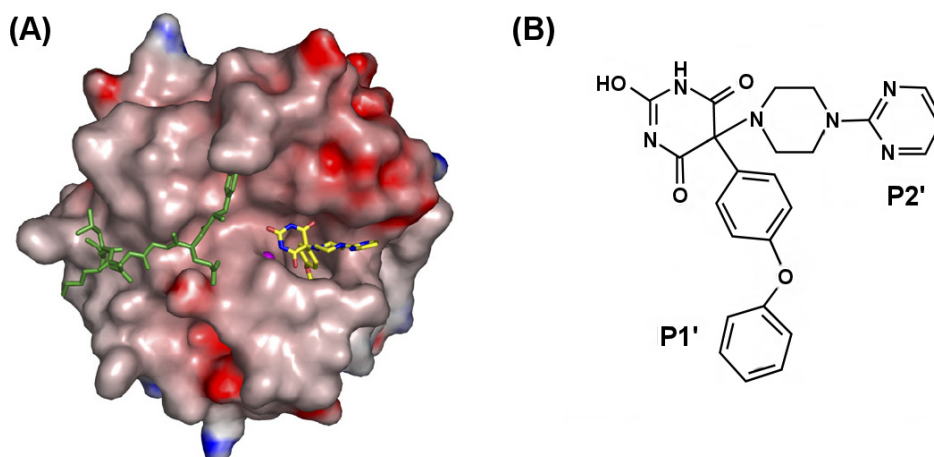


Abb. 9: Katalytische Domäne von MMP-9 im Komplex mit einem Inhibitor. (A) Die Färbung entspricht dem elektrostatischen Potential (rot = positiv, blau = negativ), das katalytische Zink-Ion ist in violett, der Inhibitor als farbiges Stäbchenmodell dargestellt. Das grüne Stäbchenmodell gibt die N-terminalen Aminosäuren (Phe¹¹⁰-Asp¹¹³) der katalytischen Domäne an. (B) Strukturformel des Inhibitors RO-206-0222 = (5-(4-phenoxy-phenyl)-5-(4-pyrimidin-2-yl-piperazin-1-yl)-pyrimidin-2,4,6-trion) (TOCHOWICZ *et al.*, 2007).

1.2. Hefen in der Biotechnologie

Eine biotechnologische Produktion von Fremdproteinen in einzelligen Wirtsorganismen ermöglicht eine kostengünstige Bereitstellung großer Produktmengen in konstanter Qualität. In den 1970er Jahren wurde das erste in *E. coli* rekombinant hergestellte Protein Somatostatin, ein Säugerhormon, beschrieben (ITAKURA *et al.*, 1977). Um die damals biotechnologisch produzierte Menge der Substanz auf herkömmlichem Wege zu gewinnen, hätte man diese aus ca. 500.000 Schafshirnen extrahieren müssen. Dieses Ereignis gilt als Meilenstein in der Gentechnik. *Escherichia coli* ist bis heute als rekombinantes Expressionssystem sehr populär und entsprechend weit verbreitet, vor allem wegen des schnellen Wachstums, der Fähigkeit zur Fermentation und der hohen Syntheseleistungen. Ein großer Nachteil bei der Produktion komplexer eukaryontischer Proteine in *E. coli* liegt vor allem in der mangelnden Fähigkeit, post-translationale Modifikationen, wie z. B. Glykosylierungen, Phosphorylierungen oder Disulfidbrücken-Bildungen durchzuführen.

(YIN *et al.*, 2007). Aus diesem Grund gerieten eukaryontische Einzeller in den Fokus der heterologen Proteinexpression.

Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae* oder *Pichia pastoris* sind heute populäre Modellorganismen in der biotechnologischen Forschung. Ihre einfache Handhabung und genetische Manipulierbarkeit, ihr Status als gentechnologisch unbedenklich (GRAS – generally recognized as safe) und der Umstand, dass Hefen trotz ihrer geringen Genomgröße dennoch alle Merkmale eines echten Eukaryonten besitzen, macht die Hefe zum idealen Wirt in der Nahrungsmittel-, Getränke- oder pharmazeutischen Industrie, vor allem bei der Herstellung therapeutisch relevanter Proteine des Menschen (ROMANOS *et al.*, 1992). Ihre rigide Zellwand ermöglicht darüber hinaus die kovalente Verankerung biotechnologisch relevanter Enzyme auf ihrer Oberfläche (SCHREUDER *et al.*, 1993; s. u.).

Phylogenetisch gesehen gehören Hefen zur Abteilung der *Ascomycota*. Die kugelförmigen, ovalen oder zylindrischen Zellen haben eine Größe von etwa 6-10 µm und sind als fakultative Anaerobier in der Lage, abhängig vom Sauerstoffangebot aerob bzw. anaerob zu wachsen. Die Fähigkeit zur Gärung findet beispielsweise bei der Herstellung alkoholischer Getränke Verwendung.

Saccharomyces cerevisiae, *Pichia pastoris*, *Zygosaccharomyces bailii* und *Kluyveromyces lactis* gliedern sich in die monophyletische Klasse *Saccharomycetes*, Ordnung *Saccharomycetales* ein. Die Klasse besteht aus etwa 1.000 Arten einzelliger Pilze, die vornehmlich saprobiontisch in Assoziation mit Pflanzen oder Tieren leben. Wenige Arten sind pflanzen- oder humanpathogen (ERIKSSON & WINKA, 1997; SUH *et al.*, 2006). Die Entwicklung der fünften verwendeten Hefe-Art *Schizosaccharomyces pombe* hat sich evolutionsgeschichtlich recht früh (vor etwa einer Milliarde Jahren) von den *Saccharomycetes* getrennt und wird heute in der Unterabteilung *Taphrinomycotina* in der monotypischen Klasse *Schizosaccharomycetes* in einer eigenen Ordnung *Schizosaccharomycetales* geführt (ERIKSSON & WINKA, 1997; FORSBURG & RHIND, 2006; HEDGES, 2002).

Saccharomyces cerevisiae

Die ‚Bäcker-‘ oder ‚Bierhefe‘ *S. cerevisiae* wird schon seit Jahrtausenden vom Menschen zur Brot-, Bier- oder Weinherstellung verwendet. Ende des letzten Jahrhunderts war sie der erste Organismus, der vollständig sequenziert wurde und ist daher bis heute die am besten charakterisierte Hefe-Art (GOFFEAU *et al.*, 1996). Das Hefegenom verteilt sich bei einer Größe von 15 Mb auf 16 Chromosomen. *S. cerevisiae* verfügt als Diplo-Haplont über einen heterophasischen Generationswechsel, der in der biotechnologischen Praxis stabile

Kulturen sowohl in der haploiden als auch in der diploiden Phase ermöglicht. Die Vermehrung erfolgt dabei in der Regel durch Knospung.

Bereits seit Beginn der 1980er Jahre wird die Art bei der Expression von rekombinanten Proteinen eingesetzt (HITZEMAN *et al.*, 1981). Die Anwendungsgebiete reichen von rekombinanter Protein-Produktion über Herstellung von Proteindatenbanken bis hin zu Ganzzell-Biokatalysatoren (KONDO & UEDA, 2004). Über die Jahre zeigten sich bezüglich ihrer Eignung als rekombinantes Expressionssystem jedoch einige Limitierungen, wie niedrige Sekretionsraten, begrenzte Anzahl verfügbarer Signalsequenzen, Hyperglykosylierung oder Degradation der erwünschten Proteine (BRANDUARDI, 2003), wodurch die Entwicklung alternativer Hefe-Expressionssysteme vorangetrieben wurde.

Kluyveromyces lactis

Die Milchhefe *Kluyveromyces lactis* wird bereits seit den 1950er Jahren zur Herstellung von Laktase zur Produktion Laktose-freier Milchprodukte oder als Nahrungsergänzungsmittel verwendet. In den 1980er Jahren wurde in *K. lactis* eines der ersten alternativen Hefe-Expressionssysteme etabliert. Heute werden über 40 heterologe Proteine in *K. lactis* produziert; die Palette umfasst dabei Proteine aus Bakterien, Pflanzen, Viren, Pilzen und Säugern (VAN OUYEN *et al.*, 2006). Die bekannteste biotechnologische Verwendung findet *K. lactis* in der industriellen Produktion von Chymosin, natürlicherweise ein Bestandteil des Kälberlafs, das zur Milchgerinnung bei der Käseherstellung genutzt wird (VAN DEN BERG *et al.*, 1990). *Kluyveromyces lactis* zeigt eine Reihe von Vorteilen gegenüber anderen Hefe-Expressionssystemen, unter anderem die Verfügbarkeit sowohl episomaler als auch integrativer Vektoren, hohe Wachstumsraten und ein vollständig sequenziertes Genom (DUJON *et al.*, 2004).

Zygosaccharomyces bailii

Die Gattung *Zygosaccharomyces* besteht neben *Z. bailii* aus fünf weiteren Arten und hat in der Biotechnologie bisher eine eher untergeordnete Rolle gespielt (KURTZMAN, 2003). *Zygosaccharomyces bailii* ist ein nur sehr lückenhaft charakterisierter Organismus, der vor allem als Schadhefe bei der Wein- und Lebensmittelproduktion auftritt. Er zeichnet sich durch eine außergewöhnlich hohe Toleranz gegenüber hohen Konzentrationen an Zucker, Ethanol und Konservierungsmitteln, hohen Temperaturen und hohem Säuregehalt aus, was ihn zu einem potentiell interessanten Organismus für unkonventionelle biotechnologische Verfahren macht (COLE & KEENAN, 1986; DATO *et al.*, 2008). BRANDUARDI *et al.* entwickelten 2003 das erste Expressionsplasmid pZ₃ für diese Art; bisher wurde allerdings nur eine erfolgreiche Produktion von L-Ascorbinsäure durch rekombinante L-Gulonon-1,4-lacton-

Oxidase aus *Rattus norvegicus* bzw. D-Arabinono-1,4-lacton-Oxidase aus *S. cerevisiae* für diesen Organismus beschrieben (SAUER *et al.*, 2004).

Schizosaccharomyces pombe

Die Fortpflanzung bei *Schizosaccharomyces pombe* erfolgt durch äquale Querteilung, weshalb sie den deutschen Namen ‚Spalthefe‘ trägt. Die wissenschaftliche Artbezeichnung erhielt sie von ihrem Entdecker P. LINDNER, der sie 1893 erstmals aus Hirsebier in Ostafrika isolierte; der Name lehnt sich an das Suaheli-Wort für Bier ‚Pombe‘ an (WIXON, 2002). Als klassischer Haplont tritt *S. pombe* abgesehen vom Zygoten-Status ausschließlich in haploider Form auf. Die Zellen sind in der Regel zylindrisch, können sich aber unter Mangelbedingungen verkürzen und eine rundliche Form annehmen. Gravierende Unterschiede zu der Gattung *Saccharomyces* liegen unter anderem in der Zusammensetzung der Zellwand (ERIKSSON & WINKA, 1997), was eine Übertragung von Zelloberflächen-Expressionssystemen erschwert. Das Genom von *Schizosaccharomyces pombe* wurde Anfang des Jahrhunderts vollständig entschlüsselt: es besteht aus etwa 14 Mb auf drei Chromosomen (WOOD *et al.*, 2002). LEE HARTWELL, TIM HUNT und PAUL NURSE erhielten 2001 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin für ihre Studien zu "Key regulators of the cell cycle", die sie an *S. pombe* als Modellorganismus durchführten.

Pichia pastoris

Ein vielversprechendes Expressionssystem mit einer Reihe entscheidender Vorteile gegenüber den bisher angesprochenen stellt die eng mit *Saccharomyces* verwandte Hefe *Pichia pastoris* dar. Sie ist wie andere phylogenetisch nahe stehende Arten (*Hansenula polymorpha*, *Candida boidinii*) methylo-troph, ist also in der Lage, Methanol als einzige Kohlenstoffquelle zu verwerten (HOLLENBERG & GELLISSEN, 1997; HARTNER & GLIEDER, 2006). Weil Methanol schnell und kostengünstig aus natürlichen Ressourcen (Methan) zu synthetisieren war, wurde *P. pastoris* bereits Mitte des letzten Jahrhunderts von der amerikanischen PHILIPPS PETROLEUM COMPANY in großem Maßstab zur Produktion von Tierfutter kultiviert. *P. pastoris* ist in der Lage, zu überaus hohen Zelldichten von über 130 g Trockenzellmasse pro Liter zu wachsen, was sie in Verbindung mit sehr guten Sekretions- und Glykosilierungseigenschaften im Laufe der Jahre zu einer vielversprechenden biotechnologischen Alternative zu *S. cerevisiae* avancieren ließ (HAGENSON *et al.*, 1991; MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005).

Zur Metabolisierung von Methanol verfügt *P. pastoris* über zwei Alkoholoxigenase-Genloci AOX1 und AOX2 mit unterschiedlich stark induzierbaren Promotoren. Der Promotor von AOX1 reguliert etwa 85 % des gesamten Methanolumsatzes (CREGG *et al.*, 1989). Die Verwendung dieser Promotoren in Expressionsvektoren ermöglicht abhängig von der Wahl

des Expressionsstamms und der Genom-Integrationsstelle die Konstruktion von *Pichia*-Stämmen mit unterschiedlichen Phänotypen: Mut⁺ („methanol utilizing plus“) mit zwei funktionalen Alkoholoxigenasen AOX1 und AOX2 und Mut^S („methanol utilizing slow“) mit nur AOX2. Die daraus resultierenden Veränderungen in der Fähigkeit Methanol zu verwerten, führte in der Praxis zu vielen teils widersprüchlichen Philosophien bezüglich Medien-Zusammensetzung, Kulturbedingungen und Fütterrate, die immer noch in Optimierung begriffen sind (JAHIC *et al.*, 2003; JUNGO *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2003).

Großes Potential kommt *P. pastoris* bei der Produktion von humantherapeutischen Proteinen, im besonderen Maße durch die im Vergleich zu *S. cerevisiae* deutlich reduzierte Glykosylierung, zu. Die bei der Hefe-Glykosylierung angefügten Mannose-Reste führen häufig zu Unverträglichkeiten bei der Applikation rekombinanter Therapeutika. Die Glykosylierungsmuster von *S. cerevisiae* weisen häufig bis zu 200, die von *P. pastoris* nur etwa 8-14 Mannose-Reste auf. Darüber hinaus beobachteten LAM *et al.* (2005) bei in *P. pastoris* hergestellten Antigenen eine Verstärkung der T-Zell-Stimulation im Vergleich zu nicht mannosylierten Antigenen aus *E. coli*. Derzeit werden durch gentechnische Veränderung der *P. pastoris*-Stämme ‚Glykosylierungs-Humanisierungen‘ vorgenommen, die in Zukunft humane Glykosylierungsmuster bei rekombinant hergestellten Proteinen ermöglichen werden (HAMILTON *et al.*, 2006; WILDT & GERNGROSS, 2005).

1.2.1. Zellwandverankerung

Die Zellwand macht 15-30 % der Trockenmasse einer Hefezelle aus. Sie ist etwa 200 nm dick und besteht hauptsächlich aus Mannoproteinen und β -1,3-Glukanen. Die gerüstartigen β -1,3-Glukane umgeben die Zelle als innere Schicht der Zellwand; Mannoproteine beschränken sich vornehmlich auf die äußeren Bereiche. Die Komponenten werden durch stark verzweigte β -1,6-Glukane miteinander verbunden. Chitin bildet einen wichtigen Nebenbestandteil, der im Komplex mit β -1,3-Glukanen die Hydrophobizität der Zellwand vermittelt. Mannoproteine sind stark O- und N-glykosyliert, eng gepackt und limitieren so die Zellwand-Permeabilität bezüglich gelöster Substanzen (HARTLAND *et al.*, 1994; LIPKE & OVALLE, 1998). Bisher sind etwa 20 Oberflächen-Glykoproteine bekannt (YIN *et al.*, 2005). Zellwand-Ankersysteme basieren auf einer genetischen Fusion der Targetprotein-Sequenz an die DNA-Sequenz (oder Teil-Sequenzen) dieser Mannoproteine. Allerdings konnten VAN DER VAART *et al.* (1997) nachweisen, dass es signifikante Unterschiede in der Eignung der Zellwandproteine als Anker bei der heterologen Genexpression gibt.

Durch die Immobilisierung von Proteinen auf der Oberfläche von Hefen ergibt sich eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten als Ganzzell-Biokatalysatoren, Lebend-Vakzinen oder biologische Adsorber (KONDO & UEDA, 2004; KURODA *et al.*, 2001; SALEEM *et al.*, 2008;

UEDA & TANAKA, 2000; ZHU *et al.*, 2006). Die Immobilisierung kann darüber hinaus häufig zu einer signifikanten Erhöhung der Stabilität des Proteins beitragen (SCHREUDER *et al.*, 1996). Die nahe Verwandtschaft der etablierten Hefe-Expressionssysteme und der damit verbundene ähnliche Aufbau ermöglicht oftmals eine Übertragung der Ankersysteme über Gattungsgrenzen hinweg. Eine Übertragung auf *S. pombe* ist aufgrund dessen abweichenden Zellwandbaus meist nur schwer möglich. *S. cerevisiae*-basierte Zellwandanker-Systeme sind bereits seit Jahren etabliert und finden weitreichend Anwendung (BREINIG *et al.*, 2006; BREINIG & SCHMITT, 2002; SCHREUDER *et al.*, 1993). Häufig verwendete Ankersequenzen leiten sich von den Zellwandgenen *CWP2*, *FLO1*, *SED1* oder *AGA1* ab. Ebenso wurden für *K. lactis* (UCCELLETTI *et al.*, 2002) und *Yarrowia lipolytica* (YUE *et al.*, 2008) einige Experimente zur Zellwandverankerung heterologer Proteine durchgeführt.

Aufgrund der steigenden Attraktivität von *P. pastoris* als Expressionssystem für rekombinante Proteine beschäftigt sich derzeit eine Reihe von Arbeitsgruppen mit der Etablierung und Optimierung von Zellwand-Verankerungssystemen in diesem Organismus. In Ermangelung einer frei verfügbaren Genomsequenz stützt man sich dabei auf die Adaptation von erfolgreichen Methoden aus *S. cerevisiae*. MERGLER *et al.* waren im Jahr 2004 die Ersten, die ein *Pichia*-Zelloberflächen-Expressionssystem entwickelten. Die Verankerung des ‚*Kluyveromyces lactis* yellow protein‘ basierte auf der Verwendung der C-terminalen Hälfte von α -Agglutinin (Aga1p) am C-Terminus des Proteins. WANG *et al.* waren in der Lage, eGFP durch C-terminale Fusion mit Pir1p und Aga1p auf der Zelloberfläche zu fixieren (WANG *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2008). Von TANINO *et al.* (2006), REN *et al.* (2007) und JIANG *et al.* (2007) wurden N-terminale Ankersysteme entwickelt, die sich auf die Verwendung von N-terminalen Teilen von Flo1p als Ankerdomäne konzentrierten. In weiteren Untersuchungen zeigte sich, dass die Immobilisierung biologisch aktiver Lipasen auf der Zelloberfläche von *P. pastoris* entscheidende Vorteile gegenüber der Verankerung auf *S. cerevisiae* mit sich bringt, insbesondere bezüglich der Stabilität des Proteins (JIANG *et al.*, 2008). Um die bisherigen Erkenntnisse zur optimierten Proteinexpression in *Pichia* (s. o.) mit der Zelloberflächen-Expression zu vereinen, werden derzeit unter Verwendung des Zelloberflächenproteins α -Agglutinin (Aga1p) Untersuchungen zur Zellwandverankerung mit Glykosylierungs-optimierten Stämmen durchgeführt (JACOBS *et al.*, 2008).

1.3. Ziele der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der rekombinanten Expression humaner Matrix-Metalloproteasen (MMP-2 und MMP-9) auf der Zelloberfläche von Hefen zur Etablierung eines zellbasierten Bioassays für die Identifizierung und systematische Testung neuartiger MMP-Inhibitoren. Die Entwicklung von MMP-spezifischen Inhibitoren zur Therapie maligner Tumore ist von großem medizinischem Interesse. Der derzeit hohe Kostenaufwand bei der Gewinnung aktiver MMPs aus humanen Primärzellen oder Tumor-Zelllinien und deren aufwändige *in vitro*-Aktivierung erschweren jedoch ein effektives Screening nach potentiellen Hemmstoffen. Die Vorteile der Expression humaner Matrix-Metalloproteasen in bzw. auf Hefezellen liegen sowohl in der schnellen Verfügbarkeit der rekombinanten Enzyme als auch im Einsatz der MMP-exprimierenden Hefen als zellbasiertes Testsystem zur Analyse MMP-spezifischer Inhibitoren. Letzteres ermöglicht eine effektive und systematische Testung neuartiger, bioinformatisch vorhergesagter und organisch-chemisch synthetisierter MMP-Hemmstoffe mit hohem Durchsatz. Um eine möglichst optimale Qualität und Funktion der MMPs zu gewährleisten, sollten in einem ersten Schritt die MMP-Gene MMP-2 und MMP-9 in die Genome der Hefen *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *K. lactis*, *P. pastoris* und *Z. bailii* integriert und die betreffenden Genprodukte in sekretorischer Form exprimiert werden, um die Hefen auf ihre Eignung als Wirt zur MMP-Expression zu untersuchen. Innerhalb des selektierten Wirtsorganismus sollte anschließend eine Optimierung der *in vivo*-Aktivierung und der Zellwandverankerung unter Einsatz verschiedener Zellwand-Ankersequenzen durchgeführt werden. Abschließendes Ziel war es, auf der Basis bereits etablierter *in vitro*-Testsysteme, einen gleichermaßen innovativen wie effizienten *in vivo*-Bioassay zu entwickeln, der qualitative und quantitative Aussagen zur Effektivität eines potentiellen MMP-Hemmstoffes erlaubt. Neben den auf der Hefezelloberfläche exprimierten und immobilisierten Enzymen sollten grundlegende Untersuchungen zur Sekretionsoptimierung durchgeführt werden, um auf diese Weise humane MMPs in präparativem Maßstab für Röntgenstrukturanalysen im Komplex mit den jeweils identifizierten MMP-Inhibitoren zugänglich zu machen.

Die vorliegende Arbeit versteht sich als Teil eines Forschungsprojekts, das sich an der Schnittstelle von Molekular-/Zellbiologie, Bioinformatik, Organischer Chemie und Strukturbiologie bewegt. Durch fachübergreifende Kooperationen mit der Bioinformatik (zum Docking und Modelling von MMP-Substraten und -Inhibitoren), der Organischen Chemie (zur Synthese neuartiger MMP-Inhibitoren auf der Basis von Peptiden und Cyclopeptiden) sowie der Strukturbiologie (zur Kristallographie und Strukturaufklärung von MMP/Inhibitor-Komplexen) können die durch das angestrebte Testsystem gewonnenen Daten unmittelbar genutzt werden, um auf deren Basis neuartige MMP-Inhibitor-Leitstrukturen zu identifizieren, die mit Hilfe des etablierten Bioassays direkt validiert werden können und mittelfristig in der klinischen Forschung eine Tumorthherapie ermöglichen sollen.

2. Material und Methoden

2.1. Organismen-Stämme

2.1.1. Bakterien

Tab. 1 gibt die *Escherichia coli*-Stämme an, die in der vorliegenden Arbeit Anwendung fanden. Für Standard-Klonierungsarbeiten wurden TOP10- oder alternativ DH5 α -Zellen verwendet. Nova Blue Singles wurden bei der AccepTor™-Klonierung und BL21(DE3) bei der Protein-Expression in *E. coli* eingesetzt.

Tab. 1: Verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Herkunft / Referenz	Genotyp
DH5 α	PHARMACIA GRANT <i>et al.</i> (1990)	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), λ -
TOP10	INVITROGEN DURFEE <i>et al.</i> (2008)	F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str ^R) endA1 λ ⁻
Nova Blue Singles	NOVAGEN	endA1 hsdR17 (r _{K12} ⁻ m _{K12} ⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F'[proA ⁺ B ⁺ lacI ^q Z Δ M15::Tn10] (Tet ^R)
BL21 (DE3)	BIOMOL STUDIER & MOFFATT (1986)	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])

2.1.2. Hefen

Die Expression heterologer Proteine wurde in den in Tab. 2 aufgeführten Hefe-Stämmen durchgeführt.

Tab. 2: Verwendete Hefe-Stämme nach Gattung geordnet.

Stamm	Herkunft / Referenz	Genotyp
<i>K. lactis</i>		
GG799	NEW ENGLAND BIOLABS	industrielles Isolat, keine Auxotrophien oder genetische Marker
<i>S. cerevisiae</i>		
SEY6210	ROBINSON <i>et al.</i> (1988)	MAT α leu2-3, 112 his3- Δ 200 lys2-801 trp1- Δ 901 suc2- Δ 9
S86c	COOPER & BUSSEY (1989)	MAT α ura3-2 leu2 his3 pra1 prb2 prc1 cps1 (heat cured)
BY4742	WINZELER <i>et al.</i> (1999)	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0
<i>S. pombe</i>		
PW260	HEINTEL <i>et al.</i> (2001)	h ⁻ leu 1.32 ura 4. dl18 ade 6.210
<i>P. pastoris</i>		
GS115	INVITROGEN	his4 (Phänotyp: Mut ⁺)

Stamm	Herkunft / Referenz	Genotyp
KM71	INVITROGEN	<i>arg4 his4 aox1</i> : ARG4 (Phänotyp: Mut ^s , ARG ⁺)
<i>Z. bailii</i>		
ATCC60483	PUT & DE JONG (1982)	kein Genotyp verfügbar
ATCC36947	PANDYA <i>et al.</i> (1995)	kein Genotyp verfügbar

2.2. Plasmide

Im Rahmen der experimentellen Arbeiten wurden weitreichende Klonierungsarbeiten durchgeführt, die bis zur finalen Klonierung in das gewünschte Expressionsplasmid diverse Zwischenklonierungsschritte erforderten. In Tab. 3 sind die verwendeten Grundvektoren zur Zwischenklonierung, in Tab. 4 die Grund- und finalen Expressionsvektoren aufgeführt. Auf eine detaillierte Aufstellung aller resultierender Vektoren der Zwischenklonierung wird an dieser Stelle verzichtet, dieser jedoch im Ergebnisteil (vgl. 3. Ergebnisse, S. 76) explizit Rechnung getragen.

2.2.1. Zwischenklonierung, Templates & Sequenzierung

Tab. 3 und Abb. 10 geben die Grundvektoren an, die in der vorliegenden Arbeit bei Zwischenklonierungsschritten, Sequenzierungen und als PCR-Templates Verwendung fanden.

Tab. 3: Grundvektoren zur Zwischenklonierung, Sequenzierung und DNA-Amplifikation

Bezeichnung	Herkunft / Referenz	Eigenschaften / Verwendung
Zwischenklonierung		
pFB2	BREINIG & SCHMITT (2002)	multicopy Shuttle-Vektor für <i>S. cerevisiae</i> , <i>Amp^R</i> , <i>URA3</i> , enthält <i>KRE1_{SS}</i> und <i>CWP2</i> -Anker, basiert auf pPGK (KANG <i>et al.</i> , 1990)
pRS316	SIKORSKI & HIETER (1989)	Centromer-Shuttle-Vektor für <i>S. cerevisiae</i> , <i>Amp^R</i> , <i>URA3</i>
Templates		
pYES-RAS-GFP2	GIESSELMANN (2007)	Template für Vektor-Umbauten (<i>RAS</i>)
pPGK-M28-I	SCHMITT (1995)	Template für K28-Signalsequenz
pZ ₃ -Zygocin	LIND (unveröffentlicht)	Template für Zygocin-Signalsequenz
pFB2-EstA	BREINIG <i>et al.</i> (2006)	Template für Esterase A
Sequenzierung		
pCR [®] II-TOPO [®]	INVITROGEN	<i>Amp^R</i> , <i>Kan^R</i> , T7-, SP6-Promotor, LacZα-Reporter-Gen zur Blau-weiß-Selektion (4,0 kb)
pSTBlue-1	NOVAGEN	<i>Amp^R</i> , <i>Kan^R</i> , T7-, SP6-Promotor, LacZα-Reporter-Gen zur Blau-weiß-Selektion (3,9 kb)

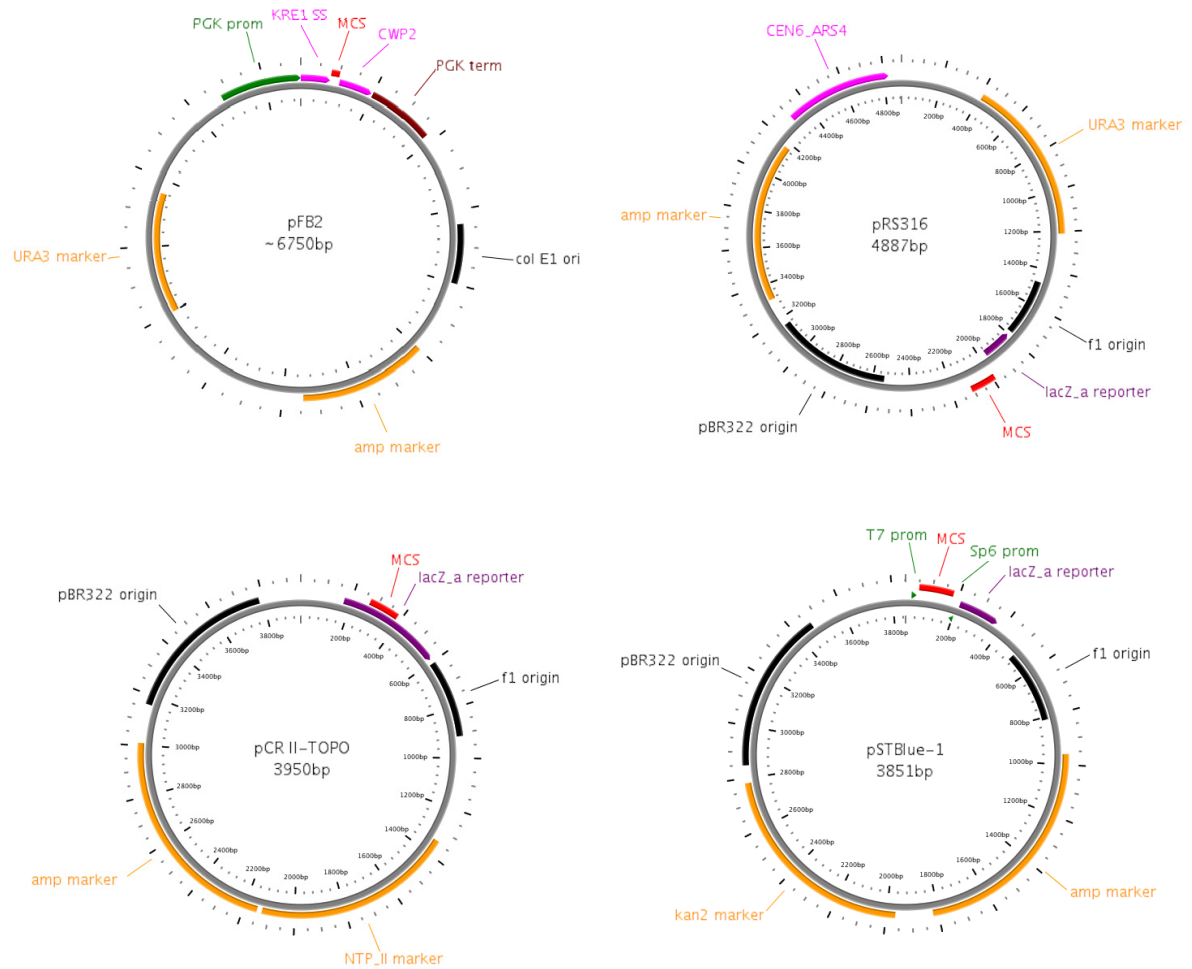


Abb. 10: Vektorkarten der verwendeten Vektoren zur Zwischenklonierung bzw. Sequenzierung. (orange = Markersequenzen, schwarz = Replikationsursprünge, violett = Reportergene, rot = multiple cloning sites, grün = Promotoren, pink = andere Gene)

2.2.2. Expressionsplasmide

In Tab. 4 sind die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstellten Expressionsplasmide und die zugrunde liegenden Ursprungs-Vektoren aufgeführt.

Tab. 4: Expressionsplasmide – Grundvektoren und im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstellte Expressionsvektoren.

Bezeichnung	Herkunft / Referenz	Eigenschaften
<i>E. coli</i>		
pET24a(+)	NOVAGEN	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor (5,3 kb), <i>Kan^R</i> , T7-Tag-Sequenz, His-Tag-Sequenz, T7-Promotor
pET24-MMP-2-HIS	diese Arbeit	pET24a(+) mit Vollängen-MMP-2 (<i>EcoRI/NotI</i>) zur intrazellulären Expression mit C-terminalem His-Tag

Bezeichnung	Herkunft / Referenz	Eigenschaften
pET24-MMP-9-HIS	diese Arbeit	pET24a(+) mit Volllängen-MMP-9 (<i>EcoRI/NotI</i>) zur intrazellulären Expression mit C-terminalem His-Tag
<i>K. lactis</i>		
pKLAC1	NEW ENGLAND BIOLABS	integrativer <i>K. lactis</i> -Expressionsvektor (9,1 kb), <i>Amp^R</i> , konstitutiver <i>LAC4-PBI</i> -Promotor, α -MF-Signalsequenz, <i>LAC4</i> -Terminator, <i>amdS</i>
pKLAC1-MMP-9s	HOFFMANN (2007)	pKLAC1 mit α -MF-SS und Volllängen-MMP-9 (<i>XhoI/NotI</i>) zur sekretorischen Expression
<i>S. cerevisiae</i>		
pPGK-6 x His-Xa-GST	BERNARDY (2006)	episomaler multicopy <i>S. cerevisiae</i> -Expressionsvektor (7,0 kb), konstitutiver <i>PGK</i> -Promotor und -Terminator, basiert auf pPGK (KANG <i>et al.</i> , 1990)
pPGK-MMP-2s	KESSLER (2006)	pPGK mit <i>KRE1_{SS}</i> und Volllängen-MMP-2 (<i>XhoI/XbaI</i>) zur sekretorischen Expression
pPGK-MMP-9s	KESSLER (2006)	pPGK mit <i>KRE1_{SS}</i> und Volllängen-MMP-9 (<i>XhoI/XbaI</i>) zur sekretorischen Expression
<i>S. pombe</i>		
pREP1	MAUNDRELL (1993)	episomaler multicopy <i>S. pombe</i> -Expressionsvektor (8,8 kb), <i>Amp^R</i> , <i>LEU2</i> , Thiamin-reprimierbarer <i>nmt</i> -Promotor
pREP-BD	diese Arbeit	pREP1 mit alternativer MCS durch <i>XRASX</i> (<i>NdeI/MaeI/SmaI</i>)
pREP-KRE1 _{SS} -MMP-2s	diese Arbeit	pREP-BD mit <i>KRE1_{SS}</i> und Volllängen-MMP-2 (<i>XhoI/BamHI</i>) zur sekretorischen Expression
pREP-KRE1 _{SS} -MMP-9s	diese Arbeit	pREP-BD mit <i>KRE1_{SS}</i> und Volllängen-MMP-9 (<i>XhoI/BglII</i>) zur sekretorischen Expression
pREP-K28 _{SS} -MMP-2s	diese Arbeit	pREP-BD mit <i>K28_{SS}</i> und Volllängen-MMP-2 (<i>XhoI/BamHI</i>) zur sekretorischen Expression
pREP-K28 _{SS} -MMP-9s	diese Arbeit	pREP-BD mit <i>K28_{SS}</i> und Volllängen-MMP-9 (<i>XhoI/BglII</i>) zur sekretorischen Expression
<i>P. pastoris</i>		
pPIC9	INVITROGEN	integrativer <i>P. pastoris</i> -Expressionsvektor (8,0 kb), <i>Amp^R</i> , <i>HIS4</i> , Methanol-induzierbarer <i>AOX1</i> -Promotor und -Terminator, α -MF _{SS}
pPIC9-MMP-2s	HOFFMANN (2007)	pPIC9 mit α -MF _{SS} und Volllängen-MMP-2 (<i>EcoRI/XbaI/BlnI</i>) zur sekretorischen Expression
pPIC9-MMP-9s	HOFFMANN (2007)	pPIC9 mit α -MF _{SS} und Volllängen-MMP-9 (<i>EcoRI/XbaI/BlnI</i>) zur sekretorischen Expression
pPIC9-MMP-2 _{mat} -s	HOFFMANN (2007)	pPIC9 mit α -MF _{SS} und MMP-2 ohne Proregion (<i>EcoRI/XbaI/BlnI</i>) zur sekretorischen Expression
pPIC9-MMP-9 _{mat} -s	HOFFMANN (2007)	pPIC9 mit α -MF _{SS} und MMP-9 ohne Proregion (<i>EcoRI/XbaI/BlnI</i>) zur sekretorischen Expression
pPIC9-MMP-2-HIS	diese Arbeit	pPIC9 mit α -MF _{SS} und Volllängen-MMP-2 (<i>EcoRI/NotI</i>) zur sekretorischen Expression mit C-terminalem His-Tag
pPIC9-MMP-9-HIS	diese Arbeit	pPIC9 mit α -MF _{SS} und Volllängen-MMP-9 (<i>EcoRI/NotI</i>) zur sekretorischen Expression mit C-terminalem His-Tag
pPIC9-MMP-2 _{mat} -HIS	diese Arbeit	pPIC9 mit α -MF _{SS} und MMP-2 ohne Proregion (<i>EcoRI/NotI</i>) zur sekretorischen Expression mit C-terminalem His-Tag

Bezeichnung	Herkunft / Referenz	Eigenschaften
pPIC9-MMP-9 $_{mat}$ -HIS	diese Arbeit	pPIC9 mit α -MF _{SS} und MMP-9 ohne Proregion (<i>EcoRI/NotI</i>) zur sekretorischen Expression mit C-terminalem His-Tag
pPIC9-SED1-MMP-2 (=pMMP _{ACE-II})	diese Arbeit	pPIC9 mit α -MF _{SS} , Volllängen-MMP-2 und <i>SED1</i> (<i>EcoRI/NotI</i>) zur Zelloberflächen-Expression
pPIC9-SED1-MMP-9 (=pMMP _{ACE-IX})	diese Arbeit	pPIC9 mit α -MF _{SS} , Volllängen-MMP-9 und <i>SED1</i> (<i>EcoRI/NotI</i>) zur Zelloberflächen-Expression
pPIC9-SED1-MMP-2 $_{mat}$	diese Arbeit	pPIC9 mit α -MF _{SS} , MMP-2 ohne Proregion und <i>SED1</i> (<i>EcoRI/NotI</i>) zur Zelloberflächen-Expression
pPIC9-SED1-MMP-9 $_{mat}$	diese Arbeit	pPIC9 mit α -MF _{SS} , MMP-9 ohne Proregion und <i>SED1</i> (<i>EcoRI/NotI</i>) zur Zelloberflächen-Expression
pPIC9-CWP2-EstA	MÜLLER (2008)	pPIC9 mit α -MF _{SS} , Esterase A und <i>CWP2</i> (<i>EcoRI/NotI</i>) zur Zelloberflächen-Expression
pPIC9-PIR1-EstA	MÜLLER (2008)	pPIC9 mit α -MF _{SS} , Esterase A und <i>PIR1</i> (<i>EcoRI/NotI</i>) zur Zelloberflächen-Expression
pPIC9-SED1-EstA	MÜLLER (2008)	pPIC9 mit α -MF _{SS} , Esterase A und <i>SED1</i> (<i>EcoRI/NotI</i>) zur Zelloberflächen-Expression
<i>Z. bailii</i>		
pZ ₃	BRANDUARDI <i>et al.</i> (2003)	episomaler <i>Z. bailii</i> -Expressionsvektor (7,9 kb), basiert auf pYX022 (R&D SYSTEMS), <i>Amp^R</i> , <i>Kan^R</i> , konstitutiver TPI-Promotor, Centromer-Region
pZ ₃ -BD	diese Arbeit	pZ ₃ mit alternativer MCS durch <i>ZRASZ</i> (<i>EcoRI/MunI/SacI</i>)
pZ ₃ -MMP-2s	diese Arbeit	pZ ₃ -BD mit Zygodin _{SS} und Volllängen-MMP-2 (<i>EcoRI/BamHI</i>) zur sekretorischen Expression
pZ ₃ -MMP-9s	diese Arbeit	pZ ₃ -BD mit Zygodin _{SS} und Volllängen-MMP-9 (<i>EcoRI/BglII/BamHI</i>) zur sekretorischen Expression

2.3. Arbeitsmaterialien

In den folgenden Tabellen sind die wichtigsten der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Arbeitsmaterialien, wie Antikörper (Tab. 5), Chemikalien, Enzyme, Labormaterialien (Tab. 6) und Kits (Tab. 7), aufgeführt.

Antikörper

Tab. 5: In der vorliegenden Arbeit verwendete primäre und sekundäre Antikörper. (HRP = Meerrettich-Peroxidase, FITC = Fluoresceinisothiocyanat)

primäre Antikörper	erkennt	entwickelt in	Hersteller
Anti-MMP-2	catalytic domain	Rabbit	BIOMOL, Hamburg
Anti-MMP-9	catalytic domain	Rabbit	BIOMOL, Hamburg
Anti-MMP-2	hinge region	Rabbit	SIGMA, Deisenhofen
Anti-MMP-9	hinge region	Rabbit	SIGMA, Deisenhofen
Anti-MMP-2	whole molecule	Rabbit	ABCAM, Cambridge (UK)
Anti-MMP-9	whole molecule	Rabbit	ABCAM, Cambridge (UK)

Anti-His	6 x His	Mouse	GE HEALTHCARE, München
sekundäre Antikörper	Konjugat	entwickelt in	Hersteller
Anti-Rabbit IgG	HRP	Goat	SIGMA, Deisenhofen
Anti-Rabbit IgG	FITC	Goat	SIGMA, Deisenhofen
Anti-Mouse IgG	HRP	Goat	SIGMA, Deisenhofen

Chemikalien, Enzyme & Labormaterialien

Tab. 6: Die wichtigsten der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien, Enzyme und weitere Labormaterialien.

Firma	Produkte
ACROS, Geel (Belgien)	4,4'-Dithiodipyridin
APPLICHEM, Darmstadt	X-Gal, T4 DNA-Ligase
CALBIOCHEM, Darmstadt	MMP-2/MMP-9 Substrat II, human active MMPs
DIFCO, Detroit (USA)	yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate, yeast nitrogen base with amino acids and ammonium sulfate
EPPENDORF, Hamburg	Taq-DNA-Polymerase
EUROGENTEC, Seraing (Belgien)	Smart Ladder
FERMENTAS, St. Leon-Rot	RNAse A, PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Restriktionsenzyme, dNTPs
MILLIPORE, Eschborn	Dialysefilter, MMPs human
NALGENE CRYOWARE, Rochester (USA)	Kryoröhrchen
NUNC, Rochester (USA)	schwarze 96 Well-Mikrotiterplatten (#265301)
PIERCE, Bonn	SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate
ROCHE, Mannheim	PVDF-Membran, Expand™ High Fidelity PCR System, Gelatinase A (72 kDa), Gelatinase A (92 kDa), complete Protease Inhibitor Cocktail
ROTH, Karlsruhe	Rotilabo®-Spritzenfilter
SARTORIUS, Göttingen	Vivaspin 20-Ultrafiltrationseinheiten, Minisart Spritzenvorsatzfilter
SERVA, Heidelberg	β-Mercaptoethanol, Coomassie Brilliant Blue, Triton X-100
SIGMA, Deisenhofen	Acrylamid, Heringssperma-DNA
STRATAGENE, La Jolla (USA)	Herculase® II Fusion DNA Polymerase

Kits

Tab. 7: In der vorliegenden Arbeit verwendete Kits.

Firma	Produkte
ANALYTIK JENA, Jena	innuPREP Plasmid Mini Kit, innuPREP Gel Extraction Kit
EPPENDORF, Hamburg	Perfectprep® Gel Cleanup Kit, Taq-DNA-Polymerase
INVITROGEN, Karlsruhe	TOPO TA Cloning Kit, <i>Pichia</i> Expression Kit
NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt	<i>K. lactis</i> Protein Expression Kit
NOVAGEN, Darmstadt	pSTBlue-1 Acceptor Vector Giga Kit
PEQLAB, Erlangen	E.Z.N.A® Plasmid Miniprep Kit II
PIERCE, Bonn	BCA-Protein Assay Kit

2.4. Nährmedien und Kulturbedingungen

Die im Folgenden aufgeführten Nährmedien und Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, in H₂O dest. gelöst und durch Autoklavieren sterilisiert. Die Lagerung erfolgte bei Flüssigmedien in der Regel bei Raumtemperatur; Agarplatten wurden bei 4 °C gelagert.

2.4.1. Bakterien

SOC-Medium

Pepton	2,0 %
Hefeextrakt	0,5 %
Natriumchlorid	10 mM
Glukose	20 mM
Magnesiumchlorid	10 mM
Magnesiumsulfat	10 mM
Kaliumchlorid	2,5 mM

Die Glukose-Lösung wurde getrennt autoklaviert. Die Lagerung erfolgte in 1 ml-Aliquots bei 4 °C.

LB-Medium

Trypton	1,0 %
Hefeextrakt	0,5 %
Natriumchlorid	0,5 %
(Agar	1,2 %)

Ampicillin-Stammlösung

Ampicillin	50 mg/ml
in 50 % Ethanol	

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

Kanamycin-Stammlösung

Kanamycin	25 mg/ml
-----------	----------

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

X-Gal-Stammlösung

X-Gal	40 mg/ml
in Dimethylformamid	

Die Lösung wurde sterilfiltriert und dunkel bei -20 °C gelagert.

IPTG-Stammlösung

IPTG	100 mM
------	--------

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte im Reagenzglas oder Erlenmeyerkolben bei 37 °C auf einem Inkubationschüttler (INFORS) bei 220 rpm. LB-Agarplatten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37 °C kultiviert.

Zur Selektion von plasmidtragenden Kulturen wurden die entsprechenden Agarplatten sowie die Flüssigkulturen, abhängig vom eingesetzten Plasmid, mit Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml, bzw. mit Kanamycin in einer Konzentration von 25 µg/ml komplementiert.

Beim Blau-weiß-Screening wurden zusätzlich 40 µl X-Gal-Stammlösung (40 mg/ml) und gegebenenfalls 40 µl IPTG-Stammlösung (100 mM) auf die Agarplatten ausgebracht.

Die Induktion der Expression im Stamm BL21 (DE3) erfolgte über Nacht unter Zugabe von 500 µM IPTG bei unterschiedlichen Temperaturen (20 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C).

2.4.2. Hefen

Im Nachfolgenden sind die Medien zur Kultur der Hefe-Stämme aufgeführt. Medien, die ausschließlich für bestimmte Hefe-Gattungen verwendet wurden, sind danach geordnet zu finden.

Synthetisches SC- bzw. Drop-out-Medium (20 mM, pH 7,0)

Glukose	2 %
(bzw. Galaktose	3 %)
Natrium- <i>Di</i> hydrogenphosphat <i>dihydrat</i>	3,12 g/l
<i>Di</i> Natrium-Hydrogenphosphat <i>dihydrat</i>	3,56 g/l
Ammoniumsulfat	0,5 %
Drop-Out- bzw. SC-Mix	0,85 g/l
YNB	1,7 g/l
(Agar	1,2 %)

Die Glukose bzw. Galaktose wurde getrennt autoklaviert und das YNB nachträglich als Stammlösung zugegeben. Die verwendete Puffermenge ergab eine 20 mM Pufferung bei pH 7,0.

YNB-Stammlösung – Standard

YNB w/o aminoacids and ammonium sulfate	17 g/l
---	--------

Die Lösung wurde unmittelbar vor Gebrauch hergestellt und sterilfiltriert.

SC- bzw. Drop-Out-Mix

Adenin	0,4 g	Phenylalanin	1,0 g
Arginin	0,4 g	Threonin	4,0 g
Histidin	0,4 g	Tryptophan	0,4 g
Isoleucin	0,6 g	Tyrosin	0,6 g
Leucin	2,0 g	Uracil	0,4 g
Lysin	0,6 g	Valin	3,0 g
Methionin	0,4 g		

Die Aufstellung gibt beispielhaft die Einwaagen für 14,2 g SC-Mix-Pulver an. Bei Drop-Out-Medien wurde(n) die entsprechende(n) Aminosäure(n) bzw. Base(n) ausgelassen. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Komplex-Medium YPD

Glukose	2 %
Pepton	2 %
Hefeextrakt	1 %
(Agar	1,2 %)

Die Glukose wurde getrennt autoklaviert.

Kluyveromyces lactisKomplex-Medium YPG

Galaktose	2 %
Pepton	2 %
Hefeextrakt	1 %
(Agar	1,2 %)

Die Galaktose wurde getrennt autoklaviert.

YCB-Agarplatten mit 5 mM Acetamid

YCB	11,7 g/l
Agar	20 g/l
1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,0)	3 %
100 x Acetamid-Stammlösung	1 %

Das Medium mit YCB und Agar wurde nach dem Autoklavieren mit Puffer- und Acetamid-Stammlösung komplettiert und die Platten gegossen.

100 x Acetamid (500 mM)

Acetamid	29,6 g/l
----------	----------

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

B-Medium

Glukose	20 g/l
Malat	20 g/l
Magnesiumsulfat <i>heptahydrat</i>	2,1 g/l
Ammoniumsulfat	1,5 g/l
Kalium- <i>D</i> ihydrogenphosphat	1 g/l
Calciumchlorid	0,5 g/l
<i>tri</i> Natriumcitrat	0,5 g/l
Inosit	0,04 g/l
SC-Mix (vgl. oben)	0,85 g/l
100 x Vitamin-Stammlösung	10 %
100 x Spurenelemente-Stammlösung	10 %

Die Glukose wurde getrennt autoklaviert und die Stammlösungen nachträglich zugegeben. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 4,7 eingestellt.

100 x Vitamin-Stammlösung

4-Aminobenzoesäure	20 mg/l
Biotin	20 mg/l
Folsäure	20 mg/l
Nikotinsäure	100 mg/l
Riboflavin	50 mg/l
Thiaminiumchlorid	50 mg/l
Calcium- <i>D</i> -Panhotenat	100 mg/l

Die Lösung wurde für 20 min unter strömendem Dampf sterilisiert und bei -20 °C gelagert.

100 x Spurenelemente-Stammlösung

Borsäure	200 mg/l
Eisen(III)-chlorid <i>hexahydrat</i>	200 mg/l
Zinksulfat <i>heptahydrat</i>	200 mg/l
Aluminiumchlorid	200 mg/l
Kupfersulfat <i>pentahydrat</i>	100 mg/l
Natriummolybdat <i>dihydrat</i>	100 mg/l
Lithiumsulfat <i>monohydrat</i>	100 mg/l
Kaliumiodid	100 mg/l
Kaliumhydrogentartrat	2 g/l

Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

1 M Natrium-Phosphatpuffer pH 7,0

Natrium-Dihydrogenphosphat *dihydrat* 118,1 g/l

D/Natrium-Hydrogenphosphat *dihydrat* 23,0 g/l

K. lactis-Zellen ohne Plasmid wurden in YPD-Komplex-Medium auf einem Inkubationschüttler bei 220 rpm und 30 °C über Nacht herangezogen. Die Selektion positiver Klone erfolgte auf YCB-Agarplatten mit 5 mM Acetamid für 3-5 d bei 30 °C im Brutschrank. Zur Expression wurden Vorkulturen über Nacht in synthetischem SC-Gal- bzw. B-Medium angezogen, die Hauptkultur im Erlenmeyerkolben damit 4 %ig angeimpft und für 3 d bei 30 °C unter Schütteln (220 rpm) inkubiert.

Saccharomyces cerevisiae

Für *S. cerevisiae* wurden ausschließlich die oben aufgeführten Standard-Medien verwendet. Die Kultur plasmidfreier Zellen erfolgte in YPD-Komplex-Medium auf einem Inkubationschüttler bei 220 rpm und 30 °C über Nacht. Zur Selektion positiver Klone wurden die Zellen für 3-5 d auf Ura-d/o-Glukose-Agarplatten bei 30 °C im Brutschrank angezogen. Zur Expression wurden Vorkulturen über Nacht in synthetischem Ura-d/o-Glukose-Medium kultiviert, die Hauptkultur im Erlenmeyerkolben damit 4 %ig angeimpft und für 3 d bei 30 °C unter Schütteln (220 rpm) inkubiert.

Schizosaccharomyces pombeYE-Medium

Glukose	3,0 %
Hefeextrakt	0,5 %
Uracil	75 mg/l
Adenin	75 mg/l

EMM-Medium (Edinburgh Minimal Medium)

Kaliumhydrogenphthalat	3 g/l
D/Natrium-Hydrogenphosphat	2,2 g/l
Ammoniumchlorid	5 g/l
Glukose	20 g/l
(bei low Glukose	5 g/l)
50 x Salz-Stammlösung	2 %
1.000 x Vitamin-Stammlösung	0,1 %
10.000 x Spurenelemente-Stammlsg.	0,01 %
10 x Aminosäuren-Stammlösung	10 %
(Thiamin-Stammlösung	0,05 %)

50 x Salz-Stammlösung

Magnesiumchlorid <i>hexahydrat</i>	52,5 g/l
Calciumchlorid <i>dihydrat</i>	0,74 g/l
Kaliumchlorid	50 g/l
Natriumsulfat	2 g/l

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

1.000 x Vitamin-Stammlösung

Calcium- <i>D</i> -Panthotenat	1 g/l
Nicotinsäure	10 g/l
Inositol	10 g/l
100 x Biotin-Stammlösung	1 %

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

100 x Biotin-Stammlösung

Biotin	1 g/l
--------	-------

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

10.000 x Spurenelemente-Stammlösung

Borsäure	5 g/l
Mangan(II)-sulfat	4 g/l
Zinksulfat <i>heptahydrat</i>	4 g/l
Eisen(II)-chlorid <i>hexahydrat</i>	2 g/l
Natriummolybdat <i>dihydrat</i>	0,4 g/l
Kaliumiodid	1 g/l
Kupfersulfat <i>pentahydrat</i>	0,4 g/l
Zitronensäure	10 g/l

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

10 x Aminosäuren-Stammlösung

Adenin	2,25 g/l
Histidin	2,25 g/l
Leucin	2,25 g/l
Uracil	2,25 g/l
Lysin	2,25 g/l

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert. Für die Stammlösung des Drop-Out-Mediums wurde die Aminosäure Leucin ausgelassen.

2.000 x Thiamin-Stammlösung

Thiamin	10 g/l
---------	--------

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

Zellen, die kein Plasmid enthielten, wurden in YPD-Komplex-Medium auf einem Inkubationschüttler bei 220 rpm und 30 °C über Nacht angezogen.

Die Selektion positiver Klone erfolgte auf EMM-Leu-d/o-Agarplatten mit Thiamin bei 30 °C im Brutschrank.

Zur Expression wurden über Nacht Vorkulturen im Reagenzglas mit synthetischem EMM-Leu-d/o-Medium mit Thiamin angezogen, am nächsten Tag eine Hauptkultur im Erlenmeyerkolben damit 4 %ig angeimpft und über Nacht bei 30 °C unter Schütteln (220 rpm) inkubiert. Die Induktion der Expression erfolgte durch Shiften der Kultur auf Thiamin-freies EMM-Leu-d/o-Medium. Dieser Schritt beinhaltete ein zweimaliges Waschen mit Thiamin-freiem Medium bei 8.000 rpm für 5 min. Die Induktionsdauer betrug 3 d bei 30 °C auf einem Inkubationschüttler bei 220 rpm.

Pichia pastorisBMG (Buffered Minimal Glycerol)

Glycerol	2 %
Ammoniumsulfat	1 %
YNB	3,4 %
Biotin	4×10^{-5} %
1 M Pufferstammlösung	10 %

Das Glycerol wurde mit dem Ammoniumsulfat in H₂O dest. gelöst und autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden sterile Biotin-Stammlösung und YNB zugegeben. Die Komplettierung mit der jeweils gewünschten Puffer-Stammlösung erfolgte unmittelbar vor Gebrauch.

BMM (Buffered Minimal Methanol)

Methanol	1 %
Ammoniumsulfat	1 %
Casaminoacids	1 %
YNB	3,4 %
Biotin	4×10^{-5} %
1 M Pufferstammlösung	10 %

Die Casaminoacids wurden mit dem Ammoniumsulfat in H₂O dest. gelöst und autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden sterile Biotin-Stammlösung, Methanol und YNB zugegeben und das Medium bei 4 °C gelagert. Die Komplettierung mit der jeweils gewünschten Puffer-Stammlösung erfolgte unmittelbar vor Gebrauch.

1 M Citratpuffer pH 4,0

Zitronensäure <i>monohydrat</i>	131,2 g/l
<i>tri</i> Natrium-Citrat <i>dihydrat</i>	110,5 g/l

1 M Kalium-Phosphatpuffer pH 6,0

Kalium- <i>Di</i> hydrogenphosphat	118,1 g/l
<i>Di</i> Kalium-Hydrogenphosphat	23,0 g/l

1 M Kalium-Phosphatpuffer pH 7,0

Kalium- <i>Di</i> hydrogenphosphat	106,1 g/l
<i>Di</i> Kalium-Hydrogenphosphat	212,3 g/l

1 M Natrium-Phosphatpuffer pH 7,0

Natrium- <i>Di</i> hydrogenphosphat <i>dihydrat</i>	118,1 g/l
<i>Di</i> Natrium-Hydrogenphosphat <i>dihydrat</i>	23,0 g/l

500 x Biotin-Stammlösung

Biotin	20 %
--------	------

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

YNB-Stammlösung – *Pichia*

YNB w/o aminoacids and ammonium sulfate	34 g/l
---	--------

Die Lösung wurde unmittelbar vor Gebrauch hergestellt und sterilfiltriert.

Die Anzucht der Zellen ohne Plasmid wurde in YPD-Komplex-Medium auf einem Inkubationschüttler bei 220 rpm und 30 °C über Nacht durchgeführt.

Positive Klone wurden auf His-d/o-Agarplatten bei 30 °C im Brutschrank selektiert. Klone, die sich in der Expression als positiv erwiesen, wurden zusätzlich aus der Kryokultur auf His-d/o-Agarplatten ausgebracht und nach dem Wachstum luftdicht verschlossen bei 4 °C gelagert. Zur Expression wurden davon große Kolonien in Reagenzgläsern mit His-d/o-Medium für 24 h kultiviert. Von dieser Kultur wurde im Erlenmeyerkolben eine Hauptkultur in BMG-Medium 4 %ig angeimpft und über Nacht bei 28 °C unter Schütteln (165 rpm) inkubiert. Nach 24 h wurde die Expression durch Shiften der Kultur auf methanolhaltiges BMM-Medium induziert. Die Zentrifugation erfolgte bei 8.000 rpm für 4 min. Waschschrte waren nicht erforderlich; ebenso wurden die Erlenmeyerkolben der jeweiligen BMG-Kultur weiterverwendet. Die Induktion erfolgte über 2-5 d bei 28 °C auf einem Inkubationschüttler bei 165 rpm.

Zygosaccharomyces bailiiYPF + Sorbit

Hefeextrakt	1 %
Pepton	2 %
Fructose	2 %
Sorbit	1 M

YPF-Agarplatten

Hefeextrakt	1 %
Pepton	2 %
Fructose	2 %
Agar	1,5 %

G418-Stammlösung

G418	100 mg/ml
------	-----------

synthetisches *Z. bailii* -Medium

1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0)	10 %
YNB with aminoacids and ammonium sulfate	0,69 %
Glukose	2 %

1 M Kalium-Phosphatpuffer pH 7,0

Kalium-Dihydrogenphosphat	106,1 g/l
DiKalium-Hydrogenphosphat	212,3 g/l

YNB-Stammlösung – *Zygosaccharomyces*

YNB with aminoacids and ammonium sulfate	6,9 g/l
--	---------

Die Lösung wurde unmittelbar vor Gebrauch hergestellt und sterilfiltriert.

Die Kultivierung plasmidfreier Zellen erfolgte in YPD-Komplex-Medium auf einem Inkubationschüttler bei 220 rpm und 30 °C über Nacht.

Zur Regeneration nach der Transformation wurden die Zellen für 6-14 h bei 30 °C schüttelnd in YPF + Sorbit-Medium inkubiert. YPF-Agarplatten mit 200 µg/ml G418 dienten zur Selektion positiver Klone; diese wurden für 4-6 d bei 30 °C im Brutschrank inkubiert.

Zur Expression wurden die Kulturen über Nacht im Reagenzglas mit synthetischem *Z. bailii*-Medium angezogen, am darauffolgenden Tag die Hauptkultur im Erlenmeyerkolben damit 4 %ig beimpft und für 3 d bei 30 °C unter Schütteln (220 rpm) inkubiert.

2.5. DNA Manipulation

2.5.1. Plasmid-Isolierung aus *Escherichia coli*

In der vorliegenden Arbeit wurden die Plasmide durch alkalische Lyse oder MiniPrep aus den Bakterienzellen isoliert.

2.5.1.1. Alkalische Lyse

GTE-Lösung

Glukose	50 mM
Tris	25 mM
EDTA	10 mM

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 8,0 eingestellt.

NaOH/SDS-Lösung

NaOH	200 mM
SDS	1 %

5 M Kaliumacetat-Lösung

Eisessig 99,5 %	29,5 %
-----------------	--------

Der pH-Wert wurde mit KOH auf 4,8 eingestellt.

Die alkalische Lyse wurde nach einem veränderten Protokoll von BIRNBOIM (1983) durchgeführt. Diese Methode stellt eine einfache und schnelle Möglichkeit dar, Plasmid-DNA aus *E. coli*-Kulturen zu isolieren. Dabei werden pelletierte Bakterien in osmotisch stabilisierender GTE-Lösung resuspendiert. Das darin enthaltene EDTA komplexiert zweiwertige Kationen, wie Mg^{2+} und Ca^{2+} , der Zellwand und destabilisiert diese. Durch die Zugabe von NaOH/SDS kommt es durch die detergenten Eigenschaften des SDS zur Lyse der Plasmamembran und zu einer pH-Wert-Erhöhung auf ca. 12,5 durch das NaOH, was eine Denaturierung von DNA und Proteinen zur Folge hat. Bei der folgenden Neutralisierung durch Kaliumacetat sinkt der pH-Wert in den neutralen Bereich, wodurch die Plasmid-DNA aufgrund ihrer geringen Größe renaturieren kann. Chromosomale DNA und Proteine verbleiben in denaturiertem Zustand, präzipitieren mit dem Kaliumsalz des Dodecylsulfats und können durch Zentrifugation von der gelösten Plasmid-DNA getrennt werden. Im verbleibenden Überstand erfolgt die Fällung der verbleibenden Plasmid-DNA mittels Zugabe von Ethanol auf eine Endkonzentration von ca. 70 %. Das Ethanol entzieht der DNA so viel Wasser, dass ihre Löslichkeit aufgehoben wird und sie abzentrifugiert werden kann.

Zur Isolierung von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse wurden 1,5-4 ml einer Über-Nacht-Kultur für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 100 µl GTE-Lösung resuspendiert und 30 s bei RT inkubiert. Eine vollständige Resuspension war essentiell notwendig, um eine möglichst hohe DNA-Konzentration zu erhalten. Danach wurden 200 µl NaOH/SDS zugegeben und durch Invertieren des Reaktionsgefäßes vorsichtig gemischt, bis eine klare Lösung entstand. Bei zu starkem Mischen, wie z. B. Vortexen, kann es zu einem Scheren der chromosomalen DNA kommen, die in Verunreinigungen der Plasmid-DNA resultieren kann. Nach 30 s Inkubation bei RT erfolgte die Neutralisation durch die Zugabe von 150 µl Kaliumacetat. Die vorsichtig durch Invertieren gemischte Probe wurde für 1 min auf Eis belassen. Die als weißliches Präzipitat erscheinenden Proteine und die chromosomale DNA wurden durch Zentrifugation (8-10 min bei 13.000 rpm und 4 °C) pelletiert. Ca. 400 µl des verbleibenden Überstands wurden mit 1 ml 99 % Ethanol versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (2 min bei 13.000 rpm und 4 °C) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet 5 min bei RT getrocknet, um das verbleibende Ethanol zu entfernen. Die Plasmid-DNA wurde in 20 µl H₂O dest. aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

2.5.1.2. MiniPrep

Eine alternative Möglichkeit der Plasmid-Isolierung aus Bakterienzellen stellt die MiniPrep-Isolierung dar. Hierbei handelt es sich um eine Adaptation der alkalischen Lyse, bei der die DNA nach der Zelllyse nicht mit Ethanol gefällt, sondern an eine Silika-Matrix gebunden wird. Die Vorteile liegen darin, dass die Immobilisierung der Plasmide an einer Matrix mehrere Waschschriffe ermöglicht und somit reinere DNA erhalten werden kann. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Isolierungen erfolgten zum größten Teil mittels des innuPREP Plasmid Mini Kits von ANALYTIK JENA.

Zur Isolierung der DNA wurden 4 ml einer Über-Nacht-Kultur durch Zentrifugieren pelletiert (1 min bei 13.000 rpm) und in 250 µl Resuspension Buffer aufgenommen. Nach vollständigem Resuspendieren wurden 250 µl Lysis Buffer zugegeben und durch Invertieren gemischt. Die Zugabe von 350 µl Neutralization Buffer wurde gefolgt von mehrmaligem Invertieren und einem anschließenden 10-minütigen Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm und 4 °C. Das Pellet wurde verworfen und der klare Überstand durch Zentrifugation für 1 min bei 10.000 x g auf die Matrix geladen. Es folgten zwei Waschschriffe, einmal mit 500 µl Washing Solution A und einmal mit 700 µl Washing Solution B, jeweils für 1 min bei 10.000 x g. Um restliche Spuren des in den Wasch-Puffern enthaltenen Ethanols zu entfernen, wurde die leere Säule für 2 min bei 13.000 rpm getrocknet. Das Zentrifugations-

Säulchen wurde in ein sauberes 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, 50 µl H₂O dest. direkt auf die Matrix pipettiert und 1 min bei RT belassen. Der finale Zentrifugationsschritt erfolgte für 1 min bei 8000 x g. Der erhaltene Säulendurchfluss enthielt die gereinigte Plasmid-DNA und wurde bei -20 °C gelagert.

In Ausnahmefällen erfolgte die DNA-Isolierung mittels Perfectprep® Gel Cleanup Kit der Firma EPPENDORF.

Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit der erhaltenen DNA erfolgte über eine spektralphotometrische Analyse mittels GeneQuant (PHARMACIA BIOCHROM). Das Prinzip beruht auf der Messung der Absorptionswerte bei $\lambda = 260$ nm (Absorptionsmaximum von DNA) und $\lambda = 280$ nm (Absorptionsmaximum der aromatischen Aminosäuren Phe, Trp, Tyr). Gemessen wurde eine 1:60-Verdünnung des Eluats gegen H₂O dest. in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm. Hierbei entspricht eine Absorption von 1,0 bei $\lambda = 260$ nm 50 µg/ml DNA, wobei der Quotient aus A_{260}/A_{280} als Maß für die Reinheit der DNA herangezogen wird. Reine DNA zeigt hier einen Wert von gleich oder wenig größer 1,8.

2.5.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) stellt eine *in vitro*-Methode zur Amplifikation von DNA-Abschnitten dar. Sie wurde 1983 von KARY MULLIS entwickelt, der 1993 dafür den Chemie-Nobelpreis erhielt. Die Methode basiert auf einer zyklisch wiederholten Verdoppelung der DNA durch eine thermostabile DNA-Polymerase (SAIKI *et al.*, 1985). Ein typischer PCR-Ansatz besteht aus Template-DNA, mindestens zwei Oligonukleotid-Primern, freien Desoxyribonukleotiden (dNTPs) und DNA-Polymerase in einem geeigneten Puffer. Jeder Zyklus besteht aus einem Denaturierungs-, einem Annealing- und einem Elongationsschritt. Die Denaturierung erfolgt durch Kochen der DNA, wobei sich die beiden Stränge voneinander trennen. Eine Absenkung der Temperatur unter die spezifische Schmelztemperatur der im Überschuss vorhandenen Oligonukleotid-Primer ermöglicht deren Hybridisierung mit der einzelsträngigen Template-DNA (= Annealing). Die Elongationsphase wird durch die Erhöhung der Temperatur auf das Optimum der verwendeten Polymerase eingeleitet, welche die Primersequenzen komplementär zum Template-Strang verlängert. Die sich somit in jedem Zyklus verdoppelte Zahl an Template-DNA führt zu einem exponentiellen Anstieg des Amplifikationsprodukts. Begrenzende Faktoren bei der Durchführung einer Polymerasekettenreaktion sind vor allem in der Hitze-Stabilität der einzelnen Komponenten begründet.

Ein typischer in der vorliegenden Arbeit verwendeter PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

H ₂ O dest.	ad 30 µl
10 x Polymerase-Puffer	3 µl
dNTP-Mix (25 mM)	0,2 µl
5'-Primer (100 pM)	0,3 µl
3'-Primer (100 pM)	0,3 µl
Template-DNA	0,1 µl
Polymerase (5 U/µl)	0,4 µl

Die Amplifikation erfolgte in den Thermocyclern Primus96^{advanced} (PEQLAB) bzw. MyCycler (BIORAD) unter Verwendung variierender Programme. Die einzelnen Parameter wurden jeweils bezüglich der Annealing-Temperaturen, der Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts und der verwendeten Polymerase angepasst.

Ein typischer Ablauf erfolgte unter folgenden Bedingungen:

initiale Denaturierung	94 °C	4 min	
Denaturierung	94 °C	20 s	25-30 x
Annealing	57 °C	20 s	
Elongation	72 °C	30 s	
terminale Elongation	72 °C	7 min	

Die Anzahl der Zyklen wurde zwischen 25 und 30 variiert, um die bei einer höheren Anzahl wahrscheinliche Erhöhung der Mutationsrate zu minimieren. Generell wurden Polymerasen mit Proof-Reading-Funktion verwendet (Expand™ HiFi *Taq*, ROCHE; Herculase® II, STRATAGENE), bei schwierig zu amplifizierenden Konstrukten in Ausnahmefällen *Taq*-Polymerase (EPPENDORF). Der initiale Denaturierungsschritt wurde bei der Amplifikation mit genomischer DNA als Template auf 8-10 min verlängert und die Polymerase nachträglich zugegeben (Hot Start-PCR).

Nach erfolgter PCR wurde die DNA durch Agarose-Gelelektrophorese und anschließendes Reisolieren gereinigt und zur AccepTor™-Klonierung (s. u.) eingesetzt. Alle Konstrukte wurden vor der weiteren Verwendung durch GATC BIOTECH sequenziert, um mögliche Mutationen auszuschließen.

2.5.2.1. Isolierung genomischer DNA aus Hefen

Breaking-Puffer

Triton X-100	2 %
SDS	1 %
Natriumchlorid	100 mM
Tris-HCl, pH 8,0	10 mM
EDTA	1 mM

10 x TE

Tris	100 mM
EDTA	10 mM

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,5 eingestellt.

Zur Isolierung genomischer DNA wurden 5 ml einer Über-Nacht-Kultur eines entsprechenden Hefe-Stammes durch Zentrifugation für 3 min bei 11.000 rpm geerntet und mit 10 ml sterilen H₂O dest. gewaschen. Die Pellets wurden in insgesamt 100 µl Lysepuffer aufgenommen und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 0,15 g (ca. 100 µl) Glasperlen (0,45-0,55 mm Durchmesser) und 100 µl Phenol/Chloroform/Isoamyl-Alkohol, erfolgte der Aufschluss der Zellen durch 3-minütiges Vortexen. Anschließend wurden 100 µl 1 x TE-Puffer zugegeben, durch Vortexen kurz gemischt und für 5 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 1,5 ml 99 % Ethanol gefällt. Das durch einen weiteren Zentrifugationsschritt von 2 min bei 13.000 rpm erhaltene Pellet wurde zweimal mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen, um das restliche Phenol zu entfernen, und danach in 100 µl 1 x TE-Puffer aufgenommen und als Template für die PCR eingesetzt. Die isolierte genomische DNA wurde bei 4 °C gelagert.

2.5.2.2. Oligonukleotide

In Tab. 8 sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotid-Primer dargestellt. Start- bzw. Stopp-Codons sind *kursiv* hervorgehoben. Das Primer-Design erfolgte unter Zuhilfenahme des Programms Lasergene 7.0 der Firma DNASTAR; die Synthese durch SIGMA-GENOSYS bzw. BIOMERS.

Tab. 8: In der vorliegenden Arbeit verwendete Oligonukleotid-Primer. Die Sequenzen sind jeweils in 5'→3'-Leserichtung angegeben; Start- und Stoppcodons sind kursiv hervorgehoben. (VL = Volllänge, mat = mature, SS = Signalsequenz, HIS = 6 x HIS-Tag, ZYGO = Zygodin, * = Start-Codon, • = Stopp-Codon)

Bezeichnung	5'→3'-Sequenz
MMPs & Esterase A	
5'-MMP-2-VL	<i>XhoI</i> <i>EcoRI</i> * CTCGAG GAATTC ATG GCG CCG TCG CCC ATC ATC AAG
5'-MMP-2 _{mat}	<i>XhoI</i> <i>EcoRI</i> * CTCGAG GAATTC ATG TAC AAC TTC TTC CCT CGC AAG CCC AAG TG
3'-MMP2	<i>SalI</i> • <i>XbaI</i> GTCGAC TTA TCTAGA GCA GCC TAG CCA GTC GGA TTT GAT G
3'-HIS-MMP-2	<i>NotI</i> • His His His His His His GCGGCCGC TTA ATG ATG ATG ATG ATG ATG GCA GCC TAG CCA GTC GGA TTT GAT G
5'-MMP-9-VL	<i>XhoI</i> <i>EcoRI</i> * CTCGAG GAATTC ATG GCC CCC AGA CAG CGC CAG TCC ACC CTT GTG C
5'-MMP-9 _{mat}	<i>XhoI</i> <i>EcoRI</i> * CTCGAG GAATTC ATG CAA ACC TTT GAG GGC GAC CTC AAG TG
3'-MMP-9	<i>SalI</i> • <i>XbaI</i> GTCGAC TTA TCTAGA GTC CTC AGG GCA CTG CAG GAT GTC ATA GGT CAC GTA GC
3'-HIS-MMP-9	<i>NotI</i> • His His His His His His GCGGCCGC TTA ATG ATG ATG ATG ATG ATG GTC CTC AGG GCA CTG CAG GAT GTC ATA GGT CAC GTA GC
5'-Esterase A	<i>XhoI</i> Lys Arg Glu Ala Glu Ala <i>EcoRI</i> CTCGAG AAA AGA GAG GCT GAA GCT GAATTC GTC CAG CTC CAT ATG GGC
3'-Esterase A	<i>BlnI</i> CCTAGG CTT GGT GAC GCC GGC
Vektor-Adaptation	
5'-XRASX	<i>MaeI</i> <i>Van91I</i> <i>XhoI</i> <i>SalI</i> CTAG CCAATAACTGG CTCGAG GTCGAC CCC CAC TAT AGA GGA TTC CTA CCG GAA GCA GG
3'-XRASX	<i>BamHI</i> <i>BglII</i> <i>SpeI</i> <i>NotI</i> <i>SalI</i> • GGATCC AGATCT ACTAGT GCGGCCGC GTCGAC TTA CTT GCA GCT CAT GCA GCC GGG
5'-YRASY	<i>MunI</i> <i>XhoI</i> Lys Arg <i>EcoRI</i> CAATTG CTCGAG AAA AGA GAATTC ATG ACG GAA TAT AAG CTG GTG GTG GTG GGC
3'-YRASY	<i>HindIII</i> <i>NotI</i> <i>BglII</i> <i>XbaI</i> • AAGCTT GCGGCCGC AGATCT TCTAGA TTA CTT GCA GCT CAT GCA GCC GGG G
5'-ZRASZ	<i>MunI</i> <i>XhoI</i> <i>EcoRI</i> <i>XbaI</i> CAATTG CTCGAG GAATTC TCTAGA CCC CAC TAT AGA GGA TTC CTA CCG GAA GCA GG
3'-ZRASZ	<i>SacI</i> • <i>BamHI</i> • <i>BlnI</i> <i>BglII</i> <i>XbaI</i> • GAGCTC TTA GGATCC TTA CCTAGG AGATCT TCTAGA TTA CTT GCA GCT CAT GCA GCC GGG
Signalsequenzen	
5'-ZYGO-SS	<i>XhoI</i> * CTCGAG ATG AAA GCA GCC CAA ATA TTA ACA GCA AGT ATA G
3'-ZYGO-SS	<i>EcoRI</i> GAATTC AGC ACT AGT ATA TAT TGG CAA TAA GCT TAC TAT ACT TGC TG
5'-K28-SS	<i>XhoI</i> * CTCGAG ATG GAG AGC GTT TCC TCA TTA TTT AAC ATT TTT TC
3'-K28-SS	<i>EcoRI</i> GAATTC ACC CCG TGC ATA TTT GAG ATT TGA AAC AC
Zellwandanker	
5'-CWP2	<i>BlnI</i> CCTAGG TCC GCT GCC GCC ATT TC
3'-CWP2	<i>NotI</i> • GCGGCCGC TTA TAA CAA CAT AGC AGC AGC AGC TAG
5'-FLO1	<i>BlnI</i> CCTAGG ACA GAG GCG TGC TTA CCA GCA GGC

Bezeichnung	5'→3'-Sequenz
3'-FLO1	<i>NotI</i> • GCGGCCGC TTA AAT AAT TGC CAG CAA TAA GGA CGC AAT
5'-PIR1	<i>BlnI</i> CCTAGG TAT GCT CCA AAG GAC CCG TGG TCC AC
3'-PIR1	<i>NotI</i> • GCGGCCGC TTA AGA AGT TAA AGT TGT GGC TTG GAT TTG GCC ATC
5'-SED1	<i>BlnI</i> CCTAGG TTT TCC AAC AGT ACA TCT GCT TCT TCC ACC
3'-SED1	<i>NotI</i> • GCGGCCGC TTA TAA GAA TAA CAT AGC AAC ACC AGC CAA ACC
5'-AGα1	<i>BlnI</i> CCTAGG CCA AGT TCT AAA TCT ACT TC
3'-AGα1	<i>NotI</i> • GCGGCCGC TTA ACT GAA AAT TAC ATT GCA AGC AAC TGC CAT G
Sequenzier-Primer	
SP6-Promotor	ATT TAG GTG ACA CTA TA
T7-Promotor	TAA TAC GAC TCA CTA TA
MMP-2	Mittelprimer ab bp 776 (Proenzym) GA CAG CCC TGC AAG TTT CCA TTC CG
MMP-9	Mittelprimer ab bp 780 (Proenzym) G GAC GGC AAT GCT GAT GGG AAA CC

2.5.2.3. AccepTor™-Klonierung

Um nach erfolgter PCR eine Sequenzierung der Amplifikate zu ermöglichen, wurden die PCR-Produkte mittels des AccepTor™ Vector Giga Kits (NOVAGEN) in den Vektor pSTBlue-1 ligiert. Der Vektor ist derart gestaltet, dass er eine leichte Klonierung von PCR-Produkten ermöglicht, die von DNA-Polymerasen amplifiziert wurden, die 3'-dATP-Überhänge erzeugen (wie z. B. *Taq*-Polymerase). Das Plasmid liegt in linearisierter Form vor und verfügt über 5'-dUTP-Überhänge, was eine direkte Ligation des Amplifikats in den Vektor ermöglicht.

Darüber hinaus verfügt pSTBlue-1 über sowohl einen Ampicillin- als auch einen Kanamycin-Resistenz-Marker, die Möglichkeit zur Blau-weiß-Selektion und in den MCS-flankierenden Regionen über eine SP6- bzw. T7-Promotor-Region, die für Standard-Sequenzierungen eingesetzt werden können (vgl. Abb. 10, S. 30).

Zur Ligation eines PCR-Produkts in den Vektor pSTBlue-1 wurden die Komponenten in der folgenden Reihenfolge zusammenpipettiert:

H ₂ O dest. (Nuklease-frei)	ad 5 µl
2 x Clonables™ Ligation Premix	2,5 µl
AccepTor Vektor (50 ng/µl)	0,5 µl
reisoliertes PCR-Produkt	1-2 µl

Der Ansatz wurde durch vorsichtiges Rühren gemischt und 2 h bei 16 °C inkubiert. Die Transformation in Nova Blue Singles-Zellen erfolgte wie beschrieben (vgl. 2.6.1.2, S. 55).

Blau-weiß-Selektion

Bei der Blau-weiß-Selektion handelt es sich um eine Methode, die eine schnelle Identifizierung von Klonen mit im Plasmid integriertem PCR-Produkt ermöglicht. pSTBlue1-Vektoren tragen den ORF eines *lacZα*-Gens, das für das α-Peptid der β-Galaktosidase kodiert. Das für die enzymatische Funktion essentielle Ω-Peptid wird als *lacZΩ*-Gen im Genom des Bakteriums kodiert. Eine Insertion eines PCR-Products in die MCS des Vektors zerstört den ORF des *lacZα*-Gens, wodurch keine biologisch aktive β-Galaktosidase mehr hergestellt werden kann. Kultiviert man diese Zellen auf X-Gal-haltigem Medium, können Insert-tragende Klone farblich von Klonen mit Leervektor unterschieden werden. Die Transkription des Gens wird dabei durch die Zugabe von 100 mM IPTG induziert.

Bei X-Gal handelt es sich um 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galaktopyranosid, das von der β-Galaktosidase zu Galaktose und 5-bromo-4-chloro-3-hydroxy-Indol gespalten wird (vgl. Abb. 11). Zwei Mol 5-bromo-4-chloro-3-hydroxy-Indol werden danach zu einem Mol unlöslichem, blauem 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-Indigo oxidiert, was eine Blaufärbung der Kolonien hervorruft, die bei unterbrochenen *lacZα*-Genen, also ‚positiven‘ Klonen, unterbleibt. Zur Blau-weiß-Selektion wurden jeweils 40 µl X-Gal-Stammlösung (40 mg/ml) und 40 µl IPTG-Stammlösung (100 mM) auf die Agarplatten ausgebracht.

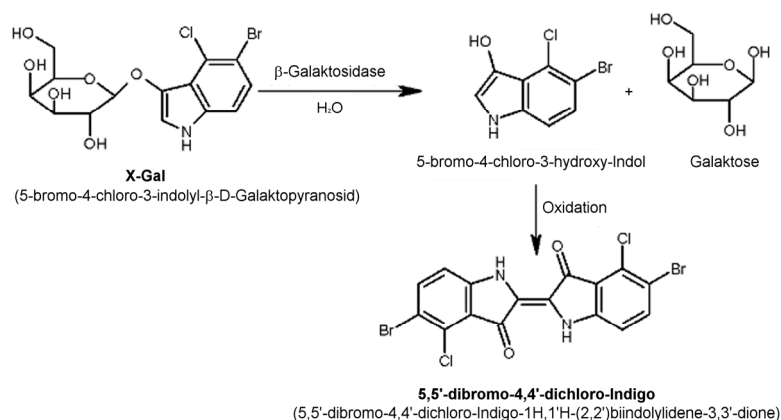


Abb. 11: Prinzip der Blau-weiß-Selektion. 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galaktopyranosid wird von β-Galaktosidase zu Galaktose und 5-bromo-4-chloro-3-hydroxy-Indol gespalten. Zwei Mol 5-bromo-4-chloro-3-hydroxy-Indol werden zu einem Mol unlöslichem, blauem 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-Indigo oxidiert.

2.5.3. DNA-Restriktion

Bei Restriktionsenzymen handelt es sich um Endonukleasen, die natürlicherweise bei Bakterien vorkommen. Ihre Aufgabe ist der Abbau artfremder DNA, z. B. von Viren, indem sie DNA-Abschnitte mit spezifischer Basenfolge – in der Regel palindromartige Sequenzabschnitte – erkennen und in diesem Bereich die Phosphodiesterbrücken des DNA-Rückgrats beider Stränge hydrolysieren. Je nach Enzym ist diese Erkennungssequenz zwischen 4 und 8 Basenpaaren groß.

Restriktionsendonukleasen werden aufgrund ihres Aufbaus und ihrer Funktion in drei Kategorien eingeteilt: Typ I, II und III, wovon fast ausschließlich Typ II-Restriktionsenzyme von praktischer molekularbiologischer Relevanz sind. Ihre Entdeckung in der Mitte des 20. Jahrhunderts legte den Grundstein für die Entwicklung der Molekularbiologie. WERNER ARBER, DANIEL NATHANS und HAMILTON OTHANEL SMITH erhielten für ihre Arbeit "The discovery of restriction enzymes and their application to problems of molecular genetics" 1978 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin. Seit dem wurden bis heute 3698 Typ II-Restriktionsenzyme beschrieben, von denen zurzeit 611 kommerziell erwerblich sind. Unter Einbeziehung aller Isoschizomere ergeben sich daraus 262 unterschiedliche Erkennungsmuster, die zur Anwendung bei molekularbiologischen Klonierungsarbeiten eingesetzt werden können (ROBERTS *et al.*, 2007). Beim Verdau von DNA entstehen abhängig vom eingesetzten Enzym kohäsive Enden mit überhängenden einzelsträngigen DNA-Abschnitten, sogenannte 'sticky ends', oder nicht-kohäsive, glatte Enden, sogenannte 'blunt ends'. Beide lassen sich mit Hilfe von DNA-Ligase mit anderen gleichartig gestalteten DNA-Fragmenten verbinden und ermöglichen somit deren gerichtete Kombination.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden DNA-Restriktionen in diversen Enzym-Kombinationen und unter variierenden Bedingungen ausgeführt. In der Regel wurden Restriktionsenzyme der Firma FERMENTAS, in Ausnahmefällen der Firma ROCHE verwendet. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze richtete sich nach den vom Hersteller angegebenen Vorschriften und folgte allgemein folgendem Schema:

H ₂ O dest.	ad 20 µl
10 x Reaktionspuffer	2 µl
RNase A	0,1 µl
Restriktionsenzym I	0,3 µl
Restriktionsenzym II	0,3 µl
DNA (alkalische Lyse)	1-2 µl

Die Inkubation erfolgte in der Regel im Brutschrank bei 37 °C für 1-2 h. Bei präparativen Ansätzen wurde gelegentlich das Gesamtvolumen der Reaktion auf das Doppelte und die Inkubationszeit auf 4-6 h erhöht, um eine optimale Menge an restringierter DNA zu erhalten.

2.5.4. Agarose-Gelelektrophorese

10 x TBE

Tris	890 mM
Borsäure	890 mM
EDTA	20 mM

Die pH-Wert wurde mit HCl auf 8,0 eingestellt.

Probenpuffer (GLB)

Glycerin	50 %
EDTA	125 mM
SDS	1 %
Bromphenolblau	0,001 %
Xylencyanol	0,001 %

Ethidiumbromid-Färbegrad

Ethidiumbromid	0,0004 %
----------------	----------

Bei der Agarose-Gelelektrophorese handelt es sich um eine physikochemische Methode, um DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe voneinander zu trennen (SAMBROOK *et al.*, 1989). Die DNA wird dabei in einer Agarose-Gelmatrix eingebettet und eine elektrische Spannung angelegt. Infolge der negativen Ladung des DNA-Phosphat-Rückgrats bei basischen Bedingungen bewegt sich diese in Richtung Anode. Aufgrund der netzartigen Struktur des Agarose-Gels können sich kleinere Moleküle schneller durch die Matrix bewegen, wodurch sich die Laufstrecke umgekehrt proportional zur Fragment-Größe verhält. Die Methode ermöglicht bei Verwendung einer standardisierten DNA-Leiter ebenfalls eine Größenbestimmung der DNA-Stücke.

Zur Herstellung eines Agarose-Gels wurde (z. B. 1 %) Agarose mit der gewünschten Menge 1 x TBE-Puffer versetzt, durch Kochen gelöst und in einen Gelschlitten gegossen. Die Proben wurden im Verhältnis 5:1 mit GLB-Puffer versetzt, durch mehrmaliges Pipettieren gemischt und in die Gel-Taschen geladen. Durch das im GLB enthaltene Glycerin wurde die Dichte der Probe erhöht, wodurch die DNA auf den Boden der Tasche sank. Außerdem enthielt der Probenpuffer Xylencyanol und Bromphenolblau als Farbstoffe, die durch ihre Laufeigenschaften eine Abschätzung der bereits erreichten Laufweite ermöglichten.

Bei dem für Standard-Gele verwendeten DNA-Marker handelte es sich um den SmartLadder der Firma EUROGENTEC. Die gelelektrophoretische Trennung von DNA wurde in der Elektrophorese-Apparatur Blue Marine (BIORAD) bei Spannungen von 180 V (Blue Marine 100) bzw. 280 V (Blue Marine 200) durchgeführt.

Nach erfolgter Trennung wurde die DNA durch 5-minütige Färbung im Ethidiumbromid-Bad sichtbar gemacht. Bei Ethidiumbromid handelt es sich um 2,7-Diamino-10-ethyl-9-phenylphenanthridiumbromid, einen roten Phenantridin-Farbstoff. Dieser ist in der Lage, sequenzunspezifisch zwischen den Basen von RNA oder DNA-Molekülen zu interkalieren, was zu einer Konformationsänderung und somit einer Verstärkung seiner Fluoreszenzemission unter UV-Licht führt (LE PECQ & PAOLETTI, 1966; WARING, 1965). Eine Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von $\lambda_A = 254$ nm führt zu einer Emission im orange-roten Bereich bei ca. $\lambda_E = 590$ nm. Die Dokumentation der Agarosegele erfolgte mittels des ChemiDoc XRS Systems (BIORAD).

2.5.5. DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Der Isolierung von DNA aus Agarosegelen dienten kommerziell erhältliche Isolierungs-Kits. In der Regel wurde hierzu das innuPREP Gel Extraction Kit von ANALYTIK JENA verwendet. Die entsprechenden DNA-Banden wurden mit einem gereinigten Skalpell aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und in ein sauberes 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Der Zugabe von 500 μ l Gel Solubilizer folgte eine ca. 15-minütige Inkubation bei 60 °C. Nachdem das Agarose-Blockchen vollständig gelöst war, wurden 250 μ l Binding Buffer zugegeben und durch Invertieren gemischt. Die Lösung wurde durch Zentrifugation für 1 min bei 10.000 x g auf den Säulenfilter geladen und der Durchfluss verworfen. Es schlossen sich zwei Waschschr tte mit Puffern abfallender Salzkonzentration an: 500 μ l Washing Solution HS wurde auf die Säule gegeben und 1 min bei 10.000 x g zentrifugiert; selbiges erfolgte nach der Zugabe von 750 μ l Washing Solution MS. Die Säule wurde 2 min bei 13.000 rpm getrocknet, um alle Ethanol-Reste zu entfernen, und danach in ein sauberes 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Abschließend wurden 30 ml H₂O dest. auf den Filter pipettiert, 1 min bei RT inkubiert und die DNA mit einem finalen Zentrifugationsschritt für 1 min bei 6.000 x g eluiert. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.5.6. Ligation

DNA-Fragmente, die mit kompatiblen Restriktionsenzymen geschnitten wurden, können mit Hilfe von DNA-Ligasen in einem *in vitro*-Verfahren zusammengefügt werden. Hierbei

werden ATP-abhängig die Esterbindungen im Nukleinsäure-Rückgrat zwischen dem 5'-Phosphat- des einen und dem 3'-Hydroxylrest des zweiten Fragments geschlossen.

Die DNA-Stücke wurden nach dem Restriktionsverdau in einem Agarosegel getrennt und reisoliert. In der Regel wurden diese Reisolat zu gleichen Teilen in der Ligationsreaktion eingesetzt. In den Fällen, in denen die DNA-Konzentration in einem Gel subjektiv entscheidend geringer erschien, wurde der Anteil dieser Komponente erhöht (10:7). Die DNA-Lösung wurde mit 10 x Ligationspuffer und T4-DNA-Ligase (APPLICHEM) komplettiert. Für einen Standard-Ligationsansatz ergab sich demnach folgende Zusammensetzung:

Vektor-DNA	8,5 µl
Insert-DNA	8,5 µl
10 x Reaktionspuffer	2 µl
T4-DNA-Ligase	1 µl

Die Inkubation erfolgte für 1-2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C.

2.6. Transformationsmethoden

2.6.1. Bakterien

2.6.1.1. Elektroporation

Die Transformation von *E. coli* erfolgte im Rahmen der Klonierungsarbeiten mittels Elektroporation. Die Bakterien werden dabei kurzen elektrischen Pulsen mit hoher Frequenz ausgesetzt, was zu einer kurzfristigen Disruption der Zellmembran führt, wodurch es hochmolekularen Substanzen, wie z. B. Plasmid-DNA, für einige Millisekunden ermöglicht wird, in die Zelle einzudringen (CALVIN & HANAWALT, 1988; DOWER *et al.*, 1988; HANAHAN, 1983).

Zur Herstellung elektrisch kompetenter Zellen wurden 200 ml LB-Medium 1 %ig mit einer frischen Über-Nacht-Kultur beimpft und unter Schütteln inkubiert (220 rpm, 37 °C) bis eine OD₆₀₀ von 1,0-1,5 erreicht wurde. Das Ernten der Kultur erfolgte durch Zentrifugation für 5 min bei 10.000 rpm und 4 °C. Danach wurden die Zellen zweimal mit kaltem 10 % Glycerin gewaschen und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden im Rückfluss resuspendiert und in sterile 2 ml-Reaktionsgefäße überführt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 5 min bei 8.000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und die verbleibenden Zellen wurden in einer dem Zellpellet-Volumen entsprechenden Menge

10 % Glycerin aufgenommen. Die Lagerung der elektrokompetenten Zellen erfolgte in 40 µl-Aliquots bei -80 °C.

Um bei der Elektroporation einen Kurzschluss in der Küvette zu vermeiden, wurden Ligationsansätze durch eine Schwimmfilter-Dialyse einem Entsalzungsprozess unterzogen. Hierbei wird ein Dialyse-Plättchen (MILLIPORE, 0,025 µm) schwimmend auf 10 % Glycerin gelagert, der Ansatz aufpipettiert und ca. 40 min dialysiert. Der salzfreie Ansatz wurde danach mit einem Aliquot (40 µl) kompetenter *E. coli*-Zellen gemischt, in eine Elektroporationsküvette überführt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Die Transformation erfolgte mittels Gene Pulser II (BIORAD) bei 200 Ω, 2,48 kV/cm und 25 µF. Nach dem Puls wurden die Zellen in 1 ml SOC-Medium (37 °C) aufgenommen und für 45 min (bei Ampicillin-Selektion) bzw. 60 min (bei Kanamycin-Selektion) bei 37 °C und 220 rpm liegend inkubiert. Die Selektion erfolgte auf Antibiotikum-haltigen LB-Agarplatten über Nacht bei 37 °C.

2.6.1.2. Chemisch kompetente Zellen

Die Zwischenklonierung der PCR-Amplifikate zur Sequenzierung erfolgte mittels AccepTor™ Vector Giga Kit (NOVAGEN; vgl. S. 49). Die für die Transformation dieser Vektoren verwendeten chemisch kompetenten Zellen entstammten dem Kit.

Zur Transformation wurden diese auf Eis aufgetaut und kurz gemischt. 1 µl des Ligations-Ansatzes wurde zu einem Aliquot Zellen gegeben und 5 min auf Eis belassen. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 30 s bei 42 °C im Heizblock. Nach einer weiteren Inkubation auf Eis für 2 min wurden 250 µl SOC-Medium (37 °C) zugegeben und die Reaktionsgefäße für 60 min bei 37 °C unter Schütteln liegend inkubiert. Die Selektion erfolgte auf Antibiotikum-haltigen LB-Agarplatten über Nacht bei 37 °C.

2.6.2. Hefen

Kluyveromyces lactis

Die chemische Transformation von *K. lactis* erfolgte nach einem modifizierten Protokoll des *K. lactis* Protein Expression Kits (NEW ENGLAND BIOLABS). Das Expressions-Prinzip beruht auf der Integration einer linearen Expressionskassette in die native LAC4-PBI-Promotor-Region des *K. lactis*-Genoms. Die gewünschten Expressionsplasmide wurden mit *Sac*II linearisiert und zur Transformation eingesetzt. Eine Selektion erfolgt durch das in der Expressionskassette zusätzlich enthaltene *amdS*-Gen. Die darin kodierte Acetamidase ist in der Lage, Acetamid zu Ammonium umzusetzen, wodurch es diesen Klonen ermöglicht wird, mit Acetamid als einziger Stickstoffquelle zu wachsen.

Chemisch kompetente GG799-Zellen wurden dem Kit entnommen und auf Eis aufgetaut. Jeweils 50 µl wurden mit 155 µl Yeast Transformation Reagent und 3,75 µl linearisierter DNA versetzt und 30 min bei 30 °C inkubiert. Es folgte für 1 h ein Hitzeschock bei 37 °C und eine anschließende Zentrifugation bei 7.000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 1 ml sterilem H₂O dest. gewaschen. Nach Resuspendieren in 1 ml YPD wurden die Zellen für 30 min bei 30 °C unter Schütteln (220 rpm) inkubiert; danach ein weiteres Mal in 1 ml sterilem H₂O dest. gewaschen, in 100 µl sterilem H₂O dest. aufgenommen, auf YCB-Agarplatten mit Acetamid ausplattiert und 3-5 d bei 30 °C inkubiert.

Saccharomyces cerevisiae

10 x Lithiumacetat

Lithiumacetat	1 M
---------------	-----

Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf 7,5 eingestellt und die Lösung sterilfiltriert.

10 x TE

Tris	100 mM
EDTA	10 mM

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,5 eingestellt.

LiAc/TE-Lösung

10 x TE	1 Teil
10 x Lithiumacetat	1 Teil
steriles H ₂ O dest.	8 Teile

PEG-Lösung

50 % PEG 4000	8 Teile
10 x TE pH 7,5	1 Teil
10 x Lithiumacetat	1 Teil

Die Transformation von *S. cerevisiae* wurde nach der Lithiumacetat-Methode durchgeführt. Die Methode beruht auf der Eigenschaft von Alkali-Kationen, Hefe-Zellen zur Aufnahme von DNA über die Zelloberfläche zu befähigen. Nach Inkubation in gepufferter Lithiumacetat-Lösung erfolgt die Transformation in Kombination mit sogenannter Carrier-DNA (DNA aus Heringssperma), was eine Erhöhung der Transformationseffizienz um etwa das 100fache mit sich bringt. Die eigentliche Aufnahme der DNA wird durch die Zugabe von Polyethylenglykol (PEG) und einen Hitzeschock bei 42 °C induziert (GIETZ *et al.*, 1995; ITO *et al.*, 1983; SCHIESTL & GIETZ, 1989).

2 ml einer frischen Über-Nacht-Kultur wurden 5 min bei 8.000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml sterilem H₂O dest. gewaschen. Nachdem die Zellen in 200 µl LiAc/TE resuspendiert wurden, wurden 20 µl hitzedenaturierte Carrier-DNA, 2 µl Plasmid-DNA und 1,2 ml PEG-Lösung hinzugegeben und der Ansatz unter Schütteln (220 rpm) für 30 min bei 30 °C inkubiert. Es folgte ein 15-minütiger Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad. Danach wurden die Zellen kurz anzentrifugiert (20 s, 13.000 rpm) und zweimal mit 500 µl 1 x TE gewaschen. Die Zellen wurden in 500 µl 1 x TE aufgenommen und zur Selektion auf den jeweiligen Drop-Out-Platten für 3-5 d bei 30 °C inkubiert.

Schizosaccharomyces pombe

Lithiumacetat/EDTA

Lithiumacetat	100 mM
EDTA	1 mM

Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf 4,9 eingestellt und die Lösung sterilfiltriert.

10 x TE

Tris	100 mM
EDTA	10 mM

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,5 eingestellt.

PEG/Lithiumacetat/EDTA-Lösung

PEG 3350	40 %
EDTA	1 mM
Lithiumacetat	100 mM

Die Lithiumacetat-Transformation von *Schizosaccharomyces pombe* lehnte sich an eine Methode von OKAZAKI *et al.* (1990), modifiziert nach KANTER-SMOLER *et al.* (1994) an.

Hierbei werden die Zellen in 10 ml EMM-low Glukose-Medium (0,5 %) bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 1,5 kultiviert und durch Zentrifugation für 5 min bei 7.000 rpm geerntet. Nach zweimaligem Waschen mit 1 ml sterilem H₂O dest. und einmaligem Waschen mit 200 µl Lithiumacetat/EDTA wurde das Pellet in 50 µl Lithiumacetat/EDTA resuspendiert. Danach wurde 1 µg in 30 µl 1 x TE-Puffer gelöste Plasmid-DNA und 300 µl PEG/Lithiumacetat/EDTA-Lösung zupipettiert. Die anschließende Inkubation bei 30 °C erfolgte auf einem Schüttler bei 220 rpm für 30 min, bevor die Zellen für 15 min einem Hitzeschock bei 42 °C im Heizblock ausgesetzt wurden. Das Ernten der Zellen erfolgte durch Anzentrifugieren (20 s, 13.000 rpm), wonach das Pellet in 1 ml 1 x TE-Puffer aufgenommen und in Aliquots zu ca. 200 µl auf selektive EMM-Leu-d/o-Platten ausplattiert

wurde. Nach 3-5 Tagen Inkubation bei 30 °C konnten die transformierten Klone in Flüssigmedium angeimpft werden.

Pichia pastoris

10 x Bicin-NaOH pH 8,3

Bicin	100 mM
-------	--------

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 8,3 eingestellt.

BEDS

10 x Bicin-NaOH pH 8,3	10 %
Ethylenglykol	3 %
Dimethylsulfoxid (DMSO)	3 %
Sorbitol	1 M

1 M DTT

Dithiothreitol	1 M
----------------	-----

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

1 M Sorbitol-Lösung

Sorbitol	1 M
----------	-----

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

Die Transformation von *Pichia pastoris* wurde nach einem Protokoll von LIN-CEREGHINO *et al.* (2005) durchgeführt. Diese kombinierten die Herstellung kompetenter Zellen nach DOHMEN *et al.* (1991) mit der Elektroporationsmethode von CREGG & RUSSELL (1998). Hierbei werden die Zellen in BEDS-Lösung aufgenommen und mit Dithiothreitol behandelt, was eine Erhöhung der Transformationseffizienz um den Faktor 20 bewirkt (WU & LETCHWORTH, 2004). Kompetente Zellen können über sechs Monate gelagert und ähnlich elektrisch kompetenter *E. coli*-Zellen direkt zur Transformation eingesetzt werden. Zur Herstellung elektrokompenter Zellen wurde die optische Dichte einer frischen Über-Nacht-Kultur bestimmt und damit in 50 ml YPD-Medium eine OD₆₀₀ von 0,2 eingestellt. Die Hauptkultur wurde unter Schütteln (220 rpm) bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 1,0 kultiviert. Das Ernten erfolgte durch Zentrifugation für 5 min bei 500 x g, wonach das Pellet in 9 ml eiskalter BEDS-Lösung resuspendiert und 1 ml 1 M DTT-Lösung zugegeben wurde. Nachdem die Zellen für 5 min bei 30 °C und 100 rpm inkubiert worden waren, erfolgten eine Zentrifugation für 5 min bei 500 x g und ein Waschschrift in 1 ml BEDS-Lösung, um das vorhandene DTT weitgehend zu entfernen. Die Suspension wurde in 55 µl-Aliquots aufgeteilt und bei -80 °C gelagert.

Zur Transformation wurde das entsprechende Plasmid linearisiert und über das innuPREP Gel Extraction Kit (ANALYTIK JENA) gereinigt (vgl. 2.5.5, S. 53). 5 µl dieses Reisolats wurden mit einem Aliquot (55 µl) elektrokompenter Zellen in einer Elektroporationsküvette gemischt und 2 min auf Eis belassen. Die Elektroporation erfolgte mittels Gene Pulser II (BIORAD) bei 200 Ω, 1,5 kV/cm und 25 µF. Direkt nach dem elektrischen Puls wurden die Zellen in einer Mischung aus 1 ml kaltem 1 M Sorbitol und 0,5 ml YPD aufgenommen und zur Regeneration für 3 h bei 30 °C und 220 rpm geschüttelt, um anschließend in unterschiedlichen Volumina auf zwei His-d/o-Platten ausplattiert und 3-5 d bei 30 °C inkubiert zu werden.

Zygosaccharomyces bailii

LiAc/DTT/Tris-Lösung

Lithiumacetat	100 mM
Dithiothreitol	10 mM
Tris	10 mM

Lithiumacetat und Tris wurden gelöst, der pH-Wert mit HCl auf pH 7,5 eingestellt und autoklaviert. DTT wurde nachträglich als Stammlösung zugegeben.

1 M Sorbitol-Lösung

Sorbitol	1 M
----------	-----

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

Die Transformation von *Zygosaccharomyces bailii* richtete sich nach einem Protokoll von BRANDUARDI *et al.* (2004). Dieser verwendete eine adaptierte Version der Lithiumacetat-Methode (s. o.) in Kombination mit Elektroporation.

Zur Herstellung elektrokompenter Hefen wurden 100 ml YPD mit 20 ml einer frischen Über-Nacht-Kultur angeimpft und einige Stunden bei 30 °C unter Schütteln (220 rpm) inkubiert bis eine OD₆₀₀ von ca. 1,5 erreicht war. Die Kultur wurde 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 10 ml LiAc/DTT/Tris resuspendiert. Nachdem die Zellen 1 h bei Raumtemperatur inkubiert hatten, wurden sie erst in 10 ml sterilem H₂O dest. und nachfolgend in 10 ml 1 M Sorbit-Lösung gewaschen. Danach erfolgte die Aufnahme der elektrokompenten Hefen in 1 ml 1 M Sorbit-Lösung, von der 200 µl-Aliquots für die folgende Elektroporation eingesetzt wurden. Die Transformation musste innerhalb weniger Stunden erfolgen, da eine längerfristige Lagerung der kompetenten Zellen grundsätzlich nicht möglich ist.

Hierzu wurde 1 µl durch alkalische Lyse isolierter Plasmid-DNA zu 200 µl kompetenten Zellen gegeben und mittels Gene Pulser II (BIORAD) bei 200 Ω, 1,5 kV/cm und 25 µF elektroporiert. Nach dem elektrischen Puls wurden direkt 500 µl YPF mit 1 M Sorbitol

zugegeben und 6-14 h bei 30 °C unter Schütteln (220 rpm) inkubiert. Hierbei war gründliches Verschließen der Reaktionsgefäße unabdingbar, weil es durch Gärprozesse zu einem starken Druckanstieg innerhalb des Reaktionsgefäßes kam. Die Zellsuspension wurde auf selektive YPF-Agarplatten, die G418 in einer Konzentration von 200 mg/l enthielten, ausgebracht und für 3-5 Tage bei 30 °C inkubiert.

2.7. Protein-Detektion

Um die Expression der gewünschten Enzyme im jeweiligen Wirt zu verifizieren und deren biologische Aktivität zu quantifizieren, wurden entsprechende Methoden zur Detektion von Proteinen angewendet. Diese umfassten Standard-Methoden wie SDS-PAGE, Western-Analyse oder Coomassie-Färbungen, spezifische qualitative und quantitative Aktivitätsmessungen und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen.

2.7.1. Probenvorbereitung

2.7.1.1. Konzentrierung zellfreier Kulturüberstände

Die Detektion sekretorischer Proteine mittels SDS-PAGE oder Aktivitätsmessungen machte es erforderlich, die Konzentration der gewünschten Proteine zu erhöhen, um eine Detektion auch bei einer möglichen geringen Sensitivität des Systems zu gewährleisten.

Die Konzentrierung der Kulturüberstände erfolgte mittels Vivaspin 20-Ultrafiltrationseinheiten (SARTORIUS) mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDa. Um ein Verstopfen der Filtereinheit zu verhindern, war es nötig, die Überstände von den Hefe-Zellen zu trennen. Hierzu wurden die Kulturen für 15 min bei 8.000 rpm zentrifugiert, die Pellets verworfen und die Überstände durch Filtration mittels Rotilabo®-Spritzenfiltern (ROTH; 0,22 µm Durchmesser) von restlichen Zellen befreit. Die nun zellfreien Kulturüberstände wurden in die Ultrafiltrationseinheiten geladen und bei 8.000 x g zentrifugiert bis sich das Volumen über der Filtereinheit auf ca. 1/50 des Ursprungsvolumens verringert hatte. Die 50fach konzentrierten Überstände wurden in Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.7.1.2. Zellaufschluss mittels Ultraschall

Binding-Puffer

D/Natrium-Phosphat	20 mM
Natriumchlorid	500 mM

Da die verwendeten *E. coli*-Expressionssysteme nur eine intrazelluläre Proteinproduktion ermöglichten, war es nötig, die Bakterien zum Nachweis einer Expression aufzuschließen.

Das Prinzip des Ultraschall-Aufschlusses basiert auf Kavitation. Durch das Ultraschallfeld werden in der Flüssigkeit Hoch- und Unterdruck-Wellen gebildet. Beim Auftreffen einer Unterdruckwelle auf eine Oberfläche können mit Dampf gefüllte Kavitationsblasen entstehen, die beim Auftreffen der folgenden Hochdruckwelle schlagartig implodieren und unter Wärmeentwicklung eine Schockwelle mit hohen Druckspitzen auslösen, deren Energie die Zellen zerstört.

Der Ultraschallaufschluss erfolgte mittels MSE Soniprep 150 Ultrasonic Disintegrator. Hierzu wurden 50 ml Bakterienkultur zentrifugiert (8.000 rpm, 10 min), das entstandene Pellet in 10 ml Binding-Puffer resuspendiert und in ein Glasröhrchen überführt. Zur Kühlung der Probe wurde der Aufschluss auf Eis durchgeführt; er umfasste 6-8 Zyklen mit jeweils 15 s Beschallung bei einer Amplitude von 20 Microns und einer darauffolgenden Abkühlphase von 30 s. Nachfolgend wurde die Suspension in einen Zentrifugenbecher überführt und für 15 min bei 15.000 rpm zentrifugiert. Der als ‚Rohextrakt‘ bezeichnete Überstand mit den löslichen und das Pellet mit den unlöslichen Bestandteilen wurden danach zur SDS-PAGE eingesetzt.

2.7.1.3. Aktivierung der MMPs mittels APMA

APMA-Stammlösung

4-Aminophenylmercuriumacetat	10 mM
NaOH	100 mM

Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

TTC-Puffer

Tris-HCl pH 7,5	50 mM
Triton X-100	0,05 %
Calciumchlorid	5 mM

Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

Um latente Vollängen-MMPs in ihre aktive Form zu überführen, wurde eine Aktivierung mittels der Organo-Quecksilber-Verbindung 4-Aminophenylmercuriumacetat (APMA; vgl. Abb. 12) durchgeführt. Diese ist in der Lage latente Matrix-Metalloproteasen in ihre aktive Form zu überführen. APMA ist dabei selbst nicht fähig, Peptid-Bindungen zu hydrolisieren; der Aktivierungsmechanismus beruht auf einer durch APMA hervorgerufenen Konformationsänderung des *pro*MMP-Enzyms, welche zu einer Destabilisierung der Prodomäne führt, was letztendlich in deren autoproteolytischer Abspaltung resultiert (COLLIER *et al.*, 1988; ITOH *et al.*, 1995; OGATA *et al.*, 1995; OKADA *et al.*, 1990; STETLER-STEVENSON *et al.*, 1989; WATANABE *et al.*, 1993).

Zur Aktivierung zellwandverankerter MMPs wurde die optische Dichte von Kulturen, die mehrere Tage induziert worden waren, bestimmt und anhand dieser Daten Suspensionen mit $OD_{600} = 5$ in TTC-Puffer hergestellt. Von diesen Suspensionen wurden jeweils 450 μ l mit 150 μ l APMA-Stammlösung (3:1) gemischt (als Negativ-Kontrolle: 150 μ l TTC-Puffer) und für 1 h bei 37 °C unter Schütteln (220 rpm) inkubiert.

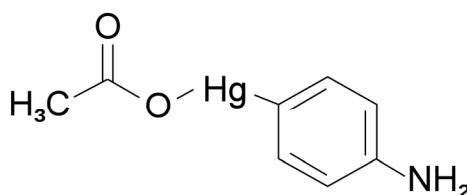


Abb. 12: 4-Aminophenylmercuriumacetat (APMA) bewirkt eine Konformationsänderung des *pro*MMPs, was zu einer Destabilisierung der Prodomäne und deren autoproteolytischen Abspaltung führt.

2.7.2. SDS-PAGE

4 x Tris-HCl/SDS pH 6,8

Tris	0,5 M
SDS	4 g/l

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 6,8 eingestellt und die Lösung durch Autoklavieren entgast.

4 x Tris-HCl/SDS pH 8,8

Tris	1,5 M
SDS	4 g/l

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 8,8 eingestellt und die Lösung durch Autoklavieren entgast.

5 x Laemmli-Elektrophoresepuffer

Tris	125 mM
Glycin	72 g/l
SDS	5 g/l

3 x SDS-Probenpuffer

5 M Tris-HCl pH 6,8	20 %
SDS	1 %
Glycerin	24 %
Coomassie-Blau 0,05 %	4 %
(β -Mercaptoethanol	10 %)

β -Mercaptoethanol wurde nur bei der Herstellung von reduzierendem Probenpuffer zugegeben.

Die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) ist eine Methode zur Trennung von Proteingemischen in einem elektrischen Feld. Als Trennmedium dient hierbei ein Gel bestehend aus einer Polyacrylamidmatrix. Die Proteine wandern aufgrund ihrer Größe, Form und Ladung unterschiedlich schnell durch die netzartige Struktur des Gels und können so voneinander getrennt werden.

Bei der Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) handelt es sich um eine spezielle Form der Polyacrylamidgelelektrophorese, bei der durch die Zugabe von SDS eine Trennung der Proteine ausschließlich basierend auf ihrem Molekulargewicht möglich wird (SHAPIRO *et al.*, 1967). SDS ist ein Monoester der Schwefelsäure, bestehend aus einer langkettigen hydrophoben Alkylgruppe und einem Sulfatrest. Wenn Proteine durch Hitzeeinwirkung denaturieren, verlieren sie ihre Sekundär- und Tertiärstrukturen. Denaturierende Agentien wie DTT oder β -Mercaptoethanol verstärken diesen Effekt, indem sie zusätzlich Disulfidbrücken aufbrechen. Danach bindet SDS als anionisches Detergens im Verhältnis 1,4:1 an die hydrophoben Aminosäurereste der Proteine, wodurch seine negative Ladung die Eigen-Ladung der Proteine überlagert. Diese langgestreckten Protein-SDS-Komplexe verfügen also über einheitliche Ladung : Masse-Verhältnisse, was dazu führt, dass die Laufgeschwindigkeit im Gel nur noch von der molaren Masse des Proteins abhängig ist.

Die von LAEMMLI (1970) entwickelte Methode zur Trennung höhermolekularer Proteine, die in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung kam, verwendet ein Tris-Glycin-Puffersystem, was eine geringere Wärmeentwicklung bei der Elektrophorese und somit höhere Spannungen und kürzere Laufzeiten ermöglicht als bei der von SCHÄGGER & VON JAGOW (1987) entwickelten Methode im Tris-Tricin-Puffersystem.

Das Polyacrylamidgel entsteht durch radikalische Polymerisation aus Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid, was zu einer Quervernetzung der linearen Polyacrylamid-Ketten

führt. In der Reaktion übernimmt APS (Ammoniumpersulfat) die Funktion des Radikalstarters; TEMED (Tetramethylethyldiamin) dient als Polymerisierungskatalysator. Die Maschengröße des Gels kann durch das Mischungsverhältnis von Acrylamid und Bisacrylamid angepasst werden.

Zur Fokussierung der Proteine und der damit verbundenen verbesserten Bandentrennung wurde ein diskontinuierliches System verwendet, bei dem die Proteine erst schnell durch ein 3,6 %iges Sammelgel laufen, um an der Trennfläche zum 8 %igen Trenngel zu akkumulieren. Zur Herstellung des Gels wurde das Trenngel in der angegebenen Reihenfolge unter vorsichtigem Rühren zusammenpipettiert:

Trenngel*

Rotiphorese Gel 30	4 ml
4x Tris-HCl/SDS pH 8,8	3,75 ml
H ₂ O dest.	7,25 ml
10 % APS	80 µl
TEMED	25 µl

* Angaben für zwei Gele

Die Lösung wurde zügig zwischen zwei abgedichtete Glasplatten mit definiertem Abstand (1 mm) gegossen und mit 1 ml Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation (ca. 30 min) wurde das Isopropanol entfernt und mit H₂O dest. gespült. Danach wurde das Sammelgel in ebensolcher Weise über das Trenngel gegossen und der Taschenkamm eingesetzt:

Sammelgel*

Rotiphorese Gel 30	1,3 ml
4x Tris-HCl/SDS pH 6,8	2,5 ml
H ₂ O dest.	6,1 ml
10 % APS	80 µl
TEMED	25 µl

* Angaben für zwei Gele

Nach vollständigem Auspolymerisieren wurde der Kamm entfernt und die Taschen wurden mehrmals mit Laemmli-Elektrophoresepuffer gespült. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit Probenpuffer versetzt und 5 min im Heizblock durch Kochen denaturiert (dieser Schritt unterblieb bei der Zymographie). Als Proteinlängenstandard wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (FERMENTAS) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte im Mini-Protean II-Elektrophorese-System (BIORAD) bei einer konstanten Spannung von 220 V.

2.7.2.1. Zymographie

Aktivierungspuffer

Triton X-100	2,5 %
Tris-HCl pH 7,5	50 mM

Inkubationspuffer

Tris-HCl pH 7,5	50 mM
Natriumchlorid	150 mM
Calciumchlorid	10 mM
Triton X-100	0,1 %

Bei der Zymographie handelt es sich um eine Spezialform der Polyacrylamidgelelektrophorese, bei der die proteolytische Aktivität von elektrophoretisch getrennten Enzymen nachgewiesen werden kann. Die hohe Sensitivität dieser Methode ermöglicht die Detektion von Proteinen im Picogramm-Bereich (HEUSSEN & DOWDLE, 1980; KLEINER & STETLER-STEVENSON, 1994; QUESADA *et al.*, 1997). Das Prinzip basiert auf einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese unter nicht-reduzierenden Bedingungen, bei der konventionelle Substrate, wie z. B. Casein oder Gelatine, mit dem Acrylamid kopolymerisiert werden. Nach der Trennung der Proteine wurde das Gel in einem Aktivierungspuffer inkubiert, der Triton X-100 enthält. Dieses verdrängt das die Proteine umgebende SDS und ermöglicht deren Renaturierung. Bei MMPs erfolgt zeitgleich eine Aktivierung des Zymogens durch Destabilisierung und folgende autokatalytische Abspaltung der Proregion. Während der folgenden Inkubation in Inkubationspuffer findet der proteolytische Abbau des Substrates statt, der danach durch negative Färbung nachgewiesen werden kann (FERNÁNDEZ-RESA *et al.*, 1995; QUESADA *et al.*, 1997).

Zur Durchführung der Zymographie wurden 10 %ige Trenngele mit 0,12 % Gelatine hergestellt. Diese wurde bei 50 °C in H₂O dest. gelöst und die Gele in der folgenden Reihenfolge zusammenpipettiert:

Trenngel*

Rotiphorese Gel 30	4 ml
4x Tris-HCl/SDS pH 8,8	3,75 ml
H ₂ O dest. + 18 mg Gelatine	7,25 ml
10 % APS	80 µl
TEMED	25 µl

* Angaben für zwei Gele

Das Sammelgel wurde wie bei der üblichen SDS-PAGE hergestellt. Die Proben wurden mit nicht-reduzierendem Probenpuffer versetzt und in die Taschen geladen. Ein Denaturierungsschritt durch 5-minütiges Kochen fand nicht statt. Die Elektrophorese erfolgte im Mini-Protean II-Elektrophorese-System (BIORAD) bei einer konstanten Spannung von 180 V. Die Reduzierung der Spannung war nötig, um größere Wärmeentwicklung zu verhindern, die die Gelatine aus dem Gel gelöst hätte. Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Gele für 1 h bei 37 °C in Aktivierungspuffer und anschließend über Nacht bei 37 °C in Inkubationspuffer inkubiert. Die Detektion der Aktivität erfolgte mittels Coomassie-Färbung.

2.7.2.2. Coomassie-Färbung

Entfärberlösung

Methanol	30 %
Essigsäure (99,5 %)	7,5 %

Färbelösung

Coomassie Brilliant Blue R	0,1 %
in Entfärberlösung.	

Coomassie Brilliant Blue R ist ein Triphenylmethan-Farbstoff, der zur Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen eingesetzt wird (vgl. Abb. 13). Ihre Eigenschaften wie ein relativ klarer Hintergrund, angemessene Sensitivität und die einfache Handhabung machen sie zu einer der am weitesten verbreiteten Methoden zur Proteindetektion. Die Nachweisgrenze liegt bei konventioneller Durchführung bei etwa 100 ng Protein, kann aber durch unterschiedliche Modifikationen auf bis zu 1 ng Protein gesenkt werden (FAZEKAS *et al.*, 1963; WANG *et al.*, 2007).

Nach erfolgter Gelelektrophorese wurden die Trenngele in Färbelösung inkubiert und für insgesamt 40 s in der Mikrowelle erhitzt, um die Färbung zu beschleunigen. Im Falle der Zymographie wurde alternativ eine mehrstündige Lagerung in Färbelösung durchgeführt, weil es durch die starke Wärmeentwicklung zu einem Lösen der Gelatine aus dem Gel gekommen wäre. Danach wurde die Färbelösung durch Entfärberlösung ausgetauscht und das Gel zum Entfärben für mehrere Stunden bei 20 °C untern Taumeln inkubiert. Der Entfärber wurde während dieser Zeit mehrmals erneuert, bis die ungefärbte Polyacrylamidmatrix klar erschien. Zur Dokumentation wurden die Gele eingescannt.

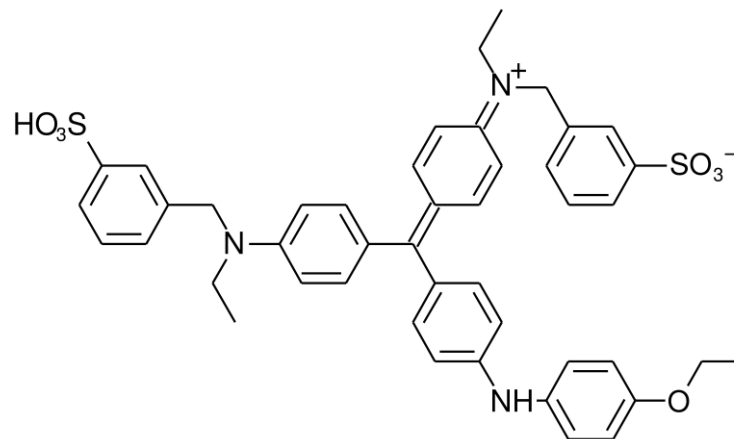


Abb. 13: Coomassie Brilliant Blue ist ein Triphenylmethan-Farbstoff, der zur Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen eingesetzt wird.

2.7.2.3. Western-Analyse

Transferpuffer

Tris	25 mM
Glycin	190 mM
Methanol	20 %
SDS	0,1 %

Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

10 x TBS

Tris	1 M
NaCl	9 %

Der pH-Wert wurde mit 37 % HCl auf 7,5 eingestellt.

Waschpuffer

10 x TBS	10 %
Tween 20	0,05 %

Blockingpuffer (Magermilch)

Magermilchpulver	3 %
in Waschpuffer	

Blockingpuffer (Casein)

Casein	1 %
in Waschpuffer	

Die Western-Analyse dient dem immunologischen Nachweis von Proteinen. Diese werden nach erfolgter SDS-PAGE auf einer Trägermembran (z. B. Polyvinylidendifluorid, PVDF) immobilisiert, was eine Detektion mittels Protein-spezifischer Antikörper ermöglicht (BURNETTE, 1981; TOWBIN *et al.*, 1979). Dazu werden Trägermembran und SDS-Gel übereinander geschichtet und im rechten Winkel dazu ein elektrisches Feld angelegt, was eine Wanderung der Proteine in Richtung Membranoberfläche bewirkt. Dort bleiben sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften, wobei das Muster der elektrophoretischen Trennung erhalten bleibt. Die immobilisierten Proteine sind nun für spezifische Antikörper zugänglich und können mittels Immunodetektion nachgewiesen werden. Vor deren Applikation werden die freien Bindestellen der Trägermembran durch Zugabe von (für die Antikörper nicht erkennbaren) Proteinen blockiert. Nach der Bindung des primären Antikörpers, der gegen das zu detektierende Protein gerichtet ist, erfolgt die Zugabe des sekundären Antikörpers, der spezifisch Epitope des primären erkennt. Dieser ist in der Regel mit einem biologisch aktiven Enzym gekoppelt, das über Sekundärreaktionen nachgewiesen werden kann. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten sekundären Antikörper lagen als Meerrettich-Peroxidase (HRP)-Konjugate vor, die eine Chemilumineszenzreaktion katalysieren. Das applizierte Substrat (SuperSignal West Dura, PIERCE) ermöglicht laut Herstellerangaben Detektionen bis in den mittleren Femtogramm-Bereich ($>10^{-14}$ g) und besteht aus einer Mischung aus Wasserstoffperoxid und Luminol (3-Aminophthalhydrazid). Die Meerrettich-Peroxidase katalysiert die Überführung des Luminols in dessen oxidierte Form, was beim Übergang eines angeregten Intermediärprodukts in den Grundzustand zur Emission eines Photons der Wellenlänge $\lambda_E = 425$ nm führt, die detektiert werden kann (vgl. Abb. 14).

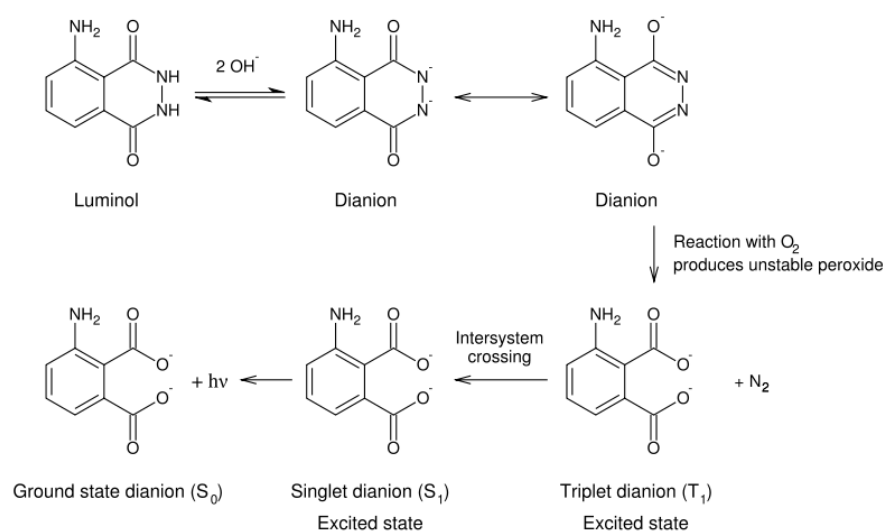


Abb. 14: Luminol-Reaktion. Die Meerrettich-Peroxidase katalysiert die Überführung des Luminols in dessen oxidierte Form, was beim Übergang eines angeregten Intermediärprodukts in den Grundzustand zur Emission eines Photons der Wellenlänge $\lambda_E = 425$ nm führt.

In der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Semi-dry-Blotting-Methode wurden nach erfolgter Elektrophorese die SDS-Gele und Whatman-Papiere für 15 min in kaltem Transferpuffer äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde kurz mit Methanol beschickt, um eine Benetzung zu ermöglichen, und ebenfalls für 15 min in Transferpuffer inkubiert. Zum Zusammenbau der Elektrophorese-Vorrichtung wurde ein Blotting-Papier halbtrocken auf die Anode aufgelegt. Darauf wurden luftblasenfrei PVDF-Membran, Polyacrylamidgel und ein weiteres Blotting-Papier als Verbindung zur Kathode geschichtet. Das Blotting erfolgte im Trans-Blot® SD Electrophoretic Transfer Cell-System (BIORAD) für 90 min bei einer konstanten Stromstärke von 55 mA pro Gel.

Die Sättigung der Membran in Blockingpuffer erfolgte auf einem Taumler bei RT, den Herstellerangaben des jeweils verwendeten primären Antikörpers folgend (vornehmlich für 2 h bei 20 °C). Die Membranen wurden danach in Hybridisierungsröhrchen überführt und mit in 10 ml Blocking-Puffer gelöstem primären Antikörper inkubiert. Nach Inkubation im Hybridizer (HB-1000 Hybridizer, UVP LABORATORY PRODUCTS) in der Regel bei 4 °C über Nacht wurde zweimal für 5 min mit Waschpuffer gewaschen und danach frischer Blocking-Puffer mit sekundärem Antikörper in einer Verdünnung von 1:10.000 zugegeben. Die AK-Bindung erfolgte für 1 h bei 20 °C, wonach zwei weitere Waschschrte in Waschpuffer folgten (je 5 min). Zur Applikation des Chemilumineszenz-Substrats wurde die Membran zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt, 400 µl frisch hergestelltes Substratgemisch zugegeben und die Lumineszenz im ChemiDoc XRS System (BIORAD) detektiert. In der Regel reichte hierbei eine Belichtungszeit von < 5 min aus.

2.7.3. Aktivitätstests

Zur Quantifizierung der enzymatischen Aktivitäten der heterolog exprimierten Proteine wurden spezifische Aktivitätsmessungen durchgeführt.

2.7.3.1. Esterase

10 x PBS

<i>Di</i> Natrium-Hydrogenphosphat <i>dihydrat</i>	100 mM
Natriumchlorid	1,37 M
Kalium- <i>Di</i> Hydrogenphosphat	17,6 mM
Kaliumchlorid	27 mM

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 8,0 eingestellt.

[illegible]

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99

ENVIRONMENTAL MONITORING AND ASSESSMENT

[illegible]

Im Folgenden werden die Systeme MMP-2/MMP-9 Substrat II der Firma CALBIOCHEM sowie EnzCheck® Gelatinase/Collagenase Assay Kit der Firma INVITROGEN näher behandelt.

MMP-2/MMP-9 Substrat II (CALBIOCHEM)

Reaktionspuffer

HEPES Puffer pH 7,0	50 mM
Calciumchlorid	10 mM
4-4'-Dithiodipyridin	1 mM
MMP-2/MMP-9 Substrat II	0,05 mM

Der pH-Wert wurde mit KOH auf 7,0 eingestellt. 4-4'-Dithiodipyridin und MMP-2/MMP-9 Substrat II wurden erst unmittelbar vor Gebrauch zugegeben.

Der Nachweis biologisch aktiver Gelatinasen erfolgt beim MMP-2/MMP-9 Substrat II-Assay indirekt über den Nachweis eines sekundären Reaktionsprodukts durch Messung von dessen Absorption. Das Prinzip basiert auf der Eigenschaft der Gelatinasen, künstlich synthetisierte Thioester-Verbindungen als Substrate zu erkennen und diese zu spalten (WEINGARTEN *et al.*, 1985; WEINGARTEN & FEDER, 1985). Als artifizielles Substrat dient dabei das Thiopeptolid Ac-Pro-Leu-Gly-(2-mercapto-4-methylpentanoyl)-Leu-Gly-OEt. Bei dessen Spaltung durch die MMPs entsteht eine freie Thiolgruppe, welche mit dem im Überschuss vorhandenen 4-4'-Dithiodipyridin reagiert und dieses zu 4-Thiopyridon und einem 4-Pyridyldithio-Derivat umsetzt (EGWIM & GRUBER, 2001). In wässriger Lösung absorbiert 4-Thiopyridon Licht von $\lambda = 324$ nm Wellenlänge, was mittels eines Spektralphotometers quantifiziert werden kann.

Die Methode wurde im Rahmen der experimentellen Arbeiten nur zur Aktivitätsbestimmung sekretorischer MMPs verwendet. Hierzu wurden jeweils 40 μ l der konzentrierten Kulturüberstände in einer Küvette mit 1 ml Reaktionspuffer gemischt und die Absorption bei $\lambda = 324$ nm über 1 h mittels des Spektralphotometers Ultrospec 2100 pro (AMERSHAM BIOSCIENCES) verfolgt. Dabei wurden Messpunkte in Intervallen von 2 min bestimmt.

EnzCheck® Gelatinase/Collagenase Assay Kit (INVITROGEN)

10 x Reaction Buffer

Tris	0,5 M
Natriumchlorid	1,5 M
Calciumchlorid	50 mM
(Natriumazid	2 mM)

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,6 eingestellt, die Lösung sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert. Die Zugabe von Natriumazid ist nur bei längerfristiger Lagerung notwendig.

DQ™ Gelatine

DQ™ gelatin from pig skin 1 mg/ml

Das lyophilisierte Substrat wurde in sterilem H₂O dest. aufgenommen, durch Erwärmen auf 50 °C im Ultraschallbad (5 min) gelöst und bei 4 °C dunkel gelagert.

Inhibitor-Stammlösung

1,10-Phenanthrolin *monohydrat* 400 µg/ml
in 100 % Ethanol

Die im Kit enthaltenen 30 mg Inhibitor wurden in 75 µl Ethanol gelöst. Durch Zugabe dieser Lösung zu 15 ml 1 x Reaction Buffer ergab sich eine 10 mM Stammlösung.

Das EnzCheck® Gelatinase/Collagenase Assay Kit basiert im Gegensatz zu obigem System nicht auf der Messung der Absorption, sondern der Fluoreszenzintensität einer Lösung. Als Substrat dient hierbei Gelatine, die so stark mit Fluorescein markiert ist, dass eine Fluoreszenz aufgrund des gegenseitigen Quenching-Effekts nicht möglich ist. Erst durch Abbau der Gelatine durch die Gelatinasen werden die Moleküle voneinander getrennt und können unter Anregung bei $\lambda_A = 495 \text{ nm}$ fluoreszieren ($\lambda_E = 515 \text{ nm}$), was über einen Fluoreszenz-Mikrotiterplatten-Reader oder ein Fluoreszenz-Photometer nachgewiesen werden kann. Die gemessene Zunahme der Fluoreszenz pro Zeiteinheit stellt das Maß für die biologische Aktivität der getesteten Gelatinase dar.

Die Parameter für die MMP-Aktivitätsbestimmung mit diesem Assay wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit in diversen Variationen getestet und optimiert, was im Ergebnisteil (vgl. Kapitel 3.3, S. 112) detailliert dargestellt ist.

Die *P. pastoris*-Zellen wurden mehrere Tage in induzierendem Medium kultiviert und die optische Dichte bestimmt. Zum Einstellen der Zellzahl wurden immer so viele Zellen abzentrifugiert, dass sich die gewünschte OD₆₀₀ durch Resuspendieren in 2 ml Puffer ergab. Vorher wurden die Zellen 4 min bei 8.000 rpm zentrifugiert und mit 1 ml 1 x Reaction Buffer gewaschen. Nach Aufnahme in 2 ml 1 x Reaction Buffer wurde die Suspension in 100 µl-Aliquots in schwarze Mikrotiterplatten (NUNC) vorgelegt. Die Substratlösung wurde durch Verdünnung der gewünschten Menge DQ™ Gelatine-Stammlösung in 1 x Reaction Buffer hergestellt und davon jeweils 100 µl zu den Zellen in die Mikrotiterplatten gegeben. Die Detektion der Enzymreaktion erfolgte im Fluoroskan Ascent CF (LABSYSTEMS; $\lambda_A = 485 \text{ nm}$; $\lambda_E = 527 \text{ nm}$) bei 37 °C in der Regel über 20 h. Messdaten wurden alle 20 min erhoben; dazwischen wurden die Platten 19,5 min lang mit 720 rpm bei einem Radius von 1 mm geschüttelt, um eine optimale Substrat- und Zell-Verteilung zu gewährleisten.

Abhängig von dem zu optimierenden Parameter wurde dieses Protokoll mit entsprechenden Abweichungen verwendet, was an entsprechender Stelle ausgeführt ist.

2.7.3.3. Proteinbestimmung zur Ermittlung der spezifischen Aktivität

BCA-Arbeitsreagenz

Reagenz A (Bicinchoninsäure)	50 Teile
Reagenz B (Kupfersulfat)	1 Teil

Die Ermittlung der spezifischen Aktivität einer Zellsuspension erfordert die Relativierung der gemessenen Aktivität in Hinblick auf die vorhandene Gesamtproteinmenge. Hierzu wurde der Proteingehalt einer *Pichia*-Kultur in Abhängigkeit von ihrer optischen Dichte ermittelt, wobei der BCA Protein Assay Kit der Firma PIERCE Verwendung fand. Die Quantifizierung erfolgt durch einen Farbumschlag der Testlösung von grün zu violett proportional zur vorhandenen Proteinmenge (SMITH *et al.*, 1985). Das Prinzip stützt sich auf die Tatsache, dass Cu^{2+} -Ionen in Anwesenheit von Proteinen zu Cu^+ -Ionen reduziert werden. Hierfür sind vor allem die Aminosäuren Cys, Trp, Tyr und die Peptid-Bindung selbst verantwortlich (WIECHELMAN *et al.*, 1988). Cu^+ -Ionen gehen mit der im Testansatz vorhandenen Bicinchoninsäure (BCA, 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure) eine Komplexverbindung ein, die eine intensive Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 562 \text{ nm}$ zeigt, was colorimetrisch detektiert werden kann (vgl. Abb. 16).

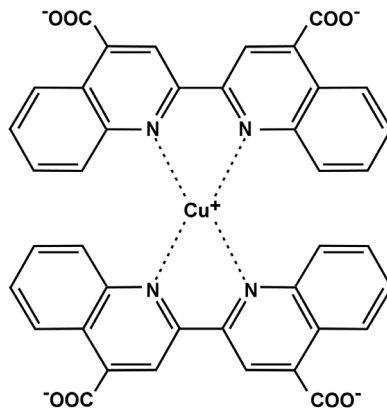


Abb. 16: BCA Protein Assay. Cu^+ -Ionen gehen mit Bicinchoninsäure (2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure) eine Komplexverbindung ein, die eine intensive Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 562 \text{ nm}$ zeigt.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde 1 ml einer *Pichia*-Kultur ($\text{OD}_{600} = 50\text{-}60$) bei 8.000 rpm für 4 min zentrifugiert und in 200 μl Lysepuffer mit 0,03 g Glasperlen aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte in einer Schwingmühle der Firma RETSCH (zweimal 1 min bei 100 Hz). Danach wurden 800 μl H_2O dest. auf den Ansatz gegeben, was der Wiederherstellung des ursprünglichen Volumens diente, und dieser für 5 min bei 300 x g

zentrifugiert, um die Glasperlen von der Proteinlösung zu trennen. Zur Proteinbestimmung wurde eine 1:1-Verdünnung eingesetzt.

Als Referenzwerte wurden parallel die Proteingehalte einer Verdünnungsreihe von Rinderserumalbumin (BSA) mit bekannter Proteinkonzentration ermittelt (25-1.000 µg/ml), um daraus später eine Eichgerade zu erstellen. Zur Messung wurden 25 µl der jeweiligen Probe (bzw. des Proteinstandards) in Wells einer Mikrotiterplatte vorgelegt und 200 µl BCA-Arbeitsreagenz zugegeben. Die Inkubation für 30 min bei 37 °C erfolgte ebenso wie die Absorbationsmessung bei $\lambda = 560$ nm im Microplate Reader Model 680 XR (BIORAD).

2.8. Indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie

10 x PBS

<i>Di</i> Natrium-Hydrogenphosphat <i>dihydrat</i>	100 mM
Natriumchlorid	1,37 M
Kalium- <i>Di</i> Hydrogenphosphat	17,6 mM
Kaliumchlorid	27 mM

Die pH-Wert wurde mit HCl auf 7,5 eingestellt.

Der Nachweis zellwandverankerter Proteine auf Hefezellen erfolgte mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie. Ähnlich der Immunodetektion bei der Western-Analyse wird auch hier ein indirekter Nachweis durch Enzym-spezifische Antikörper verwirklicht. Die sekundären Antikörper sind dabei jedoch nicht mit einem biologisch aktiven Enzym, sondern mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt. In der vorliegenden Arbeit wurden FITC-konjugierte Anti-Rabbit-IgG-Antikörper (SIGMA) verwendet. FITC (Fluorescein-5-isothiocyanat, vgl. Abb. 17) ist ähnlich Coomassie Brilliant Blue ein Triphenylmethan-Farbstoff, der bei Bestrahlung mit einer Anregungswellenlänge von $\lambda_A = 490$ nm grün-gelb fluoresziert ($\lambda_E = 520$ nm).

Pichia pastoris-Zellen wurden mehrere Tage in BMM-Medium kultiviert und danach geerntet. Hierzu wurden 20 µl Kultur in 1 ml 1 x PBS pH 7,5 aufgenommen und 4 min für 8.000 rpm zentrifugiert (Angaben beziehen sich auf OD₆₀₀-Werte der Kultur von ca. 50-100). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet im Rückfluss (ca. 50 µl) aufgenommen. Nach Zugabe von 2 µl Anti-MMP-Antikörpern (ABCAM) bzw. Anti-Esterase A-Antiserum erfolgte eine Inkubation für 1 h bei 20 °C auf einem Drehrad. Um überschüssige Antikörper zu entfernen, wurden drei Waschschrte mit jeweils 500 µl 1 x PBS pH 7,5 angeschlossen und das resultierende Pellet im Rückfluss (ca. 50 µl) resuspendiert. Die Bindung des FITC-markierten sekundären Antikörpers erfolgte für 45 min bei 20 °C auf einem Drehrad in Dunkelheit. Nicht gebundene Antikörper wurden durch drei Waschschrte mit jeweils 500 µl

1 x PBS pH 7,5 entfernt, das Pellet im Rückfluss aufgenommen und zur Mikroskopie eingesetzt. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit dem Fluoreszenz-Mikroskop BZ-8000K (KEYENCE) durchgeführt und anschließend mit dem Programm BZ Analyzer (KEYENCE) bearbeitet.

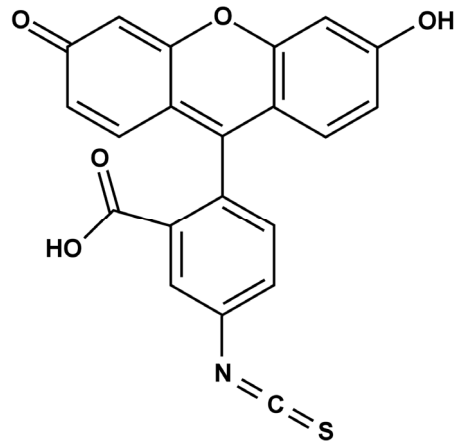


Abb. 17: FITC (Fluorescein-5-isothiocyanat) ist ein Triphenylmethan-Farbstoff, der bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_A = 490$ nm grün-gelb fluoresziert ($\lambda_E = 520$ nm).

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollten die humanen Matrix-Metalloproteasen MMP-2 und MMP-9 heterolog in Hefen exprimiert und auf deren Oberfläche immobilisiert werden. Das übergeordnete Ziel lag in der Etablierung eines zellbasierten Bioassays zur Testung potentieller MMP-Hemmstoffe. In der praktischen Anwendung sollen die mit aktiven MMPs beladenen Hefe-Zellen Hemmstoff-Entwicklern in einem einfachen, leicht reproduzierbaren und sicheren System die Testung synthetisierter Hemmstoffe ermöglichen. Die Methodik sollte dabei die bisherigen Hürden der MMP-Isolierung aus Säugerzelllinien und ihrer nachträglichen Aktivierung durch umweltschädigende Quecksilberverbindungen umgehen und darüber hinaus die Reproduzier- und Vergleichbarkeit der Testergebnisse verbessern.

Die experimentellen Arbeiten zur Etablierung dieses Systems gliederten sich in drei Ebenen. In einem ersten Schritt wurden unterschiedliche Expressionswirte auf ihre generelle Eignung bei der rekombinanten Herstellung der Enzyme untersucht. Hierzu wurden diese in einer sekretorischen Form exprimiert und die Kulturüberstände bezüglich des Vorhandenseins von MMPs und deren biologischer Aktivität verglichen.

Für den vielversprechendsten Expressionswirt wurden Untersuchungen zur Optimierung der Zellwandverankerung durchgeführt. Hierzu wurden in diesem bzw. in verwandten Organismen etablierte Zellwand-Ankersysteme vergleichend auf ihre Eignung im Wirtsorganismus untersucht. Als Reporterprotein diente eine bakterielle Esterase aus *Burkholderia gladioli*, deren Aktivität photometrisch quantifiziert wurde. Aus der Esterase-Aktivität konnten indirekte Rückschlüsse auf die Anzahl der verankerten Proteine und somit auf die Eignung des jeweiligen Ankersystems gezogen werden.

Die mit dem optimalen Zellwand-Anker immobilisierten MMPs wurden abschließend zur Auswahl eines geeigneten Gelatinase-Assays eingesetzt. Hierbei kamen ein photometrischer und ein fluorimetrischer Assay zum Einsatz. Die Parameter für die Messung der *in vivo*-Proben und deren Aktivierung wurden sukzessive optimiert und eine Schritt-für-Schritt-Anleitung erstellt.

3.1. Auswahl des Wirtsorganismus

Zur Auswahl des geeigneten Wirtsorganismus wurden die Gene der MMPs mit N-terminalen ER-Signalsequenzen versehen (entfiel bei *E. coli*) und in wirtsspezifische Expressionsplasmide eingebracht. Nach Transformation in die Expressionsstämme erfolgte

eine Analyse der Kulturüberstände (Zellaufschlüsse bei *E. coli*) auf das Vorhandensein von MMPs.

3.1.1. Herstellung der Expressionsplasmide

Zur Herstellung der Expressionsvektoren wurden die DNA-Sequenzen von humanen MMP-2 und MMP-9 mittels Expand High Fidelity Polymerase amplifiziert, in pCR[®]II-TOPO[®]-Vektoren zwischenkloniert und sequenziert. Die als Template verwendete cDNA wurde freundlicherweise von ERIC W. HOWARD (University of Oklahoma) zur Verfügung gestellt.

Die verwendeten PCR-Primer 5'-MMP-VL und 3'-MMP (vgl. Tab. 8, S. 48) ermöglichten eine Amplifikation der *proMMP*-Sequenz unter Entfernung der natürlichen ER-Signalsequenz (Präregion). Die Konstrukte wurden am 5'-Ende mit den Schnittstellen *XhoI* und *EcoRI* gefolgt von einem Start-Codon versehen und am 3'-Ende durch *XbaI*- und *SalI*-Schnittstellen, getrennt durch ein Stopp-Codon, ergänzt (vgl. Abb. 18). Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit Genom-Datenbanken (NCBI) abgeglichen, um mögliche Mutationen zu identifizieren. Bei MMP-9 stimmte die amplifizierte Sequenz mit der online verfügbaren überein. Das MMP-2-Amplifikat enthielt drei stille Mutationen durch eine Transversion an Position 591 (C zu G) und zwei Transitionen an den Positionen 663 (C zu T) und 1.719 (T zu C). Später durchgeführte PCRs mit diesem Template führten zu Produkten mit Mutationen an den gleichen Stellen, was darauf hindeutet, dass diese bereits in der Template-DNA vorhanden waren.

Ausgehend von den Sequenzierungs-Vektoren TOPO-MMP-2 und TOPO-MMP-9 wurden die Expressionsvektoren für die einzelnen Wirtsorganismen erstellt. Die Klonierung erforderte mehrere Zwischenklonierungsschritte und Plasmid-Anpassungen. Abb. 19 gibt eine zusammenfassende Darstellung der einzelnen Klonierungsschritte wieder, die im Folgenden näher erläutert werden. Die Ausführungen richten sich nach der logischen Folge der Klonierungsarbeiten.

<i>XhoI</i>	<i>EcoRI</i>	*	<i>proMMP-2</i> (1.896 bp)					<i>XbaI</i>		<i>SalI</i>
CTCGAG	GAATTC	CATG	GCGCCGTCGCCC	ATC		GACTGGCTAGGCTGC	TCTAGA	TAA	GTCTCGAC	
L E	E F	M	A P S P I			N W L G C	S R	•		

<i>XhoI</i>	<i>EcoRI</i>	*	<i>proMMP-9</i> (2.067 bp)					<i>XbaI</i>		<i>SalI</i>
CTCGAG	GAATTC	CATG	GCCCCCAGACAGCGC		CAGTGCCCTGAGGAC	TCTAGA	TAA	GTCTCGAC		
L E	E F	M	A P R Q R			Q C P E N	S R	•		

Abb. 18: Amplifikate der *proMMP*-Sequenzen mit eingeführten Schnittstellen. Die Konstrukte enthalten *XhoI*, *EcoRI* und ein Start-Codon am 5'-Ende und *XbaI*, ein Stopp-Codon und *SalI* am 3'-Ende. *proMMP-2* enthält drei stille Mutationen, bei *proMMP-9* ist die *SalI*-Schnittstelle nicht funktional (* = Start-Codon, • = Stopp-Codon).

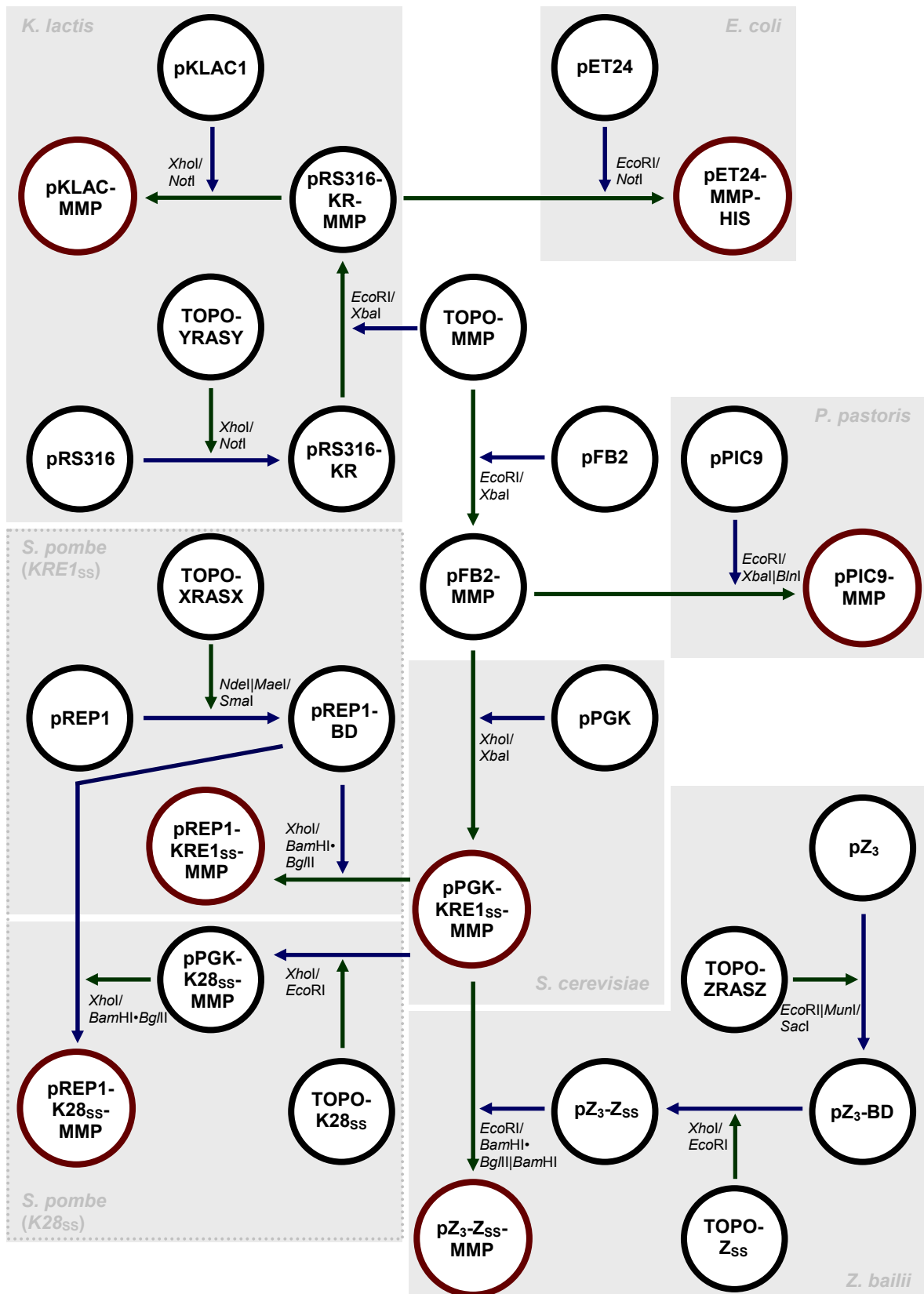


Abb. 19: Klonierungsplan zur Herstellung der Expressionsvektoren zur Identifizierung des optimalen MMP-Expressionswirts. Zur Herstellung der Expressionsplasmide (rot) wurden mehrere Vektoradaptationen und Zwischenklonierungsschritte durchgeführt. Die Farbe der Pfeile gibt an, ob von dem Ursprungsplasmid der Vektoranteil (blau) oder das Insert (grün) weiter verwendet wurde („BamHI•BglII“ – für MMP-2 wurde BamHI, für MMP-9 BglII verwendet; Enzym1|Enzym2 – Ligation über kompatible Enden, Schnittstellen wurden zerstört).

Kluyveromyces lactis

Die Expression in *K. lactis* erfolgte mittels des *K. lactis* Protein Expression Kits (NEW ENGLAND BIOLABS). Der verwendete Vektor pKLAC1 (vgl. Abb. 21 A) ermöglicht eine Proteinexpression unter der Kontrolle einer mutierten Form des *LAC4*-Promotors (COLUSSI & TARON, 2005). Das Plasmid verfügt upstream der MCS über eine α -MF-Signalsequenz, um die rekombinanten Proteine in den sekretorischen Weg der Hefe zu dirigieren. Der linearisierte Vektor wird durch homologe Rekombination in den *LAC4*-Locus des Genoms integriert. Das in der Expressionskassette enthaltene Acetamidase-Gen *amdS* ermöglicht eine Selektion positiver Transformanten durch die Fähigkeit zum Wachstum auf Medien, die Acetamid als alleinige Stickstoffquelle enthalten. Klone, die das *amdS*-Gen besitzen, sind in der Lage, Acetamid zu Ammonium umzusetzen und dieses als Stickstoffquelle zu nutzen. Darüber hinaus hat die Selektion auf Acetamid den Vorteil, dass über 90 % der selektierten Transformanten multiple Insertionen aufweisen, wodurch eine gesteigerte Proteinproduktion erreicht werden kann (VAN OUYEN *et al.*, 2006).

Das Einklonieren der MMP-Gene erforderte aufgrund der Beschaffenheit der pKLAC-MCS einen Zwischenklonierungsschritt in einen adaptierten Vektor pRS316 (SIKORSKI & HIETER, 1989). In *K. lactis* exprimierte Proteine benötigen eine Kex-Protease-Schnittstelle zwischen α -MF-Signalsequenz und Target-Protein, um dessen korrekte Prozessierung auf dem sekretorischen Weg zu gewährleisten. Um die MMP-Konstrukte mit dieser Schnittstelle zu ergänzen, wurde die MCS des Vektors pRS316 wie folgt umgebaut: mittels der Primer 5'-YRASY und 3'-YRASY wurde das Säuger-Gen *RAS* amplifiziert und am 5'-Ende mit den Schnittstellen *Xho*I und *Eco*RI getrennt durch eine Kex-Schnittstelle ergänzt. Das 3'-Ende erhielt die Schnittstellen *Xba*I, *Bgl*II und *Not*I (vgl. Abb. 20). *RAS* diente dabei lediglich als eine Hilfssequenz, die später wieder entfernt wurde.

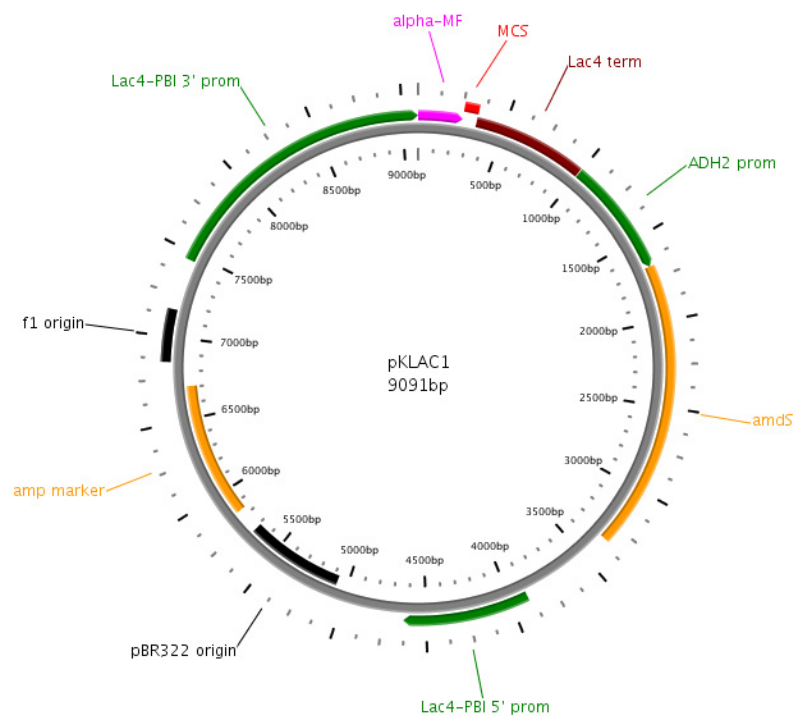
<i>Xho</i> I	Kex*	<i>Eco</i> RI	<i>RAS</i>				<i>Xba</i> I	<i>Bgl</i> II	<i>Not</i> I
CTCGAG	AAAAGA	GAATTC	ATGACGGAATATAAG		ATGAGCTGCAAGTAA	TCTAGA	AGATCT	GCGGCCGC	
L E	K R	E F	M T E Y K		M S C R •	S R	R S	A A A	

Abb. 20: Adaptierte Multiple Cloning Site des Vektors pRS316-KR. Um die MMP-Gene mit einer Kex-Protease-Schnittstelle zu ergänzen, wurde das Säuger-Gen *RAS* mit flankierenden Sequenzen versehen, um später durch die MMP-Gene ersetzt zu werden (• = Stopp-Codon).

Die DNA-Sequenz wurde aus dem Vektor TOPO-YRASY über *Xho*I/*Not*I in die MCS des pRS316-Vektors eingebracht und die Funktionalität der Schnittstellen mittels Testrestriktionen überprüft; eine Sequenzierung erfolgte nicht. Der resultierende Vektor pRS316-KR wurde anschließend mit *Eco*RI/*Xba*I restringiert und das enthaltene *RAS*-Gen

durch das MMP-9-Gen aus TOPO-MMP-9 ersetzt. Die Vektor pRS316-KR-MMP-9 ermöglichte die anschließende Klonierung zum Expressionsvektor pKLAC1-MMP-9s unter Verwendung der Schnittstellen *XhoI* und *NotI*. Die finale Expressionskassette enthielt demnach die Signalsequenz des α -MF, direkt gefolgt von einer Kex-Protease-Schnittstelle und dem MMP-Gen. Als Stopp-Codon wurde das pKLAC1-eigene verwendet; unter Berücksichtigung aller Restriktions-Schnittstellen resultierte dies in einer Verlängerung des Proteins um zwei Aminosäuren am N- und sieben am C-Terminus (vgl. Abb. 21 B).

(A)



(B)

pKLAC1-MMP-9s:

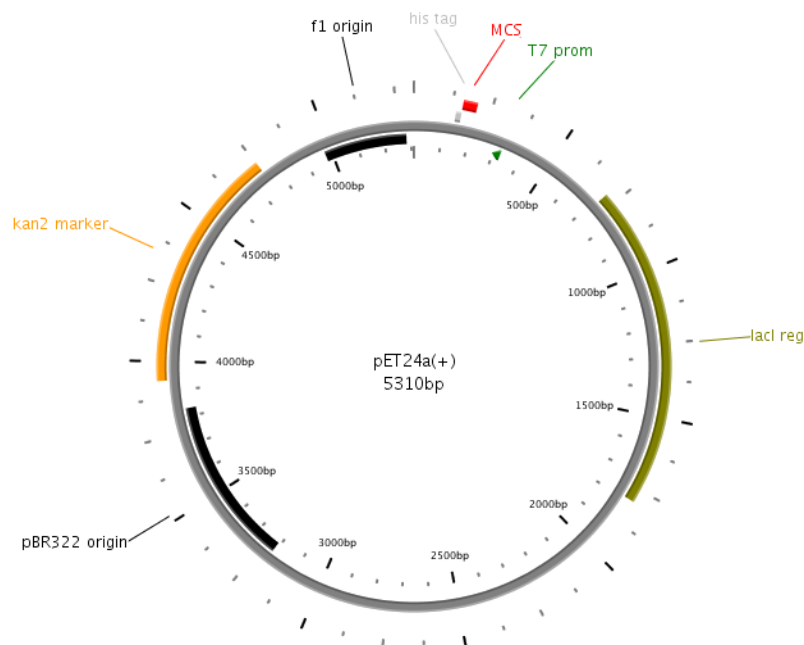
<i>XhoI</i>	Kex*	<i>EcoRI</i>	<i>proMMP-9</i>			<i>XbaI</i>	<i>BglII</i>	<i>NotI</i>
CTCGAG	AAAAGA	GAAATTC	ATGGCCCC		CTGAGGAC	TCTAGA	AAGATCT	GCGGCCGC
L E	K R	E F	M A P		P E N	S R	R S	A A A

Abb. 21: Der *Kluyveromyces lactis*-Expressionsvektor pKLAC1 aus dem *K. lactis* Protein Expression Kit (NEW ENGLAND BIOLABS). **(A)** Die Integration erfolgt durch homologe Rekombination in den *LAC4*-Lokus des Wirtsgenoms. Das Acetamidase-Gen *amdS* ermöglicht eine Selektion auf Medien mit Acetamid als alleiniger Stickstoffquelle. **(B)** Das *RAS*-Gen wurde über *EcoRI/XbaI* durch das MMP-9-Gen ersetzt (vgl. HOFFMANN, 2007).

Escherichia coli

Zur Expression in *E. coli* wurde das pET System der Firma NOVAGEN verwendet. Die Expression der Zielgene wird über den stark induzierbaren Bakteriophagen-T7-Promotor gesteuert. Die Transkription wird durch das Vorhandensein von T7-RNA-Polymerase im Wirtsorganismus induziert. BL21 (DE3)-Zellen verfügen über eine chromosomale Kopie der T7-RNA-Polymerase unter Kontrolle des mit IPTG induzierbaren lacUV5-Promotors (STUDIER & MOFFATT, 1986). Die Selektivität und Aktivität dieser Polymerase rekrutiert bei voller Induktion nahezu alle Ressourcen des Bakteriums zur Transkription des Zielgens. Laut Herstellerangaben kann das rekombinante Protein nach wenigen Stunden die Hälfte der bakteriellen Gesamtproteinmenge einnehmen. Der verwendete Vektor pET24a(+) verfügt über einen Kanamycin-Resistenz-Marker und die MCS flankierende Standard-Tags (5': T7, 3': 6 x His; vgl. Abb. 22 A).

Ausgehend von den im Rahmen der *K. lactis*-Expression hergestellten Vektoren pRS316-KR-MMP wurden die *E. coli*-Expressionsvektoren pET24-MMP-HIS durch Ligation in den Vektor pET24a(+) über die Schnittstellen *EcoRI*/*NotI* hergestellt. Die resultierenden Proteine verfügen N-terminal über einen T7-Tag, der über fünf weitere Aminosäuren mit der MMP-Proregion verbunden ist. Der C-Terminus ist über fünf Aminosäuren an einen 6 x His-Tag fusioniert (vgl. Abb. 22 B).

(A)

(B)

pET24-MMP-2-HIS:

T7-Tag		<i>EcoRI</i>	<i>proMMP-2</i>
ATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGT	CGCGGATCC	GAATTC	ATGGCGCC...
M A S M T G G Q Q M G	R G S	E F	M A P

<i>proMMP-2</i>	<i>NotI</i>		6 x His-Tag	
...TAGGCTGC	GCGGCCGC	ACTCGAG	CACCACCACCACCACCAC	TGA
L G C	A A A	L E	H H H H H H	•

pET24-MMP-9-HIS:

T7-Tag		<i>EcoRI</i>	<i>proMMP-9</i>
ATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGT	CGCGGATCC	GAATTC	ATGGCCCC...
M A S M T G G Q Q M G	R G S	E F	M A P

<i>proMMP-9</i>	<i>NotI</i>		6 x His-Tag	
...CTGAGGAC	GCGGCCGC	ACTCGAG	CACCACCACCACCACCAC	TGA
P E N	A A A	L E	H H H H H H	•

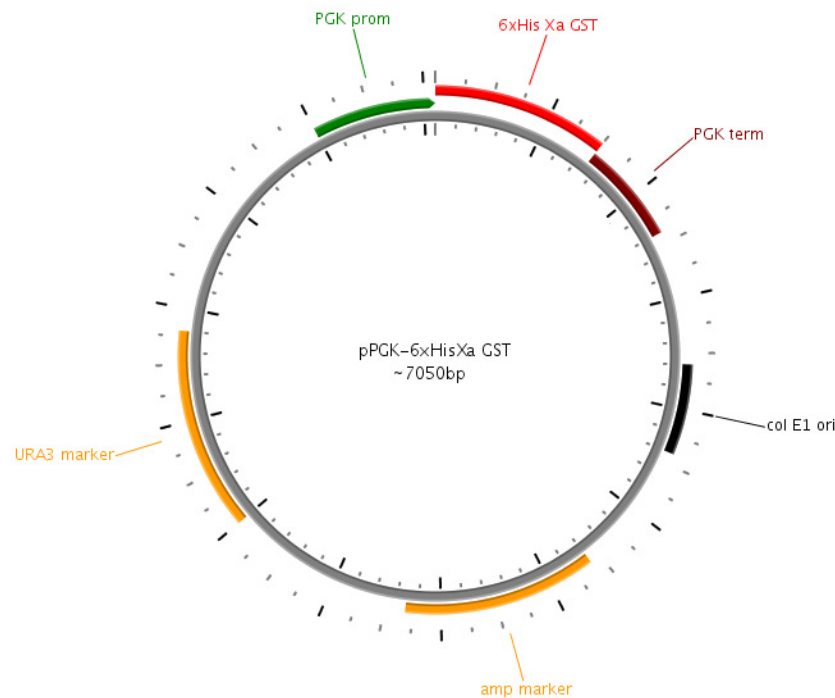
Abb. 22: Der *Escherichia coli*-Expressionsvektor pET24a(+) von NOVAGEN. (A) Das Plasmid verfügt über ein Kanamycin-Resistenz-Gen und integrierte Standard-Tags, die die MCS flankieren. Die Expression wird über den starken T7-Bakteriophagen-Promotor gesteuert, der indirekt durch IPTG-Zugabe induziert werden kann. (B) Die Klonierung der MMP-Gene erfolgte über *EcoRI*/*NotI* aus pRS316-KR-MMP (• = Stopp-Codon).

Saccharomyces cerevisiae

Der für die Expression in *S. cerevisiae* vorgesehene Vektor pPGK-6xHis-Xa-GST basiert auf dem Vektor YEpDT-PGK von KANG *et al.* (1990) mit Veränderungen nach BERNARDY (2006). Er verfügt über einen konstitutiven Promotor der Phosphoglyceratkinase (PGK) und einen *URA3*-Prototrophie-Marker zur Selektion in Hefen sowie einem Ampicillin-Resistenzgen zur Verwendung in *E. coli* (vgl. Abb. 23 A).

Um die Sekretion der heterologen Proteine zu ermöglichen, mussten diese in einem Zwischenklonierungsschritt mit einer ER-Signalsequenz versehen werden. Hierzu wurden die MMP-Gene aus dem jeweiligen TOPO-Vektor über die Schnittstellen *EcoRI*/*XbaI* in den Vektor pFB2 (BREINIG & SCHMITT, 2002) ligiert. Dieser enthält upstream der *EcoRI*-Schnittstelle die Signalsequenz des *KRE1*-Gens, welche am 5'-Ende von einer *XhoI*-Schnittstelle flankiert wird. Die nachfolgende Klonierung aus dem Vektor pFB2-MMP in pPGK-6 x His-Xa-GST (*XhoI*/*XbaI*) führte zu einem vollständigen Austausch der 6xHisXaGST-Kassette und resultierte in pPGK-KRE1_{ss}-MMPs. Die Plasmide enthielten downstream der einklonierten *KRE1*_{ss}-MMP-Fusion ein Stopp-Codon gefolgt von Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Bgl*II (vgl. Abb. 23 B). Die finale Proteinsequenz erhält nach erfolgter Prozessierung durch die Signalpeptidase einen um jeweils zwei Aminosäuren verlängerten N- bzw. C-Terminus.

(A)



(B)

pPGK-MMP-2s:

<i>Xho</i> I	<i>KRE1</i> _{ss} (84 bp)	<i>Eco</i> RI	<i>proMMP-2</i>	<i>Xba</i> I	<i>Bam</i> HI	<i>Bgl</i> II
CTCGAG	ATGATG...GCTGTG	GAATTC	ATGGCGCC.....TAGGCTGC	TCTAGA	TAA	GGATCCAGATCT
L E	M M A V	E F	M A P L G C	S R	• G S	R S

pPGK-MMP-9s:

<i>Xho</i> I	<i>KRE1</i> _{ss} (84 bp)	<i>Eco</i> RI	<i>proMMP-9</i>	<i>Xba</i> I	<i>Bam</i> HI	<i>Bgl</i> II
CTCGAG	ATGATG...GCTGTG	GAATTC	ATGGCCCC.....CTGAGGAC	TCTAGA	TAA	GGATCCAGATCT
L E	M M A V	E F	M A P P E N	S R	• G S	R S

Abb. 23: Der *Saccharomyces cerevisiae*-Expressionsvektor pPGK-6xHisXaGST (A) verfügt über einen konstitutiven Promotor der Phosphoglyceratkinase (PGK) und einen *URA3*-Prototrophie-Marker zur Selektion in Hefen (Größenverhältnisse entsprechen nicht den tatsächlichen Gengrößen). **(B)** Die *KRE1*_{ss}-MMP-Fusionen wurden aus pFB2-MMP über *Xho*I/*Xba*I eingebracht (• = Stopp-Codon; vgl. KESSLER, 2006).

Schizosaccharomyces pombe

Die heterologe Expression in *S. pombe* basiert auf dem Vektorsystem von MAUNDRELL (1993). Das episomale Plasmid pREP1 verwendet den durch Thiamin-Zugabe reprimierbaren Promotor und das Polyadenylierungssignal des *nmt1*-Gens aus *S. pombe* (MAUNDRELL, 1990). Dies ermöglicht eine Thiamin-vermittelte Steuerung der Transkription des rekombinanten Target-Gens. Der Vektor verfügt über ein Ampicillin-Resistenz-Gen zur Selektion in *E. coli* und einen *LEU2*-Prototrophie-Marker zur Identifizierung transformierter Hefe-Klone (vgl. Abb. 25 A). Die Multiple Cloning Site besteht lediglich aus vier Restriktions-Erkennungssequenzen *Nde*I, *Sall*, *Bam*HI und *Sma*I, was nur eine reduzierte Flexibilität bei

der praktischen Arbeit zulässt. Neben der begrenzten Anzahl der verfügbaren Klonierungsstellen schränken die Eigenarten der Schnittstellen *NdeI* und *SmaI* die Praktikabilität der MCS weiter ein: die Sequenz von *NdeI* (CATATG) verfügt über ein internes Start-Codon und das Restriktionsenzym *SmaI* unüblicherweise über ein Temperaturoptimum von 25 °C.

Um die Struktur der MCS den Bedürfnissen der durchzuführenden Experimente anzupassen, wurde der Vektor in diesem Bereich dergestalt umgebaut, dass die *NdeI*-Schnittstelle zerstört und weitere Schnittstellen eingebracht wurden. Zu diesem Zweck wurde eine verkürzte Form des *RAS*-Gens mittels PCR mit flankierenden Schnittstellen versehen und zum Austausch der pREP1-MCS eingesetzt (vgl. Abb. 24); der korrekte Zustand der Restriktionsstellen wurde durch Testverdaus verifiziert. pREP1 wurde mit *NdeI/SmaI*, der das *RASΔ*-Fragment enthaltende Vektor TOPO-XRASX mit *MaeI/SmaI* restringiert. Die anschließende Ligation resultierte durch die kompatiblen Überhänge der Enzyme *MaeI* und *NdeI* in der Zerstörung beider Schnittstellen. Um das *RASΔ*-Fragment zu entfernen, wurde mit *SaI* verdaut und das so linearisierte Plasmid anschließend zum Vektor pREP1-BD religiert (vgl. Abb. 25 B).

<i>MaeI</i>	<i>Van91I</i>	<i>XhoI</i>	<i>SaI</i>	<i>RASΔ</i>							
CTAG	CCAATAACTGG	CTCGAG	GTCGAC	CACTATAGAGGATTC...							
L	A N N W	L E	V N	H Y R G F							

<i>RASΔ</i>	<i>SaI</i>	<i>NotI</i>	<i>SpeI</i>	<i>BglII</i>	<i>BamHI</i>	<i>SmaI</i>
...ATGAGCTGCAAGTAA	GTCGAC	GCGGCCGC	ACTAGT	AGATCT	GGATCC	CCCGGG
M S C R •	V N	A A A	L V	D L	D P	P G

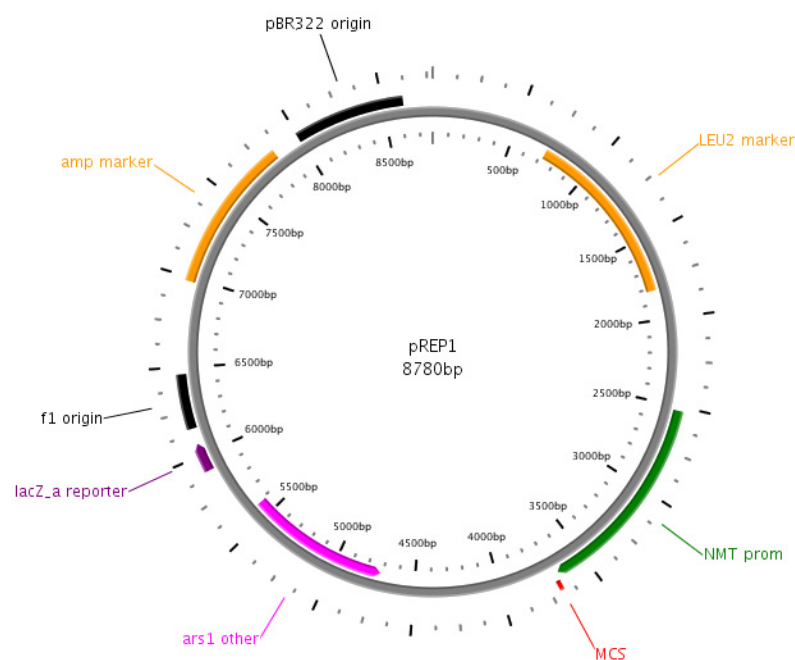
Abb. 24: Klonierungskassette zur Herstellung des Vektors pREP1-BD. Die in pREP1 enthaltene *NdeI*-Schnittstelle wurde durch die Ligation mit dem kompatiblen Überhang des Enzyms *MaeI* zerstört und weitere Schnittstellen wurden eingebracht (• = Stopp-Codon).

Die neue Multiple Cloning Site ermöglichte die Übertragung der *KRE1_{SS}-MMP*-Fusion aus dem *S. cerevisiae*-Vektor pPGK-*KRE1_{SS}-MMP* in den Vektor pREP1-BD. Da dieser über kein internes Stopp-Codon verfügt, wurde dieses ebenfalls aus pPGK-*KRE1_{SS}-MMP* übernommen. Da in den Gelatinase-Genen Schnittstellen für *BglII* (bei MMP-2) bzw. *BamHI* (bei MMP-9) vorhanden sind, erfolgte die Klonierung für MMP-2 über *XhoI/BamHI*, für MMP-9 über *XhoI/BglII*, was in den Expressionsplasmiden pREP1-*KRE1_{SS}-MMPs* resultierte (vgl. Abb. 25 C).

Da zum Zeitpunkt der experimentellen Arbeiten eine Funktionalität der *KRE1*-Signalsequenz in *Schizosaccharomyces pombe* nicht nachgewiesen war, wurden zusätzlich Konstrukte mit der Signalsequenz des Killertoxins K28 hergestellt. Diese wurde von EIDEN-PLACH *et al.*

(2004) für diesen Expressionwirt als funktional beschrieben. Hierzu wurden die ersten 108 bp der Toxinsequenz mittels PCR amplifiziert und am 5'- und 3'-Ende mit *XhoI* bzw. *EcoRI* ergänzt. Nach erfolgreicher Sequenzierung konnte die Signalsequenz *KRE1_{SS}* im Vektor pPGK-MMP über *XhoI/EcoRI*-Verdau durch *K28_{SS}* ersetzt werden. Die im Vektor pPGK-*K28_{SS}*-MMP enthaltene Expressionskassette wurde analog zum bereits für das *KRE1_{SS}* beschriebenen Weg über *XhoI/BamHI* für MMP-2 bzw. über *XhoI/BglII* für MMP-9 in den Vektor pREP1-BD zum finalen Expressionsplasmid pREP1-*K28_{SS}*-MMPs kloniert (vgl. Abb. 25 C).

(A)



(B)

pREP1-BD (MCS):

$\Delta NdeI$	<i>Van91I</i>	<i>XhoI</i>	<i>SalI</i>	<i>NotI</i>	<i>SpeI</i>	<i>BglII</i>	<i>BamHI</i>	<i>SmaI</i>
CATAG	CCAATAACTGG	CTCGAG	GTCGAC	GCGGCCGC	ACTAGT	AGATCT	GGATCC	CCCGGG
	A N N W	L E	V N	A A A	L V	D L	D P	P G

(C)

pREP1-KRE1_{ss}-MMP-2s:

<i>XhoI</i>	<i>KRE1_{ss}</i>	<i>EcoRI</i>	<i>proMMP-2</i>	<i>XbaI</i>	<i>BamHI</i>
CTCGAG	ATGATG...GCTGTG	GAATTC	ATGGCGCC.....TAGGCTGC	TCTAGATAA	GGATCC
L E	M M A V	E F	M A P L G C	S R	• G S

pREP1-KRE1_{ss}-MMP-9s:

<i>XhoI</i>	<i>KRE1_{ss}</i>	<i>EcoRI</i>	<i>proMMP-9</i>	<i>XbaI</i>	<i>BamHI</i>	<i>BglII</i>
CTCGAG	ATGATG...GCTGTG	GAATTC	ATGGCCCC.....CTGAGGAC	TCTAGATAA	GGATCC	CAGATCT
L E	M M A V	E F	M A P P E N	S R	• G S	R S

pREP1-K28_{ss}-MMP-2s:

<i>XhoI</i>	<i>K28_{ss}</i> (108 bp)	<i>EcoRI</i>	<i>proMMP-2</i>	<i>XbaI</i>	<i>BamHI</i>
CTCGAG	ATGGAG...CGGGGT	GAATTC	ATGGCGCC.....TAGGCTGC	TCTAGATAA	GGATCC
L E	M E R G	E F	M A P L G C	S R	• G S

pREP1-K28_{ss}-MMP-9s:

<i>XhoI</i>	<i>K28_{ss}</i> (108 bp)	<i>EcoRI</i>	<i>proMMP-9</i>	<i>XbaI</i>	<i>BamHI</i>	<i>BglII</i>
CTCGAG	ATGGAG...CGGGGT	GAATTC	ATGGCCCC.....CTGAGGAC	TCTAGATAA	GGATCC	CAGATCT
L E	M E R G	E F	M A P P E N	S R	• G S	R S

Abb. 25: Der *Schizosaccharomyces pombe*-Expressionsvektor pREP1 (A) verfügt über einen Thiamin-reprimierbaren *nmt1*-Promotor, Ampicillin-Resistenzgen und *LEU2*-Prototrophie-Marker. **(B)** Der Umbau der MCS resultierte in einer Zerstörung der *NdeI*-Schnittstelle im Vektor pREP1-BD. **(C)** Für die Expression sekretorischer Proteine wurden alternativ die Signalsequenzen *KRE1_{ss}* bzw. *K28_{ss}* verwendet (• = Stopp-Codon).

Zygosaccharomyces bailii

Zygosaccharomyces bailii spielt bislang bei der Expression rekombinanter Proteine noch eine vergleichsweise untergeordnete Rolle. Der episomale Vektor pZ₃ ist das erste Expressionsplasmid, das für diesen Organismus von BRANDUARDI *et al.* (2004) entwickelt wurde. Als Basis diente das kommerziell erhältliche *S. cerevisiae*-Expressionsplasmid pYX022, in welchem der *HIS3*-Prototrophie-Marker entfernt und eine ARS-Centromer-Region und ein Kanamycin-Resistenz-Gen eingesetzt wurden. Die Transkription heterologer Gene wird von dem konstitutiven Promotor der Triosephosphat-Isomerase (TPI) gesteuert und durch dessen korrespondierende Polyadenylierungssequenz ergänzt (vgl. Abb. 27 A). Um eine Klonierung der MMP-Konstrukte in pZ₃ zu ermöglichen, war auch hier eine umfassende Umgestaltung der Multiple Cloning Site notwendig. Insbesondere die unmittelbar am Beginn (5'-Ende) der MCS gelegene *EcoRI*-Schnittstelle sollte im Zuge des Umbaus zerstört werden, um eine spätere Klonierung mit diesem Enzym an anderer Stelle zu ermöglichen. Analog zu den bereits oben beschriebenen Umbauten wurde ein Teilstück des *RAS*-Gens mittels PCR mit flankierenden Schnittstellen versehen und in den Vektor TOPO-ZRASZ kloniert (vgl. Abb. 26). Die Überprüfung der Funktionalität der Schnittstellen erfolgte durch Testrestriktionen; die DNA wurde nicht sequenziert.

<i>MunI</i>	<i>XhoI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>XbaI</i>	<i>RASΔ</i>								
CAATTG	CTCGAG	GAATTC	TCTAGA	CCCCACTATAGAGGA...								
Q L	L E	E F	S R	P H Y R G								

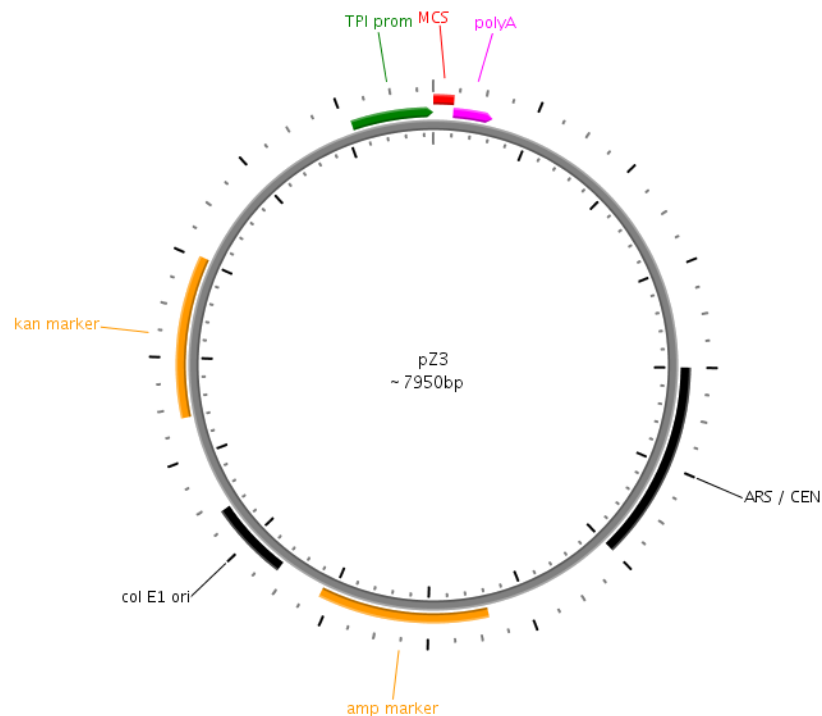
<i>RASΔ</i>	<i>XbaI</i>	<i>BglII</i>	<i>BlnI</i>		<i>BamHI</i>		<i>SacI</i>
...ATGAGCTGCAAGTAA	TCTAGA	AAGATCT	CCTAGG	TAA	GGATCC	TAA	GAGCTC
M S C R	S R	R S	P R	•	G S	•	E L

Abb. 26: Klonierungskassette zur Herstellung des Vektors pZ₃-BD. Die in pZ₃ enthaltene *EcoRI*-Schnittstelle sollte durch die Ligation mit dem kompatiblen Überhang des Enzyms *MunI* zerstört und weitere Schnittstellen eingebracht werden (• = Stopp-Codon).

Das Ziel war ein vollständiger Austausch der MCS von pZ₃. Der Vektor wurde mit den Enzymen *EcoRI* und *SacI*, deren Schnittstellen die beiden Enden der MCS markierten, geschnitten und mit dem *MunI/SacI*-Fragment des TOPO-Vektors ligiert. Die Kompatibilität der überhängenden Enden der *MunI* und *EcoRI*-Verdaus zerstörte dabei die Funktionalität beider Erkennungssequenzen. Downstream der neuen MCS sind die ursprünglichen internen Stopp-Codons noch im Plasmid enthalten. Die eingebauten Schnittstellen für *XbaI*, *BglII* und *BlnI* sind funktional, können aber nicht für Klonierungen verwendet werden, da weitere Schnittstellen im Vektor vorhanden sind (vgl. Abb. 27 B).

Um eine optimale Sekretion der MMPs zu gewährleisten, wurde eine artspezifische Signalsequenz des *Z. bailii*-Toxins Zygocin verwendet (WEILER *et al.*, 2002). Der 63 bp große DNA-Abschnitt wurde aus dem Template pZ₃-Zygocin (LIND, unveröffentlicht) amplifiziert und über entsprechende PCR-Primer durch eine *XhoI*-Schnittstelle am 5'- und *EcoRI* am 3'-Ende komplettiert. Die Klonierung dieses *XhoI/EcoRI*-Fragments aus TOPO-Z_{SS} in den Vektor pZ₃-BD lieferte das Grundplasmid pZ₃-Z_{SS}. Die MMP-Gene wurden aus dem *S. cerevisiae*-Expressionsvektor pPGK-KRE1_{SS}-MMP über *EcoRI/BamHI* (bei MMP-2) bzw. *EcoRI/BglII* (bei MMP-9) zu pZ₃-Z_{SS}-MMPs ligiert. Im Falle von MMP-9 wurde dabei die *BamHI/BglII*-Schnittstelle durch die Fusion kompatibler Enden zerstört, gleichzeitig jedoch unmittelbar davor wiederum eine *BamHI*-Schnittstelle aus dem pPGK-Vektor übertragen (vgl. Abb. 27 C).

(A)



(B)

pZ₃-BD (MCS):

Δ EcoRI	XhoI	EcoRI	XbaI	...	XbaI	BglII	BlnI		BamHI		SacI					
CAATTC	CTCGAG	GAATTC	TCTAGA		TCTAGA	AGATCT	CCTAGG	TAA	GGATCC	TAA	GAGCTC	AGC	TAGC	TAA	CTGA	
Q	F	L	E		E	F	S	R		S	R	R	S	P	R	•

(C)

Z_{SS}-MMP-2s:

XhoI			Z _{SS} (63 bp)			EcoRI			proMMP-2						XbaI			BamHI		
CTCGAG			ATGAAA . . . AGTGCT			GAATTC			ATGGCGCC TAGGCTGC						TCTAGA			TAAGGATCC		
L	E	M	K	S	A	E	F	M	A	P	L	G	C	S	R	•	G	S		

pZ₃-Z_{SS}-MMP-9s:

XhoI	Z _{SS} (63 bp)				EcoRI	<i>proMMP-9</i>				XbaI		BamHI	ΔBglII							
CTCGAG	ATGAAA...AGTGCT				GAATTC	ATGGCCCC.....CTGAGGAC				TCTAGA	TAA	GGATCC	AGATCC							
L	E	M	K	S	A	E	F	M	A	P	P	E	N	S	R	•	G	S	R	S

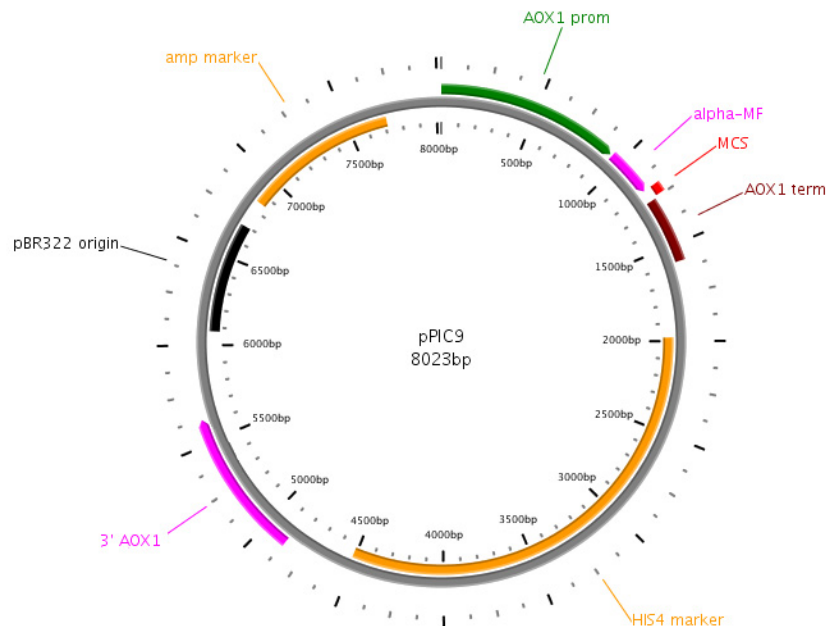
Abb. 27: Der *Zygosaccharomyces bailii*-Expressionsvektor pZ₃ (A) basiert auf dem *S. cerevisiae*-Expressionsplasmid pYX022, in welchem der *HIS3*-Marker entfernt und eine ARS-Centromer-Region und ein Kanamycin-Resistenz-Gen eingesetzt wurden (Größenverhältnisse entsprechen nicht den tatsächlichen Gengrößen). (B) Zur Erstellung des Vektors pZ₃-BD wurde die MCS vollständig ausgetauscht und die ursprüngliche *EcoRI*-Schnittstelle zerstört; die Vektor-eigenen Stopp-Codons bleiben funktional. Die Schnittstellen *XbaI*, *BglII* und *BlnI* finden sich zusätzlich mindestens noch einmal im Vektor und eignen sich daher nicht für Klonierungsarbeiten. (C) Für die Expression sekretorischer Proteine wurde die Signalsequenz des *Z. bailii*-Toxins Zygocin (Z_{SS}) verwendet (• = Stopp-Codon).

Pichia pastoris

Das *Pichia* Expression Kit der Firma INVITROGEN bietet eine Vielzahl an Expressionsvektoren. Aufgrund der Beschaffenheit der Multiple Cloning Site wurde in der vorliegenden Arbeit ausschließlich der Vektor pPIC9 verwendet (vgl. Abb. 28 A). Dieser trägt einen Ampicillin-Marker zur Selektion in *E. coli* und einen *HIS4*-Prototrophie-Marker zur Identifizierung positiver *Pichia*-Klone. Die MCS ermöglicht in frame-Klonierungen zur vorangeschalteten α -MF-Signalsequenz über die Schnittstellen *Xho*I, *Sna*BI, *Eco*RI, *Bln*I und *Not*I. Zwischen *Xho*I und *Sna*BI liegt das Erkennungsmotiv, das für die Abspaltung des Signalpeptids verantwortlich ist (vgl. Abb. 28 B). Die Prozessierung der α -MF-Signalsequenz findet bei der Expression in zwei Stufen statt. In einem ersten Schritt schneidet Kex2p direkt hinter dem Lys-Arg-Motiv, die folgenden Glu-Ala-Repeats erhöhen dabei die Effektivität der Protease. Die Glu-Ala-Glu-Ala-Sequenz selbst wird später von Ste13p entfernt. Die Expression wird durch den Methanol-induzierbaren Promotor von *AOX1* kontrolliert. Bei der Transformation erfolgt die Integration des Plasmids in das Hefegenom über den *HIS4*- oder *AOX1*-Lokus. Durch die Wahl des Restriktionsenzymys kann die Stelle der Linearisierung im Vektor und somit auch der Ort der späteren homologen Rekombination bestimmt werden.

Zur Herstellung der MMP-Expressionsplasmide wurden die Vektoren pFB2-MMP mit *Eco*RI/*Xba*I und pPIC9 mit *Eco*RI/*Bln*I verdaut. Die folgende Ligation zerstörte die *Xba*I/*Bln*I-Schnittstelle und führte zum finalen Expressionsvektor pPIC9-MMPs. Die Termination der Transkription wird durch das Vektor-eigene Stopp-Codon vermittelt. Die resultierenden Proteine verfügen über einen um vier Aminosäuren verlängerten N- und einen um sechs Aminosäuren verlängerten C-Terminus (vgl. Abb. 28 C).

(A)



(B)

pPIC9 (MCS):

<i>Xho</i> I	Signal-Cleavage	<i>Sna</i> BI	<i>Eco</i> RI	<i>B</i> lnI	<i>Not</i> I		
CTCGAG	AAAAGAGAGGCTGAAGCT	TACGTA	GAATTC	CCTAGG	GCGGCCGC	GAAT	TAA
L E	K R E A E A	Y V	E F	P R	A A A	N	•

(C)

pPIC9-MMP-2s:

<i>Xho</i> I	Signal-Cleavage	<i>Sna</i> BI	<i>Eco</i> RI	proMMP-2	Δ <i>B</i> lnI	<i>Not</i> I		
CTCGAG	AAAAGAGAGGCTGAAGCT	TACGTA	GAATTC	ATGGCG...GGCTGC	TCTAGG	GCGGCCGC	GAAT	TAA
L E	K R E A E A	Y V	E F	M A ... G C	S R	A A A	N	•

pPIC9-MMP-9s:

<i>Xho</i> I	Signal-Cleavage	<i>Sna</i> BI	<i>Eco</i> RI	proMMP-9	Δ <i>B</i> lnI	<i>Not</i> I		
CTCGAG	AAAAGAGAGGCTGAAGCT	TACGTA	GAATTC	ATGGCC...GAGGAC	TCTAGG	GCGGCCGC	GAAT	TAA
L E	K R E A E A	Y V	E F	M A ... E N	S R	A A A	N	•

Abb. 28: Der *Pichia pastoris*-Expressionsvektor pPIC9 (A) enthält ein Ampicillin-Resistenz-Gen und einen *HIS4*-Prototrophie-Marker. Die Expression wird durch den Methanol-induzierbaren *AOX1*-Promotor gesteuert; die Signalsequenz des α -MF dirigiert die rekombinanten Proteine in den sekretorischen Weg der Hefe. **(B)** Die MCS enthält das Erkennungsmotiv zur Prozessierung der α -MF-Signalsequenz zwischen *Xho*I und *Sna*BI. **(C)** Die MMP-Gene wurden über *Eco*RI und *Xba*I/*B*lnI einkloniert und verwenden das Vektor-eigene Stopp-Codon (• = Stopp-Codon; vgl. HOFFMANN, 2007).

3.1.2. Transformation und Expression

Escherichia coli

Zur Transformation der Expressionsplasmide pET24-MMP-HIS mittels Elektroporation wurden die Klonierungsarbeiten bereits mit dem *E. coli*-Expressionsstamm BL21 (DE3) durchgeführt. Der entsprechende Ligationsansatz wurde für 40 min gegen 10 % Glycerin dialysiert und danach zu den elektrokompenten Zellen gegeben. Die Elektroporation erfolgte bei 200 Ω , 2,48 kV/cm und 25 μ F. Die Zellen wurden in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und für 60 min bei 37 °C und 220 rpm in einem Reaktionsgefäß inkubiert. Die Selektion erfolgte auf LB_{Kan}-Agarplatten über Nacht bei 37 °C. Anschließend wurden mehrere Klone angeimpft und einem Kontrollverdau unterzogen.

Zur Induktion der Expression wurden Erlenmeyerkolben mit LB_{Kan}-Medium 10 %ig mit frischen Über-Nacht-Kulturen positiv identifizierter Klone beimpft; die Induktion erfolgte durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 0,1 mM. Die Kulturen wurden bei unterschiedlichen Temperaturen (20 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C) unter Schütteln inkubiert, um mögliche temperaturbedingte Variationen in der Expression verfolgen zu können.

Nach 24 h wurden die Zellen einer 50 ml-Kultur durch Zentrifugation (5 min bei 13.000 rpm) geerntet, in 10 ml Binding-Puffer aufgenommen und durch Ultraschall aufgeschlossen. Die nachfolgende Zentrifugation bei 15.000 rpm für 15 min trennte die Zelltrümmer der Pellet-Fraktion vom Rohextrakt, der die löslichen Proteine enthielt. Zur Überprüfung der MMP-Produktion wurden die Komponenten beider Fraktionen (15 μ l) in einem SDS-Gel getrennt und eine Coomassie-Färbung durchgeführt.

Die Proben zeigten bei allen Temperaturen identische Muster. In Abb. 29 sind vergleichend die Expressionsergebnisse für MMP-2 und MMP-9 jeweils bei 30 °C und 37 °C dargestellt. Bei der Pellet-Fraktion von MMP-2 ist eine deutliche Protein-Expression im Bereich von ca. 72 kDa zu erkennen, was der Größe des Volllängen-MMP-2-Proteins entspricht. Das Fehlen einer entsprechenden Bande im Rohextrakt legt die Vermutung nahe, dass das Protein als unlösliche Inclusion Bodies vorliegt. Die MMP-9-Proben zeigten keinerlei Expression im Bereich der erwarteten Größe (92 kDa).

Ergänzende Versuche zur Expression bei unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen und Temperaturen sowie mit N-terminal (um die Prodomäne) verkürzten MMPs führten zu identischen Ergebnissen. Erwartungsgemäß waren die Gelatinasen nicht mittels Zymographie nachweisbar und lagen somit im Falle von MMP-2 nicht als funktionale Enzyme vor (Ergebnisse nicht gezeigt).

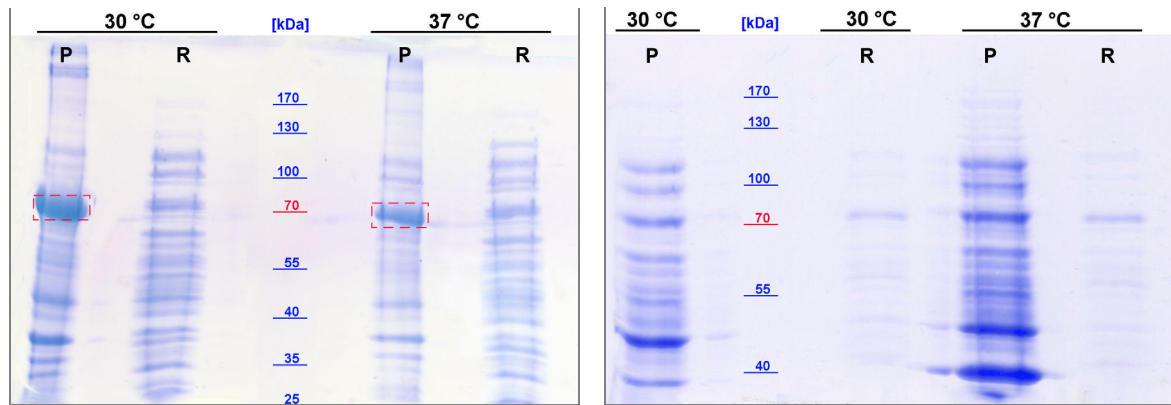


Abb. 29: MMP-Expression in *Escherichia coli* bei 30 °C und 37 °C. Die Zellen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen, die Proteine über SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie angefärbt (P = Pellet, R = Rohextrakt, rote Umrandung = MMP).

Kluyveromyces lactis

Die Untersuchungen bei *K. lactis* beschränkten sich aus Praktikabilitätsgründen zunächst ausschließlich auf MMP-9. Für den Fall einer erfolgreichen Expression waren ergänzende Experimente für MMP-2 geplant (vgl. HOFFMANN, 2007).

Die Transformation in den *K. lactis*-Stamm GG799 erfolgte mittels des Protein Expression Kits von NEW ENGLAND BIOLABS. Da der Vektor pKLAC1 erfahrungsgemäß dazu neigte, die Kopienzahl in *E. coli* mit der Zahl der Überimpfungen zu verringern, wurde das Plasmid frisch in DH5α-Zellen transformiert und die Plasmid-DNA der Über-Nacht-Kultur mittels alkalischer Lyse isoliert. Von dem Isolat wurden 2 µl pKLAC1-MMP-9s mit *SacII* verdaut, um den Vektor im Bereich des *LAC4-PBI*-Promotors zu linearisieren. Der Restriktionsansatz wurde über ein Gelextraktions-Kit gereinigt und zur Transformation eingesetzt. 3,75 µl wurden zu 50 µl kompetenter Zellen gegeben und der Ansatz mit 155 µl Yeast Transformation Reagent versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 30 °C erfolgte für 1 h ein Hitzeschock bei 37 °C. Die Zellen wurden auf YPD geshiftet und für 30 min unter Schütteln inkubiert, bevor sie zur Selektion auf YCB-Agarplatten mit Acetamid ausgebracht wurden. Nach 4 d bei 30 °C konnten die Klone in Flüssigkultur angeimpft werden.

Zur Expression wurden die Zellen in SC-Gal-Medium bei 30 °C für 3 d inkubiert. Nach dem Ernten (15 min bei 8.000 rpm) wurde der Kulturüberstand sterilfiltriert und mittels Ultrafiltration (SARTORIUS Vivaspin 20, 30 kDa) etwa 50fach konzentriert. Nach der Trennung im SDS-Gel wurden die Proteine mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen und immunologisch mittels Anti-MMP-9-Antikörpern (BIOMOL; 1:1.000), die gegen die katalytische Domäne gerichtet waren, colorimetrisch detektiert. Als Negativ-Kontrolle fungierte der Kulturüberstand von GG799 transformiert mit dem pKLAC1-Leervektor.

In keiner der getesteten Proben konnte eine Expression von MMP-9 nachgewiesen werden. Der Blot zeigte außer der Positiv-Kontrolle (Gelatinase 92 kDa, ROCHE) lediglich

unspezifische Bindungen im hochmolekularen Bereich. HOFFMANN (2007) konnte bei weiterführenden Untersuchungen mittels PAS-Färbung eine Glykosylierung der Proteine in diesem Bereich nachweisen. Dies eröffnet die Möglichkeit, dass MMP-9 eventuell in einer stark glykosylierten Form gebildet wurde.

Saccharomyces cerevisiae

Der *S. cerevisiae*-Stamm SEY6120 wurde mittels der Lithium-Acetat-Methode transformiert. Zur Expression der rekombinanten Proteine wurden Erlenmeyerkolben mit Ura-d/o-Medium 1 %ig mit einer frischen Über-Nacht-Vorkultur beimpft und für 3 d bei 30 °C und 220 rpm kultiviert. Das Ernten erfolgte durch Zentrifugation bei 8.000 rpm für 15 min. Die Kulturüberstände wurden durch Filtration von den restlichen Zellen befreit und über Vivaspin Ultrafiltrationseinheiten (SARTORIUS, 30 kDa) konzentriert. Nach Trennung der Proteine in der SDS-PAGE wurde ein Western Blot durchgeführt. Zur Absättigung der Membran wurde diese für 2 h in Blockingpuffer mit 3 % Magermilchpulver bei Raumtemperatur geschwenkt. Die Bindung der Anti-MMP-Antikörper (ABCAM, 1:5.000) erfolgte bei 4 °C über Nacht. Der anschließenden Inkubation in sekundärem HRP-gekoppeltem Anti-Rabbit-IgG-Antikörper (SIGMA; 1:10.000) für 1 h bei 20 °C folgte die Entwicklung der Membran mittels des Chemilumineszenz-Substrats SuperSignal West Dura (PIERCE). Als Negativ-Kontrolle fungierte der Kulturüberstand von SEY6210 mit pFB2-Leervektor; die mitgeführten Positiv-Kontrollen bestanden aus den kommerziell erhältlichen MMP-Isolaten ‚MMP-2 human‘ bzw. ‚MMP-9 human‘ (MILLIPORE).

Außer den Positiv-Kontrollen waren keinerlei MMP-Signale detektierbar. Auch bei verlängerter Belichtungsdauer zeigte sich keine Veränderung. Die gleichen Untersuchungen wurden zusätzlich parallel für die *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme S86c und BY4742 durchgeführt und führten überall zu dem gleichen Ergebnis. *S. cerevisiae* scheint somit nicht in der Lage zu sein, sekretorische Formen von MMP-2 oder MMP-9 zu produzieren. KESSLER (2006) war in der Lage, die Proteine bei der Expression von zellwandverankerten Gelatinase-Formen in Zellfraktionierungs-Untersuchungen nachzuweisen. Die Experimente deuten darauf hin, dass MMP-2 und MMP-9 von *S. cerevisiae* sehr wohl exprimiert, allerdings nicht sezerniert werden können. Darüber hinaus zeigten die Proben bei den korrespondierenden Zymographien eine nur schwache enzymatische Aktivität. *Saccharomyces cerevisiae* erwies sich daher für MMP-2 und MMP-9 als Expressionswirt ungeeignet.

Schizosaccharomyces pombe

Die Expression sekretorischer MMPs in *Schizosaccharomyces pombe* wurde in einer ersten Stufe unter Verwendung des Kre1p-Signalpeptids durchgeführt. Da die Funktionalität dieser Sequenz in *S. pombe* zu diesem Zeitpunkt noch nicht beschrieben war, wurden die Experimente zusätzlich durch eine zweite Versuchsreihe mit K28-Signalsequenz ergänzt.

Die Zellen wurden transformiert und nach 4 Tagen Inkubation bei 30 °C in EMM-Leu-d/o-Flüssigmedium mit 5 mg/l Thiamin überführt. Die Kulturen verblieben über Nacht im Schüttler bei 30 °C. Am nächsten Tag erfolgte das Animpfen der Hauptkultur in einem Erlenmeyerkolben (4 %ig). Nach 24 h Inkubation bei 30 °C und 220 rpm wurde die Kultur für 5 min bei 8.000 rpm zentrifugiert und zweimal mit Thiamin-freiem EMM-Leu-d/o-Medium gewaschen, um letzte Reste des reprimierenden Thiamins zu entfernen. Die Induktion der Expression erfolgte 3 d in EMM-Leu-d/o-Medium bei 30 °C auf einem Inkubationschüttler.

Zur Gewinnung der Kulturüberstände wurden die Ansätze in Zentrifugationsgefäße überführt und bei 8.000 rpm für 15 min pelletiert. Die Überstände wurden wie bereits für andere Wirte beschrieben sterilfiltriert und eingengt. Die Proteine wurden nach der SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran geblottet und mit Anti-MMP-Antikörpern entwickelt. Für die Versuchsreihe mit Kre1p-Signalsequenz wurden Anti-MMP-AK gegen die katalytische Domäne (BIOMOL), bei K28-Signalpeptid gegen die Hinge-Region (SIGMA) verwendet. Die Bindungszeiten richteten sich nach den Angaben des jeweiligen Herstellers.

Unabhängig von der verwendeten Signal-Sequenz zeigten die Western-Blots weder eine Expression von MMP-2 noch von MMP-9. Ausschließlich die verwendeten Positiv-Kontrollen zeigten eine deutliche Bande in der erwarteten Höhe. *Schizosaccharomyces pombe* muss somit ebenfalls als Expressionswirt für die Matrix-Metalloproteasen MMP-2 und MMP-9 ausgeschlossen werden.

Zygosaccharomyces bailii

Für die heterologe Expression in *Zygosaccharomyces bailii* wurden die Stämme ATCC60483 und ATCC36947 verwendet. Die Transformation mit pZ₃-Z_{SS}-MMPs erfolgte mittels Elektroporation.

Die Expression erfolgte in einem Erlenmeyerkolben mit synthetischem *Z. bailii*-Medium, das 4 %ig mit einer frischen Über-Nacht-Kultur beimpft wurde. Nach 3 d bei 30 °C und 220 rpm wurden die Kulturüberstände sterilfiltriert und konzentriert. Die Trennung der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot, der mit Anti-MMP-AK (ABCAM, whole molecule, 1:3.000) mittels Chemilumineszenz entwickelt wurde.

Die Blots aller *Z. bailii*-ATCC36947-Proben erschienen sowohl für MMP-2 als auch für MMP-9 vollständig leer. Lediglich bei ATCC60483 konnten in der konzentrierten MMP-9-

Probe zwei schwache Banden zwischen 60 kDa und 70 kDa ausgemacht werden, bei denen es sich möglicherweise um MMP-9-Abbauprodukte gehandelt haben könnte (vgl. Abb. 30).

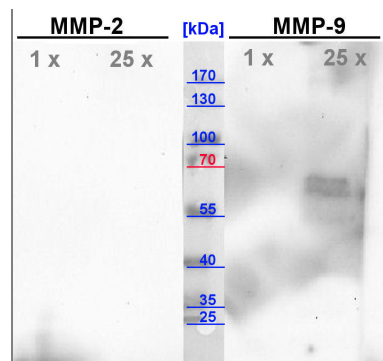


Abb. 30: Western-Blot zum Nachweis einer MMP-Expression in *Z. bailii* ATCC36947. Im konzentrierten Kulturüberstand sind für MMP-9 zwei schwache Banden sichtbar. Die Kulturüberstände vom Stamm ATCC36947 enthielten keine MMPs.

Pichia pastoris

Die Expression in *Pichia pastoris* fand parallel in den Stämmen GS115 und KM71 aus dem *Pichia* Expression Kit (INVITROGEN) statt. Beide Stämme unterscheiden sich vor allem bezüglich ihrer Phänotypen bei der Methanolverwertung. GS115 verfügt über zwei funktionale Alkoholoxigenasen AOX1 und AOX2, die einen Mut⁺-Phänotyp („methanol utilizing plus“) bewirken. Bei KM71 ist, bedingt durch eine *aox1::ARG4*-Disruption, nur noch das schwächere AOX2-Gen aktiv, weshalb sich durch eine verlangsamte Methanol-Verwertung ein Mut^S-Phänotyp („methanol utilizing slow“) ergibt.

Die Transformation mit dem integrativen Vektor pPIC9-MMPs erfolgte mittels Elektroporation. Der Vektor ermöglicht die Integration an unterschiedlichen Orten im Hefe-Genom über drei verschiedene Mechanismen. Eine Vektorlinearisierung mit *Bgl*II führt zu einer Integrationskassette mit flankierenden Fragmenten des AOX1-Promotors (am 5'-Ende) bzw. des AOX1-Gens (am 3'-Ende). Durch das doppelte Crossover-Ereignis bei der Genom-Integration kommt es bei GS115 zu einer Änderung im Phänotyp der Methanolverwertung (Mut⁺ zu Mut^S), da das gesamte AOX1-Gen durch die Expressionkassette ersetzt wird. Wird der Vektor mit *Sac*I im Bereich des AOX1-Promotors geschnitten, kommt es bei der Insertion nur zu einem einfachen Crossover, wodurch der Phänotyp erhalten bleibt. Die experimentellen Versuche der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich über Integrationen des dritten Typs durchgeführt: Linearisierung mit *Stu*I oder *Sal*I schneidet das im Vektor enthaltene *HIS4*-Gen, welches mit einem einfachen Crossover-Ereignis durch homologe Rekombination im *his4*-Lokus des Chromosoms integriert werden kann. Dies führt zu zwei Kopien des Histidinol-Dehydrogenase-Gens, wovon eine weiterhin in einer mutanten, die andere durch Komplementierung des mutierten chromosomalen *his4*-Genabschnitts in der Wild-Typ-Form vorliegt (vgl. Abb. 31). Die Hefe

wird dadurch phänotypisch prototroph für Histidin und kann auf entsprechenden Minimalmedien selektiert werden. Da die Integration keine Veränderung im Bereich des *AOX1*-Gens bedingt, entspricht die Ausprägung des Methanolverwertungs-Phänotyps dem des ursprünglich verwendeten Stammes (Mut^+ für GS115 und Mut^S für KM71).

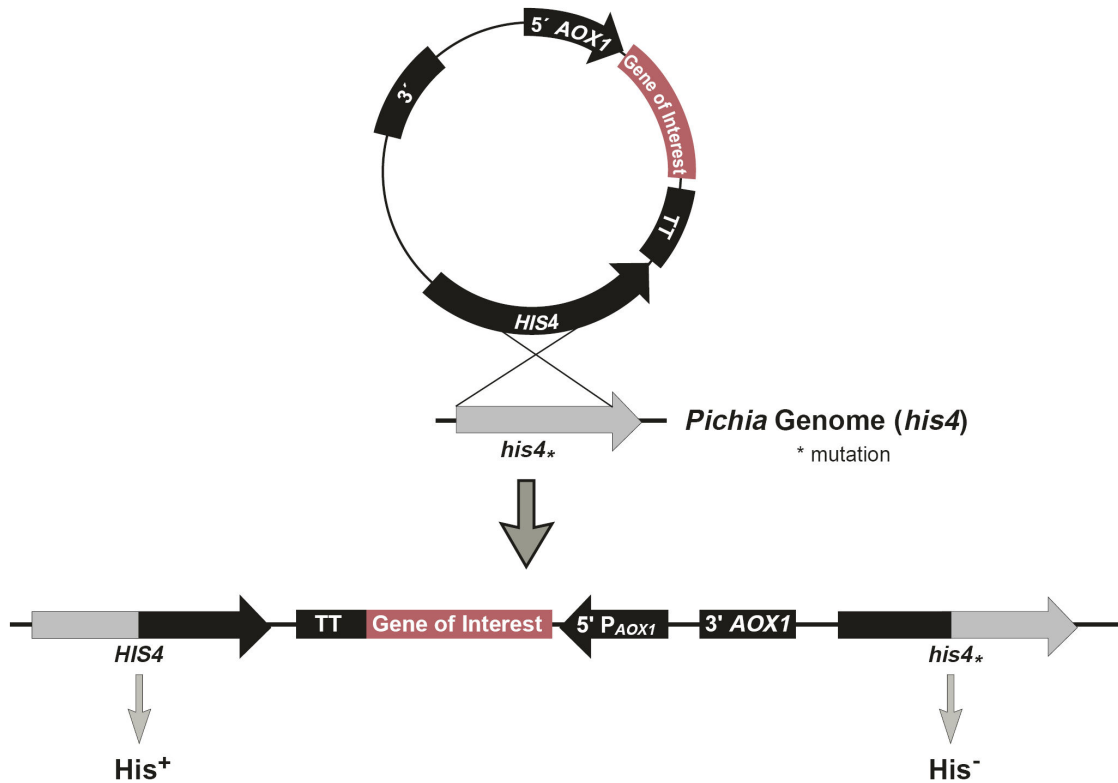


Abb. 31: Plasmid-Integration in das Genom von *Pichia pastoris*. Das im Bereich des *HIS4*-Gens linearisierte Plasmid wird durch ein einfaches Crossover in den *his4*-Lokus auf dem *Pichia*-Chromosom inseriert. Als Resultat ergeben sich zwei Kopien des *HIS4/his4*-Gens, wovon eine weiterhin in einer mutanten, die andere in der wildtypischen Form vorliegt.

Zur Transformation der Expressionsplasmide pPIC9-MMPs wurden diese für 5 h mit *Stul* restringiert und der Ansatz anschließend mittels des innuPREP Gel Extraction Kits (ANALYTIK JENA) gereinigt. Für die Elektroporation wurden jeweils 5 µl des Reisolats eingesetzt.

Zur Expression wurden große Kolonien von der Agarplatte aufgenommen und in 5 ml His-d/o-Flüssigmedium überführt. Nach 24 h Inkubation bei 30 °C und 220 rpm wurden 50 ml BMG (100 mM Na-Phosphatpuffer; pH 7,0) 4 %ig mit der Vorkultur beimpft und 24 h bei 28 °C und 165 rpm kultiviert. Das anschließende Überführen in induzierendes Medium erfolgte durch Zentrifugation der Kultur für 4 min bei 8.000 rpm (bei 4 °C) und anschließendes Resuspendieren der Zellen in BMM (100 mM Na-Phosphatpuffer; pH 7,0). Die Kulturen wurden für 3 d bei 28 °C und 165 rpm geschüttelt und dabei täglich mit 0,5 % Methanol gefüttert. Die Kulturüberstände wurden sterilfiltriert und mittels Vivaspin-

Ultrafiltrationseinheiten (SARTORIUS) konzentriert. Nach der SDS-PAGE wurde ein Western Blot durchgeführt und mit Anti-MMP-Antikörpern (BIOMOL, katalytische Domäne, 1:1.000) colorimetrisch detektiert. Wie in Abb. 32 gezeigt, ergaben sich deutliche Banden auf der erwarteten Höhe der Gelatinasen, die bereits im nicht eingengten Kulturüberstand nachweisbar waren.

Zur Überprüfung der biologischen Aktivität der MMPs wurden korrespondierende Zymographien angefertigt. Bei der Coomassie-Färbung erschien die intakte (nicht hydrolysierte) Gelatine im Gel farbig, wodurch die Bereiche mit gelatinolytischer Aktivität als farblose Areale sichtbar wurden (vgl. Abb. 32). Die Ergebnisse demonstrieren die Fähigkeit von *Pichia pastoris*, MMP-2 und MMP-9 in enzymatisch aktiver Form zu sezernieren, was sie zu einem vielversprechenden Kandidaten zur heterologen Expression von Gelatinasen macht. Generell erschien GS115 als der Stamm mit der besseren Sekretionsleistung (vgl. HOFFMANN, 2007).

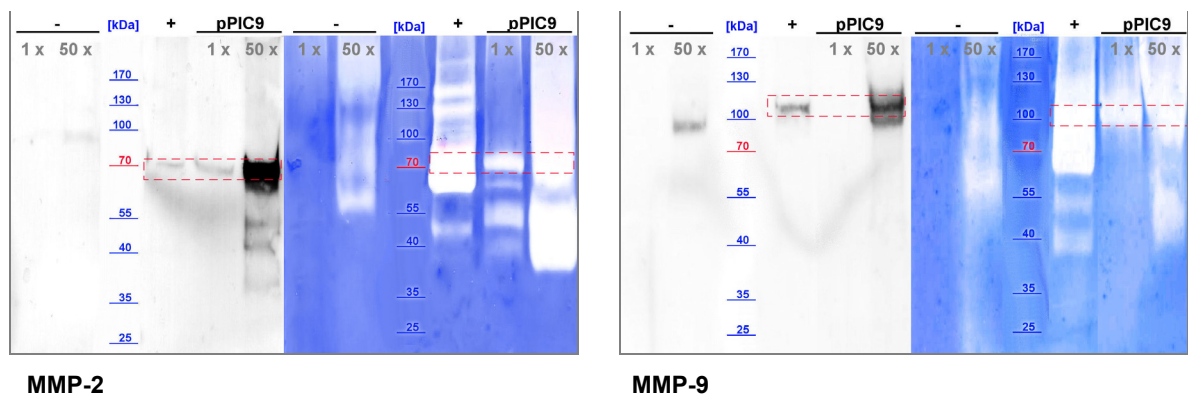


Abb. 32: MMP-Expression in *Pichia pastoris* (GS115). Die Western Blots mit ihren korrespondierenden Zymographien zeigen eine hohe MMP-Produktion in biologisch aktiver Form. Für KM71-Stamm wurden vergleichbare Ergebnisse erhalten (- = Negativ-Kontrolle, + = Positiv-Kontrolle, rote Umrandung = MMP).

Zusammenfassend ergaben sich folgende Rückschlüsse bei der Identifikation des optimalen Expressionswirts für die Matrix-Metalloproteasen MMP-2 und MMP-9:

Die Hefegattungen *Kluyveromyces*, *Saccharomyces* und *Schizosaccharomyces* waren nicht in der Lage, die humanen Gelatinasen heterolog in sezernierter Form zu exprimieren. Ein Stamm von *Zygosaccharomyces* zeigte ein Signal für MMP-9, jedoch in einer zu niedrigen Proteingröße. Sie schieden damit als Expressionswirte bei den weiteren Untersuchungen aus. *Escherichia coli* war in der Lage, MMP-2 zu exprimieren, jedoch nur in einer enzymatisch inaktiven Form. MMP-9 wurde auch von *E. coli* nicht gebildet.

Pichia pastoris war als einziger der getesteten Organismen fähig, MMP-2 und MMP-9 in einer den Anforderungen entsprechenden Qualität als biologisch aktive Enzyme zu

sezernieren. Alle folgenden Untersuchungen stützten sich daher ausschließlich auf das *Pichia pastoris*-Expressionssystem.

3.1.3. Erweiterte Untersuchungen zur *Pichia*-Expression

Mature-Konstrukte

Da MMPs natürlicherweise als Zymogene sezerniert werden, ist in der Regel eine nachträgliche Aktivierung zur Gewinnung der vollständigen Enzymaktivität notwendig. Um diesen Aktivierungsschritt umgehen zu können, wurden die MMPs auf DNA-Ebene um die codierenden Sequenzen der jeweils ersten 80 Aminosäuren verkürzt, um die Rolle der darin codierten Proregion bei der Herstellung der Enzymfunktionalität zu charakterisieren. Die DNA-Abschnitte wurden analog der oben beschriebenen Klonierung der Volllängen-Konstrukte als *EcoRI/XbaI*-Fragmente in den pPIC9-Vektor ligiert (vgl. Abb. 33). Die resultierenden Proteine wurden als MMP-2*mat* und MMP-9*mat* bezeichnet (,mature' = ,reifes' Protein). Die beiden *P. pastoris*-Stämme waren in der Lage, die Enzyme in biologisch aktiver Form zu sezernieren; ihre Aktivität stellte sich in der Zymographie jedoch als um ein Vielfaches geringer als bei den entsprechenden Volllängen-Konstrukten heraus (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse sprachen dafür, dass die Proregion zumindest in begrenztem Maße für die korrekte Faltung einer aktiven Gelatinase notwendig ist. Die spätere Untersuchung zellwandverankerter MMP*mat*s sollten identische Ergebnisse liefern (vgl. 3.3.2, S. 114). Da für die Entwicklung und die Testung von MMP-Hemmstoffen die Produktion einer möglichst authentischen Proteinstruktur gewährleistet sein muss, wurde auf eine Ausweitung dieser Option verzichtet.

pPIC9-MMP-2*mat*-s:

<i>XhoI</i>	Signal-Cleavage	<i>SnaBI</i>	<i>EcoRI</i>	MMP-2 <i>mat</i>	Δ <i>BlnI</i>	<i>NotI</i>		
CTCGAG	AAAAGAGAGGCTGAAGCT	TACGTA	GAATTC	ATGTAC...GGCTGC	TCTAGG	GCGGCCGC	GAAT	TAA
L E	K R E A E A	Y V	E F	M Y ... G C	S R	A A A	N	•

pPIC9-MMP-9*mat*-s:

<i>XhoI</i>	Signal-Cleavage	<i>SnaBI</i>	<i>EcoRI</i>	MMP-9 <i>mat</i>	Δ <i>BlnI</i>	<i>NotI</i>		
CTCGAG	AAAAGAGAGGCTGAAGCT	TACGTA	GAATTC	ATGCAA...GAGGAC	TCTAGG	GCGGCCGC	GAAT	TAA
L E	K R E A E A	Y V	E F	M Q ... E N	S R	A A A	N	•

Abb. 33: MCS der *Pichia pastoris*-Expressionsvektoren pPIC9-MMP*mat* enthalten die 5'-verkürzten MMP-Gene ohne Proregion. Die Fragmente wurden über *EcoRI* und *XbaI*/*BlnI* einkloniert und verwenden das Vektor-eigene Stopp-Codon (• = Stopp-Codon).

Optimierung der Expressionsparameter

Eine generelle Hürde bei der heterologen Expression der Gelatinasen in *P. pastoris* stellte die Reproduzierbarkeit der Untersuchungsergebnisse dar. Die Gelatinase-Expression zeigte abhängig von Medienzusammensetzung und Expressionsbedingungen überaus große Unterschiede, die von reduzierten Proteinmengen über fragmentierte MMPs bis hin zu fast vollständig MMP-freien Kulturüberständen reichten. Zur Entwicklung eines standardisierten Produktions-Verfahrens wurden daher die Medienzusammensetzung bezüglich pH-Pufferung und Zugabe von additiven Substanzen und die Kultivierungsparameter hinsichtlich Sauerstoff-Eintrag, Induktionszeitpunkt und Induktionsdauer in allen Kombinationen getestet. Die zellfreien Kulturüberstände wurden 50fach eingeeengt und die Qualität der Produkte im Western Blot bewertet (Daten nicht gezeigt).

Als wichtigstes Additiv stellten sich Casaminoacids heraus. Hierbei handelt es sich um hydrolysiertes Casein, das den im Kulturmedium vorhandenen Proteasen als zusätzliches Substrat dient und somit den Abbau sezernierter Proteine vermindert. Die Casaminoacids wurden 1 %ig zugesetzt und führten zu einer signifikanten Stabilisierung des Zielproteins, wodurch sie generell für die sekretorische Protein-Expression in *Pichia* als essentiell bezeichnet werden können. Eine weitere Verbesserung konnte durch die Zugabe von Protease-Inhibitor (complete, ROCHE) erreicht werden. Die Zellen wurden nach dem Shiften in BMM mit hohen Mengen an Protease-Inhibitor (1 Tablette pro 25 ml) kultiviert. Das Wachstum wurde nicht beeinflusst, ebenso wenig die spätere Funktionalität der heterologen Enzyme. Die pH-Werte wurden durch Verwendung unterschiedlicher Puffersysteme variiert (pH 4,0 Citratpuffer, pH 6,0 K-Phosphat-Puffer, pH 7,0 K-Phosphatpuffer, pH 7,0 Natriumphosphatpuffer, jeweils 100 mM). Die Vorkulturen in BMG-Medium waren ebenfalls korrespondierend gepuffert. Generell konnte eine Optimierung der MMP-Stabilität mit steigendem pH-Wert verzeichnet werden. Die Expression in Citratpuffer hatte ein fast vollständiges Ausbleiben von MMP-Signalen zur Folge; die optimale Produktion konnte durch Pufferung mit Na-Phosphatpuffer (pH 7,0) erreicht werden. Der Sauerstoff-Eintrag wurde durch die Wahl des Kulturgefäßes (1 l-Schikane- bzw. -Erlenmeyerkolben) variiert. Eine Expression war im Schikanekolben generell nur unter Zugabe von Antischaum-Lösung (BREOX FM 30, 0,05 %) möglich. In Erlenmeyerkolben konnte auf deren Zugabe verzichtet werden. Bedingt durch die höhere Wachstumsrate wurde im Schikanekolben mehr Protein produziert, das (wahrscheinlich durch das ebenfalls vermehrte Auftreten von Proteasen) einem schnelleren Abbau unterlag. Die stabilisierende Wirkung der Casaminoacids im Medium wurde hier besonders deutlich; ohne deren Zugabe wurde MMP-9 fast vollständig fragmentiert. MMP-2 unterlag einem stärkeren Abbau, weshalb sich hierfür eine Kultivierung mit hohem Sauerstoffeintrag als nicht empfehlenswert herausstellte. Zur Ermittlung des optimalen Induktionszeitpunkts wurden die Expressionsstämme vor dem Shiften auf

induktives Medium zu unterschiedlichen Zelldichten ($OD_{600} = 2; 5; 10; 30; 50$) im BMG-Medium kultiviert. Die Stabilität der MMPs nahm mit Höhe der Induktions-OD zu. Optimalerweise erfolgte ein Shiften ab einer $OD_{600} > 30$; höhere ODs erwiesen sich als vorteilhaft. Eine zu niedrige Induktionsdauer (24 h) führte zu geringen Proteinmengen, eine zu hohe zu vermehrtem Auftreten von Abbau-Produkten durch die Aggregation von Proteasen. Eine Induktion von 48 h(-72 h) stellte sich als adäquater Kompromiss heraus.

3.2. Immobilisierung der MMPs

Nachdem *Pichia pastoris* als Wirt für die heterologe Expression von MMP-2 und MMP-9 identifiziert worden war, galt es in einem nächsten Schritt, die Proteine zu immobilisieren. Das Ziel der Verankerung war vor allem eine einfache Reinigung der MMPs und somit ihre Separierung von möglicherweise im Kulturüberstand vorhandenen Proteasen oder sonstigen Faktoren, die das Messergebnis des Aktivitäts-Assays verfälschen könnten.

Ein erster Ansatz beschäftigte sich dabei mit der Expression His-getaggter MMPs, die später über affinitätschromatographische Methoden gereinigt werden sollten. *P. pastoris* war zwar in der Lage, diese Enzymvarianten zu bilden, allerdings konnten diese im Western Blot nur mit Anti-MMP-Antikörpern (ABCAM) nachgewiesen werden. Die Entwicklung der Blots mit Anti-His-Antikörpern (GE HEALTHCARE) zeigte keine korrespondierenden Signale, was auf eine mangelnde Zugänglichkeit oder eine Disruption des C-terminalen Tags hindeutete. Darüber hinaus erwiesen sich die Konstrukte (ausgenommen VL-MMP-9) in der Zymographie als vergleichsweise nur sehr schwach bis gar nicht aktiv (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Kombination dieser Mängel bei für das Versuchsziel wesentlichen Faktoren machte daher die Etablierung alternativer Immobilisierungsstrategien notwendig.

Die Verankerung biologisch aktiver Enzyme auf der Oberfläche von Hefen, dabei vor allem *Saccharomyces cerevisiae*, findet bereits seit Jahren Anwendung (BREINIG *et al.*, 2006; BREINIG & SCHMITT, 2002; SCHREUDER *et al.*, 1993). Für *P. pastoris* existiert bisher nur eine relativ geringe Anzahl an Untersuchungen zur Zellwandverankerung. Insbesondere das Fehlen eines vollständig sequenzierten Genoms verhindert die Verwendung arteigener Mannoproteine als Oberflächenanker, jedoch erwiesen sich einige aus *S. cerevisiae* abgeleitete Gene auch in *Pichia* als funktional (MERGLER *et al.*, 2004; REN *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2007).

Um mögliche Homologien zwischen den Zellwandproteinen der beiden Hefe-Arten *S. cerevisiae* und *P. pastoris* zu identifizieren, wurden auf der Basis des publizierten *S. cerevisiae*-Genoms PCR-Primer für die Zellwand-Gene *CWP2*, *FLO1*, *SED1*, *PIR1* und *AGa1* erstellt und Amplifikationen mit genomischer DNA aus *P. pastoris* als Template durchgeführt. Es war dabei möglich, für jedes potentielle Zellwandgen ein PCR-Produkt zu erhalten, ausgenommen *AGa1* (Ergebnisse nicht gezeigt). Die DNA-Fragmente wurden in den Vektor pSTBlue-1 kloniert und standardmäßig sequenziert. Im Ergebnis zeigte sich eine 99,9 %ige Übereinstimmung der Basensequenzen der Gene aus *P. pastoris* mit denen aus *S. cerevisiae*. Einige wenige Punktmutationen waren dabei höchstwahrscheinlich auf den Vorgang der PCR und nicht auf tatsächliche Unterschiede in den Gensequenzen

zurückzuführen. Aufgrund der Tatsache, dass *Pichia pastoris* offensichtlich über Zellwandproteine verfügt, die mit denjenigen aus *S. cerevisiae* identisch oder stark homolog sind, wurden die nachfolgenden Untersuchungen mit Zellwand-Gensequenzen aus *S. cerevisiae* S86c bzw. BY4742 durchgeführt.

Wie VAN DER VAART *et al.* (1997) für *S. cerevisiae* nachweisen konnten, gibt es zwischen Zellwandproteinen signifikante Unterschiede bezüglich ihrer Eignung bei der Verankerung heterologer Proteine. Bisherige Veröffentlichungen zur Zelloberflächen-Expression in *P. pastoris* beschreiben zwar die generelle Eignung einzelner Zellwandproteine, geben aber keine Auskunft über ihre Verankerungs-Effektivität im gegenseitigen Vergleich. Um eine möglichst effektive Immobilisierung der Matrix-Metalloproteasen zu ermöglichen, wurden daher vergleichende Untersuchungen zur Zellwandverankerung in *Pichia pastoris* durchgeführt (vgl. MÜLLER, 2008).

Analog zu den Experimenten von VAN DER VAART *et al.* (1997) für *S. cerevisiae*, die α -Galaktosidase als Reporterprotein verwendeten, wurden in der vorliegenden Arbeit die einzelnen Zellwandanker auf Genebene mit der bakteriellen Esterase A aus *Burkholderia gladioli* fusioniert. In früheren Experimenten konnte dieses Enzym bereits in biologisch aktiver Form auf der Zelloberfläche von *S. cerevisiae* verankert werden (BREINIG *et al.*, 2006). Seine enzymatische Aktivität kann photometrisch durch die Messung der Umsetzung des farblosen Substrats *p*-Nitrophenylacetat zu gelbem *p*-Nitrophenol ermittelt werden. Die Zunahme der Absorption bei $\lambda = 405$ nm pro Zeiteinheit wurde als Maß für die Bestimmung der Enzymaktivität herangezogen. Im Hinblick auf den angestrebten Vergleich der Effektivität unterschiedlicher Zellwandanker stellte diese Methode ein einfaches und schnell durchzuführendes Test-System dar, das quantitative Rückschlüsse auf die Immobilisierungskapazität der einzelnen Anker mit hoher Genauigkeit bei gleichzeitig niedrigen Kosten ermöglichte.

3.2.1. Herstellung der Expressionsplasmide

Die vergleichenden Untersuchungen zur Zellwandverankerung in *P. pastoris* beinhalteten die *S. cerevisiae*-Zellwandproteine Cwp2p, Pir1p und Sed1p. Cwp2p und Sed1p verfügen über ein intramolekulares GPI-Ankersignal, das nach dem Transport in das ER durch eine Transamidase entfernt und durch einen GPI-Anker ersetzt wird, der primär eine Immobilisierung in der Plasmamembran des Organismus bewirkt (AMTHAUER *et al.*, 1993). Nachfolgend werden die Proteine über noch ungeklärte Wege kovalent in der Zellwand verankert. Pir1p verfügt anstelle eines GPI-Signals über interne Sequenz-Wiederholungen (Pir = „protein with internal repeats“), die nach der Sekretion die Bindung an β -1,3-Glukane

der Zellwand vermitteln (SUMITA *et al.*, 2005). Cwp2p spielt als Haupt-Mannoprotein bei *S. cerevisiae* eine zentrale Rolle bei der Vermittlung der Zellstabilität (VAN DER VAART *et al.*, 1995). Bisher ist noch keine funktionale Anwendung in *P. pastoris* beschrieben worden. Das Gen hat eine Größe von 279 bp und wurde daher 5'-terminal nur um die ersten 63 bp verkürzt, die für die proteineigene ER-Signalsequenz kodieren (vgl. Abb. 34). Pir1p findet sich in der Zellwand vor allem in den Chitin-Ringen der Sprossnarben (SUMITA *et al.*, 2005). Neben seiner intrazellulären Funktion bei der mitochondrialen Translokation von Apn1p, einem DNA-Reparaturprotein, spielt es eine Rolle bei der Vermittlung einer Toleranz gegenüber Hitzeschock (TOH-E *et al.*, 1993; VONGSAMPHANH *et al.*, 2001). WANG *et al.* entwickelten damit 2008 ein neuartiges Zelloberflächen-Expressionssystem, mit dem sie in der Lage waren, eGFP auf der Oberfläche von *P. pastoris* zu verankern. Sie konnten zeigen, dass eine C-terminale Verkürzung des Proteins eine homogenere Verteilung auf der Zelloberfläche bewirkt. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde in der vorliegenden Arbeit das Gen *PIR1* 3'-terminal um 363 bp auf 663 bp verkürzt (Ursprungslänge: 1.026 bp). Am 5'-Ende wurde zusätzlich die für die Signalsequenz kodierende Region entfernt, wodurch sich eine finale Länge von 606 bp ergab (vgl. Abb. 34). Sed1p ist ein Hauptzellwand-Protein in der stationären Wachstums-Phase von Hefezellen und dabei maßgeblich für die Resistenz gegen lytische Enzyme, wie Zymolyase o. ä., verantwortlich (SHIMO *et al.*, 1998). Eine Verwendung als Zellwandanker in *P. pastoris* ist bisher nicht beschrieben worden. Zur praktischen Anwendung bei der Esterase-Verankerung wurde das 1.017 bp große Gen am 5'-Ende um die natürliche ER-Signalsequenz auf 960 bp verkürzt und zur Klonierung eingesetzt (vgl. Abb. 34).

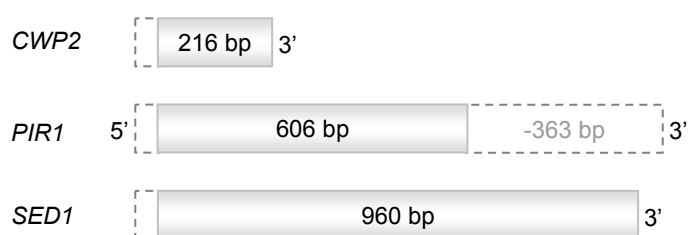


Abb. 34: Verwendete Zellwandanker-Sequenzen. Bei allen Ankern wurde die proteineigene ER-Signalsequenz am 5'-Ende entfernt, um eine intramolekulare Prozessierung durch eine Signalpeptidase zu verhindern. *PIR1* wurde um 363 bp am 3'-Ende verkürzt.

Zur Amplifikation der Ankersequenzen wurde die genomische DNA aus 5 ml einer frischen Über-Nacht-Kultur von *S. cerevisiae* BY4742 bzw. S86c isoliert und 2 µl der DNA-Lösung als Template bei der PCR eingesetzt. Die DNA-Abschnitte erhielten dabei eine *BlnI*-Schnittstelle am 5'- und eine *NotI*-Schnittstelle am 3'-Ende. Anschließend wurden sie in den

Vektor pSTBlue-1 kloniert und sequenziert. Zur Klonierung in das Expressionsplasmid wurden der Vektor pPIC9 und die Plasmid-DNA mutationsfreier Anker-Klone mit *BlnI*/*NotI* restringiert und danach ligiert. Die PCR zur Produktion des Esterase-Gens fand unter Verwendung des Template-Plasmids pFB2-EstA statt. Der 5'-Primer war dabei so gestaltet, dass er eine *XhoI*- und eine *EcoRI*-Schnittstelle getrennt von einer Signal-Cleavage-Region enthielt; 3'-terminal wurde eine *BlnI*-Restriktionsstelle angefügt. Nach Klonierung in pSTBlue-1 und anschließender Sequenzierung wurde das Gen als *XhoI*/*BlnI*-Fragment in die einzelnen Anker-Plasmide ligiert. Durch die Struktur des 5'-Terminus führte dies zu einer Entfernung der ursprünglich in der MCS des Vektors enthaltenen *SnaBI*-Schnittstelle, wodurch die resultierenden Proteine nach finaler Prozessierung eine N-terminale Verlängerung um ausschließlich zwei Aminosäuren (Glu-Phe) vorwiesen. Die Esterase-Expressionsplasmide wurden entsprechend der verwendeten Ankersequenzen als pPIC9-CWP2-EstA, pPIC9-PIR1-EstA und pPIC9-SED1-EstA bezeichnet (vgl. Abb. 35). Sie wurden so gestaltet, dass die Zellwandverankerung beliebiger Genprodukte (wie z. B. MMPs) durch einen einfachen Austausch des Esterase-Gens über die Schnittstellen *EcoRI*/*BlnI* möglich war.

pPIC9-CWP2-EstA

<i>XhoI</i>	<i>Signal-Cleavage</i>	<i>SnaBI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>EST A</i> (1.056 bp)	<i>BlnI</i>	<i>CWP2</i> (216 bp)	<i>NotI</i>
CTCGAG	AAAAGAGAGGCTGAAGCT	TACGTAGAATTC	GTCCAG...ACCAAG	CCTAGG	TCCGCT...TTGTTATAA	GCGGCCGC	
L E	K R E A E A	Y V	E F	V Q ... T L	S R	S A ... L L •	A A A

pPIC9-PIR1-EstA

<i>XhoI</i>	<i>Signal-Cleavage</i>	<i>SnaBI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>EST A</i> (1.056 bp)	<i>BlnI</i>	<i>PIR1</i> (606 bp)	<i>NotI</i>
CTCGAG	AAAAGAGAGGCTGAAGCT	TACGTAGAATTC	GTCCAG...ACCAAG	CCTAGG	TATGCT...ACTTCTTAA	GCGGCCGC	
L E	K R E A E A	Y V	E F	V Q ... T L	S R	Y A ... T S •	A A A

pPIC9-SED1-EstA

<i>XhoI</i>	<i>Signal-Cleavage</i>	<i>SnaBI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>EST A</i> (1.056 bp)	<i>BlnI</i>	<i>SED1</i> (960 bp)	<i>NotI</i>
CTCGAG	AAAAGAGAGGCTGAAGCT	TACGTAGAATTC	GTCCAG...ACCAAG	CCTAGG	TTTTCC...TTCTTATAA	GCGGCCGC	
L E	K R E A E A	Y V	E F	V Q ... T L	S R	F S ... F L •	A A A

Abb. 35: Konstrukte zur Zellwandverankerung von Esterase A im *Pichia pastoris*-Expressionsvektor pPIC9. Die Gene der Zellwandanker wurden am 5'-Ende um die natürliche Signalsequenz verkürzt und schließen mit einem Stopp-Codon ab. Die Plasmide ermöglichen die zellwandverankerte Expression beliebiger Proteine durch den Austausch des Esterase-Gens über die Schnittstellen *EcoRI*/*BlnI* (• = Stopp-Codon).

3.2.2. Expression und Aktivitäts-Messung

3.2.2.1. Esterase-Aktivitäts-Assay

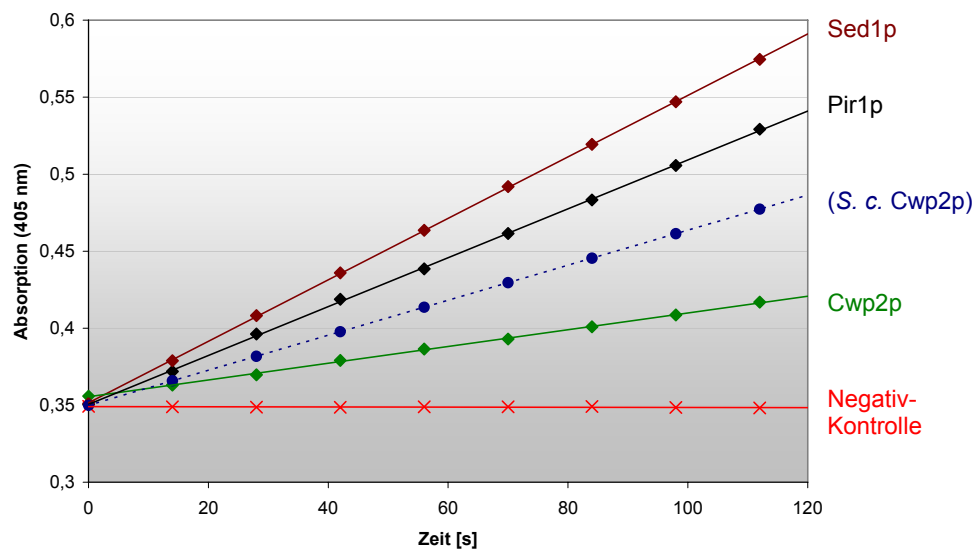
Die Esterase A-Expressionsplasmide wurden mit *Stu*I oder *Sac*II linearisiert, gereinigt und standardmäßig durch Elektroporation in *P. pastoris* transformiert. Zur Expression wurden die Zellen für 24 h in einem Erlenmeyerkolben mit 25 ml BMG und anschließend für 72 h in 25 ml BMM-Medium kultiviert (28 °C, 165 rpm); die Fütterrate betrug dabei 2 x 0,5 % Methanol pro Tag.

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität wurde die OD₆₀₀ der Zellen in einer Küvette auf 0,32 eingestellt und die Suspension mit 4,5 mM *p*-Nitrophenylacetat versetzt. Dieses Substrat wurde durch die auf der Zelloberfläche verankerten Esterasen zu *p*-Nitrophenol umgesetzt. Die Zunahme der Absorption bei $\lambda = 405$ nm konnte spektralphotometrisch bei neutralem pH und 32 °C über einen Zeitraum von 2 min gegen eine zellfreie Referenz bestimmt werden. Als Negativ-Kontrolle diente der jeweilige *Pichia*-Stamm transformiert mit dem Leervektor pPIC9.

Zur Auswertung der Daten wurden die Absorptionen von mindestens drei Messreihen gemittelt und graphisch gegen die Zeit aufgetragen. Die Steigung $\Delta A/\text{min}$ der resultierenden Geraden beschreibt die Substratumsetzung pro Zeiteinheit und wurde als Maß für die Effektivität der Esterase-Verankerung herangezogen. Ein Vergleich der Steigungen der unterschiedlichen Zellwand-Proteine ließ Rückschlüsse auf deren Eignung als *P. pastoris*-Zelloberflächen-Anker zu.

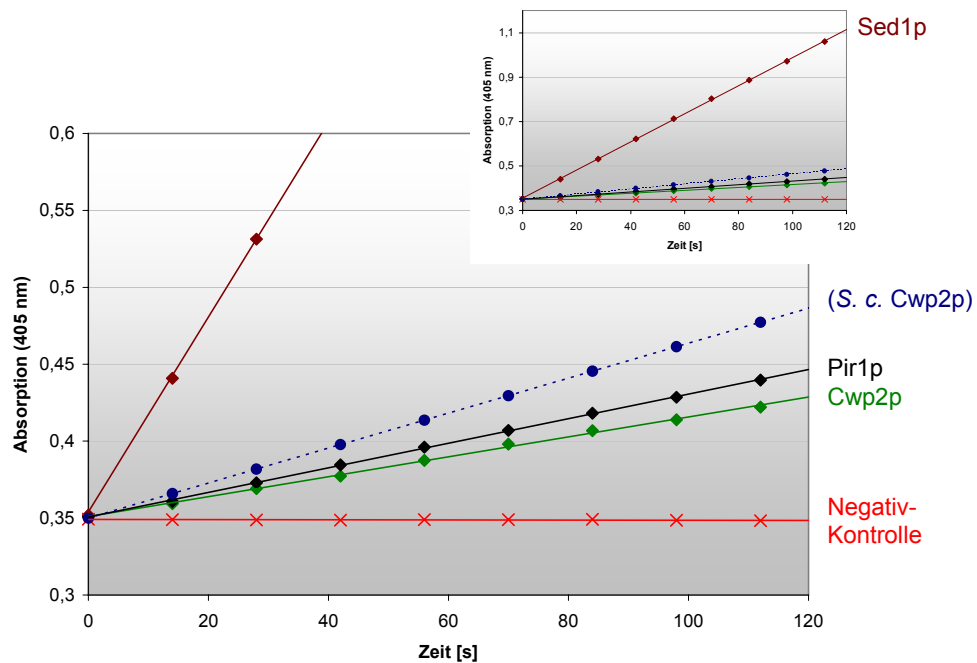
Abb. 36 zeigt die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen getrennt für die beiden Stämme GS115 und KM71. Jede Graphik enthält zusätzlich eine Messreihe früherer Untersuchungen der Esterase A-Aktivität in einem etablierten *S. cerevisiae*-Zellwandanker-System, was eine anschauliche Einordnung der aktuellen Messergebnisse ermöglichen soll. Im *S. cerevisiae*-Stamm BY4742 wurde die Esterase A mittels eines Cwp2p-Ankers auf der Oberfläche immobilisiert und die Messungen unter gleichen Parametern durchgeführt. Es ist zu beachten, dass die *S. cerevisiae*-Zellen im Gegensatz zu den *Pichia*-Proben unter optimierten Bedingungen in einem Bioreaktor kultiviert wurden.

(A)



GS115

(B)



KM71

Abb. 36: Zelloberflächen-Expression von Esterase A in *Pichia pastoris*. Die Bildung von *p*-Nitrophenol aus *p*-Nitrophenylacetat wurde durch Absorptionsmessung bei $\lambda = 405 \text{ nm}$ verfolgt. Die Steigungen der Geraden dienen als Maß für die Bewertung des jeweiligen Zellwandproteins bezüglich seiner Eignung als Anker bei der heterologen Proteinexpression. **(A)** *P. pastoris*-Stamm GS115, **(B)** *P. pastoris*-Stamm KM71; die kleinere Graphik gibt die Werte in veränderter Ordinaten-Skalierung an. Die blaue gestrichelte Linie beschreibt den bei früheren Untersuchungen ermittelten Verlauf für *S. cerevisiae* SEY6210 mit Cwp2p-EstA-Expression.

3.2.2.2. Bestimmung der Esterase-Aktivität

Volumenaktivität

Auf der Basis der Ergebnisse des enzymatischen Aktivitätstests war es möglich, die Volumenaktivitäten der Testkulturen zu bestimmen. Eine ‚Unit (U)‘ wurde definiert als die Menge an Esterase A, die unter den beschriebenen Parametern benötigt wird, um 1 μMol *p*-Nitrophenol pro min freizusetzen. Zur Ermittlung des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ wurde eine *p*-Nitrophenol-Verdünnungsreihe mit Endkonzentrationen von 0,002 mM bis 0,225 mM erstellt und deren Absorptionswerte graphisch gegen die jeweilige Konzentration aufgetragen. Eine Regression der erhaltenen Geraden ergab den molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon = 3,7283$.

Die Berechnung der Volumenaktivität erfolgte nach der Formel:

$$\text{Volumenaktivität} = \frac{\text{Steigung } (\Delta A/\text{min})}{\text{molarer Extinktionskoeffizient } \epsilon} \times \frac{\text{OD}_{\text{Kultur}}}{\text{OD}_{\text{Küvette}}}$$

[U/ml]

Trotz einer ubiquitär vorhandenen enzymatischen Aktivität, traten abhängig von der gewählten Stamm-Anker-Konstellation signifikante Unterschiede im Vergleich der Einzel-Aktivitäten auf. In Abb. 37 sind die Volumenaktivitäten der getesteten Konstrukte dargestellt; zur besseren Vergleichbarkeit wurden alle Volumenaktivitäten für Zellsuspensionen der $\text{OD}_{600} = 10$ bestimmt. Der Cwp2p-Anker zeigte in beiden Stämmen eine vergleichbare Aktivität (GS115: 251 mU/ml; KM71: 302 mU/ml) und stellte sich in Relation zu den übrigen als der ineffektivste heraus. Die Verankerung mit Pir1p lag bei KM71 mit 407 mU/ml etwa im Bereich des Cwp2p-Ankers. Bei GS115 konnte mit Pir1p hingegen eine fast doppelt so hohe Aktivität (805 mU/ml) verzeichnet werden, eine Verdreifachung der Effektivität des Cwp2p-Ankers in diesem Stamm. Die effektivsten Immobilisierungen wurden in beiden Stämmen mit dem Zellwandprotein Sed1p erreicht. Mit 1.599 mU/ml lag die Aktivität im Stamm GS115 zweimal so hoch wie bei Pir1p und sechsmal so hoch wie bei Cwp2p. Eine außerordentlich hohe Esterase-Aktivität konnte bei KM71-Zellen mit Sed1p-Anker erreicht werden. Die bereits in Abb. 36 (B) subjektiv erkennbare Immobilisierungs-Effizienz erreichte eine Volumenaktivität von 3.169 mU/ml und lag somit zweimal höher als der gleiche Anker im GS115-Stamm; im Vergleich zum Cwp2p-Anker konnte die Effektivität um das Zehnfache gesteigert werden. Selbst die unter optimalen Bedingungen kultivierte *S. cerevisiae*-Probe erreichte nur ein Sechstel dieser Aktivitätswerte.

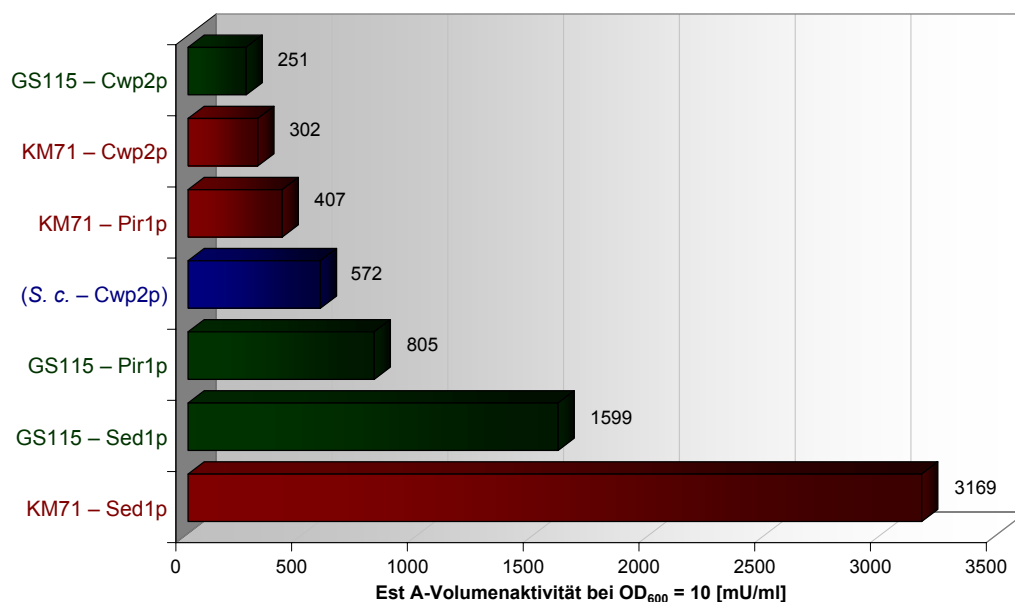


Abb. 37: Vergleich der Esterase A-Aktivitäten in Abhängigkeit der gewählten Stamm-Anker-Kombination. Die Effizienz der Zellwand-Verankerung konnte vom niedrigsten zum höchsten Wert um das Zehnfache gesteigert werden; im Vergleich zum etablierten *S. cerevisiae*-System war eine Erhöhung um das Sechsfache möglich (aufgeführt sind Volumenaktivitäten berechnet für Zellsuspensionen mit der OD₆₀₀ = 10).

Spezifische Aktivität

Der Vergleich der bisherigen Messergebnisse basierte auf der Annahme, dass beide *Pichia*-Stämme bei gleicher OD₆₀₀ über eine vergleichbare Zellzahl und somit Gesamtproteinmenge verfügen. Um auszuschließen, dass die gemessenen Aktivitätsunterschiede auf abweichende Gesamtmengen an Zellprotein zurückgeht und um eine spätere Vergleichbarkeit der Zellankersysteme in z. B. anderen Hefe-Gattungen zu ermöglichen, wurden die Aktivitäten in Relation zur Proteinmenge dargestellt.

Zur Ermittlung der Gesamt-Proteinmenge wurden BMG-Kulturen von GS115 und KM71 mit einer OD₆₀₀ von ca. 50-60 verwendet. Die Zellen wurden mittels Glasperlen aufgeschlossen und der Ansatz danach mit H₂O dest. wieder auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt.

Der Proteingehalt einer 1:1-Verdünnung dieser Lösung wurde mittels BCA Protein Assay Kit (PIERCE) bestimmt. Als Referenzwerte dienten parallel gemessene BSA-Standards (25-1.000 µg/ml), aus denen später eine Regressionsgerade erstellt und die Proteinkonzentrationen der Proben errechnet wurden.

Umgerechnet auf die in der Küvette vorhandene optische Dichte von 0,32 ergaben sich für GS115: 2,18 µg/ml Protein, für KM71: 2,17 µg/ml. Die beinahe identischen Werte lassen demnach einen Vergleich der beiden Stämme auch auf Ebene der Volumenaktivität zu. Die spezifischen Aktivitäten der einzelnen Stamm-Anker-Kombinationen sind in Tab. 9 aufgeführt.

Tab. 9: Spezifische Aktivitäten von Esterase A nach Zellwandverankerung in *P. pastoris* in Abhängigkeit der gewählten Stamm-Anker-Kombination. Die Zahlenwerte der Volumenaktivität beziehen sich auf Versuchsansätze mit $OD_{600} = 10$. Die Spezifische Aktivität gibt die Volumenaktivität in Relation zum Gesamtproteingehalt der enthaltenen Zellen an.

Stamm/Anker	Esterase A	
	Volumenaktivität [mU/ml]	spezifische Aktivität [mU/μg]
GS115		
Cwp2p	251	3,7
Pir1p	805	11,8
Sed1p	1599	23,5
KM71		
Cwp2p	302	4,5
Pir1p	407	6,0
Sed1p	3169	46,8

3.2.2.3. Zellwandverankerung der MMPs

Nachdem Sed1p für Esterase A als geeigneter Zellwandanker in *P. pastoris* identifiziert worden war, wurde dessen Anwendbarkeit bei der Immobilisierung der Matrix-Metalloproteasen untersucht. Hierzu wurden geeignete Expressionsplasmide hergestellt und die Zelloberflächen-Expression der rekombinanten Proteine fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen.

Herstellung der Expressionsplasmide pMMPACE-II und -IX

Die Vektoren zur Expression zellwandverankerter MMPs wurden analog zu denen der Esterase-Expression gestaltet. Hierzu wurde durch Restriktion mit *EcoRI/BlnI* das Esterase A-Gen aus pPIC9-SED1-EstA entfernt und durch das jeweilige MMP-Gen aus dem Vektor TOPO-MMP (*EcoRI/XbaI*) ersetzt. Die Ligation der Fragmente wurde über die kompatiblen überhängenden Enden von *XbaI* und *BlnI* ermöglicht, was zur Zerstörung beider Erkennungssequenzen führte (vgl. Abb. 38). Die resultierenden Proteine besaßen nach vollständiger Prozessierung einen um vier Aminosäuren (Tyr-Val-Glu-Phe) verlängerten N-Terminus an ihrer Prodomäne und waren an ihrem C-Terminus über zwei weitere Aminosäuren (Ser-Arg) mit Sed1p fusioniert. Die MMP-Expressionsplasmide erhielten die Bezeichnungen pMMPACE-II (MMP-2) und pMMPACE-IX (MMP-9).

Die Plasmide wurden mit *Stul* linearisiert und beide *Pichia*-Stämme mittels Elektroporation transformiert.

pMMPACE-II

<i>XhoI</i>	<i>Signal-Cleavage</i>	<i>SnaBI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>proMMP-2</i>	Δ <i>BlnI</i>	<i>SED1</i>	<i>NotI</i>
CTCGAG	AAAAGAGAGGCTGAAGCT	TACGTA	GAATTC	ATGGCG...GGCTGC	TCTAGG	TTT...TTATAA	GCGGCCGC
L E	K R E A E A	Y V	E F	M A ... G C	S R	F ... L •	A A A

pMMPACE-IX

<i>XhoI</i>	<i>Signal-Cleavage</i>	<i>SnaBI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>proMMP-9</i>	Δ <i>BlnI</i>	<i>SED1</i>	<i>NotI</i>
CTCGAG	AAAAGAGAGGCTGAAGCT	TACGTA	GAATTC	ATGGCC...GAGGAC	TCTAGG	TTT...TTATAA	GCGGCCGC
L E	K R E A E A	Y V	E F	M A ... E N	S R	F ... L •	A A A

Abb. 38: Die Expressionsplasmide pMMPACE-II und pMMPACE-IX enthalten die Konstrukte zur Zellwandverankerung von *proMMP-2* und *proMMP-9*. Die *proMMP*-Gene wurden als *EcoRI/XbaI*-Fragmente in den *Pichia pastoris*-Expressionsvektor pPIC9-SED1 eingesetzt. Die *BlnI*-Schnittstelle des Vektors wurde durch Ligation kompatibler Überhänge (*XbaI/BlnI*) zerstört (• = Stopp-Codon).

Indirekte Immunfluoreszenz

Zum fluoreszenzmikroskopischen Nachweis einer erfolgreichen MMP-Verankerung auf der Zelloberfläche von *P. pastoris* wurden die auf His-d/o-Platten selektierten KM71-Klone in His-d/o-Flüssigmedium angeimpft, über Nacht bei 30 °C geschüttelt und von dieser Lösung eine BMG-Kultur im Erlenmeyerkolben 4 %ig beimpft. Nach 24 h bei 28 °C (165 rpm) erfolgte das Shiften auf BMM-Medium (100 mM Na-Phosphatpuffer, pH 7,0). Die Hauptkultur wurde 72 h bei 28 °C und 165 rpm inkubiert und zweimal täglich mit 1 % Methanol gefüttert.

Zur Bindung des primären Anti-MMP-Antikörpers (ABCAM) wurde dieser in einer Verdünnung von ca. 1:25 appliziert. Nach einer Stunde Inkubation bei 20 °C auf einem Drehrad wurde nach mehreren Waschschritten FITC-markierter Anti-Rabbit-IgG-AK (SIGMA) in der Verdünnung 1:15 als sekundärer Antikörper zugegeben und der Ansatz weitere 45 min bei 20 °C im Dunkeln gedreht. Nach weiteren Waschschritten wurde die Fluoreszenz der Hefe-Zellen fluoreszenzmikroskopisch ($\lambda_A = 480$ nm, $\lambda_E > 510$ nm) dokumentiert und die Bilder einem digitalen Schwarzabgleich und einer Unschärfereduktion unterzogen. Als Negativ-Kontrolle dienten die jeweils mit pPIC9-Leervektor transformierten Hefe-Stämme, die sowohl mit Anti-MMP-2- als auch Anti-MMP-9-Antikörpern behandelt und auf die gleiche Weise dokumentiert wurden.

Die Negativ-Kontrollen zeigten weder nach Anti-MMP-2- noch nach Anti-MMP-9-AK-Behandlung eine Fluoreszenz. Bei den MMPACE-Zellen war die Markierung der MMPs in der Zellwand als deutlich fluoreszierender Ring erkennbar. Dabei erschien die Fluoreszenz von KM71 mit pMMPACE-II subjektiv um einiges stärker als die von KM71 mit pMMPACE-IX und trat auch bei mehr Zellen auf. Wiederholungen der Fluoreszenz-Mikroskopie zu späteren Zeitpunkten führten zu identischen Resultaten. Die Ergebnisse veranschaulichen die erfolgreiche Verankerung der humanen Gelatinasen auf der Zelloberfläche von *P. pastoris* (vgl. Abb. 39).

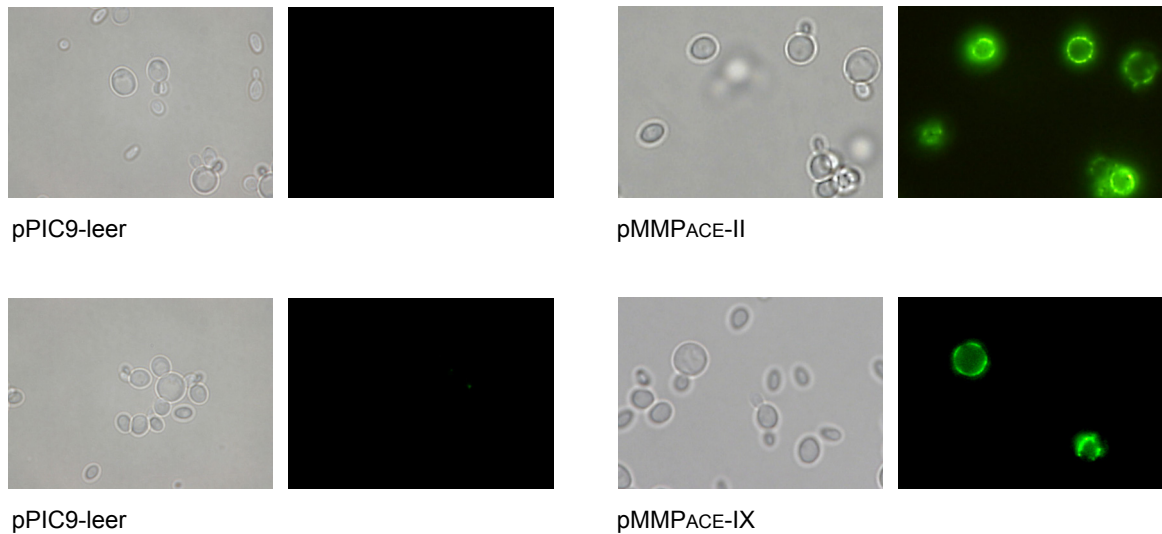


Abb. 39: Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis zellwandverankerter MMPs in *P. pastoris*. Hefezellen des Stamms KM71 mit entsprechendem Expressionsplasmid wurden 72 h unter induzierenden Bedingungen kultiviert. Die MMPs wurden mit Anti-MMP-AK (ABCAM, 1:25) und mit FITC-markierten Anti-Rabbit-IgG-AK (SIGMA, 1:15) gelabelt (Fluoreszenz-Mikroskop: KEYENCE BZ-8000; $\lambda_A = 480 \text{ nm}$; $\lambda_E > 510 \text{ nm}$).

Zusammenfassend konnten im Rahmen der Experimente zur Zellwandverankerung in *P. pastoris* drei Zellwandanker bezüglich ihrer Immobilisierungs-Effektivität untersucht werden. Die Zelloberflächen-Expression einer bakteriellen Esterase ermöglichte eine Quantifizierung und somit einen Vergleich der unterschiedlichen Ankersequenzen. Dabei konnte mit Sed1p ein für *P. pastoris* neuartiger Zellwandanker identifiziert werden, dessen Effizienz die bisher bekannten Ankersysteme um ein Vielfaches übertrifft. Durch die Fusion dieses Zellwandproteins mit dem C-Terminus der humanen Gelatinasen A und B konnten diese auf der Zelloberfläche von *P. pastoris* verankert und mittels indirekter Immunfluoreszenz-Mikroskopie dargestellt werden.

Um festzustellen, ob die Enzyme in einer biologisch aktiven Form vorhanden waren und für die Etablierung des angestrebten Testsystems verwendet werden konnten, bedurfte es nachfolgend eines geeigneten MMP-Aktivitäts-Assays.

3.3. MMP-Aktivitäts-Assay

Nachdem für die MMP-Expression ein geeigneter Wirtsorganismus identifiziert und ein funktionales Zelloberflächen-Expressionssystem etabliert worden waren, war der finale Schritt auf dem Weg zu einem zellbasierten MMP-Bioassay die Auswahl einer geeigneten Methode zur Bestimmung der Gelatinase-Aktivität und nachfolgend deren Anpassung und Optimierung an die Anforderungen eines *in vivo*-Testsystems.

3.3.1. Auswahl

Bei den zur Wahl stehenden kommerziell erhältlichen MMP-Aktivitätstests kamen zwei für die Anwendung in der vorliegenden Untersuchung in Betracht: das MMP-2/MMP-9 Substrat II (CALBIOCHEM) und das EnzCheck® Gelatinase/Collagenase Assay Kit (INVITROGEN).

MMP-2/MMP-9 Substrat II

Das Prinzip des MMP-2/MMP-9 Substrats II beruht auf einer Substratumsetzung und der Detektion eines sekundären Reaktionsprodukts mittels Absorptionsmessung. Als Substrat diente ein künstlich synthetisiertes Thiopeptolid, das nach der Spaltung durch die MMPs mit 4-4'-Dithiodipyridin reagiert und dieses zu 4-Thiopyridon umsetzt. Die Absorption des Produkts wurde bei $\lambda = 324$ nm im Spektralphotometers Ultrospec 2100 pro (AMERSHAM BIOSCIENCES) detektiert. Als MMP-Proben dienten die konzentrierten Überstände der im Rahmen der sekretorischen Optimierung hergestellten rekombinanten Gelatinasen aus GS115. Zur Messung wurden jeweils 40 μ l der Kulturüberstände eingesetzt und die Absorptionzunahme über 60 min verfolgt (vgl. Abb. 40).

Sowohl für MMP-2 als auch für MMP-9 konnten enzymatische Aktivitäten nachgewiesen werden. Die Kurve von MMP-2 zeigte dabei eine signifikant höhere Steigung als die von MMP-9. Wie aus der Graphik ersichtlich, zeigte jedoch auch die Negativ-Kontrolle eine vergleichsweise große Absorptionzunahme. Darüber hinaus war das Substrat in der eingesetzten Konzentration von 0,05 mM bereits nach spätestens 30 min aufgebraucht und die Absorptionskurven der MMP-Proben erreichten eine Sättigung. Das Hauptproblem dieses Testsystems lag jedoch in seiner praktischen Handhabung: Das Substrat wurde in solch geringen Mengen (ca. 0,03 mg pro Küvette) eingesetzt, dass ein genaues Abwiegen nicht möglich war. Die Herstellung einer Stammlösung war aufgrund der Instabilität des Substrats in Lösung ebenfalls nicht möglich. Die theoretisch mit dieser Konzentration mögliche Test-Anzahl von 150 Küvetten konnte nicht einmal annähernd erreicht werden. Darüber hinaus erwiesen sich die finanziellen Kosten von (zum aktuellen Zeitpunkt) 260,- €

für 5 mg bei der Entwicklung eines kostengünstigen MMP-Assays als kontraproduktiv. Im Hinblick auf die angestrebte Anwendung bei einem zellbasierten Testsystem ergaben sich Bedenken, dass die Messung der Absorption durch eine möglicherweise notwendige hohe Zelldichte im Messansatz gestört werden könnte.

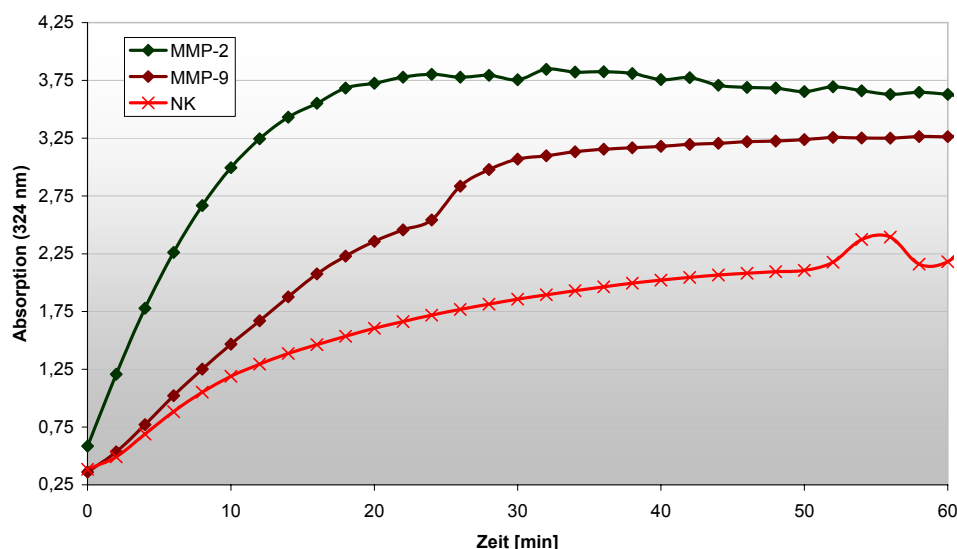


Abb. 40: MMP-Aktivitätsmessung mittels MMP-2/MMP-9 Substrat II (CALBIOCHEM). Das Spaltprodukt eines künstlich synthetisierten Thiopeptolids setzte 4-4'-Dithiodipyridin zu 4-Thiopyridon um, wobei dessen Absorptionszunahme bei $\lambda = 324 \text{ nm}$ gemessen wurde (Substrat: 0,05 mM, 4-4'-Dithiodipyridin: 1 mM; NK = Negativ-Kontrolle).

EnzCheck® Gelatinase/Collagenase Assay

Eine alternative Möglichkeit bot der EnzCheck® Gelatinase/Collagenase Assay. Im Unterschied zum vorherigen System wurde hier die MMP-Aktivität fluorimetrisch bestimmt. Das Substrat besteht aus Fluorescein-markierter Gelatine, deren Fluoreszenz beim Abbau durch im Ansatz vorhandene Gelatinasen induziert wird. Als MMP-Proben wurden wiederum die konzentrierten Überstände der sekretorischen Gelatinasen aus GS115 verwendet. Die Detektion erfolgte bei der höchsten empfohlenen Substratkonzentration (100 $\mu\text{g/ml}$) in einem Microplate Reader (Fluoroskan Ascent CF, LABSYSTEMS; $\lambda_A = 485 \text{ nm}$; $\lambda_E = 527 \text{ nm}$) über einen Zeitraum von 150 min.

Für beide MMPs ergab sich eine linear verlaufende Fluoreszenzzunahme bei vollständig inaktiver Negativ-Kontrolle. Die Steigung bei MMP-2 lag wiederum höher als bei MMP-9. Dieses Testsystem vereinigte neben den eindeutigeren Messergebnissen eine Vielzahl an Vorteilen bei der praktischen Anwendung. Das Substrat konnte in gelöstem Zustand über Wochen im Kühlschrank aufbewahrt werden und ermöglichte so eine einfache Dosierung. Ein großer Vorteil lag vor allem in der Verwendung eines Fluoreszenz-Readers, bei dem kein Licht den Probenansatz durchdringen musste, da sowohl die Einrichtungen zur

Anregung als auch zur Detektion unter der Mikrotiterplatte lokalisiert waren. Somit wäre es möglich gewesen, die Zelldichte innerhalb des Wells fast beliebig zu erhöhen. Die Kosten von 272,- € für 5 mg Substrat werden durch die Tatsache relativiert, dass im Vergleich zu obigem Testsystem mit der gleichen Menge ca. die 20fache Anzahl an Tests durchgeführt werden konnte.

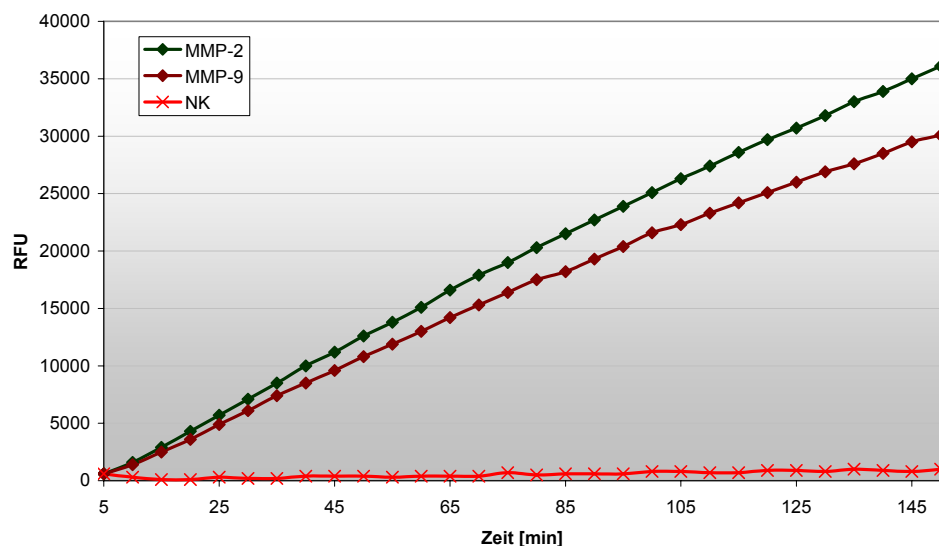


Abb. 41: MMP-Aktivitätsmessung mittels EnzCheck® Gelatinase/Collagenase Assay (INVITROGEN). Die Gelatinasen spalteten die Fluorescein-markierte Gelatine. Die Fluoreszenzzunahme wurde bei $\lambda_A = 485 \text{ nm}$ und $\lambda_E = 527 \text{ nm}$ verfolgt (DQ™ Gelatine: 100 µg/ml; RFU = Relative Fluoreszenz-Einheiten; NK = Negativ-Kontrolle).

Die Analyse der praktischen Anwendung beider Testsysteme führte zu dem Resultat, dass das EnzCheck® Gelatinase/Collagenase Assay für den Einsatz in einem zellbasierten MMP-Aktivitätstest am besten geeignet war. Im Folgenden wurden daher die Optimierung wesentlicher Testparameter und die Anpassung an das angestrebte *in vivo*-Testverfahren für diesen Assay vorgenommen.

3.3.2. Optimierung des MMPACE-Assays

Da das EnzCheck® Gelatinase/Collagenase Assay üblicherweise keine Verwendung im Rahmen eines zellbasierten Systems vorsah, war es notwendig, die optimalen Testparameter bezüglich Zelldichte und Substratkonzentration zu ermitteln, um anschließend auf Zell-Ebene weitere Experimente zur Optimierung der Kultivierung (wie Fütterrate und Induktionsdauer) und der Bedingungen für eine effiziente MMP-Aktivierung durchzuführen. Zu diesem Zweck wurden die Aktivitäten unter Variation der entsprechenden Parameter gemessen. Unerwarteterweise war es möglich, diese Untersuchungen mit

zellwandverankerten Vollängen-MMPs durchzuführen, ohne dass eine vorherige Aktivierung notwendig war. Die MMPs in *P. pastoris* GS115 zeigten bei den Untersuchungen eine deutliche Gelatinase-Aktivität, allerdings konnte diese (analog zu den Ergebnissen mit Esterase A) im Stamm KM71 um ein Vielfaches übertroffen werden (Daten nicht gezeigt). Alle weiteren Experimente wurden daher ausschließlich mit Expressionsstämmen basierend auf dem Stamm KM71 durchgeführt, die entsprechend ihres integrierten Plasmids die Bezeichnungen ‚MMPACE-II‘ und ‚MMPACE-IX‘ erhielten (= *Pichia pastoris*-KM71 mit über Sed1p in der Zellwand verankerten Vollängen-MMPs). Als Negativkontrolle diente immer der Stamm KM71 transformiert mit dem pPIC9-Leervektor. Die MMP-Aktivitätsmessungen wurden über einen Zeitraum von 20 h bei 37 °C durchgeführt und zeigten den in Abb. 42 dargestellten typischen Verlauf. Die Kurve für MMP-2 wies nahezu von Beginn an einen steilen linearen Anstieg auf, der nach einigen Stunden in eine Sättigung überging. Der Verlauf der MMP-9-Kurve gliederte sich in zwei lineare Phasen. Die erste dauerte zwischen 300 min und 400 min und verlief deutlich flacher als die sich anschließende zweite, die wie bei MMP-2 nach einigen Stunden eine Sättigung erreichte.

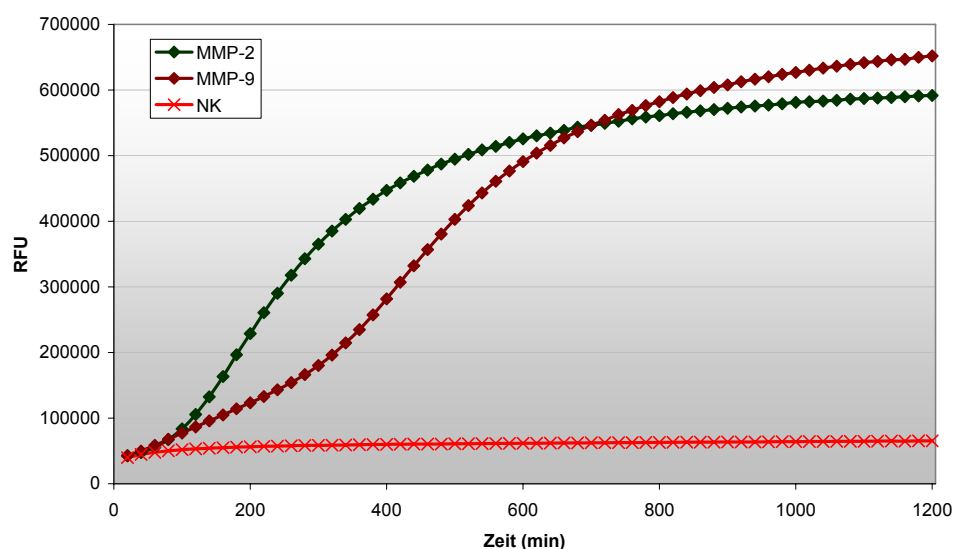


Abb. 42: Typischer Verlauf einer MMPACE-Aktivitätsmessung für MMP-2 und MMP-9. MMP-2 zeigte einen linearen Verlauf, der später in eine Sättigung überging. Die anfängliche Steigung bei MMP-9 verlief flacher und erhöhte sich nach ca. 400 min, um später ebenfalls eine Sättigung zu erreichen (DQ™ Gelatine: 100 µg/ml; RFU = Relative Fluoreszenz-Einheiten; NK = Negativ-Kontrolle).

Die Aktivität der Enzyme definiert sich als Fluoreszenz-Änderung pro Zeiteinheit und entspricht daher der jeweiligen Steigung der Messkurve. Um die unterschiedlichen Kurven-Verläufe objektiv bewerten zu können, wurden jeweils die Steigungen $\Delta\text{RFU}/\text{min}$ im linear verlaufenden Bereich der Messkurven bestimmt und miteinander verglichen. Die Kultivierung der Vorkulturen erfolgte immer nach dem gleichen Prinzip. Der

Expressionsstamm wurde auf einer His-d/o-Agarplatte ausgestrichen und nachdem die Kolonien ausgebildet waren luftdicht verschlossen bei 4 °C gelagert. Von dieser Platte wurden 5 ml His-d/o-Flüssigmedium in einem Reagenzglas beimpft und für 24 h bei 30 °C inkubiert. Von dieser Suspension wurde 1 ml in einen 250 ml-Erlenmeyerkolben mit 25 ml BMG überführt und dieser bei 28 °C für 24 h kultiviert. In der Regel hatten die Kulturen bis zu diesem Zeitpunkt eine $OD_{600} > 50$ erreicht. Die induzierende Phase in BMM variierte in ihrer Dauer und der applizierten Fütterrate. Zur Einstellung der gewünschten Zelldichten wurde die OD_{600} der Kultur bestimmt und so viel davon abzentrifugiert, dass man den gewünschten Wert in einem Volumen von 2 ml erhielt.

Zelldichte

Eine zu hohe Zellzahl im Testansatz würde durch die Trübung zu einer Verminderung der detektierbaren Fluoreszenz führen. Bei zu wenigen Zellen wirkt die begrenzte Menge an aktiven Matrix-Metalloproteasen als limitierender Faktor. Um einen Kompromiss bezüglich dieser beiden Faktoren zu finden, wurde in einem ersten Schritt die optimale Zelldichte für die MMP-Messung ermittelt. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe mit unterschiedlichen optischen Dichten von 0,3 bis 5 eingestellt und die Gelatinase-Aktivität gemessen. Abb. 43 gibt die Steigungen der entsprechenden Messkurven wieder. MMP-2 zeigte eine konstant hohe Aktivität mit maximalen Werten bei den optischen Dichten 1,25 (781 RFU/min) und 2,5 (763 RFU/min). Das Maximum der MMP-9-Aktivität ergab sich bei einer OD_{600} von 2,5 (413 RFU/min). Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden alle folgenden Untersuchungen bei einer OD_{600} von 2,5 durchgeführt.

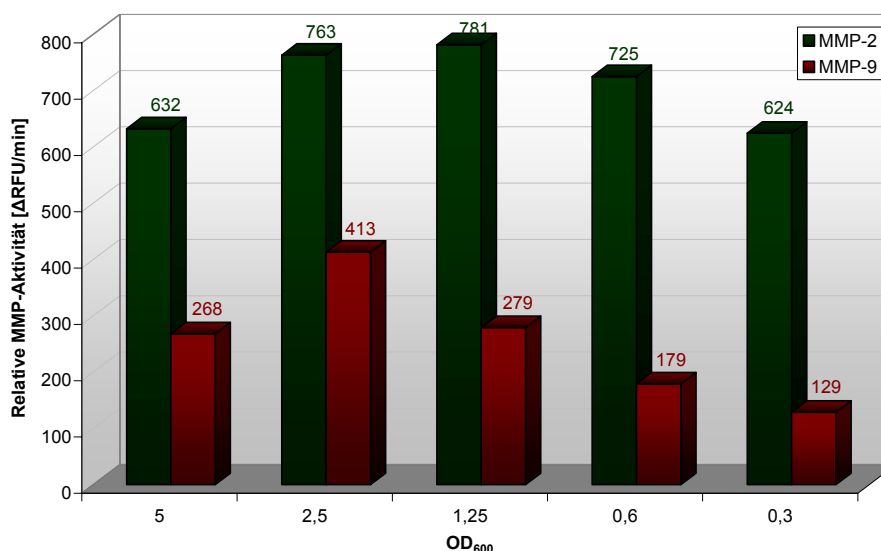


Abb. 43: Ermittlung der optimalen Zelldichte im MMP-Messansatz. Die MMP-Aktivitäten bei unterschiedlichen Zellzahlen wurden gemessen und die Steigungen der linearen Bereiche der resultierenden Messkurven aufgetragen (DQ™ Gelatine: 50 µg/ml; Fütterrate: 0,5 % MeOH/d; Induktionsdauer: 48 h; RFU = Relative Fluoreszenz-Einheiten).

Substratkonzentration

Bei der Entwicklung des angestrebten MMP-Inhibitor-Testsystems war die Reduktion der finanziellen Kosten ein zentrales Anliegen. Da hier der Hauptkostenanteil durch Arbeitsmaterial (Mikrotiterplatten) und MMP-Substrat entstand, sollte die DQ™ Gelatine-Konzentration ermittelt werden, bei der noch eine ausreichend hohe Gelatinase-Aktivität messbar war. Laut Herstellerangaben waren Aktivitäts-Messungen bei Substratkonzentrationen von 12,5 µg/ml bis 100 µg/ml möglich. Ausgehend von der maximalen Konzentration (100 µg/ml) wurde eine Verdünnungsreihe bis 6,25 µg/ml erstellt und die Aktivitäten für beide MMPs bestimmt. Die messbare Aktivität verringerte sich innerhalb dieses Konzentrationsgefälles bei MMP-2 auf ca. 17 %, bei MMP-9 auf ca. 10 % des Maximalwertes. Im Hinblick auf die Testung und den angestrebten quantitativen Vergleich von MMP-Inhibitoren erschien eine Verwendung von 25 µg/ml DQ™ Gelatine sinnvoll. Alle folgenden Untersuchungen erfolgten in dieser Substrat-Konzentration.

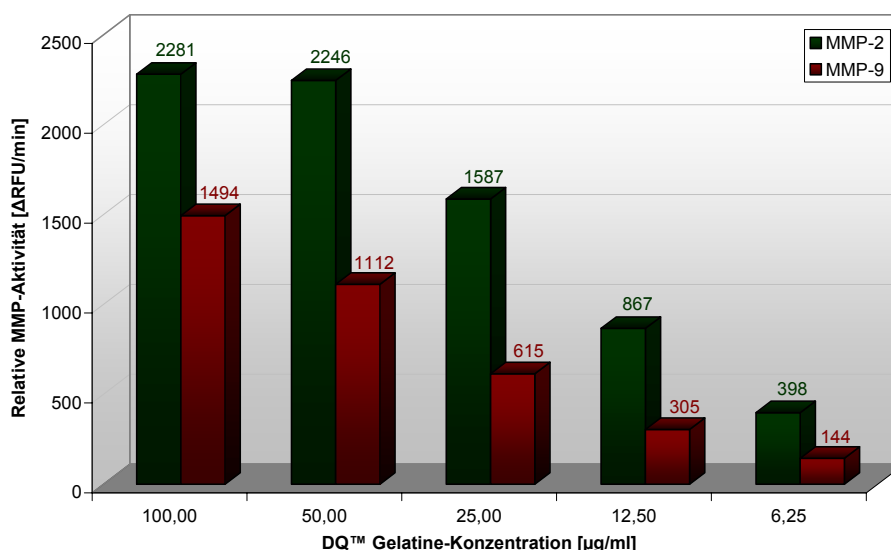


Abb. 44: Ermittlung der optimalen MMP-Substratkonzentration. Die MMP-Aktivitäten wurden bei unterschiedlicher Substratkonzentration gemessen und die Steigungen der linearen Bereiche der resultierenden Messkurven aufgetragen (Fütterrate: 2 x 1 % MeOH/d; Induktionsdauer: 96 h; OD₆₀₀: 2,5; RFU = Relative Fluoreszenz-Einheiten).

Fütterrate

Da *P. pastoris* das täglich zugefütterte Methanol sowohl als Kohlenstoffquelle als auch als Expressionsinduktor verwendet, sollte die maximal tolerierbare Fütterrate ermittelt werden, um eine optimale MMP-Expression zu erhalten. Eine zentrale Fragestellung war dabei, ob durch die Erhöhung der Methanol-Konzentration eine Steigerung der verankerten MMP-Menge möglich ist oder ob diese vorher von anderen Faktoren begrenzt wird. Wie in Abb.

45 dargestellt, resultierte eine Steigerung der täglichen Methanol-Zugabe von 2 x 0,5 % auf 2 x 1 % in einer signifikanten Erhöhung der gelatinolytischen Aktivität. Eine Fütterrate von 2 x 2 % Methanol täglich bewegte sich bereits an der Toleranzgrenze des KM71-Stamms und hatte ein Abfallen der Aktivitätswerte, bei MMP-9 sogar unterhalb derer bei 2 x 0,5 %, zur Folge. Unter den gegebenen Kulturbedingungen konnte die optimale Fütterrate somit auf 2 x 1 % Methanol pro Tag festgelegt werden.

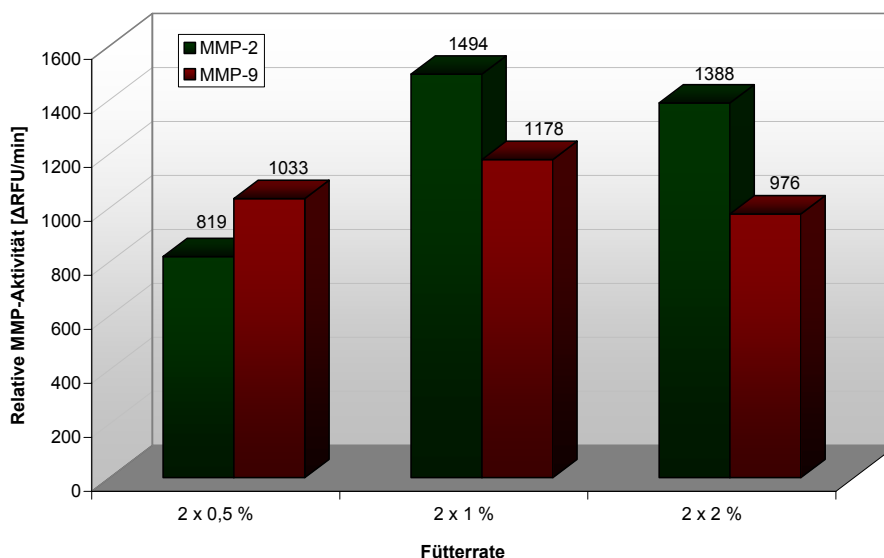


Abb. 45: Ermittlung der zur MMP-Expression optimalen Methanol-Fütterrate. Die MMP_{ACE}-Stämme wurden bei unterschiedlichen Methanol-Fütterraten kultiviert, die MMP-Aktivitäten nach 72 h Induktion gemessen und die Steigungen der linearen Bereiche der resultierenden Messkurven aufgetragen (DQ™ Gelatine: 25 µg/ml; Induktionsdauer: 72 h; OD₆₀₀: 2,5; RFU = Relative Fluoreszenz-Einheiten).

Induktionsdauer

Der letzte Optimierungsschritt auf Zellebene adressierte die Dauer der Induktionszeit der MMP_{ACE}-Stämme. Im Laufe der vorangegangenen Untersuchungen konnte beobachtet werden, dass Aktivitätsmessungen zu beliebigen Zeitpunkten > 48 h nach Induktionsbeginn möglich waren. Im Bestreben, eine möglichst hohe MMP-Aktivität pro Zelle zu erreichen, wurde ergänzend untersucht, ob eine längere Induktionsdauer eine größere Anzahl an zellwandverankerten MMPs hervorbringt oder ob z. B. die Aufnahmekapazität der Zelloberfläche ab einem frühen Zeitpunkt limitierend wirkt. Die in Abb. 46 aufgeführten Daten geben die Aktivitätsmessungen beider Stämme nach unterschiedlich langen Methanol-Phasen wieder. Für beide MMPs war eine signifikante Aktivitätszunahme mit steigender Induktionsdauer zu verzeichnen. Das Maß der Steigerung selbst nahm von Tag zu Tag ab und hätte nach 6 d voraussichtlich nur noch minimale Auswirkungen gehabt. Der größte Zuwachs war im Zeitraum zwischen 48 h und 72 h zu verzeichnen. Eine

Induktionsdauer von 72 h stellt somit einen optimalen Kompromiss zwischen schneller Verfügbarkeit der Zellen und möglichst hoher MMP-Aktivität pro Zelle dar.

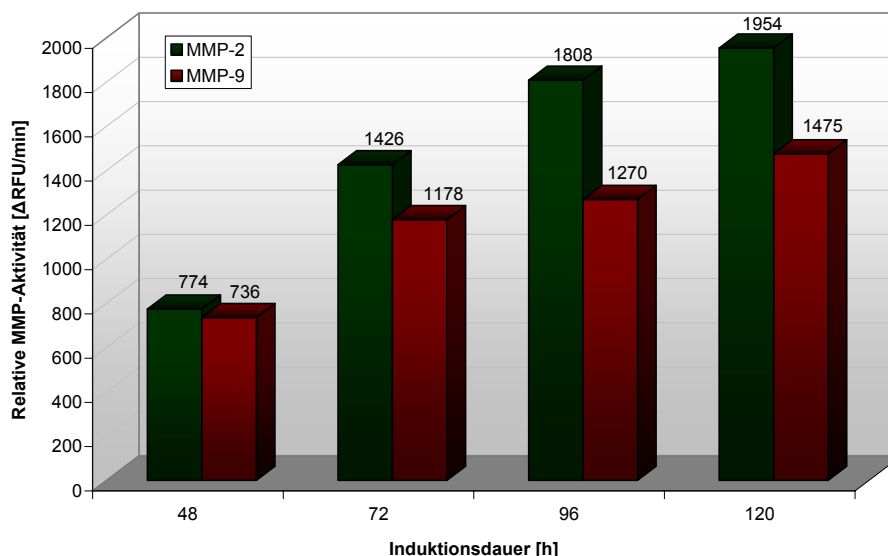


Abb. 46: Einfluss der Induktionsdauer auf die relative MMP-Aktivität. Die MMP_{ACE}-Stämme wurden in BMM bei einer Fütterrate von 2 x 1 % MeOH/d kultiviert, die MMP-Aktivitäten täglich gemessen und die Steigungen der linearen Bereiche der resultierenden Messkurven aufgetragen (DQTM Gelatine: 25 µg/ml; Fütterrate: 2 x 1 % MeOH/d; OD₆₀₀: 2,5; RFU = Relative Fluoreszenz-Einheiten).

Aktivierung

Unabhängig davon, dass die Vollängen-Konstrukte in der Lage waren, das Substrat ohne eine vorangegangene Aktivierung umzusetzen, wurden Untersuchungen zur weiteren Erhöhung der Aktivität durch Optimierungen in diesem Bereich durchgeführt. Ein erster Ansatz adressierte eine Optimierung auf DNA-Ebene, indem die codierenden Sequenzen der ersten 80 Aminosäuren der MMPs, also der inaktivierenden Proregion, deletiert wurden. Diese ‚Mature‘-Konstrukte MMP-2_{mat} und MMP-9_{mat} wurden als *EcoRI/XbaI*-Fragmente in den mit *EcoRI/BlnI* restringierten Vektor ligiert, was in den *proMMPs* analogen Expressionvektoren resultierte (vgl. Abb. 47 A). Die Plasmide wurden in *P. pastoris* KM71 transformiert und die Expression parallel mit den zum Vergleich mitgeführten VL-Konstrukten für mehrere Tage induziert. Der anschließend durchgeführte Aktivitätstest zeigte für beide Konstrukte eine gelatinolytische Aktivität, jedoch nur in einer stark verminderten Ausprägung, die noch unterhalb der Aktivitäten im GS115-Stamm mit immobilisierten latenten MMPs lag (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise ist dieses Phänomen auf die Notwendigkeit der Proregion für die korrekte Faltung des Proteins oder dessen Stabilisierung zurückzuführen. Eine Verbesserung der MMP-Aktivität konnte über diesen experimentellen Ansatz zumindest nicht erreicht werden.

Die alternativ durchgeführte nachträgliche Gelatinase-Aktivierung auf Proteinebene basierte auf der Anwendung von 4-Aminophenylmercuriumacetat (APMA). Die Organo-Quecksilber-Verbindung wird standardmäßig zur Überführung latenter MMPs in ihre aktive Form verwendet. Die Anwesenheit des Moleküls führt zu einer autoproteolytischen Abspaltung der Proregion als Folge einer Destabilisierung des *pro*MMPs. Zur Aktivierung der oberflächenverankerten Gelatinasen wurden die MMPACE-Zellen mit 2,5 mM APMA in einem entsprechenden Puffer (TTC) suspendiert und für 1 h bei 37 °C geschüttelt. Als Kontrolle wurden parallel Proben in TTC-Puffer ohne APMA mitgeführt. Abb. 47 B zeigt die anschließend ermittelten MMP-Aktivitätskurven. Die Behandlung mit APMA führte sowohl bei MMP-2 als auch bei MMP-9 zu einem vollständigen Verlust der MMP-Aktivität. Möglicherweise bewirkte die durch APMA hervorgerufene Konformationsänderung eine Ablösung der MMPs von der Zellwand oder die Zellwand selbst wurde in Mitleidenschaft gezogen, was bei den nachfolgenden Waschschritten zur Entfernung der MMPs aus der Probelösung führte. Eine Optimierung der MMP-Aktivität konnte mittels dieser *in vitro* bewährten Aktivierungsmethode nicht erreicht werden.

Interessanterweise zeigte sich jedoch bei den mit reinem TTC-Puffer behandelten Proben ein positiver Effekt. Die MMP-2-Aktivität steigerte sich im Vergleich zu der von unbehandelten Zellen um 80 %. Bei MMP-9 wurde der sonst typische Kurvenverlauf mit einer anfänglich flachen linearen Phase verändert, so dass ein mit MMP-2 vergleichbarer Verlauf mit einer einzigen, konstant ansteigenden linearen Phase entstand; die Aktivität steigerte sich um 150 %. Demnach war eine Inkubation in TTC-Puffer für eine optimale Aktivierung der MMPACE-Proben ausreichend, wodurch die Verwendung quecksilberhaltiger Substanzen umgangen werden konnte bzw. musste.

(A)

pPIC9-SED1-MMP-2mat

<i>Xho</i> I	Signal-Cleavage	<i>Sna</i> BI	<i>Eco</i> RI	MMP-2mat	Δ <i>Bln</i> I	SED1	<i>Not</i> I
CTCGAG	AAAAGAGAGGCTGAAGCT	TACGTA	GAATTC	ATGTAC...GGCTGC	TCTAGG	TTT...TTATAA	GCGGCCGC
L E	K R E A E A	Y V	E F	M Y ... G C	S R	F ... L •	A A A

pPIC9-SED1-MMP-9mat

<i>Xho</i> I	Signal-Cleavage	<i>Sna</i> BI	<i>Eco</i> RI	MMP-9mat	Δ <i>Bln</i> I	SED1	<i>Not</i> I
CTCGAG	AAAAGAGAGGCTGAAGCT	TACGTA	GAATTC	ATGCAA...GAGGAC	TCTAGG	TTT...TTATAA	GCGGCCGC
L E	K R E A E A	Y V	E F	M Q ... E N	S R	F ... L •	A A A

(B)

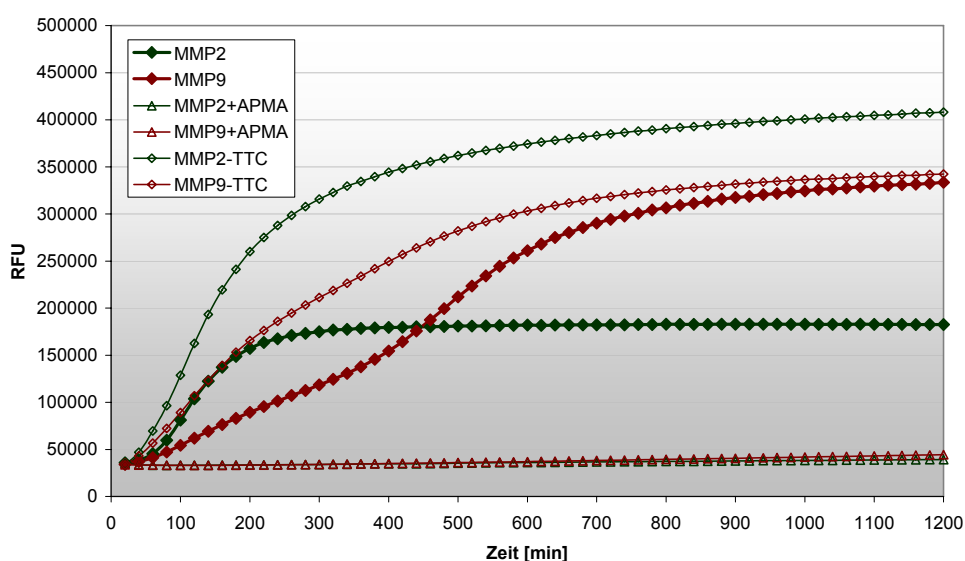


Abb. 47: Optimierung der MMP-Aktivierungsbedingungen. (A) Mature-Konstrukte – Die *MMPmat*-Gene wurden als *Eco*RI/*Xba*I-Fragmente in den *Pichia pastoris*-Expressionsvektor pPIC9-SED1 eingesetzt. Die *Bln*I-Schnittstelle des Vektors wurde durch Ligation kompatibler Überhänge (*Xba*I/*Bln*I) zerstört. **(B) Aktivierung der proMMPs** durch APMA führte zu einem vollständigen Verlust der MMP-Aktivität, die alleinige Einwirkung des TTC-Puffers führte zu einer Aktivierung der MMPs (DQ™ Gelatine: 25 µg/ml; Fütterrate: 2 x 1 % MeOH/d; Induktionsdauer: 72 h; OD₆₀₀: 2,5; RFU = Relative Fluoreszenz-Einheiten; • = Stopp-Codon).

Lagerung

Im Hinblick auf die spätere praktische Anwendung des Bioassays erschien es vorteilhaft, Möglichkeiten für eine schnelle Bereitstellung aktiver MMP-beladener Zellen zu finden. Da bereits gezeigt worden war, dass während der Produktion eine optimale Methanolphase mindestens 72 h in Anspruch nimmt, bedeutete dies inklusive Vor- und BMG-Kultur eine minimale Anzuchtzeit von 5 d. Eine schnellere Bereitstellung konnte demnach nur durch eine Lagerung der bereits mit MMPs bestückten Zellen realisiert werden. Hierzu wurden zwei unterschiedliche Konservierungsmethoden getestet.

Beim ersten Ansatz wurden die Zellen als Glycerinkultur bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Zur Vorbereitung wurden die Zellen 96 h induziert, gewaschen und mit einer $\text{OD}_{600} = 5$ in 1 x Reaction Buffer mit 50 % Glycerin für zwei Wochen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Das System ermöglichte durch das Einfrieren im Reaktionspuffer eine sofortige Verwendung der Probe. Nach dem Auftauen wurden die Testansätze direkt mit Substratlösung komplettiert und zur Messung eingesetzt. Die Wells enthielten also entsprechend 25 % Glycerin. In Abb. 48 sind die gemessenen Daten als leere Kreise dargestellt. Der Vergleich mit den direkt am Tag des Einfrierens gemessenen Referenzdaten (gefüllte Rauten) zeigt bei MMP-2 keinen Verlust der messbaren Aktivität. Bei MMP-9 entspricht die Steigung des Graphen der ersten linearen Phase des Referenzwertes, eine zweite, steilere lineare Phase unterbleibt.

Bei der zweiten Methode erfolgte die Konservierung der Proben durch Gefriertrocknen. Die gleichen Zellen, die bereits oben Verwendung fanden, wurden mit sterilem H_2O dest. gewaschen und in 2 ml eine OD_{600} von 5 eingestellt. Die pelletierten Zellen wurden mittels Vacuum Concentrator (BACHOFER) lyophilisiert und zwei Wochen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Zur Messung wurden sie in 2 ml 1 x Reaction Buffer rekonstituiert und mit Substratlösung ergänzt. Die Messdaten sind in Abb. 48 als leere Dreiecke sichtbar. Bei MMP-2 kam es zu einer etwas geringeren Sättigungshöhe, allerdings ergaben sich bei der für die Aktivitätsbestimmung relevanten Steigung des linearen Kurvenabschnitts nur geringfügige Differenzen zum Referenzwert. Bei MMP-9 zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Steigung im Vergleich zur ersten linearen Phase der Referenz, die bis zum Erreichen der Sättigung konstant blieb.

Grundsätzlich waren beide Methoden für die Konservierung der MMPACE-Stämme empfehlenswert, dennoch brachte die Gefriertrocknung entscheidende Vorteile mit sich. Neben der unkomplizierteren Lagerung und Transportmöglichkeit sowie der Abwesenheit von Glycerin im Messansatz war es vor allem der positive Effekt auf die Aktivität von MMP-9, der dem System einen Vorsprung einräumte, da sich somit eine gesonderte Aktivierung der Gelatinasen (s. o.) gänzlich umgehen ließ.

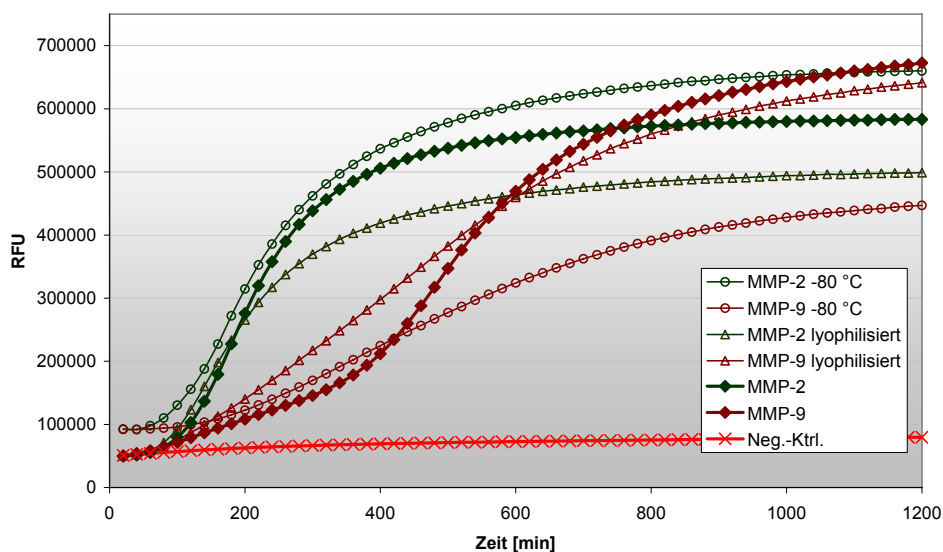


Abb. 48: Einfluss der Lagerung auf die MMPase-Aktivität. Die Kryokulturen wurden in 1 x Reaction Buffer mit 50 % Glycerin für 2 Wochen bei -80 °C eingefroren und direkt zur Messung eingesetzt (Messansatz enthielt als 25 % Glycerin). Die salzfreien Lyophilisate wurden 2 Wochen bei -20 °C gelagert und vor der Messung in 1 x Reaction Buffer resuspendiert (DQ™ Gelatine: 25 µg/ml; Fütterrate: 2 x 1 % MeOH/d; Induktionsdauer: 96 h; OD₆₀₀: 2,5; RFU = Relative Fluoreszenz-Einheiten).

3.3.3. Quantitative Bestimmung der MMP-Gehalte

Die Immobilisierung der MMPs auf der Zelloberfläche erschwerte eine direkte Bestimmung des Proteingehalts und der relativen MMP-Aktivität. Daher erfolgte die Quantifizierung indirekt über einen Vergleich mit den Messdaten bekannter MMP-Konzentration bzw. -Aktivität.

Human active MMPs

Als Standards für die Bestimmung der vorhandenen MMP-Konzentration dienten in Säugerzellen rekombinant hergestellte Gelatinasen, die zuvor mit APMA aktiviert und gereinigt worden waren („human active MMP-2 bzw. -9“, CALBIOCHEM). Zur Erstellung von Eichgeraden wurden die gelatinolytischen Aktivitäten in Verdünnungsstufen von 400 ng/ml bis 12,5 ng/ml bestimmt (vgl. Abb. 49, leere Rauten) und die Steigungen der linearen Kurvenabschnitte graphisch gegen die Konzentration aufgetragen. Um den möglichen Einfluss der Zellen auf das Messergebnis zu berücksichtigen, wurden die Verdünnungsstufen in 1 x Reaction Buffer mit einer KM71-Negativ-Kontrolle (OD₆₀₀ = 2,5; pPIC9-Leervektor) erstellt. Aus den mathematischen Funktionen der Regressionsgeraden ließ sich anschließend die jeweilige MMP-Konzentration in den mitgeführten MMPase-Proben (gefüllte Rauten) berechnen. Obwohl die Aktivitäten der kommerziell erworbenen „active MMP-2“-Proben bei gleichen Konzentrationen etwa um den Faktor 6,7 höher lagen als bei „active MMP-9“, wurden bei der Quantifizierung der MMPase-Stämme nahezu

identische Ergebnisse erhalten. Bei der im Messansatz eingestellten OD_{600} von 2,5 konnte für MMP-2 eine Konzentration von 147 ng/ml, bei MMP-9 von 142 ng/ml errechnet werden. Umgerechnet auf die Zellzahl des ursprünglichen Kulturmediums ($OD_{600} \approx 80$) liegt die Masse der aktiven MMPs für beide Stämme bei über 4,5 mg/l_{Kulturmedium}. Die getesteten Proben waren 72 h induziert und vorher nicht aktiviert worden.

Basierend auf diesen Daten, wurde am Beispiel von MMP-2 die Anzahl der auf der Zelloberfläche verankerten Enzyme errechnet. Ausgehend von einem Molekulargewicht von 66.000 g/mol ergab sich für 1 ml einer Suspension der $OD_{600} = 1$ (mit einer Masse von $147 \text{ ng} / 2,5 = 58,8 \text{ ng} = 5,88 \times 10^{-8} \text{ g}$) eine Molekülzahl von $8,9 \times 10^{-13} \text{ Mol} = 5,4 \times 10^{11}$. Bei einer angenommenen Zahl von 10^7 Zellen pro ml bei $OD_{600} = 1$ ergibt sich somit ein Wert von $5,4 \times 10^4$ MMP-Molekülen pro Zelle.

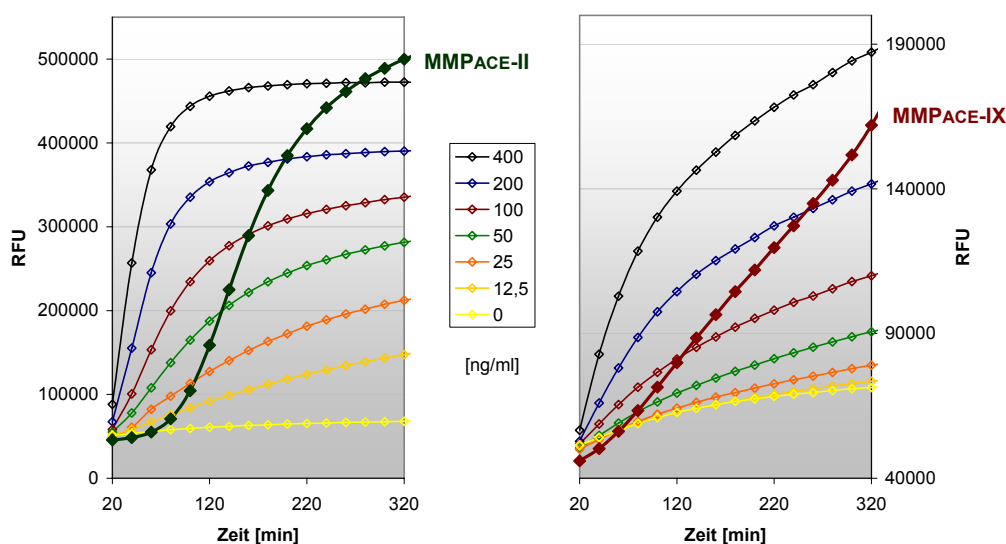


Abb. 49: Quantitative Bestimmung des MMP-Gehalts mittels ‚human active MMPs‘ (CALBIOCHEM). Die gelatinolytischen Aktivitäten von MMP-Proben mit bekannter Konzentration wurden bestimmt und als Standard zur Quantifizierung der MMPACE-Proben heran gezogen. Die mathematische Funktion der resultierenden Regressionsgeraden diente der Berechnung der MMP-Masse in den Kulturen der Expressionsstämme (DQ™ Gelatine: 50 µg/ml; Fütterrate: 2 x 1 % MeOH/d; Induktionsdauer: 72 h; OD_{600} : 2,5; RFU = Relative Fluoreszenz-Einheiten).

Typ IV-Collagenase

Um eine quantitative Aussage bezüglich der MMP-Enzymaktivität treffen zu können, wurde analog zu obigen Konzentrationsbestimmungen eine Eichgerade mit einem Enzym bekannter Aktivität erstellt. Als solches diente die Typ IV-Kollagenase aus *Clostridium histolyticum*, die als Positiv-Kontrolle im EnzCheck® Gelatinase/Collagenase Assay Kit enthalten war. Eine Unit ist definiert als die Menge Enzym, die für die Freisetzung von 1 µMol L-Leucin-Äquivalenten aus Kollagen in 5 h bei 37 °C und pH 7,5 benötigt wird. Die Verdünnungsstufen von 0,25 U/ml bis 0,013 U/ml wurden in 1 x Reaction Buffer mit einer

KM71-Negativ-Kontrolle ($OD_{600} = 2,5$; pPIC9-Leervektor) hergestellt. Die Steigungswerte der linearen Abschnitte der Messkurven (vgl. Abb. 50) wurden gegen die jeweilige Unitkonzentration aufgetragen und eine Regressionsgerade erstellt. Die Berechnung der Enzymaktivitäten für die MMPACE-Proben ergaben für den jeweiligen Messansatz $2,3 \times 10^{-2}$ U/ml für MMP-2 sowie $1,4 \times 10^{-2}$ U/ml für MMP-9. Auf Grundlage der Unit : Masse-Relation der Kollagenase von $2,86 \times 10^{-4}$ U/ng ergibt sich für MMP-2 eine Aktivität, die bei ca. 55 %, für MMP-9 bei ca. 34 % der Aktivität der Kollagenase liegt ($= [2,86 \times 10^{-4} \times \text{Masse}_{\text{MMP}}] / \text{Units}_{\text{MMP}}$)

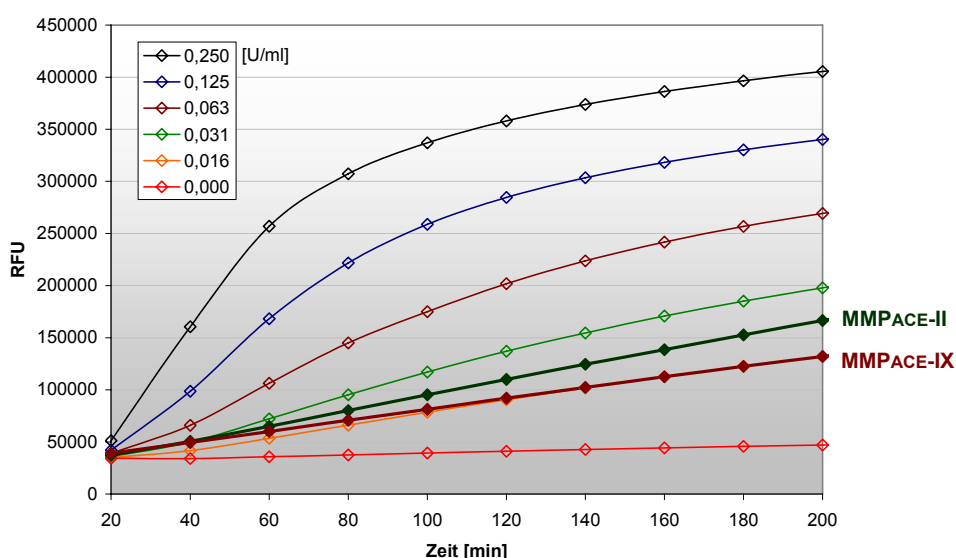


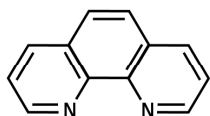
Abb. 50: Quantitative Bestimmung der relativen MMPACE-Aktivität mittels Typ IV-Kollagenase (INVITROGEN). Die gelatinolytischen Aktivitäten einer Kollagenase-Verdünnungsreihe wurden bestimmt und als Standard zur Quantifizierung der MMPACE-Proben heran gezogen. Die mathematische Funktion der resultierenden Regressionsgeraden diente der Berechnung der relativen MMP-Aktivität in den Kulturen der Expressionsstämme (DQ™ Gelatine: 50 µg/ml; Fütterrate: 2 x 1 % MeOH/d; Induktionsdauer: 72 h; OD_{600} : 2,5; RFU = Relative Fluoreszenz-Einheiten)

3.4. Validierung des Inhibitor-Testsystems

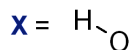
Da die praktische Anwendung des Bioassays die qualitative Testung und den quantitativen Vergleich von Hemmstoffen gegen Matrix-Metalloproteasen zum Ziel hatte, wurde abschließend die Funktionalität des Testsystems anhand eines kommerziell erhältlichen MMP-Inhibitors verifiziert. Als allgemeiner MMP-Hemmstoff diente der Metallchelator 1,10-Phenanthrolin (vgl. Abb. 51 A). Der Inhibitor wurde in einer Konzentrationsreihe von 1 mM bis 0,063 mM mit MMPACE-Zellen versetzt und die Rest-Aktivitäten gemessen. Die Steigungen der linearen Phasen der Messkurven wurden anschließend graphisch gegen die 1,10-Phenanthrolin-Konzentration aufgetragen (vgl. Abb. 51 B). Die Graphik bestätigte für beide MMPs einen kausalen Zusammenhang zwischen der Steigerung der Hemmstoff-Konzentration und der Verminderung der gelatinolytischen Aktivität im Messansatz. MMP-2 zeigte bei einer Konzentration von ca. 0,06 mM Phenanthrolin eine Restaktivität von 50 %; bei Konzentrationen > 0,25 mM wurden die Gelatinasen fast vollständig gehemmt. Durch die an sich niedrigere Grundaktivität von MMP-9 erfolgte dessen vollständige Hemmung bereits ab Inhibitor-Konzentrationen > 0,1 mM. Die Funktionalität des Testsystems konnte somit erfolgreich validiert werden und erlaubt die praktische Anwendung in der Inhibitor-Forschung. Im Rahmen einer fächerübergreifenden Kooperation mit dem Lehrstuhl für Organische Chemie der Universität des Saarlandes (Prof. Dr. U. KAZMEIER) wurden erste Experimente zur praktischen Verwendung des Testsystems durchgeführt. Die Entwicklung neuartiger Hemmstoffe befand sich zum aktuellen Zeitpunkt noch in einem Zwischenstadium, weshalb nur zwei Intermediate auf ihre Wirksamkeit getestet werden konnten. Die Darstellung der Carboxylat- bzw. Hydroxamat-Inhibitoren MP 137 und MP 146 (vgl. Abb. 51 A) basierte auf der Strukturoptimierung eines funktionalen Gelatinase-Inhibitors. Der MMPACE-Assay konnte einen qualitativen Nachweis der Wirksamkeit der Inhibitoren erbringen. Durch den unpolaren Charakter und die somit sehr schwache Löslichkeit der Verbindungen war jedoch keine Quantifizierung der Inhibitor-Wirkung möglich (Daten nicht gezeigt).

(A)

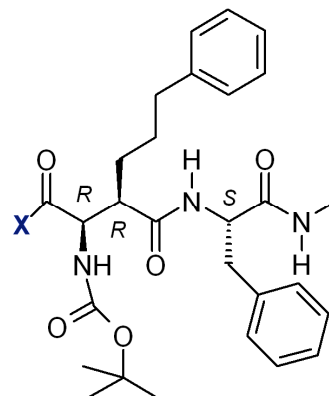
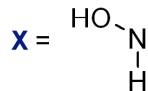
1,10-Phenanthrolin:



MP 137:



MP 146:



(B)

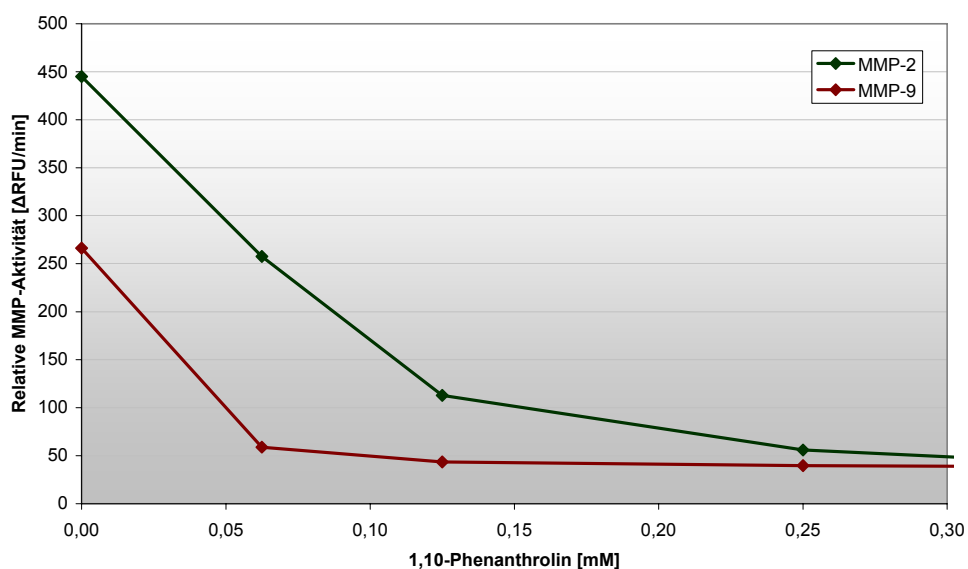


Abb. 51: Validierung des Inhibitor-Testsystems. (A) Als Modell-Hemmstoff diente der Metallchelator und allgemeine MMP-Inhibitor 1,10-Phenanthrolin; bei MP 137 und MP 146 handelt es sich um intermediäre Synthesisierungs-Stadien sich in Entwicklung befindlicher Inhibitoren (B) Konzentration-Wirkung-Diagramm von 1,10-Phenanthrolin für MMPACE-II und MMPACE-IX (DQ™ Gelatine: 25 µg/ml; Fütterrate: 2 x 1 % MeOH/d; Induktionsdauer: 96 h; OD₆₀₀: 2,5; RFU = Relative Fluoreszenz-Einheiten).

4. Diskussion und Ausblick

Matrix-Metalloproteasen sind zinkabhängige Endopeptidasen, die ihre natürlichen Aufgaben bei regulatorischen Mechanismen innerhalb der Extrazellulären Matrix wahrnehmen. Ihr Substratspektrum reicht dabei von nominell allen strukturellen Bestandteilen, wie Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsionsmolekülen, über bioaktive Signalmoleküle bis hin zu Wachstumsfaktoren. Aufgrund ihrer zentralen Rolle bei der Regulation essentieller Vorgänge innerhalb eines Gewebes unterliegen sie strengen Kontrollen auf Ebenen der Transkription, Translation und Aktivierung. In der Regel werden sie von den Gewebezellen als inaktive Zymogene sezerniert und nachträglich durch Abspaltung ihrer Prodomäne aktiviert (STERNLICHT & WERB, 2001).

Störungen im Zusammenspiel zwischen Matrix-Metalloproteasen und ihren kontrollierenden Elementen gehen mit der Ausbildung und Förderung ernstzunehmender Krankheitsbilder einher. Fehlregulationen in der MMP-Expression spielen eine zentrale Rolle z. B. bei Arthritis, Diabetes mellitus und insbesondere bei Tumorwachstum und Metastasierung zahlreicher Krebsformen (ITO *et al.*, 2002; KADOGLU *et al.*, 2005). Die in der vorliegenden Arbeit behandelten Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 sind hierbei überdurchschnittlich häufig vertreten (MASSON *et al.*, 2005; RAUVALA *et al.*, 2006; TURPEENNIEMI-HUJANEN, 2005; ZHENG *et al.*, 2006). Da MMPs in gesunden Organismen kaum aktiv sind, wurde spezifischen Inhibitoren großes Potential bei der Entwicklung cancerostatischer Medikamente zugesprochen. Bei einer ersten Generation von Hemmstoffen verhinderten vor allem deren mangelnde Selektivität und die damit verbundenen negativen Auswirkungen auf den Organismus eine Zulassung zur therapeutischen Anwendung. Bis heute existiert kein auf Proteinebene wirkender MMP-Hemmstoff, der nicht spätestens in Phase 3 der klinischen Testung verworfen wurde (CORBITT *et al.*, 2007; TU *et al.*, 2008). Insbesondere die zwischen den MMPs stark konservierten Strukturen in den Inhibitor-Binderegionen und die finanziell aufwändige Bereitstellung geeigneter Testproteine (durch Isolierung aus Fibroblasten oder rekombinanten Zelllinien) erschweren die Entwicklung hochspezifischer Hemmstoffe (OVERALL & KLEIFELD, 2006; RUSH & POWERS, 2004).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines innovativen zellgebundenen Inhibitor-Screening-Systems auf der Basis immobilisierter humaner Matrix-Metalloproteasen. Zu diesem Zweck sollten MMP-2 und MMP-9 heterolog in Hefezellen exprimiert und in biologisch aktiver Form auf deren Oberfläche verankert werden. Die anschließende Anpassung eines bereits etablierten *in vitro*-Testsystems auf die Verwendung *in vivo* sollte eine quantitative Bewertung der MMP-Aktivitäten in Anwesenheit unterschiedlicher Inhibitoren ermöglichen.

In einem ersten Schritt wurde die Fähigkeit verschiedener mikrobieller Expressionswirte zur heterologen Expression von Matrix-Metalloproteasen untersucht. Innerhalb des danach favorisierten Organismus wurden Experimente zur Optimierung der Zelloberflächen-

Expression durchgeführt und die resultierenden Expressionsstämme zur Weiterentwicklung des Enzymaktivitäts-Assays verwendet.

Heterologe Expression

Zur Identifikation eines geeigneten Hefe-Expressionswirts wurden die MMP-Gene mit einer ER-Signalsequenz versehen und in spezifische Expressionsplasmide eingebracht. Zusätzlich erfolgte eine intrazelluläre Expression in *E. coli*. Von den getesteten Organismen waren ausschließlich *Escherichia coli*, *Zygosaccharomyces bailii* und *Pichia pastoris* (zumindest teilweise) in der Lage, MMPs zu produzieren bzw. zu sezernieren. Bei *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* konnten keine Gelatinasen im Kulturüberstand nachgewiesen werden.

Die Expression in *E. coli* zeigte sich nur bei MMP-2 erfolgreich. Die His-getaggten Formen konnten als Inclusion Bodies in der Pellet-Fraktion des Ultraschallaufschlusses detektiert werden. In anschließenden Aktivitätstests zeigten diese jedoch keine enzymatische Aktivität. Hervorgerufen wurde dies durch die Komplexität der natürlichen Proteinstruktur mit zahlreichen posttranslationalen Modifikationen, vor allem intramolekularer Disulfid-Brücken, die in prokaryontischen Expressionssystemen nur unzureichend durchgeführt werden können. Viele bisherige MMP-Expressionsversuche in *E. coli* führten zu vergleichbaren Ergebnissen. PEISLEY & GOOLEY (2007) waren in der Lage, eine funktionale Fibronectin Typ II-Domäne von MMP-2 in einem Thioredoxin-Reduktase defizienten *E. coli*-Stamm durchzuführen, der die Bildung von intramolekularen Disulfid-Brücken ermöglichte. PARKAR *et al.* (2000) stellten eine rekombinante Form der katalytischen Domäne von MMP-12 in *E. coli* her; KOO *et al.* (2002) das Vollängen-Genprodukt von MMP-14, ITOH *et al.* (1996) MMP-7, SHIMADA *et al.* (1999) eine verkürzte MMP-16-Variante. In jedem dieser Fälle traten die Proteine hauptsächlich in unlöslicher Form auf und erreichten ihre biologische Aktivität erst nach vorheriger Reinigung und *in vitro*-Rückfaltung. Die aufwändigen nachträglichen *in vitro*-Verfahren, die mangelnden Möglichkeiten einer *in vivo*-Immobilisierung und das gänzliche Fehlen eines Genprodukts für MMP-9 ließen *E. coli* als Expressionswirt für die geplante Anwendung als ungeeignet erscheinen.

Bei der Expression in *Z. bailii* konnten nur beim Stamm ATCC60483 in Western-Analysen Fragmente von MMP-9 nachgewiesen werden; in ATCC36947 war kein Nachweis möglich. MMP-2 konnte in keinem der Stämme detektiert werden. *Z. bailii* spielt bislang bei der heterologen Protein-Expression nur eine sehr untergeordnete Rolle. Seit der Entwicklung des ersten Expressionsplasmids durch BRANDUARDI *et al.* (2003) wurde nur eine erfolgreiche Produktion von L-Ascorbinsäure durch rekombinante L-Gulonon-1,4-lacton-Oxidase aus

Rattus norvegicus bzw. *D*-Arabinono-1,4-lacton-Oxidase aus *S. cerevisiae* für diesen Organismus beschrieben (SAUER *et al.*, 2004). Die nur marginale Charakterisierung des Organismus in Verbindung mit der fehlenden Kenntnis bezüglich möglicher Zelloberflächen-Expressionsmöglichkeiten und einer nur unzureichenden MMP-Expression ließen *Z. bailii* als Expressionswirt ebenfalls ausscheiden.

K. lactis, *S. pombe* und *S. cerevisiae* konnten ebenfalls als Expressionswirte ausgeschlossen werden, da keines der beiden MMPs im Kulturüberstand nachweisbar war. In weiterführenden Untersuchungen zur sekretorischen MMP-Expression in *S. cerevisiae* konnte KESSLER (2006) eine intrazelluläre Expression von MMP-2 und biologisch aktivem MMP-9 nachweisen. Die begrenzenden Faktoren der Expression scheinen auf Ebene des Sekretionsweges zu suchen zu sein. Bisher wurde auch noch von keiner anderen Arbeitsgruppe eine heterologe Expression von MMPs in *S. cerevisiae* beschrieben.

P. pastoris war als einziger der getesteten Organismen in der Lage, MMP-2 und MMP-9 in biologisch aktiver Form zu sezernieren. Die Art zeigte sich bereits in früheren Untersuchungen als für die Expression diverser Matrix-Metalloproteasen, wie z. B. (muriner) MMP-2 (MASURE *et al.*, 1997), MMP-14 (RODERFELD *et al.*, 2000; ROZANOV & STRONGIN, 2003) oder MMP-1 (ROSENFELD *et al.*, 1996) geeignet. DING *et al.* (2001) und DOYLE (2001) beschäftigten sich erfolgreich mit der Expression der humanen Gelatinasen MMP-2 bzw. MMP-9 in *P. pastoris*. Beide beschrieben die ebenfalls in der vorliegenden Arbeit festgestellte Fragmentierung der MMPs als eines der Hauptprobleme bei der Expression von Matrix-Metalloproteasen in *Pichia* und führten diese auf proteolytische Degradation des Zymogens durch *Pichia*-eigene Proteasen zurück. Die von DOYLE (2001) vorgeschlagenen Lösungsansätze durch Veränderungen der Kultivierungsbedingungen (pH-Pufferung > 6,0; Zugabe von Casaminoacids und Proteaseinhibitor, Induktionsdauer) wurden im Prinzip in der vorliegenden Arbeit aufgegriffen, optimiert und ergänzt und führten zu einer signifikanten Stabilisierung der rekombinanten sekretorischen Proteine. In Analogie zu anderen Autoren stellte sich der *P. pastoris*-Stamm GS115 in der aktuellen Untersuchung als der für die Sekretion von Proteinen am besten geeignete heraus. Die optimale Kultivierung zur sekretorischen Expression von MMP-2 und MMP-9 in *P. pastoris* konnte in BMM-Medium (1 % Methanol) mit 1 % Casaminoacids und Proteaseinhibitor bei Pufferung mit 100 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7,0) erreicht werden. Eine Glycerolphase bis zu einer OD₆₀₀ > 30 ist empfehlenswert; die Induktionsphase sollte 48-72 h betragen. Generell erwiesen sich die Produktionsergebnisse der *P. pastoris*-Zellen auch unter optimierten Bedingungen als sehr variabel, weshalb zum Erreichen einer stabilen MMP-Expression eine kontrollierte Kultivierung in einem Bioreaktor unumgänglich erscheint.

Tagging der MMPs

Um erste Untersuchungen bezüglich einer späteren Reinigung (und *in vitro*-Immobilisierung) der MMPs vorzunehmen, wurden sowohl in *E. coli* als auch in *P. pastoris* Konstrukte mit C-terminalem 6 x His-Tag exprimiert. Das Epitop konnte jedoch weder im Western Blot noch in affinitätschromatographischen Reinigungsverfahren als funktional nachgewiesen werden, was für eine unzureichende Zugänglichkeit des C-Terminus spräche. Darüber hinaus verloren die Gelatinasen durch das Tagging fast vollständig ihre enzymatische Aktivität. Eine immunologische Detektion mittels Anti-MMP-Antikörpern bestätigte, dass dieser Funktionsverlust nicht auf eine gesteigerte Fragmentierung zurückzuführen war; die Stabilität der Proteine blieb unbeeinflusst. Die Möglichkeit eines primär vermuteten C-terminalen Abbaus der Hemopexin-Domäne, wie von LINDSTAD *et al.* (2005) für die *in vitro*-Aktivierung von MMP-2 beschrieben, erschien durch die spätere erfolgreiche Immobilisierung mittels C-terminaler Zellwandanker ebenfalls unwahrscheinlich. Im Falle einer möglicherweise zukünftig angestrebten *in vitro*-Immobilisierung sollten alternative Tags getestet werden. Andere MMPs konnten bereits erfolgreich über diverse (auch Hexahistidin-)Tags gereinigt werden. KINOSHITA *et al.* (1998) und SHIMADA *et al.* (1999) verwendeten Flag-Tags zur Reinigung von C-terminal verkürzten MMP-14- bzw. MMP-16-Varianten, ITOH *et al.* (1996) waren in der Lage, eine His-getaggte Vollängen-MMP-7 zu exprimieren.

Der Vorteil der vereinfachten Reinigung getaggtter MMP-Varianten, z. B. mittels HPLC, ist allerdings mit diversen Nachteilen verbunden, weshalb die Methode für MMPs nicht standardmäßig Verwendung findet. Die Elution mittels Harnstoff oder über Erniedrigung des pH-Werts geht oftmals mit einer spontanen Aktivierung bzw. Deaktivierung der *pro*MMPs durch intramolekulare Konformationsänderungen einher. Darüber hinaus können die biochemischen Eigenschaften der MMPs durch die angehängten Tags verändert werden. Für die alleinige MMP-Reinigung aus den Kulturüberständen ist daher die Verwendung etablierter säulenchromatographischer Verfahren empfehlenswert, die den Gebrauch von Tags überflüssig machen (IMAI & OKADA, 2008; vgl. S. 152).

Zellwandverankerung

Die Immobilisierung biotechnologisch relevanter Enzyme ermöglicht eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten, die von Peptid- oder Antikörper-Bibliotheken über Lebendvakzinen bis hin zu Ganz-Zell-Biokatalysatoren reichen.

Erste anwendungsorientierte Untersuchungen zur Oberflächen-Expression wurden von SCOTT & SMITH (1990) durchgeführt, die eine Epitop-Bibliothek auf der Basis von filamentösen Bakteriophagen entwickelten. Als limitierender Faktor dieses Systems stellte sich die mangelnde Fähigkeit, Proteine mit großem Molekulargewicht zu präsentieren, heraus. Die Lösung für dieses Problem wurde durch die Entwicklung von Bakterien-Oberflächen-Expressionssystemen erreicht (LITTLE *et al.*, 1993). Hierdurch wurde es möglich, größere Peptide, wie z. B. die B-Untereinheit des Cholera-Toxins (LILJEQVIST *et al.*, 1997), oder funktionelle Enzyme, wie z. B. β -Lactamase (FRANCISCO *et al.*, 1992), auf Bakterienzellen zu immobilisieren. Um das Potential der Anwendung von Zelloberflächen-Expressionen ausschöpfen zu können, wurden Zellwand-Ankersysteme für Hefen, vor allem *Saccharomyces cerevisiae*, entwickelt, die aufgrund ihres GRAS-Status einen unbedenklichen Einsatz insbesondere in der pharmazeutischen und Lebensmittel-Industrie erlaubten (KONDO & UEDA, 2004). Darüber hinaus wurden Hefen bei vielen weiteren umwelt- und biotechnologisch relevanten Prozessen eingesetzt. Genetisch manipulierte Hefezellen finden beispielsweise als Bioadsorber in der Umwelttechnik Verwendung. Zellwand-verankerte Poly-Histidin-Oligopeptide sind in der Lage, Schwermetallionen, wie Ni^{2+} oder Cu^{2+} , zu chelatieren und auf der Hefeoberfläche zu binden. Diese können mit den Zellen durch einfache Zentrifugations- oder Sedimentationsschritte vom Medium und durch anschließende EDTA-Behandlung von den Hefezellen getrennt und recycelt werden (KURODA *et al.*, 2001). Besonders großes Potential kommt Hefen jedoch vor allem bei der Verwendung als Ganzzell-Biokatalysatoren zu. SHIGECHI *et al.* (2004) 'bewaffneten' *S. cerevisiae*-Zellen mit amylolytischen Enzymen, die eine effiziente, direkte Umsetzung von Stärke in Ethanol ermöglichten, was bis dahin nur durch mehrstufige, ökonomisch unrentable Fermentationsprozesse möglich gewesen war. Analog dazu entwickelten FUJITA *et al.* (2002) Hefe-Zellen mit cellulolytischen Enzymen, die zur Verwertung von Cellulose-haltigen Abfallprodukten durch deren Umsetzung zu Ethanol eingesetzt werden können. Darüber hinaus können Hefezellen durch die Zelloberflächen-Expression von biotechnologisch relevanten Enzymen, wie z. B. Lipasen oder anderen Esterasen, eine stereo- und enantioselektive Synthese chemischer Produkte ermöglichen (MATSUMOTO *et al.*, 2004; BREINIG *et al.*, 2006). Zukunftsweisende Ansätze liefern außerdem erste Experimente zur Entwicklung von hefezellbasierten Lebend-Vakzinen, bei denen Zellen oral verabreicht und

darauf immobilisierte Pathogen-Antigene eine Immunantwort des zu impfenden Organismus auslösen sollen (SCHREUDER *et al.*, 1996*; TAMARU *et al.*, 2006).

Pichia pastoris zeigt bei der heterologen Expression von Proteinen gegenüber *Saccharomyces cerevisiae* entscheidende Vorteile. Neben der Fähigkeit, kostengünstiges Methanol als einzige Kohlenstoffquelle zu verwenden und zu extrem hohen Zelldichten wachsen zu können, sind es vor allem die bei pharmazeutischen Anwendungen relevanten Glykosylierungseigenschaften, die *P. pastoris* ein großes biotechnologisches Potential als Expressionswirt zellwandverankerter Proteine einräumen. Die große Anzahl der bei der Glykosylierung in *S. cerevisiae* auftretenden Mannosereste (bis zu 200) kann zu unerwünschten Nebenwirkungen bei der Applikation rekombinanter Therapeutika führen. *P. pastoris* verfügt über ein vergleichsweise stark reduziertes Glykosylierungsmuster (8-14 Mannose-Reste), das derzeit durch die Konstruktion spezieller Expressions-Stämme weiter ‚humanisiert‘ und in Zukunft säugerähnliche Glykosylierungsmuster ermöglichen soll (HAMILTON *et al.*, 2006; WILDT & GERNGROSS, 2005).

Zellwandverankerung in *Pichia pastoris*

Um die Vielfalt der Anwendungsmöglichkeiten zellwandverankerter Proteine mit den Vorteilen von *P. pastoris* zu kombinieren, werden seit einigen Jahren Anstrengungen unternommen, neuartige Systeme zur Zellwandverankerung in *P. pastoris* zu etablieren. Da bisher keine Genomsequenz von *P. pastoris* publiziert worden ist, wurden in *S. cerevisiae* funktionale Zellwandanker-Sequenzen (Agg1p, Flo1p, Pir1p) eingesetzt. Neben Fluoreszenz-Proteinen (MERGLER *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2008) und Adenoregulin (REN *et al.*, 2007) wurden vor allem enzymatisch aktive Lipasen (TANINO *et al.*, 2006; JIANG *et al.*, 2007; JIANG *et al.*, 2008) auf der Oberfläche der Zellen verankert. Für die Lipase LipB52 aus *Pseudomonas fluorescens* wurden dabei erstmals konkrete Vorteile gegenüber der Verankerung auf *Saccharomyces cerevisiae*, insbesondere bezüglich der Stabilität des Proteins, beschrieben (JIANG *et al.*, 2008).

Auf Basis der bisher publizierten Daten können Aussagen über die generelle Eignung einer Ankersequenz, allerdings keine über die Qualität dieser im Vergleich zu anderen Zellwandankern getroffen werden. Analog zu VAN DER VAART *et al.* (1997), die signifikante Unterschiede in der Immobilisierungs-Effizienz einzelner Anker bei der Zelloberflächen-Expression in *S. cerevisiae* feststellen konnten, wurden in der vorliegenden Arbeit vergleichende Untersuchungen in *P. pastoris* durchgeführt (vgl. auch MÜLLER, 2008). Die Experimente konzentrierten sich dabei ausschließlich auf die Optimierung der C-terminalen Verankerung heterologer Proteine. Um potentielle *Pichia*-Ankersequenzen zu identifizieren, wurden auf Basis des Genoms von *S. cerevisiae* Oligonukleotid-Primer für die Zellwand-

Mannoprotein-Gene *AGα1*, *CWP2*, *FLO1*, *PIR1* und *SED1* erstellt und Polymerase-Kettenreaktionen mit genomischer DNA aus *P. pastoris* als Template durchgeführt. Alle zu testenden Sequenzen außer *AGα1* ließen sich erfolgreich amplifizieren. Eine nachfolgende Sequenzanalyse erbrachte eine 99,9 %ige Übereinstimmung mit den Gensequenzen aus der *S. cerevisiae*-Datenbank. Die einzeln aufgetretenen Punktmutationen sind dabei höchstwahrscheinlich auf Lesefehler bei der PCR-Reaktion und nicht auf tatsächliche Abweichungen zwischen beiden Genomen zurückzuführen. Eine gesicherte Aussage wäre nur durch eine mehrfache Sequenzierung der DNA-Abschnitte zur Ermittlung der tatsächlichen Basenfolge zu gewährleisten, was aber im Kontext der angestrebten Verwendung als nicht zielführend erschien. Generell gestaltete sich die Amplifikation der Ankersequenzen in der Praxis aufgrund der Vielzahl an repetitiven Sequenzabschnitten als kompliziert. Eine Reduktion der kürzeren Zwischenprodukte zugunsten der Volllängen-Gene war nur durch weitreichende individuelle Anpassungen bezüglich Annealing-Temperatur, Elongationszeiten und der Verwendung spezieller DNA-Polymerasen möglich. Möglicherweise liegt darin der Grund für das Fehlen eines *AGα1*-Amplifikats. Insbesondere die enge Verwandtschaft beider Arten in Verbindung mit der zentralen Rolle, die das Protein beim Mating von *S. cerevisiae*-Zellen spielt (DOI *et al.*, 1989), lässt die Wahrscheinlichkeit, dass *P. pastoris* nicht über dieses Gen verfügt, als gering erscheinen. Darüber hinaus wurde seine Funktionalität bei der *P. pastoris*-Zellwandverankerung bereits mehrfach beschrieben (MERGLER *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2007). Da sich somit eine vollständige Homologie der *P. pastoris*- mit den *S. cerevisiae*-Ankersequenzen als wahrscheinlich annehmen ließ, wurden in der vorliegenden Arbeit Amplifikate aus *S. cerevisiae* eingesetzt, zumal deren frei verfügbare Genom-Sequenz eine Kontrolle der DNA-Fragmente bezüglich möglicher Mutationen erlaubte.

Um einen objektiven, quantitativen Vergleich der Ankersequenzen zu realisieren, wurde die bakterielle Esterase A aus *Burkholderia gladioli* als Reporterprotein eingesetzt und genetisch an die Ankersequenzen *CWP2*, *PIR1* und *SED1* fusioniert (*FLO1* wurde nicht verwendet, da dieses bisher nur zur N-terminalen Verankerung in *P. pastoris* herangezogen worden war). Die Esterase wurde bereits in früheren Untersuchungen zur Quantifizierung der Immobilisierungs-Effektivität bei *S. cerevisiae* eingesetzt (BREINIG *et al.*, 2006). Als Maß für die Effizienz des Zellwandankers diente dabei die Geschwindigkeit der Umsetzung des Esterase-Substrats *p*-Nitrophenylacetat zu *p*-Nitrophenol, die durch eine einfache photometrische Messung ermittelt wurde. Für jede Ankersequenz konnte in beiden *P. pastoris*-Stämmen eine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden. Allerdings zeigten sich abhängig von der jeweils verwendeten Stamm-Anker-Kombination signifikante Unterschiede in der Immobilisierungs-Effizienz. Die minimalen und maximalen Volumenaktivitäten (bei OD₆₀₀ = 10) unterschieden sich um mehr als den Faktor 12 (GS115-

Cwp2p: 251 mU/ml; KM71-Sed1p: 3.169 mU/ml). Im Widerspruch zu den Ergebnissen von VAN DER VAART *et al.* (1997) für *S. cerevisiae* ergab sich für *P. pastoris* ein kausaler Zusammenhang zwischen einer Verlängerung der Ankersequenz und der messbaren Esterase-Aktivität. Wie in Abb. 52 dargestellt, nimmt die Volumenaktivität innerhalb des getesteten Größenbereichs exponentiell mit der Größe des verwendeten Zellwandankers zu. Dies spricht dafür, dass höhere Volumenaktivitäten weniger auf die grundsätzliche Eignung der Ankersequenz als viel mehr auf die verbesserte Zugänglichkeit des Reporterenzym für das Substrat zurückzuführen sind. Vergleichbare Ergebnisse konnten bei Zelloberflächen-Expressionen in *S. cerevisiae* erzielt werden, indem Ankersequenzen künstlich durch Spacerregionen verlängert wurden. BREINIG & SCHMITT (2002) waren dadurch in der Lage, die Antikörper-Zugänglichkeit eines mit Cwp2p bzw. Flo1p verankerten HA-Epitops signifikant zu erhöhen; WASHIDA *et al.* (2001) verzeichneten eine gesteigerte Aktivität einer mit Aga1p immobilisierten Lipase aus *Rhizopus orizae*.

P. pastoris-KM71-Zellen zeigten im Vergleich zum GS115-Stamm deutlich stärkere Esterase-Aktivitäten. Die beiden Stämme unterscheiden sich zwar phänotypisch primär lediglich in der Ausprägung der ‚Methanol utilization‘ (KM71: Mut^S; GS115: Mut⁺), dennoch sollte laut Herstellerangaben (INVITROGEN) der optimale Expressionswirt für jedes Zielprotein individuell bestimmt werden. O'CALLAGHAN *et al.* (2002) konnten beispielsweise zwischen den beiden Stämmen keine Präferenzen bei der Expression einer Laccase aus *Trametes versicolor* feststellen. Im Gegensatz dazu beobachteten SHI *et al.* (2007) eine erhöhte Produktion von Alfimeprase in GS115, wohingegen das Protein in KM71 in einer reineren Form hergestellt wurde.

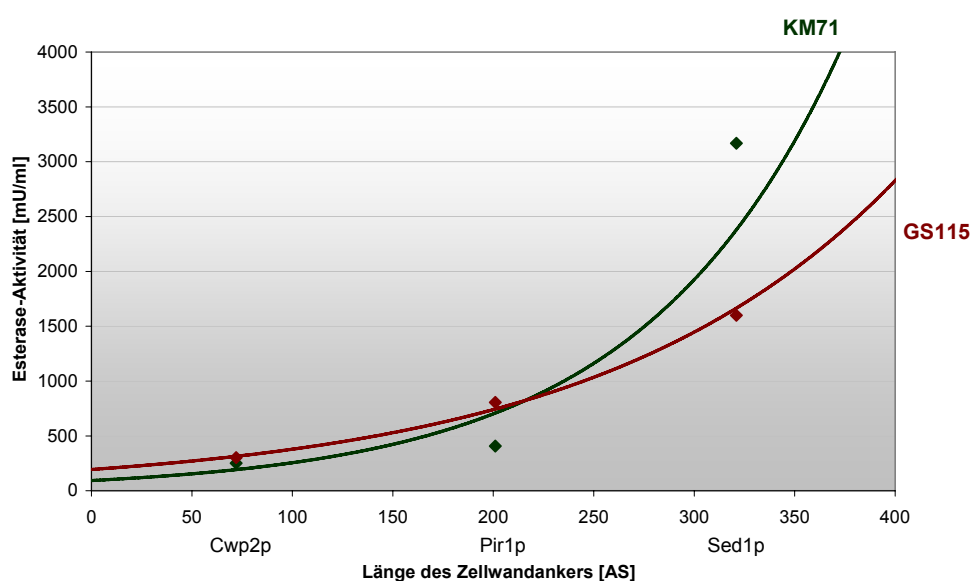


Abb. 52: Relation der Ankergröße zur gemessenen Esterase-Aktivität in *P. pastoris*. Für beide Stämme ergibt sich ein exponentieller Zusammenhang zwischen Länge der Ankersequenz und Substratumsetzung, der möglicherweise auf die verbesserte Substrat-Zugänglichkeit des Enzyms zurückzuführen ist. Angegeben ist die errechnete Volumenaktivität für eine Zellsuspension mit der $OD_{600} = 10$ (AS = Aminosäuren).

Mit Cwp2p und Sed1p wurden zwei für *P. pastoris* neuartige Ankersysteme identifiziert, von denen insbesondere Sed1p ein großes Potential in der biotechnologischen Anwendung zugeschrieben werden kann. Dessen gesteigerte Immobilisierungs-Effizienz ist vor allem im Vergleich mit etablierten *S. cerevisiae*-Ankersystemen besonders hervorzuheben. In vorangegangenen Untersuchungen mit Cwp2p-verankerter Esterase erreichte *S. cerevisiae* – trotz optimaler Kulturbedingungen im Bioreaktor – mit 572 mU/ml (BREINIG *et al.*, 2006) nur etwa 18 % der Aktivität, die in der vorliegenden Arbeit mit Sed1p als Anker in *P. pastoris* erreicht wurde (3.169 mU/ml).

Anwendungsmöglichkeiten

Dieses neuartige Ankersystem eröffnet in Verbindung mit den bereits angesprochenen Vorteilen von *P. pastoris* als Expressionswirt vielfältige biotechnologische Anwendungsmöglichkeiten. Erhöhte Enzymaktivitäten der einzelnen Zellen und deren Wachstum zu höheren Zelldichten ermöglichen eine effizientere Substratumsetzung durch Ganz-Zell-Biokatalysatoren. Die höheren Erträge und der geringere Platzbedarf erhöht die wirtschaftliche Rentabilität von biotechnologischen Verfahren, z. B. zur alternativen Ethanolgewinnung aus Stärke- oder Cellulose-haltigem Material (SHIGECHI *et al.*, 2004; FUJITA *et al.*, 2002; s. o.), was die Förderung biotechnologischer Anwendungen im industriellen Maßstab vorantreiben könnte. Im Bereich des Umweltschutzes können analog zu KURODA *et al.* (2001) effizientere Bioadsorber hergestellt werden, die in der Lage sind, größere Mengen Schwermetalle zu binden. In der Medizin könnte die Entwicklung *Pichia*-basierender Lebend-Vakzinen, eine effektivere Antigen-Präsentation ermöglichen und somit eine stärkere Immunantwort auslösen, die (durch das im Vergleich zu *S. cerevisiae* optimalere Glykosylierungsmuster) mit geringeren Nebenwirkungen verbunden wäre.

Zellwandverankerung von MMP-2 und MMP-9

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Zellwandanker-System erstmals praktisch zur Etablierung des angestrebten MMP-Bioassays angewendet. Hierzu wurde das jeweilige MMP-Gen C-terminal an den Sed1p-Anker fusioniert. Die Gelatinasen konnten damit erfolgreich auf der Zelloberfläche von *P. pastoris* immobilisiert und mittels indirekter Immunfluoreszenz-Mikroskopie dargestellt werden. Nach subjektiver Bewertung zeigten mehr als vier von fünf Zellen eine deutliche Fluoreszenz im Bereich der Zellwand. Dies korreliert mit Ergebnissen von MÜLLER (2008), die mittels Sed1p das monomere Red Fluorescence Protein (mRFP) auf der Oberfläche von *P. pastoris* verankerte; in FACS-Analysen zeigten dabei 89 % aller Zellen eine intensive Fluoreszenz. Unterschiede zeigten die MMP-Expressionsstämme lediglich in der Fluoreszenz-Intensität: Zellen mit MMP-9

erschieden wesentlich lichtschwächer als Zellen mit MMP-2. Bei späteren Aktivitätsmessungen konnten für beide MMPs jedoch identische Mengen an verankertem Enzym nachgewiesen werden (s. u.). Die Abweichungen sind daher vornehmlich auf die unterschiedlichen Eigenschaften der Antikörper zurückzuführen. Die verwendeten Anti-MMP-Antikörper (ABCAM) waren bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht auf ihre Anwendbarkeit bei Immunfluoreszenz-Untersuchungen getestet worden. Das Fehlen von Herstellerangaben zu optimalen Arbeitskonzentrationen erlaubt daher keine objektive Bewertung der abweichenden Fluoreszenz-Intensitäten.

Aktivitätsassay

Nach der erfolgreichen Immobilisierung der MMPs auf der Oberfläche von *P. pastoris* galt es, einen geeigneten Gelatinase-Assay zu identifizieren und diesen auf die Bedürfnisse eines zellbasierten Testsystems anzupassen.

Aus diversen kommerziell verfügbaren Assay-Kits wurde jeweils eine colorimetrische und eine fluorimetrische Methode ausgewählt und ihre Vor- und Nachteile vergleichend bewertet. Das colorimetrische System MMP-2/MMP-9 Substrat II (CALBIOCHEM) basiert auf der Umsetzung eines artifiziellen Substrats, dessen Spaltprodukt mit einem sekundären Substrat (4-4'-Dithiodipyridin) reagiert und dieses zu 4-Thiopyridon umsetzt (EGWIM & GRUBER, 2001). Die Absorptionszunahme des Produkts wurde photometrisch ermittelt und als Maß für die Esterase-Aktivität heran gezogen. Die fluorimetrische Methode des Enzcheck® Gelatinase/Collagenase Assays (INVITROGEN) verwendet Fluorescein-markierte Gelatine als Substrat. Die Intensität des Labelings führt zu einem gegenseitigen Quenching-Effekt, der eine Fluoreszenz erst nach Fragmentierung der Gelatine durch die MMPs erlaubt. Die Zunahme der Fluoreszenz dient dabei als Grundlage zur Quantifizierung der gelatinolytischen Aktivität.

Mit beiden Messmethoden konnten bereits nach wenigen Minuten MMP-Aktivitäten detektiert werden. Das colorimetrische System zeigte gegenüber dem fluorimetrischen System jedoch deutliche Nachteile: die Absorptionskurve der Negativ-Kontrolle verlief unterhalb der der Messproben, wies aber eine vergleichsweise hohe eigene Absorptionszunahme auf (vgl. Abb. 40, S. 113). Vor allem bei der geplanten quantitativen Bewertung der MMP-Aktivitäten bei Anwesenheit unterschiedlicher Hemmstoffe ist eine klare Differenzierung von Positiv- und Negativ-Proben unerlässlich. Eine Erhöhung der Zelldichte im Messansatz würde durch die höhere MMP-Konzentration zwar zu einer schnelleren Substratumsetzung und somit einer begrenzten verbesserten Auflösung führen, die Absorptionsmessung aber durch

zunehmende Trübung des Reaktionsansatzes erschwert werden. In der eingesetzten Konzentration war das Substrat bereits nach 20-30 min aufgebraucht, was früh zur Ausbildung einer Sättigungsphase im Kurvenverlauf führte. Eine Erhöhung der Substratkonzentration könnte diesen Effekt kompensieren, allerdings würde die damit verbundene massive Erhöhung der Kosten dem Ziel der vorliegenden Arbeit widersprechen. Das Haupt-Hindernis lag vor allem in der praktischen Anwendung der Assaykomponenten. Das Substrat soll laut Herstellerangaben in solch geringen Mengen eingesetzt werden, dass ein genaues Abwiegen kaum möglich erscheint. Da es sich in wässriger Lösung instabil verhält, ist eine Lagerung als Stammlösung nicht möglich. Letzteres trifft ebenso für das Sekundär-Substrat zu, welches laut Herstellerangaben in Lösung nur etwa eine Stunde stabil ist. Theoretisch wären in der verwendeten Konzentration ca. 750 Messungen (in 200 µl- Wells) möglich. Bei einem aktuellen Preis von 260,- € für 5 mg Substrat würden sich für eine 96 Well-Platte Kosten in einer Höhe von 33,28 € ergeben. In der Praxis dürften sich diese Kosten jedoch durch die unpraktikable Handhabung um ein Vielfaches erhöhen.

Das fluorimetrische System stellt sich im Hinblick auf die angestrebte Verwendung, insbesondere bezüglich seiner praktischen Anwendung als deutlich überlegen dar (vgl. Abb. 41, S. 114). Die Negativkontrollen zeigen praktisch keine Fluoreszenz-Zunahme, was eine eindeutige Quantifizierung der MMP-Aktivitäten der Kontrollproben ermöglicht. Die Messung erfolgt außerdem nicht über eine Zwischenreaktion, sondern direkt über den Umsatz des Primärsubstrats, was die Anzahl der Fehlerquellen im System verringert. In der Praxis zeigen sich die einfache Lagerung der stabilen Stammlösungen und deren unkomplizierte Dosierung beim Zusammenpipettieren des Messansatzes als zentraler Vorteil. Durch die Verwendung eines Fluoreszenz-Readers, bei dem Detektion- und Anregungs-Einheiten auf der gleichen Seite der Mikrotiterplatte lokalisiert sind, kann die Zelldichte im Messansatz stark erhöht werden, bevor die Trübung zu großen Einfluss auf die Messdaten nimmt. Aus dem Grundpreis von 272,- € für 5 mg Substrat errechnen sich bei der niedrigsten laut Herstellerangaben empfehlenswerten Konzentration Kosten von 13,05 € pro 96 Well-Platte. Die Abwägung aller relevanten Parameter führte zu dem Resultat, dass die fluorimetrische Methode des Enzcheck® Gelatinase/Collagenase Assays (INVITROGEN) gegenüber dem MMP-2/MMP-9 Substrat II (CALBIOCHEM) entscheidende Vorteile besitzt, weshalb dieses für die weiteren Untersuchungen verwendet wurde.

Optimierung der Messparameter

Um das EnzCheck® Gelatinase/Collagenase Assay im Rahmen eines zellbasierten Systems verwenden zu können, wurden in einem ersten Schritt die optimalen Testparameter

bezüglich Zelldichte und Substratkonzentration ermittelt und anschließend Optimierungen der Zell-Kultivierung und MMP-Aktivierung durchgeführt.

Der *P. pastoris*-Stamm KM71 stellte sich bei den Aktivitätsmessungen grundlegend als der geeignetste heraus. Analog zu den Ergebnissen bei der Verankerung der Esterase A (s. o.) zeigte er bei den MMPs eine deutlich höhere gelatinolytische Aktivität als der Vergleichsstamm GS115. Möglicherweise ist dies auf zufällig ähnliche Stammpräferenzen der drei immobilisierten Proteine MMP-2, MMP-9 und Esterase A zurückzuführen, wahrscheinlicher ist jedoch eine bessere Eignung des KM71-Expressionsstamms für den Zellwandanker Sed1p. Die mangelnde Charakterisierung beider Stämme bezüglich möglicher Differenzen im Phänotyp, z. B. im Bereich der Zellwandstruktur oder in der Prozessierungskapazität des Sekretionsweges, lassen an dieser Stelle nur Spekulationen zu.

Zur Ermittlung der optimalen Zelldichte im Messansatz wurden parallele Messungen in unterschiedlichen Verdünnungsstufen durchgeführt (vgl. Abb. 43, S. 116). Für beide MMPs ergaben sich Optimumkurven: zu niedrige Zelldichten führten durch die geringere Menge an MMPs zu einer niedrigeren Gesamt-Aktivität; zu hohe Zelldichten erhöhten die Trübung des Messansatzes, wodurch die Lichtemission fluoreszierender Gelatine-Fragmente aus den oberen Suspensionsschichten nicht mehr ausreichend detektiert werden konnte, was in einem Abfallen der Kurve resultierte. Für MMP-2 ergaben sich insgesamt vergleichsweise konstante, hohe Werte, die in OD_{600} -Bereichen von 1,25 und 2,5 die höchste Aktivität aufwiesen. Bei MMP-9 fielen die Abweichungen gravierender aus; es ergab sich ein deutliches Optimum bei $OD_{600} = 2,5$. Um die Handhabung des Testsystems zu vereinheitlichen, wurden für beide MMPs Zelldichten mit einer $OD_{600} = 2,5$ als Optimum gesetzt.

Um die Maßgabe der Etablierung eines kostengünstigen Messsystems erfüllen zu können, galt es, den Haupt-Kostenfaktor, das Fluoreszenz-Substrat, auf ein Minimum zu reduzieren. Messungen mit Substrat-Verdünnungen im Bereich des vom Hersteller empfohlenen Dosierungsspektrums zeigten für beide MMPs erwartungsgemäß steigende Aktivitätswerte bei steigender Substratkonzentration (vgl. Abb. 44, S. 117). Für MMP-2 ergab sich bis zu einer DQ™-Gelatine-Konzentration von 25 µg/ml ein linearer Zusammenhang zwischen Substratkonzentration und messbarer Aktivität (eine Verdoppelung des Gelatine-Anteils führte zu einer Verdoppelung der Aktivität); bei MMP-9 war dieser Effekt bei Substratkonzentrationen bis zu 50 µg/ml nachzuweisen. Eine Verdoppelung der Substratmenge auf 100 µg/ml resultierte bei beiden nur in einer geringfügigen Aktivitätserhöhung; bei MMP-9 stärker als bei MMP-2. Messungen sind aus wirtschaftlicher Sicht ausschließlich in diesen linearen Bereichen sinnvoll, da nur dort eine Verdoppelung der Kosten durch eine Verdoppelung der erreichbaren Aktivitätswerte gerechtfertigt ist. Von

Messungen mit 100 µg/ml Substrat ist für MMP-2 generell, für MMP-9 bedingt abzuraten, da kaum eine Verbesserung der Messdaten im Vergleich zu 50 µg/ml erreicht werden kann. Gelatinase-Aktivitäten sind zwar auch bei niedrigen Substratkonzentrationen von bis zu 6,25 µg/ml detektierbar, allerdings ergeben sich in diesen Zonen Schwierigkeiten bei der graphischen Auswertung der Messkurven. Die linearen Abschnitte gehen sehr schnell und fließend in die Sättigungsbereiche über, was eine belastbare quantitative Auswertung erschwert. Zum praktischen Arbeiten sind daher Substratkonzentrationen über 12,5 µg/ml, optimalerweise 25 µg/ml zu empfehlen. Durch die *per se* niedrigeren Aktivitäten bei MMP-9 kann hier in Ausnahmefällen eine Erhöhung auf 50 µg/ml sinnvoll sein.

Optimierung der MMP-Produktion

Die MMPACE-Zellen wurden in optimierten Medien kultiviert, basierend auf den Ergebnissen der Untersuchungen zur sekretorischen Expression. Die Methodik ermöglichte durch quantitative Messdaten eine Verfeinerung dieser experimentellen Arbeiten bezüglich weiterer Kultivierungsparameter.

Methanol spielt bei der *P. pastoris*-Expression eine zentrale Rolle als Kohlenstoffquelle und als Transkriptions-Induktor. Um eine maximale Proteinausbeute zu erreichen, ist eine kontrollierte Zugabe notwendig, die eine Balance zwischen Proteinproduktion und Zellüberleben ermöglicht. Eine zu niedrige Fütterrate führt durch die schwache Induktion zu einer geringen Proteinausbeute; zu hohe Zugaben können bei Anreicherung des Methanols toxisch auf die Zellen wirken. Bei Kultivierungen in Bioreaktoren können die Methanolgehalte in Echtzeit indirekt über den Sauerstoff-Partialdruck oder direkt über Methanol-Sonden erfasst werden (ZHOU *et al.*, 2002); die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Anzucht in Erlenmeyerkolben erforderte ein empirisches Ermitteln der optimalen Fütterrate (vgl. Abb. 45, S. 118). Die Variation der Methanolzugabe hatte bei MMPACE-II einen stärkeren Einfluss auf die MMP-Aktivität als bei MMPACE-IX. Bei einer Fütterung von 2 x 1 % MeOH/d wurde im Vergleich zu 2 x 0,5 % MeOH/d eine Steigerung von mehr als 82 % erreicht; bei MMP-9 von lediglich 14 %. Eine weitere Erhöhung der täglichen Methanolzugabe auf 2 x 2 % führte in beiden Stämmen zu einem Rückgang der Aktivität - die plötzliche Erhöhung der Methanolkonzentration bei der Fütterung konnte nicht mehr ausreichend schnell vom Zellmetabolismus kompensiert werden. Die in der praktischen Anwendung optimale Fütterrate ergab sich entsprechend mit täglich 2 x 1 % Methanol. Bei kontinuierlichen Kulturen wirkt bereits ein halb so hoher Methanolgehalt von 5 g/l toxisch (ZHANG *et al.*, 2000). Diese Konzentration wird jedoch bei den hier verwendeten Fütterungsintervallen (bedingt durch den vergleichsweise schnellen Abbau durch die Zellen)

nur kurzfristig aufrecht erhalten und hat somit keinen negativen Einfluss auf Zellwachstum und Proteinproduktion.

Als weiterer kritischer Faktor bei der Proteinproduktion in *P. pastoris* wurde der Einfluss einer verlängerten Induktionsdauer untersucht. Analog zu DOYLE (2001) konnte bei den experimentellen Arbeiten zur sekretorischen Expression der MMPs (s. o.) eine gesteigerte Fragmentierung der heterologen Proteine bei verlängerter Methanol-Phase, bedingt durch die Anreicherung proteolytischer Enzyme im Medium, beobachtet werden. Ein vergleichbarer Effekt war demnach auch bei zellwandverankerten Enzymen zu erwarten. Darüber hinaus war anzunehmen, dass sich die Aufnahmekapazität der Hefe-Zelloberfläche als limitierender Faktor darstellen würde. Die Zellwand einer einzelnen Zelle von *S. cerevisiae* ist in der Lage, ca. 10^4 - 10^5 heterologe Proteine aufzunehmen (NAKAMURA *et al.*, 2001; SHIBASAKI *et al.*, 2001). Eine zeitliche Ausdehnung der MMP-Expression bei *P. pastoris* über einen solchen Punkt hinaus hätte demnach keine Steigerung der Aktivität erbracht und die Produktionskosten unnötig erhöht. Zur Analyse dieser Fragestellung wurden die Zellen über fünf Tage induziert und alle 24 h ihre gelatinolytischen Aktivitäten bestimmt (vgl. Abb. 46, S. 119). Eine Induktion von 24 h führte zu einer nur sehr schwachen MMP-Aktivität und ist daher nicht zu empfehlen. Bei Methanolphasen mit einer Dauer von mehr als 48 h ist die MMP-Menge generell für Messungen mit dem MMPACE-System ausreichend. Eine Erhöhung der Induktionszeit auf 72 h führte zu einer signifikanten Steigerung der Aktivitäten im Vergleich zu den Proben, die nach 48 h gemessen wurden (MMP-2: 84 %; MMP-9: 60 %). Eine weitere Verlängerung auf 96 h erbrachte bei MMP-2 eine zusätzliche Steigerung um 26 %, bei MMP-9 lag diese jedoch bereits unter 10 %. Nach 120 h konnte für beide Enzyme nur noch eine geringe Zunahme der Aktivität verzeichnet werden. Die maximale Aufnahmekapazität der *Pichia*-Zellwand wurde demnach erst nach mehreren Tagen Induktion erreicht. In der praktischen Anwendung ist zur Produktion von MMP-2 und MMP-9 eine Methanolphase von mindestens 48 h essentiell. Um eine optimale Enzymaktivität zu erreichen, ist eine Induktionszeit von 96 h empfehlenswert. Entgegen den Vermutungen zeigte die Anreicherung mit sekretorischen Proteasen auch nach 120 h keinen negativen Einfluss auf die MMP-Stabilität. Möglicherweise ist dies auf eine verminderte Zugänglichkeit für lösliche Proteasen in Folge der Immobilisierung zurückzuführen, wie bereits SCHREUDER *et al.* (1996) eine gesteigerte Stabilität immobilisierter Proteine beschrieben. Das vollständige Ausbleiben eines nachweisbaren Abbauprozesses lässt darüber hinaus die Hypothese zu, dass die MMP-Moleküle in ausreichend hohen Konzentrationen in der Lage sein könnten, sich gegenseitig als Substrat zu erkennen. FRIDMAN *et al.* (1995) beschrieben die Aktivierung von MMP-9 durch aktive Formen von MMP-2. Durch die strukturelle Homologie beider Gelatinasen ist eine ähnliche Funktion auch umgekehrt und zwischen den Proteinen selbst

denkbar. Das Ausbleiben eines Abbaus bei zellwandverankerten MMPs ließe sich somit durch eine zu geringe räumliche Nähe und somit Zugänglichkeit der MMPs zueinander erklären.

Aktivierung

Grundsätzlich konnten alle MMP-Aktivitätsmessungen mit zellwandverankerten Vollängen-MMPs durchgeführt werden, ohne dass eine vorherige Aktivierung notwendig war (vgl. Abb. 42, S. 115). NAGASE & WOESSNER (1999) beschreiben die Abspaltung der Proregion durch das Aufbrechen des Cystein-Switches als unumgänglichen Schritt bei der Überführung der MMPs von ihrer latenten Form in den aktiven Zustand. Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass lediglich eine Unterbrechung der Cystein-Zink-Interaktion für die Aktivierung essentiell ist, auch bei intakter kovalenter Bindung der Proregion (RA & PARKS, 2007). Diese Disruption kann durch eine Vielzahl von Ereignissen, wie proteolytische Spaltung der Proregion, Substrat-Bindung, allosterische Veränderungen oder reaktive Sauerstoffspezies hervorgerufen werden. BANNIKOV *et al.* (2002) konnten nachweisen, dass speziell MMP-9 durch Bindung an Gelatine- bzw. Kollagen-bedeckten Oberflächen gelatinolytische Aktivität entwickelt, obwohl das Proenzym dabei intakt bleibt. Die Aktivität erreichte zwar im Vergleich nur etwa 10 % der Aktivität von proteolytisch aktivierten Formen, gleichzeitig aber eine 600fache Steigerung gegenüber den latenten MMPs in Lösung. Sezernierte MMPs liegen innerhalb der Extrazellulären Matrix häufig sekundär an Matrix-Komponenten gebunden vor, was eine autolytische Abspaltung der Prodomäne als Folge einer allosterischen Disruption des Cystein-Switches hervorrufen kann (RA & PARKS, 2007). SHIOMI *et al.* (2005) beschrieben einen solchen Effekt für *proMMP-7*, das auf der Zelloberfläche mit CD151 interagiert und in Anwesenheit des natürlichen Substrats autolytisch aktiviert wird. Für Gelatinasen ist bisher zwar ebenfalls eine *in vivo*-Immobilisierung beobachtet worden – MMP-2 bindet an $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, MMP-9 an CD44 (BROOKS *et al.*, 1996; YU & STAMENKOVIC, 1999) – allerdings fanden keine Untersuchungen zu möglicherweise damit verbundenen Aktivierungsmechanismen statt. Im Hinblick auf die eigenen Ergebnisse zur MMP-Sekretion sowie die Daten anderer Autoren (DING *et al.*, 2001; DOYLE, 2001), bei denen eine sekretorische Expression in *Pichia* zu aktiven MMP-Fragmenten führte, ist die wahrscheinlichste Theorie der Aktivierung eine partielle Prozessierung durch sezernierte Proteasen im Kulturmedium.

Bemerkenswert ist der unterschiedliche Kurvenverlauf der jeweiligen Messreihen für beide Gelatinasen. MMP-2 zeigte von Beginn an einen linearen Kurvenverlauf, der nach einigen Stunden in eine Sättigung überging. Bei MMP-9 ging eine erste lineare Phase nach

ca. 6-7 h in einen sekundären, signifikant steileren Abschnitt über, der wahrscheinlich durch eine spontane Aktivierung des Enzyms hervorgerufen wurde. Der Zeitpunkt war dabei lediglich von der Dauer der Inkubation abhängig und erfolgte immer nach ca. 400 min, unabhängig von Substratkonzentration oder MMP-Menge. Die Ausprägungsintensität des Effekts konnte durch eine Erhöhung der Zelldichte und somit des MMP-Gehalts kompensiert werden (vgl. Abb. 53). Interessanterweise verhinderte eine Zugabe von 25 % Glycerin die Ausbildung einer zweiten linearen Phase und führt zu einem konstanten Anstieg mit Geschwindigkeiten wie im (sonst) ersten linearen Abschnitt (vgl. Abb. 48, S. 123). Möglicherweise haben die mechanischen Kräfte durch die hohe Schüttelfrequenz im Fluoreszenz-Reader einen positiven Effekt auf die Aktivierung, was durch die erhöhte Viskosität der Suspension durch das Glycerin abgeschwächt wurde. Die letztendliche Ursache des Phänomens bleibt ungeklärt. Bei einem Einfluss der Substratkonzentration hätte durch den unterschiedlich schnellen Abbau ein Übergang bei gleichen RFUs, nicht aber zu gleichen Zeitpunkten, auftreten müssen. Eine Anreicherung sekretorischer (gelatinolytisch aktiver) Proteasen hätte von Beginn an und nicht spontan nach mehreren Stunden eine Auswirkung gezeigt.

Denkbar ist insbesondere im Vergleich zu MMP-2 ein Einfluss der Glykosylierungsmuster. MMP-2 verfügt lediglich über zwei potentielle N-Glykosylierungsmotive nahe am C-Terminus; MMP-9 über eines innerhalb der Proregion und zwei am N-Terminus der katalytischen Domäne. Die unterschiedliche Lokalisation könnte in MMP-9 eine Stabilisierung der Proregion und damit eine Verzögerung der autolytischen Aktivierung hervorgerufen haben. Der beobachtete spontane Phasenübergang ist damit jedoch ebenso wenig zu erklären.

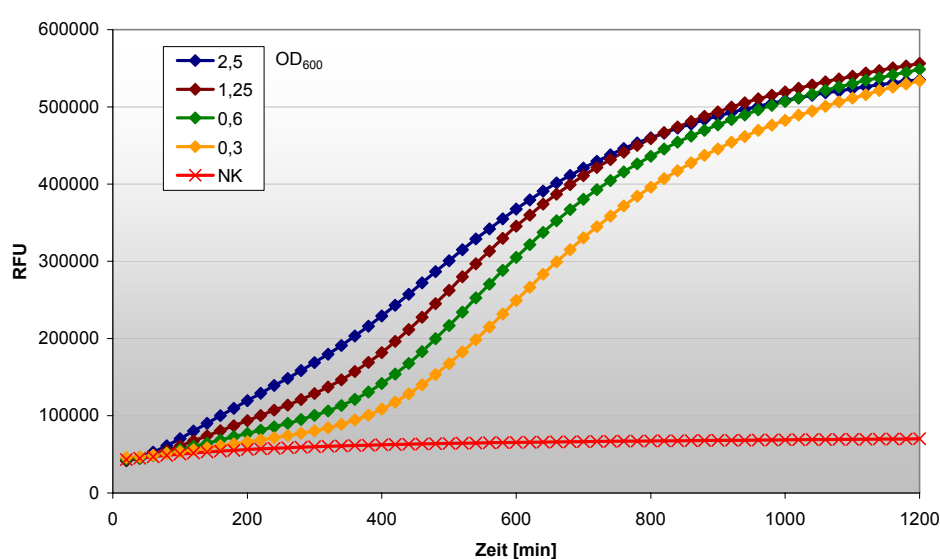


Abb. 53: Spontane Aktivierung von MMP-9. MMP-9 zeigte einen atypischen Kurvenverlauf mit einem plötzlichen Übergang in eine zweite lineare Phase nach ca. 400 min. Die Diskrepanz beider Abschnitte konnte durch Erhöhung der MMP-Konzentration teilweise kompensiert werden (RFU = Relative Fluoreszenz-Einheiten; NK = Negativ-Kontrolle).

Um hinsichtlich des angestrebten Ziels eine möglichst hohe MMP-Aktivität zu erreichen, wurde analysiert, ob sich die biologische Wirkung durch eine nachträgliche Aktivierung weiter steigern ließe. Hierbei wurden zum einen die MMPs in Proregion-defizienten („mature“) Formen exprimiert, zum anderen die Volllängen-Proteine mittels APMA aktiviert. Die „Mature“-Konstrukte zeigten im Vergleich zu nicht aktivierten Volllängen-MMPs eine stark verminderte Aktivität, was die Daten von HOFFMANN (2007) für sekretorische Mature-Konstrukte bestätigte. Die Ursache liegt in einer möglichen Funktion der Proregion als intramolekulares Chaperon, das zur korrekten Faltung des reifen Proteins benötigt wird. Für MMP-14 ist eine solche Funktion bereits nachgewiesen (STERNLICHT & WERB, 2001). WATANABE *et al.* (2001) waren in der Lage, rekombinantes MMP-9 in aktiver Form aus Säugerzellen zu sezernieren, in dem sie eine Furin-Erkennungssequenz zwischen Pro- und katalytische Domäne einbrachten. Durch das Vorhandensein einer funktionalen Proregion im Sekretionsweg wurde die Proteinfaltung nicht negativ beeinflusst.

Die MMP-Aktivierung mittels 4-Aminophenylmercuriumacetat (APMA) ist eine *in vitro*-Methode, die standardmäßig beim praktischen Arbeiten mit MMPs Anwendung findet. Sie beruht nicht auf einer spezifischen proteolytischen Spaltung der Aminosäuresequenz, sondern auf einer Konformationsänderung und somit Destabilisierung der latenten MMP, was letztendlich in einer autoproteolytischen Abspaltung der Proregion resultiert. Die Anwendung dieser Methodik auf die zellwandverankerten Proteine des MMPACE-Systems führte überraschenderweise zu einem vollständigen Verlust der gelatinolytischen Aktivität (vgl. Abb. 47, S. 121). Eine Behandlung mit APMA kann neben der eigentlichen Aktivierung zu einem graduellen Abbau der MMPs führen (OKADA *et al.*, 1990). In dem hier dargestellten speziellen Fall führte dies wahrscheinlich zur Ablösung der MMPs von der Hefezellwand, was eine vollständige Entfernung der Gelatinasen durch die anschließenden Waschschriffe bedingte. Eine Aktivierung zellwandverankerter MMPs ist demnach mit dieser Methode nicht möglich.

Bei der Aktivierung mittels APMA wurden als Negativ-Kontrolle Zellen in AMPA-freiem TTC-Puffer mitgeführt. Eine einstündige Inkubation führte dabei überraschenderweise zu einer deutlichen Erhöhung der gelatinolytischen Aktivität: Die Aktivität von MMP-2 konnte um 80 %, die von MMP-9 um 150 % gesteigert werden. Darüber hinaus führte die Behandlung durch einen Angleich der linearen Abschnitte in der MMP-9-Kurve zu einer einheitlichen Steigung. Die Wirkung wurde möglicherweise durch das im TTC-Puffer enthaltene Triton X-100 gefördert, welches unter anderem zu diesem Zweck bei Zymographien eingesetzt wird (HEUSSEN & DOWDLE, 1980). MARCHENKO *et al.* (2002) beschrieben einen ähnlichen Effekt für die Aktivierung von MMP-26. Der von ihnen verwendete Puffer enthielt in ähnlichen Konzentrationen Brij 35, wie Triton X-100 ein

Polyoxyethylen, als Detergens. Bei einer Temperatur von 4 °C ließen sich die MMPs damit innerhalb von Stunden bis Tagen in ihre aktive Form überführen.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse ist für eine Aktivierung der Gelatinasen eine einstündige Inkubation in TTC-Puffer bei 37 °C am besten geeignet. Die Methode umgeht die Verwendung gesundheits- und umweltschädlicher Organo-Quecksilber-Verbindungen, ist zeit- und kostensparend. Eine alternative Möglichkeit zur optimalen Aktivierung bietet die Verwendung diverser MMPACE-Lagerungsmethoden, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

Lagerung

Um späteren Anwendern eine möglichst unkomplizierte Handhabung des MMPACE-Systems zu ermöglichen, war es notwendig, die Bereitstellung der MMP-beladenen Zellen zu optimieren. Wie bereits dargestellt, nimmt die Produktion aktiver MMPACE-Zellen inklusive aller Vor- und Hauptkulturen mit optimaler Induktionsdauer mehrere Tage in Anspruch und bedarf eines entsprechenden Arbeitsaufwands. Die Kultivierung der Zellen ist für nicht-laborbiologisch ausgebildete Anwender durchaus fehleranfällig; darüber hinaus stehen nur selten alle dafür nötigen Gerätschaften zur Verfügung. Um eine längerfristige Lagerung und damit schnelle Verfügbarkeit der MMPACE-Zellen zu realisieren, wurden Experimente mit Glycerinkulturen und Zell-Lyophilisaten durchgeführt (vgl. Abb. 48, S. 123).

Im Fall der Kryokulturen wurden entsprechende Zellmengen in Reaction Buffer mit 50 % Glycerin aufgenommen und bei -80 °C gelagert. Bei der anschließenden Messung wurden sie nach kurzer Auftauphase direkt in die Mikrotiterplatten pipettiert. Dies ermöglichte eine schnelle, leicht dosierbare Anwendung. Die anschließenden Messreihen zeigten im Vergleich zu den unbehandelten Proben keine Veränderung in der Aktivität. Bei MMP-9 unterblieb lediglich der Übergang in eine zweite lineare Phase (s. o.), was für die Bestimmung der MMP-Aktivität aber unerheblich war.

Bei der Gefriertrocknung wurden definierte Volumina der entsprechenden Kultur lyophilisiert und bei -20 °C eingefroren. Die Zellen konnten durch einfaches Resuspendieren in einem vorgeschriebenen Volumen an Reaction Buffer rekonstituiert werden. Die Messdaten ergaben einen leichten Rückgang der MMP-2-Aktivität, der jedoch kaum ins Gewicht fiel. Bei MMP-9 ermöglichte analog zu den Ergebnissen der Aktivierung mit TTC-Puffer eine Steigerung der Aktivität um 90 % bei gleichzeitiger Angleichung der beiden linearen Phasen. Insgesamt sind beide Methoden für die Lagerung aktiver MMPACE-Zellen sehr gut geeignet. Für eine Präferenz der Glycerinkultur sprechen die konstante Aktivität bei MMP-2 und der geringe Arbeitsaufwand. Insgesamt vereint allerdings die Gefriertrocknung mehr Vorteile in sich. Die fast wasserfreie Konsistenz der lyophilisierten Zellen ermöglicht eine

platzsparende Lagerung und einen unkomplizierten Transport (ähnlich Trockenhefe). In der Praxis sind darüber hinaus keine teuren Hochleistungs-Gefriertruhen vonnöten und die Datenerhebung erfolgt ohne Glycerin im Messansatz.

Auf Grundlage dieser Daten können Hemmstoff-Entwicklern aktive MMPACE-Zellen zur Verfügung gestellt werden, die sofort zur Inhibitor-Testung verwendet werden können. Die einfache und kostengünstige Lagerung in definierten Aliquots umgeht die auf Dauer arbeitsaufwändige Anpassung der gewünschten Zelldichten und die damit verbundene Notwendigkeit einer Anschaffung entsprechender Messgeräte. In der praktischen Anwendung würde eine Pipette zur ‚Herstellung‘ einer Zellsuspension mit definierter optischer Dichte genügen.

Quantifizierung der MMP-Gehalte

Da die MMPs im entwickelten Expressionssystem nicht in Lösung, sondern kovalent mit der Zellwand verbunden vorlagen, war eine Proteinbestimmung auf konventionellem Wege nicht möglich. Die Konzentrationen bzw. relativen Aktivitäten der MMPs wurden daher indirekt durch einen Vergleich mit den Aktivitäten von Enzymlösungen bekannter Konzentration ermittelt. Zur Bestimmung der Masse der MMPs wurden kommerziell erhältliche ‚human active MMPs‘ (CALBIOCHEM) verwendet. Diese waren rekombinant in Säugerzellen hergestellt, nachträglich mittels APMA aktiviert und gereinigt worden. Die Messergebnisse der Verdünnungsreihen der Referenz-Gelatinasen zeigten bei MMP-2 eine um den Faktor 6,7 höhere MMP-Aktivität als bei MMP-9 (vgl. Abb. 49, S. 124). Diese Beobachtung spiegelt die Erkenntnisse bei den Analysen der MMPACE-Aktivitäten wider; dort wurden bei MMP-9 ebenfalls signifikant niedrigere Aktivitäten gemessen. Die Analogie beider MMP-Quellen zeigte sich besonders deutlich bei der anschließenden rechnerischen Ermittlung der MMP-Konzentrationen. Trotz der massiven Abweichungen zwischen den beiden Gelatinasen konnten für beide MMPACE-Stämme nahezu identische Konzentrationen errechnet werden. In einer Zellsuspension der $OD_{600} = 2,5$ wurden für MMP-2 eine Konzentration von 147 ng/ml, für MMP-9 von 142 ng/ml ermittelt; dies entspricht einer Abweichung von weniger als 4 %. Basierend auf diesen Werten konnte der Proteingehalt einer MMPACE-Kultur bei einer angenommenen OD_{600} von 80 mit jeweils ca. 4,5 mg/l ermittelt werden. Im Hinblick auf die in Bioreaktoren erreichbaren Zelldichten bei *P. pastoris* erscheint eine potentielle Proteinmenge im Gramm-Bereich realistisch. Die Proteinmenge, die bei der sekretorischen Expression von rekombinanten Proteinen in *P. pastoris* erreicht werden kann, schwankt in Abhängigkeit vom jeweiligen Produkt von wenigen Milligramm bis mehreren Gramm pro Liter (MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005). Durch die

Zellwandverankerung und die damit nicht gegebene Möglichkeit einer Anreicherung im Kulturmedium ist eine Einordnung der MMPACE-Expression nur bedingt möglich.

Da die getesteten Proben lediglich 72 h induziert und vorher nicht aktiviert worden waren, könnten die absoluten Werte möglicherweise weiter gesteigert werden. Besonders bei MMP-9 sollte die Berechnung zu höheren Aktivitätswerten führen, da die Quantifizierung mit Messdaten der ersten linearen Phase durchgeführt wurde, deren Steigung sich bei vorheriger Aktivierung deutlich erhöht hätte (s. o.). Unter der Annahme, dass beide MMPs in vergleichbaren Mengenverhältnissen auf der Zelloberfläche vorhanden sein sollten, deutet dies darauf hin, dass die in der vorliegenden Arbeit etablierte Methode im Vergleich zur APMA-Behandlung der ‚human active MMP-9‘ eine verbesserte Aktivierung ermöglicht.

Auf Grundlage der erhaltenen Daten war es darüber hinaus möglich, die Größenordnung der Anzahl zellwandverankerter Proteine auf den *P. pastoris*-Zellen zu bestimmen. Bei einer Zahl von etwa 10^7 Zellen pro ml bei $OD_{600} = 1$ konnte für die zellwandverankerten Gelatinasen eine Anzahl von ca. 5×10^4 Molekülen pro Zelle errechnet werden. Diese Berechnung kann aufgrund der Ungenauigkeit vieler Faktoren nur einen Näherungswert beschreiben und ist daher nicht als absolut anzusehen. Interessanterweise liegt die errechnete Kopienzahl der MMPs jedoch exakt in der von SHIBASAKI *et al.* (2001) und NAKAMURA *et al.* (2001) für *S. cerevisiae* ermittelten Größenordnung von 10^4 - 10^5 Molekülen pro Zelle, was die Anwendbarkeit der verwendeten mathematischen Methode weiter untermauert.

Die relative MMP-Aktivität wurde anhand einer Eichgeraden berechnet, die durch Messung einer Verdünnungsreihe einer im Enzcheck® Gelatinase/Collagenase Assay (INVITROGEN) enthaltenen Typ IV-Kollagenase aus *Clostridium histolyticum* erstellt worden war. Die berechneten Enzymaktivitäten für die MMPACE-Proben ergaben Werte von $2,3 \times 10^{-2}$ U/ml für MMP-2 und $1,4 \times 10^{-2}$ U/ml für MMP-9. Eine Unit ist hierbei definiert als die Menge Enzym, die für die Freisetzung von 1 μ Mol L-Leucin-Äquivalenten aus Kollagen in 5 h bei 37 °C und pH 7,5 benötigt wird. Im direkten Vergleich hierzu lag die Aktivität der MMPACE-Gelatinasen bei 34 % (MMP-9) bzw. 55 % (MMP-2) der als Positiv-Kontrolle im Kit enthaltenen Kollagenase.

Inhibitor-Tests

Um die Anwendbarkeit des Testsystems beim Screening von potentiellen MMP-Hemmstoffen zu validieren, wurde eine Messreihe mit einem kommerziell erhältlichen MMP-Inhibitor durchgeführt. Bei 1,10-Phenanthrolin handelt es sich um einen Metallchelator, der von OKADA *et al.* (1990) als Inhibitor von Gelatinasen beschrieben wurde. Die graphische Darstellung der MMPACE-Aktivitäten in Anwesenheit unterschiedlich hoher Inhibitor-

Konzentrationen bestätigte für beide MMPs einen kausalen Zusammenhang zwischen einer Steigerung der 1,10-Phenanthrolin-Konzentration und der Abnahme der MMP-Aktivität (vgl. Abb. 51, S. 127). Die Funktionalität des Testsystems wurde damit erfolgreich nachgewiesen. Um bei einer avisierten praktischen Anwendung des Testsystems einen quantitativen Vergleich zweier Inhibitoren ermöglichen zu können, sollten ebenfalls die Aktivitäten bei unterschiedlichen Verdünnungsstufen gemessen werden. Als Vergleichswerte können dann z. B. die Werte bei den Inhibitor-Konzentrationen fungieren, bei denen nur noch ein definierter Anteil (z. B. 50 %) der maximalen Aktivität vorhanden ist. Bei dem verwendeten unspezifischen Inhibitor 1,10-Phenanthrolin lag dieser Punkt zwischen 0 mM und 0,15 mM. Die optimale Arbeitskonzentration muss jedoch für jeden Hemmstoff individuell ermittelt werden.

Erste Experimente mit potentiellen Inhibitoren wurden in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Organische Chemie der Universität des Saarlandes (Prof. Dr. U. KAZMEIER) durchgeführt. Da die Synthese neuartiger Hemmstoffe zum Test-Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen war, kamen eine Carboxylat- (MP 137) und eine Hydroxamat-Verbindung (MP 146) zum Einsatz, die jeweils als Intermediate in der Syntheseroute zu einem potentiellen Hemmstoff auftraten. Die Molekülstrukturen leiteten sich von einem für MMP-2 und MMP-9 bereits als wirksam beschriebenen Hemmstoff ab (LEE *et al.*, 2004). Die objektive Bewertung mittels des MMPACE-Assays scheiterte an den ungünstigen physikochemischen Eigenschaften der Stoffe. Durch den unpolaren Charakter der intermediären Strukturen waren diese im wässrigen Reaction Buffer nur sehr schwer in Lösung zu bringen, was eine Quantifizierung der Ergebnisse nicht zuließ. Frühere Untersuchungen konnten eine um den Faktor 100-2.000 gesteigerte Funktionalität von Hydroxamaten gegenüber korrespondierenden Carboxylaten nachweisen (BABINE & BENDER, 1997). Eine Bestätigung dieser Beobachtung für die hier getesteten Strukturen war aufgrund der bereits diskutierten Hürden nicht möglich. Eine therapeutische Anwendbarkeit von in wässrigem Milieu schwer löslichen Substanzen darf darüber hinaus bezweifelt werden.

Schritt-für-Schritt-Anleitung

Die in den vorangegangenen Kapiteln gesammelten Ergebnisse ermöglichen das Erreichen einer maximalen Funktionalität bei der praktischen Anwendung des MMPACE-Inhibitor-Testsystems. Die Erkenntnisse wurden in den folgenden Entwurf einer Schritt-für-Schritt-Anleitung umgesetzt.

Benötigte Lösungen

- His-Drop-Out (Agarplatten & Flüssigmedium)
- BMG-Medium (100 mM Na-Phosphatpuffer, pH 7,0)
- BMM-Medium (100 mM Na-Phosphatpuffer, pH 7,0; mit Casaminoacids)
- TTC-Puffer (optional)
- 1 x Reaction Buffer
- DQ™ Gelatine Substrat

Herstellung der MMPACE-Zellen

1. Zellen auf eine His-d/o-Agarplatte ausstreichen und für 3-4 d bei 30 °C inkubieren (*Die Platten können nach dem Wachstum für mehrere Wochen luftdicht verschlossen bei 4 °C gelagert werden. Direktes Überimpfen der Kryokultur/Flüssigkultur in Flüssigmedium sollte vermieden werden.*).
2. 5 ml His-d/o-Medium in einem Reagenzglas mit einer großen MMPACE-Kolonie beimpfen und für 24 h bei 30 °C und 220 rpm kultivieren.
3. 25 ml BMG-Medium in einem 250 ml-Erlenmeyerkolben mit 1 ml Vorkultur beimpfen und für 24 h bei 28 °C und 165 rpm inkubieren.
4. Kultur auf BMM-Medium durch 4 min Zentrifugation bei 8.000 x g shiften (*die Kolben können weiter verwendet werden, es ist kein Waschschrift erforderlich*). Zellen für 96 h bei 28 °C und 165 rpm kultivieren und täglich mit 2 x 1 % Methanol (in möglichst großem zeitlichem Abstand) füttern.
5. Um eine OD₆₀₀ von 5 (OD_{Target}) einzustellen, die optische Dichte der Kultur (OD_{Kultur}) bestimmen und 1 ml steriles H₂O dest. in 2 ml Reaktionsgefäße vorlegen. Das einzusetzende Volumen (V_{Kultur}) errechnet sich nach der Formel:

$$V_{\text{Kultur}} [\mu\text{l}] = \frac{\text{OD}_{\text{Target}} \times V_{\text{Target}}}{\text{OD}_{\text{Kultur}}} = \frac{10.000}{\text{OD}_{\text{Kultur}}}$$

6. Zellen durch 4 min Zentrifugation bei 8.000 x g ernten; Überstand verwerfen. In gefriergetrocknetem Zustand können die Zellen bei -20 °C gelagert werden (*bei Standard-Anwendungen werden 5 Reaktionsgefäße pro 96 Well-Platte benötigt.*).

Aktivierung (optional)

Die Zellen können alternativ direkt nach der Herstellung zur Messung eingesetzt werden: Letzten Punkt der Zellherstellung und den ersten Punkt der Aktivitäts-Messung überspringen.

1. Zellen in 2 ml TTC-Puffer resuspendieren und Reaktionsgefäße für 1 h bei 37 °C und 220 rpm liegend inkubieren.
2. Zellen durch Zentrifugation für 4 min bei 8.000 x g pelletieren und anschließend einmal mit 1 x Reaction Buffer waschen.

Durchführung der MMP-Aktivitäts-Messung

1. Zellen auftauen und in 2 ml 1 x Reaction Buffer (V_{Target}) rekonstituieren.
2. Jeweils 100 µl der Zellsuspension in die gewünschte Anzahl Wells einer schwarzen Mikrotiterplatte pipettieren (*Achtung! Pichia pastoris neigt zu schnellem Sedimentieren. Auf die Homogenität der Suspension achten.*).
3. In 1 x Reaction Buffer eine 4 x Stammlösung des zu testenden Inhibitors herstellen und jeweils 50 µl zu der entsprechenden Zellsuspension in der Mikrotiterplatte geben (*Die optimale Inhibitor-Konzentration muss durch den Endbenutzer festgelegt werden. In jeder Messung sollte eine MMP-Positiv-Kontrolle ohne Inhibitor mitgeführt werden.*).
4. In 1 x Reaction Buffer eine 100 µg/ml DQ™ Gelatine-Stammlösung herstellen und die Reaktionsansätze mit jeweils 50 µl komplettieren.
5. Fluoreszenz in einem geeigneten Fluoreszenz-Reader bei 37 °C für mindestens 400 min detektieren ($\lambda_A = 495 \text{ nm}$; $\lambda_E = 515 \text{ nm}$; empfohlenes Messintervall: 20 min). Um ein Sedimentieren der Zellen zu vermeiden, sollte die Mikrotiterplatte zwischen den Messungen mit ca. 700 rpm (1 mm) geschüttelt werden.

Das Maß für die Aktivität innerhalb des Messansatzes ist die Änderung der Fluoreszenz-Einheiten pro Zeiteinheit ($\Delta\text{RFU}/\text{min}$) im linear verlaufenden Kurvenabschnitt der jeweiligen Messung (*Jeweils Mittelwerte aus mindestens vier Messungen bilden, um eine statistische Belastbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.*).

Vorteile gegenüber herkömmlichen Verfahren

Der zentrale Vorteil des entwickelten Verfahrens liegt in der Art und Weise der Bereitstellung der aktiven Matrix-Metalloproteasen. Herkömmliche Testverfahren sind auf die Verwendung kommerziell erhältlicher MMPs angewiesen, die für die Aktivitätsmessungen, z. B. mittels EnzCheck® Gelatinase/Collagenase Assay, eingesetzt werden. Diese werden aus etablierten Tumor-Zelllinien, wie z. B. HT1080 Fibrosarkoma- (OKADA *et al.*, 1992) und U937 Monoblastoid-Zellen (WATANABE *et al.*, 1993), oder primären Fibroblasten aus pathologischen Geweben, z. B. aus rheumatoiden Gelenken (OKADA *et al.*, 1990), gewonnen, die in Flüssigkultur in der Lage sind, *pro*Gelatinasen und andere MMPs zu sezernieren.

Arbeitsaufwand

Die Vielzahl der im Medium auftretenden Proteine und vor allem das Vorhandensein unterschiedlicher MMPs macht eine kostenaufwändige Reinigung über diverse chromatographische Schritte notwendig. IMAI & OKADA (2008) veröffentlichten kürzlich einen Übersichtsartikel, in dem sie optimierte Reinigungsverfahren für unterschiedliche Matrix-Metalloproteasen vorstellen (vgl. Abb. 54). Die Methoden zur Gewinnung von *pro*MMP-2 und *pro*MMP-9 umfassen hierbei vier bzw. fünf einzelne Reinigungsstufen, die selbst in optimierter Form einen Zeitraum von mehr als zwei Wochen in Anspruch nehmen. Darüber hinaus bringt die sukzessive MMP-Immobilisierung und Elution vergleichsweise hohe Verluste mit sich und die komplexe Durchführung macht das Verfahren anfällig gegen eine Vielzahl von Fehlerquellen. Die resultierenden *pro*MMPs müssen zudem anschließend mittels geeigneter *in vitro*-Verfahren in ihre aktive Form überführt werden, was in der Regel über umweltschädliche Organo-Quecksilber-Verbindungen realisiert wird.

Das MMPACE-System umgeht alle kritischen Reinigungs- und Aktivierungsschritte durch die direkte Verwendung immobilisierter MMPs auf der Oberfläche von Hefezellen. Da *P. pastoris* keine eigenen Matrix-Metalloproteasen besitzt, ist das umgebende Medium weitgehend frei von unerwünschten Fremdprodukten. Ein wesentlicher Vorteil ergibt sich dadurch, dass die Proteine in einem einfachen Zentrifugationsschritt in weniger als 5 min vom Kulturüberstand getrennt und zur Messung eingesetzt werden können. Die Aktivierung findet optional spontan beim Vorgang der Lyophilisation oder in gesundheitlich unbedenklichem TTC-Puffer statt, der später ebenfalls durch Zentrifugation entfernt werden kann. Die biologischen Eigenschaften der Wirtszellen ermöglichen dabei eine konstante Produktion des Ziel-Proteins in gleichbleibend hoher Qualität bei äußerst geringen Kosten.

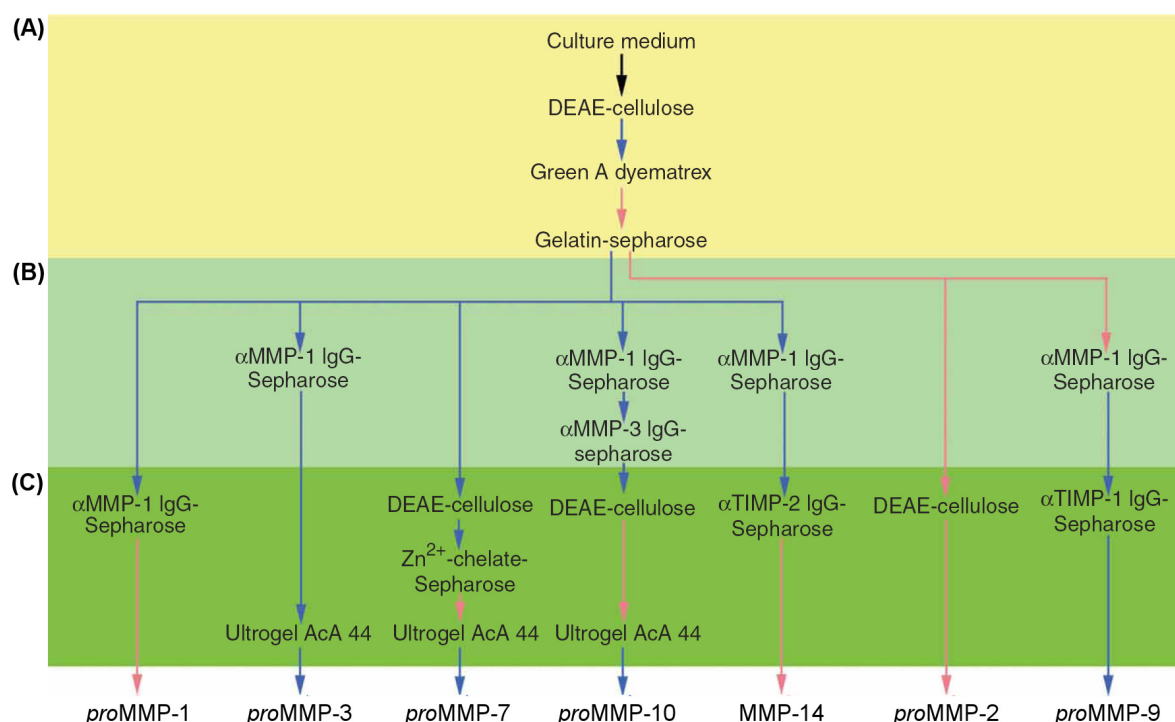


Abb. 54: Reinigung humaner Matrix-Metalloproteasen aus Zellkultur-Medien. (A) Der initiale Schritt trennt die Gelatinasen (*proMMP-2* und *proMMP-9*) von den übrigen MMPs. Schritt (B) dient dem Entfernen von weiteren jeweils unerwünschten MMPs; vor allem wird über eine Anti-MMP-1-IgG-Sepharose-Säule MMP-1 in diesem Schritt entfernt, welches sich nur schwierig durch Größenausschluss-Chromatographie von anderen MMPs trennen lässt. (C) Finaler Schritt zur homogenen Reinigung der MMPs; empfohlen wird eine Größenausschluss-Chromatographie mittels Ultrogel AcA 44-Säule zum Entfernen kontaminierender Rest-Proteine (DEAE = Diethylaminoethyl; blau: Durchfluss; rot: Eluat; nach IMAI & OKADA, 2008).

Kosten

Die Komplexität der beschriebenen Reinigungsverfahren begründet die hohen Kosten, die beim Erwerb industriell hergestellter MMPs anfallen. Durch die heterologe Expression im MMPACE-System können diese Kosten auf ein Minimum reduziert werden:

Im Rahmen der experimentellen Arbeiten wurde eine Quantifizierung des MMP-Gehalts im Kulturmedium durch einen Vergleich der Aktivität der MMPACE-Zellen mit denen kommerziell erworbener Produkte („human active MMPs“, CALBIOCHEM) bekannter Konzentration durchgeführt. Die Berechnung ergab eine theoretische MMP-Konzentration von jeweils mehr als 4,5 mg/l_{Kulturmedium}. Basierend auf dem derzeit aktuellen Nettopreis von jeweils 309,- € für 5 µg aktivierte Gelatinase A bzw. B (CALBIOCHEM) entspricht diese Menge einem finanziellen Gegenwert von $([>4.500 \mu\text{g} / 5 \mu\text{g}] \times 309,- \text{€}) \approx 280.000,- \text{€}$. Wie in Tab. 10 dargestellt, sind die Herstellungskosten dabei verschwindend gering. Basierend auf aktuellen Preislisten erfordert die Herstellung eines Liters MMPACE-Kultur in der empfohlenen Medien-Zusammensetzung einen finanziellen Aufwand von ca. 8,- €. Die Aufstellung berücksichtigt alle Phasen in Flüssigkultur, einschließlich aller Vor- und Hauptkulturen und einer Methanol-Phase von fünf Tagen; Energiekosten sind nicht berücksichtigt.

Tab. 10: Kalkulation der Kosten zur Herstellung von 1 l MMPACE-Kultur. Die Daten berücksichtigen die Zusammensetzung aller Vor- und Hauptkulturen (inkl. 5 d MeOH-Phase) in der erforderlichen Menge. Die Kosten basieren auf den Netto-Preisangaben der Hersteller APPLICHEM bzw. ROTH in 09/2008.

	benötigte Mengen				Preis pro kg bzw. l	Kosten
	His-d/o (40 ml)	BMG (1 l)	BMM (1 l)	gesamt		
Ammoniumsulfat	0,2 g	10 g	10 g	20,20 g	22,15 €	0,45 €
d/o-Mix	0,04 g	-	-	0,04 g	~ 70,00 €	0,03 €
YNB	0,07 g	3,4 g	3,4 g	6,87 g	502,70 €	3,45 €
Na-D/hydrogenphosphat	0,13 g	11,8 g	11,8 g	23,73 g	31,95 €	0,76 €
DiNa-Hydrogenphosphat	0,14 g	2,3 g	2,3 g	4,74 g	31,95 €	0,15 €
Glycerol	-	20 ml	-	20 ml	36,60 €	0,73 €
MeOH	-	-	100 ml	100 ml	15,80 €	1,58 €
Casaminoacids	-	-	10 g	10 g	83,80 €	0,84 €
					gesamt:	7,99 €

Durch die Verwendung des MMPACE-Bioassays lassen sich die Gesamtkosten bei einem Inhibitor-Test im Vergleich zu herkömmlichen Verfahrensweisen um 85 % senken. Tab. 11 gibt eine vergleichende Kalkulation eines Hemmstoff-Tests in einer 96 Well-Mikrotiterplatte für das MMPACE-System auf der einen und unter Verwendung der ‚human active MMPs‘ (CALBIOCHEM) auf der anderen Seite wieder. Die Kosten für das MMP-Substrat und die Mikrotiterplatte sind bei beiden Methoden gleich. Die zentrale Ursache der Ersparnis beim MMPACE-System liegt in der quasi kostenlosen Bereitstellung der aktiven Gelatinasen. Bei einer für Hemmstoff-Tests optimalen Konzentration von 150 ng/ml ergibt sich im kommerziellen *in vitro*-System für eine komplette 96 Well-Platte ($96 \times 200 \mu\text{l} = 19,2 \text{ ml}$) ein Bedarf an 2,9 μg ‚human active MMPs‘. Bei Verwendung der MMPACE-Zellen entspricht dies der Gelatinase-Aktivität bei einer OD_{600} von 2,5. Wie oben beschrieben liegen die Herstellungskosten bei ca. 8,- € pro Liter MMPACE-Kultur. Abhängig von der finalen optischen Dichte reicht die darin enthaltene Zell-Menge für 1.500 bis 2.000 Mikrotiterplatten aus, weshalb die Kosten einer einzigen Platte vernachlässigbar sind ($8,- \text{ €} / 2.000 < 0,01 \text{ €}$).

Das enorme Einsparungspotential, das die Anwendung dieser Methode mit sich bringt, macht den Assay besonders für nicht-kommerzielle Forschungseinrichtungen, wie z. B. Universitäten interessant, denen damit eine Hochdurchsatz-Inhibitor-Testung bei einem überschaubaren finanziellen Aufwand zur Verfügung gestellt wird.

Tab. 11: Kalkulation eines MMPACE-Inhibitor-Tests im Vergleich mit herkömmlichen Verfahren. Die Berechnung bezieht sich auf die Kosten für die Messung einer kompletten Mikrotiterplatte (96 Proben). Die Daten stützen sich auf Netto-Preisangaben der Hersteller in 09/2008. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die jeweilige Endkonzentration im Messansatz (kommerzielle MMPs: ‚human active MMPs‘, CALBIOCHEM; Mikrotiterplatten: # 265301, NUNC; Substrat: DQ™ Gelatine, INVITROGEN).

	Menge	Preis pro mg bzw. Stück	MMPACE	kommerziell
MMPs (150 ng/ml)	2,9 µg	61,80 €	0,01 €	185,40 €
Mikrotiterplatte	1 Stk.	6,40 €	6,40 €	6,40 €
DQ™ Gelatine (25 µg/ml)	480 µg	54,38 €	26,10 €	26,10 €
		gesamt:	32,51 €	217,90 €
			14,9 %	100 %

Ausblick

Das fächerübergreifende Forschungsprojekt, als dessen Teil sich die vorliegende Arbeit versteht, hat zum Ziel, mittelfristig neuartige MMP-Inhibitoren zur therapeutischen Anwendung, z. B. in der Krebsbehandlung, zu entwickeln. Auf Basis bioinformatisch modellierter Strukturen soll eine chemische Synthese neuartiger Hemmstoffe erfolgen, deren Wirksamkeit anschließend durch Krystallographie-Studien an MMP-Inhibitor-Komplexen und durch quantitative Vergleiche mittels des MMPACE-Systems validiert werden soll.

Sekretorische MMPs

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur sekretorischen Expression von Matrix-Metalloproteasen dienen als Grundlage zur Bereitstellung ausreichend großer Mengen an Gelatinasen, die zu späteren strukturellen Analysen verwendet werden können. Für die humanen Matrix-Metalloproteasen MMP-2 und MMP-9 erwies sich *Pichia pastoris* als einziger Organismus in der Lage, beide Gelatinasen in biologisch aktiver Form zu produzieren. Die Protein-Expression in *P. pastoris* ist jedoch in hohem Maße von der Stabilität der Kultivierungsbedingungen abhängig, weshalb bis heute aufwändige Versuche zur Verbesserung dieser Parameter angestellt werden. Die Datenerhebungen belegen dabei einen signifikanten Einfluss bei minimalen Veränderungen diverser Faktoren, wie z. B. Stickstoffquelle (PRITCHETT & BALDWIN, 2004), Spurenelemente (PLANTZ *et al.*, 2007), Temperatur (JAHIC *et al.*, 2003*) oder Zelldichte (ZHANG *et al.*, 2004). Die Untersuchungen reichen dabei von der Untersuchung des Schüttelkolben-Designs (VILLATTE *et al.*, 2001) bis hin zu mathematischen Modellen zur Maximierung der Proteinproduktion (ZHANG *et al.*, 2005).

Die engen Toleranzbereiche der Hefe bei Variationen dieser Parameter ließen innerhalb der praktischen Rahmenbedingungen der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente lediglich eine tendenzielle Aussage über optimale MMP-Expressionen zu. Eine wirkliche Optimierung der MMP-Produktion kann nur individuell unter eng kontrollierbaren Bedingungen in einem Bioreaktor erfolgen, bei der die bisher ermittelten Ergebnisse als Grundlage dienen können. Das zentrale Anliegen sollte dabei die Stabilisierung der sekretorischen Gelatinasen sein. Bisher konnten vielversprechende Erfolge durch Verwendung eines Na-Phosphatpuffers mit pH 7,0 und durch die Zugabe eines Protease-Inhibitors in der Methanolphase erzielt werden.

Um einen späteren Aktivierungsschritt umgehen zu können, ist eine zusätzliche Expression von intrazellulär aktivierten Formen sinnvoll. Das Vorhandensein der Proregion bei der Protein-Faltung ist dabei zum Erreichen einer voll funktionalen, aktiven Matrix-Metalloprotease von zentraler Bedeutung. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten ‚mature‘-Varianten, die ohne Proregion exprimiert wurden, zeigten eine enzymatische Aktivität, die weit unter der der Volllängen-Konstrukte zurückblieb. WATANABE *et al.* (2001) konnten in CHO-K1-Zellen eine rekombinante Form von MMP-9 als aktives Enzym sezernieren, indem sie eine Furin-Erkennungssequenz zwischen Pro- und katalytischer Domäne einbrachten. Für *P. pastoris* ist daher ein ebenso erfolgreicher Einsatz einer Kex-Protease-Schnittstelle denkbar.

Bei der späteren Reinigung der MMPs aus dem Kulturmedium sollte auf den Einsatz von Tag-Sequenzen verzichtet werden. Die von IMAI & OKADA (2008) etablierten Verfahren für MMPs aus Säuger-Zellkulturen ermöglichen eine Reinigung über diverse chromatographische Verfahren. Da im *Pichia*-Kulturüberstand an heterologen Proteinen ausschließlich die gewünschte MMP vorhanden ist, kann auf eine sonst notwendige Separierung von Komponenten wie MMP-2 bzw. MMP-9, MMP-14 oder TIMP-1 verzichtet werden, was das Verfahren um ein Vielfaches beschleunigt.

MMPACE-II & -IX

Durch die Etablierung des MMPACE-Inhibitor-Screening-Systems wurde die Basis zur quantitativen Bestimmung der Wirksamkeit neuer MMP-Hemmstoffe bei geringem finanziellen Aufwand geschaffen. Durch die einfache Handhabung durch das mittels der Schritt-für-Schritt-Anleitung standardisierte Messverfahren und die Möglichkeit einer langfristigen Lagerung der MMPACE-Zellen kann das System ohne molekular- oder zellbiologische Grundkenntnisse ähnlich eines *in vitro*-Assays verwendet werden und ist somit für jedermann anwendbar. Im Kontext des UdS-MMP-Forschungsprojekts stellt die Fertigstellung des funktionalen Aktivitäts-Assays die Grundlage für den Ausbau weiterer Forschungstätigkeiten zur Entwicklung neuer MMP-Hemmstoffe dar. Durch die massive

Kostensenkung kann eine Vielzahl an Inhibitoren mit hohem Durchsatz getestet und somit mittelfristig deren Spezifität verbessert werden.

Um das große Potential des Assays ausschöpfen zu können, sollten parallel weitere Verbesserungen und Umgestaltungen des Systems erfolgen. Die MMP-Aktivität der einzelnen Zelle kann möglicherweise durch künstliche Verlängerungen der Ankersequenzen gesteigert werden. Analog zu den Untersuchungen von BREINIG & SCHMITT (2002) und WASHIDA *et al.* (2001) kann dies in einer verbesserten Substrat-Zugänglichkeit und somit erhöhter Gesamtaktivität resultieren. Empfehlenswert ist eine Verwendung Ser/Thr-reicher Sequenzen, die durch ihre starke Glykosylierung eine Streckung und somit verbesserte Präsentation des jeweiligen Enzyms ermöglichen (BREINIG & SCHMITT, 2002). Grundsätzlich ist auch bei den zellwandverankerten MMPs eine Produktionsoptimierung im Bioreaktor dringend zu empfehlen, womit sich die Aktivitätswerte zumindest begrenzt steigern ließen. Um die Schritte zur nachträglichen Aktivierung der zellwandverankerten MMPs umgehen zu können, sollte wie bereits für die sekretorischen Proteine vorgeschlagen, analog zu WATANABE *et al.* (2001) eine artifizielle Proproteinkonvertase-Schnittstelle zwischen Pro- und katalytischer Region eingebaut werden, um eine intrazelluläre Prozessierung in eine korrekt gefaltete aktive Form zu ermöglichen.

Den Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 kommt eine Schlüsselfunktion bei der Entwicklung und Metastasierung von Tumoren zu, allerdings tragen auch Fehlfunktionen anderer MMPs zur Förderung diverser Krankheitsbilder bei. Für alle humanen MMPs (ausgenommen MMP-18, MMP-22, MMP-23 und MMP-27) wurden Fehlregulationen in Verbindung mit Tumorbildung beobachtet. Neben MMP-2 und MMP-9 ist vor allem MMP-1 die am häufigsten bei Krebs nachgewiesene Matrix-Metalloprotease (CORBITT *et al.*, 2007). Darüber hinaus spielen beispielsweise MMP-3, MMP-7 oder MMP-13 bei diversen Krebsarten, wie z. B. Haut- oder Brustkrebs, eine Rolle (WALKER & WOOLLEY, 1999; BEEGHLY-FADIEL *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2008). Für alle der genannten existieren dem für die Gelatinasen verwendeten Enzcheck® Gelatinase/Collagenase Assay vergleichbare Fluoreszenz-Kits (z. B. IQ™ von PIERCE oder SensoLyte™ von ANASPEC), die mehr oder minder leicht an die Verwendung mit zellwandbasierten Enzymen adaptiert werden könnten. Die entsprechenden MMPs könnten analog zu den Gelatinasen auf der Zelloberfläche von *P. pastoris* verankert und zur Aktivitätsmessung heran gezogen werden. Damit könnten ebenfalls Inhibitoren gegen diese tumorrelevanten Enzyme getestet werden. Im Umkehrschluss könnten die Wirkungen von z. B. Gelatinase-Inhibitoren direkt an anderen MMPs getestet werden, um unerwünschte Kreuzreaktionen bei der späteren therapeutischen Anwendung frühzeitig auszuschließen.

5. Zusammenfassung

Die Extrazelluläre Matrix höherer Organismen unterliegt einem Fließgleichgewicht dynamischer Auf- und Abbauprozesse, deren Regulation von Matrix-Metalloproteasen (MMPs) übernommen wird. Diese sind in der Lage, in ihrer Gesamtheit alle Matrix-Bestandteile, wie Strukturkomponenten, Adhäsionsproteine oder Signalmoleküle abzubauen bzw. zu prozessieren. Durch ihre zentrale Funktion unterliegen sie dabei selbst einem empfindlichen Netzwerk vielfältiger Kontrollebenen. Diverse Krankheitsbilder, wie Diabetes mellitus, Arthritis und vor allem die Entwicklung und Metastasierung maligner Tumore gehen häufig mit einer fehlerhaften MMP-Regulation einher, weshalb die Applikation geeigneter MMP-Hemmstoffe einen fundamentalen Beitrag zur erfolgreichen Therapie dieser Krankheiten liefern könnte. Insbesondere die humanen Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 sind überdurchschnittlich häufig bei pathologischen Veränderungen vertreten und stehen daher im Fokus der pharmazeutischen Forschung. Erste Inhibitor-Generationen dämpften jedoch die in sie gesetzten Erwartungen, weil ihr Einsatz mit starken Nebenwirkungen verbunden war. Als zentrale Ursache stellte sich das breite Wirkungsspektrum der Medikamente heraus, weshalb derzeit die Erhöhung der Hemmstoff-Spezifität primäres Ziel ist. Die für die Forschung benötigten MMP-Präparate werden zurzeit unter hohem Arbeits- und Kostenaufwand aus Tumor-Zelllinien oder Fibroblasten gewonnen, was ein effektives Hochdurchsatz-Inhibitor-Screening, insbesondere bei nicht-kommerziellen Einrichtungen erschwert. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit ein zellbasierter MMP-Bioassay etabliert, der die Kosten beim Screening nach potentiellen Inhibitoren um 85 % reduziert. Die Entwicklung basierte auf einer heterologen Expression der humanen Matrix-Metalloproteasen MMP-2 und MMP-9 und deren Immobilisierung auf der Zellwand von Hefen und die Anpassung eines kommerziell erhältlichen *in vitro*-Assays an ein zellbasiertes Testsystem.

Zur Identifikation eines geeigneten Expressionswirts wurden die Gelatinasen in den biotechnologisch relevanten Organismen *E. coli*, *K. lactis*, *P. pastoris*, *S. cerevisiae*, *S. pombe* und *Z. bailii* zur Sekretion gebracht. Dabei war *P. pastoris* als einziger Organismus in der Lage, beide MMPs in ausreichend hoher Qualität als biologisch aktive Enzyme zu produzieren. Ergänzende grundlegende Untersuchungen zur Optimierung der MMP-Produktion in *P. pastoris* dienten als Grundlage für die spätere Expression in zellwandverankerter Form.

Da für *P. pastoris* nur eine überschaubare Menge an Zelloberflächen-Expressionssystemen existiert, wurden vergleichende Experimente zur Zellwand-Expression in diesem Organismus durchgeführt. Esterase A aus *Burkholderia gladioli* diente als Reporterprotein zum Vergleich der Immobilisierungs-Effizienzen der *S. cerevisiae*-Zellwandproteine Cwp2p, Pir1p und Sed1p. Im Rahmen der Untersuchungen konnten mit Cwp2p und Sed1p zwei neuartige Verankerungs-Systeme für *P. pastoris* identifiziert werden. Mit Sed1p wurde ein hoch

effizientes Zelloberflächen-Expressionssystem für *P. pastoris* etabliert, das die für *S. cerevisiae* maximal erreichbare Immobilisierungs-Effizienz um den Faktor 6,7 übertrifft.

Um eine praktische Anwendung zu ermöglichen, wurde ein kommerziell erhältlicher Gelatinase-Assay bezüglich der Parameter Zelldichte und Substratkonzentration an die Anforderungen eines zellbasierten Systems angepasst und die MMP-Bereitstellung bezüglich Kultivierungsbedingungen, Aktivierung und Lagerungsfähigkeit optimiert. Die Funktionalität des so entwickelten und als ‚MMPACE‘ bezeichneten Assays wurde anhand von Messreihen mit einem bekannten MMP-Inhibitor validiert.

Die rekombinante Herstellung der MMPs ermöglicht eine unbegrenzte und kostengünstige Bereitstellung der Enzyme für Inhibitor-Screenings. Eine Schritt-für-Schritt-Anleitung ermöglicht einen objektiven, quantitativen Vergleich der Hemmstoff-Wirkungen durch ein einfaches, standardisiertes Messverfahren.

Die vorliegende Arbeit versteht sich als Beitrag zu einem Verbundprojekt der Universität des Saarlandes, bei dem die fachlichen Ressourcen von Bioinformatik (zum Modelling von MMP-Inhibitoren), Organischer Chemie (zur Synthese dieser Inhibitoren) sowie Strukturbiochemie (zur Strukturaufklärung von MMP/Inhibitor-Komplexen) zur Entwicklung neuartiger MMP-Inhibitor-Leitstrukturen vereinigt wurden. Die Etablierung des MMPACE-Bioassays ist Grundlage für die direkte Validierung potentieller Hemmstoffe, die mittelfristig eine Tumorthherapie ermöglichen sollen.

6. Literatur

AGRAWAL SM, LAU L, YONG VW. MMPs in the central nervous system: where the good guys go bad. *Semin Cell Dev Biol.* **2008**, 19(1): 42-51

AMĂLINEI C, CĂRUNTU ID, BĂLAN RA. Biology of metalloproteinases. *Rom J Morphol Embryol.* **2007**, 48(4): 323-34

AMTHAUER R, KODUKULA K, GERBER L, UDENFRIEND S. Evidence that the putative COOH-terminal signal transamidase involved in glycosylphosphatidylinositol protein synthesis is present in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1993**, 90(9): 3973-7

BABINE RE, BENDER SL. Molecular recognition of protein-ligand complexes: applications to drug design. *Chem Rev.* **1997**, 97 (5): 1359-472

BANNIKOV GA, KARELINA TV, COLLIER IE, MARMER BL, GOLDBERG GI. Substrate binding of gelatinase B induces its enzymatic activity in the presence of intact propeptide. *J Biol Chem.* **2002**, 277(18): 16022-7

BEEGHLY-FADIEL A, SHU XO, LONG J, LI C, CAI Q, CAI H, GAO YT, ZHENG W. Genetic polymorphisms in the MMP-7 gene and breast cancer survival. *Int J Cancer.* **2008**, 124(1): 208-214.

BERNARDY G. Herstellung von Polyepitopkassetten zur Etablierung einer Hefe-basierten Impfstrategie. Diplomarbeit, Zentrum für Human- und Molekularbiologie (ZHMB), *Universität des Saarlandes*, **2006**

BIRNBOIM HC. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **1983**; 100: 243-255

BODE W, GOMIS-RÜTH FX, STÖCKLER W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett.* **1993**, 331(1-2): 134-40

BRANDUARDI P, VALLI M, BRAMBILLA L, SAUER M, ALBERGHINA L, PORRO D. The yeast *Zygosaccharomyces bailii*: a new host for heterologous protein production, secretion and for metabolic engineering applications. *FEMS Yeast Res.* **2004**, 4(4-5): 493-504

BREINIG F, DIEHL B, RAU S, ZIMMER C, SCHWAB H, SCHMITT MJ. Cell surface expression of bacterial esterase A by *Saccharomyces cerevisiae* and its enhancement by constitutive activation of the cellular unfolded protein response. *Appl Environ Microbiol.* **2006**, 72: 7140-47

BREINIG F, SCHMITT MJ. Spacer-elongated cell wall fusion proteins improve cell surface expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2002**, 58(5): 637-44

BROOKS PC, STRÖMBLAD S, SANDERS LC, VON SCHALSCHA TL, AIMES RT, STETLER-STEVENSON WG, QUIGLEY JP, CHERESH DA. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin $\alpha\beta$ 3. *Cell.* **1996**, 85(5): 683-93

BURNETTE WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate – polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* **1981**, 112(2): 195-203

CALVIN NM, HANAWALT PC. High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol.* **1988**, 170(6): 2796-801

CAMPBELL NA, REECE JB. Biology. *Pearson Education Benjamin Cummings.* **2004.**

COLE MB, KEENAN MH. Synergistic effects of weak-acid preservatives and pH on the growth of *Zygosaccharomyces bailii*. *Yeast.* **1986**, 2(2): 93-100

COLLIER IE, WILHELM SM, EISEN AZ, MARMER BL, GRANT GA, SELTZER JL, KRONBERGER A, HE CS, BAUER EA, GOLDBERG GI. H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen. *J Biol Chem.* **1988**, 263(14): 6579-87

COLUSSI PA, TARON CH. *Kluyveromyces lactis* LAC4 promoter variants that lack function in bacteria but retain full function in *K. lactis*. *Appl Environ Microbiol.* **2005**, 71(11): 7092-8

COOPER A, BUSSEY H. Characterization of the yeast KEX1 gene product: a carboxypeptidase involved in processing secreted precursor proteins. *Mol Cell Biol.* **1989**, 9: 2706-14

CORBITT CA, LIN J, LINDSEY ML. Mechanisms to inhibit matrix metalloproteinase activity: where are we in the development of clinically relevant inhibitors? *Recent Patents Anticancer Drug Discov.* **2007**, 2(2): 135-45

CREGG JM, MADDEN KR, BARRINGER KJ, THILL GP, STILLMAN CA. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol.* **1989**, 9(3): 1316-23

CREGG, J.M. AND K.A. RUSSELL. Transformation methods, p. 27-39. In D.R. Higgins and J.M. Cregg (Eds.), *Methods in Molecular Methods Molecular Biology*, Vol. 103: *Pichia Protocols*. **1998**, Humana Press, Totowa, NJ.

DATO L, SAUER M, PASSOLUNGI S, PORRO D, BRANDUARDI P. Investigating the multibudded and binucleate phenotype of the yeast *Zygosaccharomyces bailii* growing on minimal medium. *FEMS Yeast Res.* **2008**, 8(6):906-15

DÍAZ N, SUAREZ D, SORDO TL. Quantum chemical study on the coordination environment of the catalytic zinc ion in matrix metalloproteinases. *J Phys Chem B.* **2006**, 110(47): 24222-30

DING XY, LI CH, SUN LY, WANG HL. Expression, purification and identification of human matrix metalloproteinase-2. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* **2001**, 17(6): 643-7

DOHMEN RJ, STRASSER AWM, HÖNER CB & HOLLENBERG CP. An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera. *Yeast.* **1991**, 7: 691-692

DOI S, TANABE K, WATANABE M, YAMAGUCHI M, YOSHIMURA M. An α -specific gene, *SAG1* is required for sexual agglutination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet.* **1989**, 15(6): 393-8

DORMÁN G, KOCSIS-SZOMMER K, SPADONI C, FERDINANDY P. MMP inhibitors in cardiac diseases: an update. *Recent Patents Cardiovasc Drug Discov.* **2007**, 2(3): 186-94

DOWER WJ, MILLER JF, RAGSDALE CW. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **1988**, 16(13): 6127-45

DOYLE GA. Expression of recombinant matrix metalloproteinases in yeast. *Methods Mol Biol.* **2001**, 151: 219-38

DUJON B, SHERMAN D, FISCHER G, DURRENS P, CASAREGOLA S, LAFONTAINE I, DE MONTIGNY J, MARCK C, NEUVÉGLISE C, TALLA E, GOFFARD N, FRANGEUL L, AIGLE M, ANTHOUARD V, BABOUR A, BARBE V, BARNAY S, BLANCHIN S, BECKERICH JM, BEYNE E, BLEYKASTEN C, BOISRAMÉ A, BOYER J, CATTOLICO L, CONFANIOLERI F, DE DARUVAR A, DESPONS L, FABRE E, FAIRHEAD C, FERRY-DUMAZET H, GROPPA A, HANTRAYE F, HENNEQUIN C, JAUNIAUX N, JOYET P, KACHOURI R, KERREST A, KOSZUL R, LEMAIRE M, LESUR I, MA L, MULLER H, NICAUD JM, NIKOLSKI M, OZTAS S, OZIER-KALOGEROPOULOS O, PELLENZ S, POTIER S, RICHARD GF, STRAUB ML, SULEAU A, SWENNEN D, TEKAIA F, WÉSOŁOWSKI-LOUVEL M, WESTHOF E, WIRTH B, ZENIOU-MEYER M, ZIVANOVIC I, BOLOTIN-FUKUHARA M, THIERRY A, BOUCHIER C, CAUDRON B, SCARPELLI C, GAILLARDIN C, WEISSENBAACH J, WINCKER P, SOUCIET JL. Genome evolution in yeasts. *Nature*. **2004**, 430(6995): 35-44

DURFEE T, NELSON R, BALDWIN S, PLUNKETT G 3RD, BURLAND V, MAU B, PETROSINO JF, QIN X, MUZNY DM, AYELE M, GIBBS RA, WEINSTOCK GM, AND BLATTNER FR. The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. *J Bacteriol*. **2008**, 190(7): 2597-606

EGWIM IO, GRUBER HJ. Spectrophotometric measurement of mercaptans with 4,4'-dithiodipyridine. *Anal Biochem*. **2001**, 288(2): 188-94

EIDEN-PLACH A, ZAGORC T, HEINTEL T, CARIUS Y, BREINIG F, SCHMITT MJ. Viral preprotoxin signal sequence allows efficient secretion of green fluorescent protein by *Candida glabrata*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Schizosaccharomyces pombe*. *Appl Environ Microbiol*. **2004**, 70(2): 961-6

ELKINS PA, HO YS, SMITH WW, JANSON CA, D'ALESSIO KJ, MCQUENEY MS, CUMMINGS MD, ROMANIC AM. Structure of the C-terminally truncated human proMMP9, a gelatin-binding matrix metalloproteinase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. **2002**, 58(7): 1182-92

ERIKSSON OE, WINKA K. Supraordinal taxa of *Ascomycota*. *Myconet*. **1997**, 1: 1-16

FAZEKAS DE ST GROTH S, WEBSTER RG, DATYNER A. Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochim Biophys Acta*. **1963**, 71: 377-91

FERNÁNDEZ-RESA P, MIRA E, QUESADA AR. Enhanced detection of casein zymography of matrix metalloproteinases. *Anal Biochem*. **1995**, 224(1): 434-5

FINGLETON B. MMPs as therapeutic targets – still a viable option? *Semin Cell Dev Biol.* **2008**, 19(1): 61-8

FORSBURG SL, RHIND N. Basic methods for fission yeast. *Yeast.* **2006**, 23(3): 173-83

FORSYTH PA, WONG H, LAING TD, REWCASTLE NB, MORRIS DG, MUZIK H, LECO KJ, JOHNSTON RN, BRASHER PM, SUTHERLAND G, EDWARDS DR. Gelatinase-A (MMP-2), gelatinase-B (MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) are involved in different aspects of the pathophysiology of malignant gliomas. *Br J Cancer.* **1999**, 79(11-12): 1828-35

FRANCISCO JA, EARHART CF, GEORGIU G. Transport and anchoring of β -lactamase to the external surface of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1992**, 89(7): 2713-7

FRIDMAN R, TOTTH M, PEÑA D, MOBASHERY S. Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP-2). *Cancer Res.* **1995**, 55(12): 2548-55

FU X, PARKS WC, HEINECKE JW. Activation and silencing of matrix metalloproteinases. *Semin Cell Dev Biol.* **2008**, 19(1): 2-13

FUJITA Y, TAKAHASHI S, UEDA M, TANAKA A, OKADA H, MORIKAWA Y, KAWAGUCHI T, ARAI M, FUKUDA H, KONDO A. Direct and efficient production of ethanol from cellulosic material with a yeast strain displaying cellulolytic enzymes. *Appl Environ Microbiol.* **2002**, 68(10): 5136-41

GERG M, KOPITZ C, SCHATEN S, TSCHUKES A, KAHLERT C, STANGL M, VON WEYHERN CW, BRÜCHER BL, EDWARDS DR, BRAND K, KRÜGER A. Distinct functionality of tumor cell-derived gelatinases during formation of liver metastases. *Mol Cancer Res.* **2008**, 6(3): 341-51

GIANNOPOULOS G, PAVLAKIS K, PARASI A, KAVATZAS N, TINIAKOS D, KARAKOSTA A, TZANAKIS N, PEROS G. The expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and their tissue inhibitor 2 in pancreatic ductal and ampullary carcinoma and their relation to angiogenesis and clinicopathological parameters. *Anticancer Res.* **2008**, 28(3B): 1875-81

GIESSELMANN E. Analyse der *in vivo*-Topologie des zellulären HDEL-Rezeptors Erd2p. Diplomarbeit, Zentrum für Human- und Molekularbiologie (ZHMB), *Universität des Saarlandes*, **2007**

GIETZ RD, SCHIESTL RH, WILLEMS AR, WOODS RA. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*. **1995**, 11(4): 355-60

GILL SE, PARKS WC. Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *Int J Biochem Cell Biol*. **2008**, 40(6-7): 1334-47

GOFFEAU A, BARRELL BG, BUSSEY H, DAVIS RW, DUJON B, FELDMANN H, GALIBERT F, HOHEISEL JD, JACQ C, JOHNSTON M, LOUIS EJ, MEWES HW, MURAKAMI Y, PHILIPPSEN P, TETTELIN H, OLIVER SG. Life with 6000 genes. *Science*. **1996**, 274(5287): 546, 563-7

GRANT SG, JESSEE J, BLOOM FR, HANAHAN D. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1990**, 87(12): 4645-9

GROSS J, LAPIERE CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1962**, 48: 1014-22

HAGENSON MJ. Production of recombinant proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Bioprocess Technol*. **1991**, 12: 193-212

HAMILTON SR, DAVIDSON RC, SETHURAMAN N, NETT JH, JIANG Y, RIOS S, BOBROWICZ P, STADHEIM TA, LI H, CHOI BK, HOPKINS D, WISCHNEWSKI H, ROSER J, MITCHELL T, STRAWBRIDGE RR, HOOPES J, WILDT S, GERNGROSS TU. Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins. *Science*. **2006**, 313(5792): 1441-3

HANAHAN D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. **1983**, 166(4): 557-80

HARTLAND RP, VERMEULEN CA, KLIS FM, SIETSMA JH, WESSELS JG. The linkage of (1-3)- β -glucan to chitin during cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **1994**, 10(12): 1591-9

HARTNER FS, GLIEDER A. Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts. *Microb Cell Fact*. **2006**, 5: 39

HASTY KA, POURMOTABBED TF, GOLDBERG GI, THOMPSON JP, SPINELLA DG, STEVENS RM, MAINARDI CL. Human neutrophil collagenase. A distinct gene product with homology to other matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* **1990**, 265(20): 11421-4

HEDGES SB. The origin and evolution of model organisms. *Nat Rev Genet.* **2002**, 3(11): 838-49

HEINTEL T, ZAGORC T, SCHMITT MJ. Expression, processing and high level secretion of a virus toxin in fission yeast. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2001**, 56(1-2): 165-72

HEUSSEN C, DOWDLE EB. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal Biochem.* **1980**, 102(1): 196-202

HITZEMAN RA, HAGIE FE, LEVINE HL, GOEDDEL DV, AMMERER G, HALL BD. Expression of a human gene for interferon in yeast. *Nature.* **1981**, 293(5835): 717-22

HOFFMANN TM. Expression humaner Matrix-Metalloproteasen (MMP) in den Hefen *Kluyveromyces lactis* und *Pichia pastoris* zur Entwicklung eines *in vivo* Testsystems für potentielle MMP-Inhibitoren. Diplomarbeit, Zentrum für Human- und Molekularbiologie (ZHMB), Universität des Saarlandes, **2007**

HOFMANN UB, WESTPHAL JR, WAAS ET, ZENDMAN AJ, CORNELISSEN IM, RUITER DJ, VAN MUIJEN GN. Matrix metalloproteinases in human melanoma cell lines and xenografts: increased expression of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) correlates with melanoma progression. *Br J Cancer.* **1999**, 81(5): 774-82

HOLLENBERG CP, GELLISSEN G. Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts. *Curr Opin Biotechnol.* **1997**, 8(5): 554-60

IMAI K, OKADA Y. Purification of matrix metalloproteinases by column chromatography. *Nat Protoc.* **2008**, 3(7): 1111-24

ITAKURA K, HIROSE T, CREA R, RIGGS AD, HEYNEKER HL, BOLIVAR F, BOYER HW. Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science.* **1977**, 198(4321): 1056-63

ITO H, FUKUDA Y, MURATA K, KIMURA A. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol.* **1983**, 153(1): 163-8

ITOH Y, BINNER S, NAGASE H. Steps involved in activation of the complex of pro-matrix metalloproteinase 2 (progelatinase A) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 by 4-aminophenylmercuric acetate. *Biochem J.* **1995**, 308 (Pt 2): 645-51

ITOH T, MATSUDA H, TANIOKA M, KUWABARA K, ITOHARA S, SUZUKI R. The role of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in antibody-induced arthritis. *J Immunol.* **2002**, 169(5): 2643-7

ITOH M, MASUDA K, ITO Y, AKIZAWA T, YOSHIOKA M, IMAI K, OKADA Y, SATO H, SEIKI M. Purification and refolding of recombinant human proMMP-7 (pro-matrilysin) expressed in *Escherichia coli* and its characterization. *J Biochem.* **1996**, 119(4): 667-73

JACOBS PP, RYCKAERT S, GEYSSENS S, DE VUSSER K, CALLEWAERT N, CONTRERAS R. *Pichia* surface display: display of proteins on the surface of glycoengineered *Pichia pastoris* strains. *Biotechnol Lett.* **2008**, 30(12): 2173-81

JAHC M, GUSTAVSSON M, JANSEN AK, MARTINELLE M, ENFORS SO. Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch processes. *J Biotechnol.* **2003**, 102(1): 45-53

JAHC M, WALLBERG F, BOLLOK M, GARCIA P, ENFORS SO. Temperature limited fed-batch technique for control of proteolysis in *Pichia pastoris* bioreactor cultures. *Microb Cell Fact.* **2003***, 2(1): 6

JIANG Z, GAO B, REN R, TAO X, MA Y, WEI D. Efficient display of active lipase LipB52 with a *Pichia pastoris* cell surface display system and comparison with the LipB52 displayed on *Saccharomyces cerevisiae* cell surface. *BMC Biotechnol.* **2008**, 8: 4

JIANG ZB, SONG HT, GUPTA N, MA LX, WU ZB. Cell surface display of functionally active lipases from *Yarrowia lipolytica* in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* **2007**, 56(1): 35-9

JUNGO C, MARISON I, VON STOCKAR U. Regulation of alcohol oxidase of a recombinant *Pichia pastoris* Mut⁺ strain in transient continuous cultures. *J Biotechnol.* **2007**, 130(3): 236-46

KADOGLOU NP, DASKALOPOULOU SS, PERREA D, LIAPIS CD. Matrix metalloproteinases and diabetic vascular complications. *Angiology*. **2005**, 56(2): 173-89

KANG YS, KANE J, KURJAN J, STADEL JM, TIPPER DJ. Effects of expression of mammalian G α and hybrid mammalian-yeast G α proteins on the yeast pheromone response signal transduction pathway. *Mol Cell Biol*. **1990**, 10(6): 2582-90

KANTER-SMOLER G, DAHLKVIST A, SUNNERHAGEN P. Improved method for rapid transformation of intact *Schizosaccharomyces pombe* cells. *Biotechniques*. **1994**, 16(5): 798-800

KESSLER J. Entwicklung eines Zelloberflächen-Expressionssystems zur Analyse humaner Matrix-Metalloproteasen in Hefe. Diplomarbeit, Zentrum für Human- und Molekularbiologie (ZHMB), *Universität des Saarlandes*, **2006**

KINOSHITA T, FUKUZAWA H, SHIMADA T, SAITO T, MATSUDA Y. Primary structure and expression of a gamete lytic enzyme in *Chlamydomonas reinhardtii*: similarity of functional domains to matrix metalloproteases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1992**, 89(10): 4693-7

KINOSHITA T, SATO H, OKADA A, OHUCHI E, IMAI K, OKADA Y, SEIKI M. TIMP-2 promotes activation of progelatinase A by membrane-type 1 matrix metalloproteinase immobilized on agarose beads. *J Biol Chem*. **1998**, 273(26): 16098-103

KLEINER DE, STETLER-STEVENSON WG. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem*. **1994**, 218(2): 325-9

KONDO A, UEDA M. Yeast cell-surface display – applications of molecular display. *Appl Microbiol Biotechnol*. **2004**, 64(1): 28-40

KOO HM, KIM JH, HWANG IK, LEE SJ, KIM TH, RHEE KH, LEE ST. Refolding of the catalytic and hinge domains of human MT1-MMP expressed in *Escherichia coli* and its characterization. *Mol Cells*. **2002**, 13(1): 118-24

KUBO T, SAITO T, FUKUZAWA H, MATSUDA Y. Two tandemly-located matrix metalloprotease genes with different expression patterns in the *Chlamydomonas* sexual cell cycle. *Curr Genet*. **2001**, 40(2): 136-43

KUBOTA H, NAGATA K. Roles of collagen fibers and its specific molecular chaperone: analysis using HSP47-knockout mice. *Biol Sci Space*. **2004**, 18(3): 118-9

KURODA K, SHIBASAKI S, UEDA M, TANAKA A. Cell surface-engineered yeast displaying a histidine oligopeptide (hexa-His) has enhanced adsorption of and tolerance to heavy metal ions. *Appl Microbiol Biotechnol*. **2001**, 57(5-6): 697-701

KURTZMAN CP. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the *Saccharomycetaceae*, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorhizula*. *FEMS Yeast Res*. **2003**, 4(3): 233-45

LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **1970**, 227(5259): 680-5

LAFLEUR MA, HANDSLEY MM, EDWARDS DR. Metalloproteinases and their inhibitors in angiogenesis. *Expert Rev Mol Med*. **2003**, 5(23):1-39

LAM JS, MANSOUR MK, SPECHT CA, LEVITZ SM. A model vaccine exploiting fungal mannosylation to increase antigen immunogenicity. *J Immunol*. **2005**, 175(11): 7496-503

LEE M, FRIDMAN R, MOBASHERY S. Extracellular proteases as targets for treatment of cancer metastases. *Chem Soc Rev*. **2004**, 33(7): 401-9

LEE YJ, KANG DG, KIM JS, LEE HS. *Buddleja officinalis* inhibits high glucose-induced matrix metalloproteinase activity in human umbilical vein endothelial cells. *Phytother Res*. **2008**, in press

LEONTOVICH AA, ZHANG J, SHIMOKAWA K, NAGASE H, SARRAS MP JR. A novel *Hydra* matrix metalloproteinase (HMMP) functions in extracellular matrix degradation, morphogenesis and the maintenance of differentiated cells in the foot process. *Development*. **2000**, 127(4): 907-20

LEPAGE T, GACHE C. Early expression of a collagenase-like hatching enzyme gene in the sea urchin embryo. *EMBO J*. **1990**, 9(9): 3003-12

- LICHTE A, KOLKENBROCK H, TSCHESCHE H.** The recombinant catalytic domain of membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) induces activation of progelatinase A and progelatinase A complexed with TIMP-2. *FEBS Lett.* **1996**, 397(2-3): 277-82
- LILJEQVIST S, SAMUELSON P, HANSSON M, NGUYEN TN, BINZ H, STAHL S.** Surface display of the cholera toxin B subunit on *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus*. *Appl Environ Microbiol.* **1997**, 63(7): 2481-8
- LIN-CEREGRINO J, WONG WW, XIONG S, GIANG W, LUONG LT, VU J, JOHNSON SD, LIN-CEREGRINO GP.** Condensed protocol for competent cell preparation and transformation of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechniques.* **2005**, 38(1): 44, 46, 48
- LINDSTAD RI, SYLTE I, MIKALSEN SO, SEGLEN PO, BERG E, WINBERG JO.** Pancreatic trypsin activates human promatrix metalloproteinase-2. *J Mol Biol.* **2005**, 350(4): 682-98
- LIPKE PN, OVALLE R.** Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J Bacteriol.* **1998**, 180(15): 3735-40
- LITTLE M, FUCHS P, BREITLING F, DÜBEL S.** Bacterial surface presentation of proteins and peptides: an alternative to phage technology? *Trends Biotechnol.* **1993**, 11(1): 3-5
- LIU Y, DAMMANN C, BHATTACHARYYA MK.** The matrix metalloproteinase gene GmMMP2 is activated in response to pathogenic infections in soybean. *Plant Physiol.* **2001**, 127(4): 1788-97
- LLANO E, PENDÁS AM, AZA-BLANC P, KORNBERG TB, LÓPEZ-OTÍN C.** Dm1-MMP, a matrix metalloproteinase from *Drosophila* with a potential role in extracellular matrix remodeling during neural development. *J Biol Chem.* **2000**, 275(46): 35978-85
- MACAULEY-PATRICK S, FAZENDA ML, MCNEIL B, HARVEY LM.** Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast.* **2005**, 22(4): 249-70
- MAIDMENT JM, MOORE D, MURPHY GP, MURPHY G, CLARK IM.** Matrix metalloproteinase homologues from *Arabidopsis thaliana*. Expression and activity. *J Biol Chem.* **1999**, 274(49): 34706-10

MANNELLO F. Natural bio-drugs as matrix metalloproteinase inhibitors: new perspectives on the horizon? *Recent Patents Anticancer Drug Discov.* **2006**, 1(1): 91-103

MARCHENKO ND, MARCHENKO GN, STRONGIN AY. Unconventional activation mechanisms of MMP-26, a human matrix metalloproteinase with a unique PHCGXXD cysteine-switch motif. *J Biol Chem.* **2002**, 277(21): 18967-72

MASSON V, DE LA BALLINA LR, MUNAUT C, WIELOCKX B, JOST M, MAILLARD C, BLACHER S, BAJOU K, ITOH T, ITOHARA S, WERB Z, LIBERT C, FOIDART JM, NOËL A. Contribution of host MMP-2 and MMP-9 to promote tumor vascularization and invasion of malignant keratinocytes. *FASEB J.* **2005**, 19(2): 234-6

MASTROIANNI CM, LIUZZI GM. Matrix metalloproteinase dysregulation in HIV infection: implications for therapeutic strategies. *Trends Mol Med.* **2007**, 13(11): 449-59

MASURE S, PAEMEN L, VAN AELST I, FITEN P, PROOST P, BILLIAU A, VAN DAMME J, OPDENAKKER G. Production and characterization of recombinant active mouse gelatinase B from eukaryotic cells and *in vivo* effects after intravenous administration. *Eur J Biochem.* **1997**, 244(1): 21-30

MAUNDRELL K. nmt1 of fission yeast. A highly transcribed gene completely repressed by thiamine. *J Biol Chem.* **1990**, 265(19): 10857-64

MAUNDRELL K. Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene.* **1993**, 123(1): 127-30

MERGLER M, WOLF K, ZIMMERMANN M. Development of a bisphenol A-adsorbing yeast by surface display of the *Kluyveromyces* yellow enzyme on *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2004**, 63(4): 418-21

MORGUNOVA E, TUUTTILA A, BERGMANN U, ISUPOV M, LINDQVIST Y, SCHNEIDER G, TRYGGVASON K. Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: activation mechanism revealed. *Science.* **1999**, 284(5420): 1667-70

MOTT JD, WERB Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol.* **2004**, 16(5): 558-64

MÜLLER NC. Analyse und Optimierung der Zellwandverankerung heterologer Proteine in der Hefe *Pichia pastoris*. Diplomarbeit, Zentrum für Human- und Molekularbiologie (ZHMB), Universität des Saarlandes, **2008**

NAGASE H, WOESSNER JF JR. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* **1999**, 274(31): 21491-4

NAKAMURA Y, SHIBASAKI S, UEDA M, TANAKA A, FUKUDA H, KONDO A. Development of novel whole-cell immunoadsorbents by yeast surface display of the IgG-binding domain. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2001**, 57(4): 500-5

NALIVAEVA NN, FISK LR, BELYAEV ND, TURNER AJ. Amyloid-degrading enzymes as therapeutic targets in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* **2008**, 5(2): 212-24

O'CALLAGHAN J, O'BRIEN MM, McCLEAN K, DOBSON AD. Optimisation of the expression of a *Trametes versicolor* laccase gene in *Pichia pastoris*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **2002**, 29(2): 55-9

OGATA Y, ITOH Y, NAGASE H. Steps involved in activation of the pro-matrix metalloproteinase 9 (progelatinase B)-tissue inhibitor of metalloproteinases-1 complex by 4-aminophenylmercuric acetate and proteinases. *J Biol Chem.* **1995**, 270(31): 18506-11

OH J, TAKAHASHI R, KONDO S, MIZOGUCHI A, ADACHI E, SASAHARA RM, NISHIMURA S, IMAMURA Y, KITAYAMA H, ALEXANDER DB, IDE C, HORAN TP, ARAKAWA T, YOSHIDA H, NISHIKAWA S, ITOH Y, SEIKI M, ITOHARA S, TAKAHASHI C, NODA M. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell.* **2001**, 107(6): 789-800

OKADA Y, MORODOMI T, ENGHILD JJ, SUZUKI K, YASUI A, NAKANISHI I, SALVESEN G, NAGASE H. Matrix metalloproteinase 2 from human rheumatoid synovial fibroblasts. Purification and activation of the precursor and enzymic properties. *Eur J Biochem.* **1990**, 194(3): 721-30

OKADA Y, GONOJI Y, NAKA K, TOMITA K, NAKANISHI I, IWATA K, YAMASHITA K, HAYAKAWA T. Matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/type IV collagenase) from HT 1080 human fibrosarcoma cells. Purification and activation of the precursor and enzymic properties. *J Biol Chem.* **1992**, 267(30): 21712-9

OKAMOTO T, AKAIKE T, SUGA M, TANASE S, HORIE H, MIYAJIMA S, ANDO M, ICHINOSE Y, MAEDA H. Activation of human matrix metalloproteinases by various bacterial proteinases. *J Biol Chem.* **1997**, 272(9): 6059-66

OKAZAKI K, OKAZAKI N, KUME K, JINNO S, TANAKA K, OKAYAMA H. High-frequency transformation method and library transducing vectors for cloning mammalian cDNAs by trans-complementation of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res.* **1990**, 18(22): 6485-9

OVERALL CM, KLEIFELD O. Towards third generation matrix metalloproteinase inhibitors for cancer therapy. *Br J Cancer.* **2006**, 94(7): 941-6

PAGE-MCCAW A, EWALD AJ, WERB Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2007**, 8(3): 221-33

PANDYA Y, JEWETT FF, HOOVER DG. Concurrent effects of high hydrostatic pressure, acidity and heat on the destruction and injury of yeasts. *J Food Prot.* **1995**, 58: 301-304

PARKAR AA, STOW MD, SMITH K, PANICKER AK, GUILLOTEAU JP, JUPP R, CROWE SJ. Large-scale expression, refolding, and purification of the catalytic domain of human macrophage metalloelastase (MMP-12) in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* **2000**, 20(2): 152-61

PEISLEY AA, GOOLEY PR. High-level expression of a soluble and functional fibronectin type II domain from MMP-2 in the *Escherichia coli* cytoplasm for solution NMR studies. *Protein Expr Purif.* **2007**, 53(1): 124-31

PETERSON JT. Matrix metalloproteinase inhibitor development and the remodeling of drug discovery. *Heart Fail Rev.* **2004**, 9(1): 63-79

PETERSON JT. The importance of estimating the therapeutic index in the development of matrix metalloproteinase inhibitors. *Cardiovasc Res.* **2006**, 69(3): 677-87

PLANTZ BA, NICKERSON K, KACHMAN SD, SCHLEGEL VL. Evaluation of metals in a defined medium for *Pichia pastoris* expressing recombinant β -galactosidase. *Biotechnol Prog.* **2007**, 23(3): 687-92

PRITCHETT J, BALDWIN SA. The effect of nitrogen source on yield and glycosylation of a human cystatin C mutant expressed in *Pichia pastoris*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **2004**, 31(12): 553-8

- PUT HMC & DE JONG J.** Heat resistance studies of yeasts; vegetative cells versus ascospores: erythromycin inhibition of sporulation in *Kluyveromyces* and *Saccharomyces* species. *J Appl Bacteriol.* **1982**, 53, 73-79
- QUESADA AR, BARBACID MM, MIRA E, FERNÁNDEZ-RESA P, MÁRQUEZ G, ARACIL M.** Evaluation of fluorometric and zymographic methods as activity assays for stromelysins and gelatinases. *Clin Exp Metastasis.* **1997**, 15(1): 26-32
- RA HJ, PARKS WC.** Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biol.* **2007**, 26(8): 587-96
- RAUVALA M, AGLUND K, PUISTOLA U, TURPEENNIEMI-HUJANEN T, HORVATH G, WILLÉN R, STENDAHL U.** Matrix metalloproteinases-2 and -9 in cervical cancer: different roles in tumor progression. *Int J Gynecol Cancer.* **2006**, 16(3): 1297-302
- REN R, JIANG Z, LIU M, TAO X, MA Y, WEI D.** Display of adenoregulin with a novel *Pichia pastoris* cell surface display system. *Mol Biotechnol.* **2007**, 35(2): 103-8
- RIVERA-MARRERO CA, SCHUYLER W, ROSER S, RITZENTHALER JD, NEWBURN SA, ROMAN J. M.** Tuberculosis induction of matrix metalloproteinase-9: the role of mannose and receptor-mediated mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **2002**, 282(3): L546-55
- ROBERTS RJ, VINCZE T, POSFAI J, MACELIS D.** REBASE – enzymes and genes for DNA restriction and modification. *Nucleic Acids Res.* **2007**, 35(Database issue): D269-70
- ROBINSON JS, KLIONSKY DJ, BANTA LM, EMR SD.** Protein sorting in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation of mutants defective in the delivery and processing of multiple vacuolar hydrolases. *Mol Cell Biol* **1988**, 8(11): 4936-48
- RODERFELD M, BÜTTNER FH, BARTNIK E, TSCHESCHE H.** Expression of human membrane type 1 matrix metalloproteinase in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* **2000**, 19(3): 369-74
- ROMANOS MA, SCORER CA, CLARE JJ.** Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast.* **1992**, 8(6): 423-88

ROSENFELD SA, ROSS OH, HILLMAN MC, CORMAN JI, DOWLING RL. Production and purification of human fibroblast collagenase (MMP-1) expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* **1996**, 7(4): 423-30

ROZANOV DV, STRONGIN AY. Membrane type-1 matrix metalloproteinase functions as a proprotein self-convertase. Expression of the latent zymogen in *Pichia pastoris*, autolytic activation, and the peptide sequence of the cleavage forms. *J Biol Chem.* **2003**, 278(10): 8257-60

RUSH TS 3RD, POWERS R. The application of x-ray, NMR, and molecular modeling in the design of MMP inhibitors. *Curr Top Med Chem.* **2004**, 4(12): 1311-27

SAIKI RK, SCHARF S, FALOONA F, MULLIS KB, HORN GT, ERLICH HA, ARNHEIM N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* **1985**, 230(4732): 1350-4

SALEEM M, BRIM H, HUSSAIN S, ARSHAD M, LEIGH MB, ZIA-UL-HASSAN. Perspectives on microbial cell surface display in bioremediation. *Biotechnol Adv.* **2008**, 26(2): 151-61

SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH, AND T. MANIATIS. **1989.** Molecular cloning: a laboratory manual, vol. 2nd edn. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.*

SAUER M, BRANDUARDI P, VALLI M, PORRO D. Production of *L*-ascorbic acid by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii*. *Appl Environ Microbiol.* **2004**, 70(10): 6086-91

SCHÄGGER H, VON JAGOW G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.* **1987**, 166(2): 368-79

SCHIESTL RH, GIETZ RD. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet.* **1989**, 16(5-6): 339-46

SCHMALFELDT B, PRECHTEL D, HÄRTING K, SPÄTHE K, RUTKE S, KONIK E, FRIDMAN R, BERGER U, SCHMITT M, KUHN W, LENGYEL E. Increased expression of matrix metalloproteinases (MMP)-2, MMP-9, and the urokinase-type plasminogen activator is associated with progression from benign to advanced ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* **2001**, 7(8): 2396-404

SCHMITT MJ. Cloning and expression of a cDNA copy of the viral K28 killer toxin gene in yeast. *Mol Gen Genet.* **1995**, 246(2): 236-46

SCHREUDER MP, BREKELMANS S, VAN DEN ENDE H, KLIS FM. Targeting of a heterologous protein to the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **1993**, 9(4): 399-409

SCHREUDER MP, MOOREN AT, TOSCHKA HY, VERRIPS CT, KLIS FM. Immobilizing proteins on the surface of yeast cells. *Trends Biotechnol.* **1996**, 14(4): 115-20

SCHREUDER MP, DEEN C, BOERSMA WJ, POWELS PH, KLIS FM. Yeast expressing hepatitis B virus surface antigen determinants on its surface: implications for a possible oral vaccine. *Vaccine.* **1996***, 14(5): 383-8

SCOTT JK, SMITH GP. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science.* **1990**, 249(4967): 386-90

SHAPIRO AL, VIÑUELA E, MAIZEL JV JR. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun.* **1967**, 28(5): 815-20

SHI J, ZHANG ST, ZHANG XJ, XU H, GUO AG. Expression, purification, and activity identification of Alfimeprase in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* **2007**, 54(2): 240-6

SHIBASAKI S, UEDA M, IIZUKA T, HIRAYAMA M, IKEDA Y, KAMASAWA N, OSUMI M, TANAKA A. Quantitative evaluation of the enhanced green fluorescent protein displayed on the cell surface of *Saccharomyces cerevisiae* by fluorometric and confocal laser scanning microscopic analyses. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2001**, 55(4): 471-5

SHIGECHI H, KOH J, FUJITA Y, MATSUMOTO T, BITO Y, UEDA M, SATOH E, FUKUDA H, KONDO A. Direct production of ethanol from raw corn starch via fermentation by use of a novel surface-engineered yeast strain codisplaying glucoamylase and α -amylase. *Appl Environ Microbiol.* **2004**, 70(8): 5037-40

SHIMADA T, NAKAMURA H, OHUCHI E, FUJII Y, MURAKAMI Y, SATO H, SEIKI M, OKADA Y. Characterization of a truncated recombinant form of human membrane type 3 matrix metalloproteinase. *Eur J Biochem.* **1999**, 262(3): 907-14

SHIMOI H, KITAGAKI H, OHMORI H, IIMURA Y, ITO K. Sed1p is a major cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase and is involved in lytic enzyme resistance. *J Bacteriol.* **1998**, 180(13): 3381-7

SHIOMI T, INOKI I, KATAOKA F, OHTSUKA T, HASHIMOTO G, NEMORI R, OKADA Y. Pericellular activation of proMMP-7 (promatrilysin-1) through interaction with CD151. *Lab Invest.* **2005**, 85(12): 1489-506

SIKORSKI RS, HIETER P. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **1989**, 122(1): 19-27

SMITH PK, KROHN RI, HERMANSON GT, MALLIA AK, GARTNER FH, PROVENZANO MD, FUJIMOTO EK, GOEKE NM, OLSON BJ, KLENK DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* **1985**, 150(1): 76-85

SOMERVILLE RP, OBLANDER SA, APTE SS. Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biol.* **2003**, 4(6): 216

STERNLICHT MD, WERB Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **2001**, 17: 463-516

STETLER-STEVENSON WG, KRUTZSCH HC, WACHER MP, MARGULIES IM, LIOTTA LA. The activation of human type IV collagenase proenzyme. Sequence identification of the major conversion product following organomercurial activation. *J Biol Chem.* **1989**, 264(3): 1353-6

STÖCKER W, GRAMS F, BAUMANN U, REINEMER P, GOMIS-RÜTH FX, MCKAY DB, BODE W. The metzincins – topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci.* **1995**, 4(5): 823-40

STUDIER FW, MOFFATT BA. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.* **1986**, 189(1): 113-30

SUH SO, BLACKWELL M, KURTZMAN CP, LACHANCE MA. Phylogenetics of *Saccharomycetales*, the ascomycete yeasts. *Mycologia.* **2006**, 98(6): 1006-17

SUMITA T, YOKO-O T, SHIMMA Y, JIGAMI Y. Comparison of cell wall localization among Pir family proteins and functional dissection of the region required for cell wall binding and bud scar recruitment of Pir1p. *Eukaryot Cell*. **2005**, 4(11): 1872-81

TAMARU Y, OHTSUKA M, KATO K, MANABE S, KURODA K, SANADA M, UEDA M. Application of the arming system for the expression of the 380R antigen from red sea bream iridovirus (RSIV) on the surface of yeast cells: a first step for the development of an oral vaccine. *Biotechnol Prog*. **2006**, 22(4): 949-53

TANINO T, FUKUDA H, KONDO A. Construction of a *Pichia pastoris* cell-surface display system using Flo1p anchor system. *Biotechnol Prog*. **2006**, 22(4): 989-93

TÊTU B, BRISSON J, LAPOINTE H, BERNARD P. Prognostic significance of stromelysin 3, gelatinase A, and urokinase expression in breast cancer. *Hum Pathol*. **1998**, 29(9): 979-85

TOCHOWICZ A, MASKOS K, HUBER R, OLTENFREITER R, DIVE V, YIOTAKIS A, ZANDA M, BODE W, GOETTIG P. Crystal structures of MMP-9 complexes with five inhibitors: contribution of the flexible Arg424 side-chain to selectivity. *J Mol Biol*. **2007**, 371(4): 989-1006

TOH-E A, YASUNAGA S, NISOGI H, TANAKA K, OGUCHI T, MATSUI Y. Three yeast genes, PIR1, PIR2 and PIR3, containing internal tandem repeats, are related to each other, and PIR1 and PIR2 are required for tolerance to heat shock. *Yeast*. **1993**, 9(5): 481-94

TOWBIN H, STAEBELIN T, GORDON J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1979**, 76(9): 4350-4

TU G, XU W, HUANG H, LI S. Progress in the development of matrix metalloproteinase inhibitors. *Curr Med Chem*. **2008**, 15(14): 1388-95

TURPEENNIEMI-HUJANEN T. Gelatinases (MMP-2 and -9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers. *Biochimie*. **2005**, 87(3-4): 287-97

UCCELLETTI D, DE JACO A, FARINA F, MANCINI P, AUGUSTI-TOCCO G, BIAGIONI S, PALLESCHI C. Cell surface expression of a GPI-anchored form of mouse acetylcholinesterase in Klpmr1Δ cells of *Kluyveromyces lactis*. *Biochem Biophys Res Commun*. **2002**, 298(4): 559-65

- UEDA M, TANAKA A.** Genetic immobilization of proteins on the yeast cell surface. *Biotechnol Adv.* **2000**, 18(2): 121-40
- VAN DEN BERG JA, VAN DER LAKEN KJ, VAN OOYEN AJ, RENNIERS TC, RIETVELD K, SCHAAP A, BRAKE AJ, BISHOP RJ, SCHULTZ K, MOYER D, ET AL.** *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin. *Biotechnology.* **1990**, 8(2): 135-9
- VAN DER VAART JM, CARO LH, CHAPMAN JW, KLIS FM, VERRIPS CT.** Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* **1995**, 177(11): 3104-10
- VAN DER VAART JM, TE BIESEBEKE R, CHAPMAN JW, TOSCHKA HY, KLIS FM, VERRIPS CT.** Comparison of cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae* as anchors for cell surface expression of heterologous proteins. *Appl Environ Microbiol.* **1997**, 63(2): 615-20
- VAN OOYEN AJ, DEKKER P, HUANG M, OLSTHOORN MM, JACOBS DI, COLUSSI PA, TARON CH.** Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res.* **2006**, 6(3): 381-92
- VAN WART HE, BIRKEDAL-HANSEN H.** 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.* **1990**, 87(14): 5578-82
- VILLATTE F, HUSSEIN AS, BACHMANN TT, SCHMID RD.** Expression level of heterologous proteins in *Pichia pastoris* is influenced by flask design. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2001**, 55(4): 463-5
- VINCENTI MP.** The matrix metalloproteinase (MMP) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) genes. Transcriptional and posttranscriptional regulation, signal transduction and cell-type-specific expression. *Methods Mol Biol.* **2001**, 151: 121-48
- VISSE R, NAGASE H.** Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* **2003**, 92(8): 827-39
- VONGSAMPHANH R, FORTIER PK, RAMOTAR D.** Pir1p mediates translocation of the yeast Apn1p endonuclease into the mitochondria to maintain genomic stability. *Mol Cell Biol.* **2001**, 21(5): 1647-55

- WADA K, SATO H, KINOH H, KAJITA M, YAMAMOTO H, SEIKI M.** Cloning of three *Caenorhabditis elegans* genes potentially encoding novel matrix metalloproteinases. *Gene*. **1998**, 211(1): 57-62
- WALKER RA, WOOLLEY DE.** Immunolocalisation studies of matrix metalloproteinases-1, -2 and -3 in human melanoma. *Virchows Arch*. **1999**, 435(6): 574-9
- WANG P, DAI J, BAI F, KONG KF, WONG SJ, MONTGOMERY RR, MADRI JA, FIKRIG E.** Matrix metalloproteinase 9 facilitates West Nile virus entry into the brain. *J Virol*. **2008**, 82(18): 8978-85
- WANG Q, LI L, CHEN M, QI Q, WANG PG.** Construction of a novel system for cell surface display of heterologous proteins on *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett*. **2007**, 29(10): 1561-6
- WANG Q, LI L, CHEN M, QI Q, WANG PG.** Construction of a novel *Pichia pastoris* cell-surface display system based on the cell wall protein Pir1. *Curr Microbiol*. **2008**, 56(4): 352-7
- WANG X, LI X, LI Y.** A modified Coomassie Brilliant Blue staining method at nanogram sensitivity compatible with proteomic analysis. *Biotechnol Lett*. **2007**, 29(10): 1599-603
- WARING MJ.** Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J Mol Biol*. **1965**, 13(1): 269-82
- WASHIDA M, TAKAHASHI S, UEDA M, TANAKA A.** Spacer-mediated display of active lipase on the yeast cell surface. *Appl Microbiol Biotechnol*. **2001**, 56(5-6): 681-6
- WATANABE H, NAKANISHI I, YAMASHITA K, HAYAKAWA T, OKADA Y.** Matrix metalloproteinase-9 (92 kDa gelatinase/type IV collagenase) from U937 monoblastoid cells: correlation with cellular invasion. *J Cell Sci*. **1993**, 104 (Pt 4): 991-9
- WATANABE Y, HIRAKAWA K, HARUYAMA T, AKAIKE T.** Direct production of an activated matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) from mammalian cells. *FEBS Lett*. **2001**, 502(1-2): 63-7
- WEILER F, REHFELDT K, BAUTZ F, SCHMITT MJ.** The *Zygosaccharomyces bailii* antifungal virus toxin zygocin: cloning and expression in a heterologous fungal host. *Mol Microbiol*. **2002**, 46(4): 1095-105

WEINGARTEN H, FEDER J. Spectrophotometric assay for vertebrate collagenase. *Anal Biochem.* **1985**, 147(2): 437-40

WEINGARTEN H, MARTIN R, FEDER J. Synthetic substrates of vertebrate collagenase. *Biochemistry.* **1985**, 24(23): 6730-4

WIECHELMAN KJ, BRAUN RD, FITZPATRICK JD. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem.* **1988**, 175(1): 231-7

WILDT S, GERNGROSS TU. The humanization of N-glycosylation pathways in yeast. *Nat Rev Microbiol.* **2005**, 3(2): 119-28

WINZELER EA, SHOEMAKER DD, ASTROMOFF A, LIANG H, ANDERSON K, ANDRE B, BANGHAM R, BENITO R, BOEKE JD, BUSSEY H, CHU AM, CONNELLY C, DAVIS K, DIETRICH F, DOW SW, EL BAKKOURY M, FOURY F, FRIEND SH, GENTALEN E, GIAEVER G, HEGEMANN JH, JONES T, LAUB M, LIAO H, LIEBUNDGUTH N, LOCKHART DJ, LUCAU-DANILA A, LUSSIER M, M'RABET N, MENARD P, MITTMANN M, PAI C, REBISCHUNG C, REVUELTA JL, RILES L, ROBERTS CJ, ROSS-MACDONALD P, SCHERENS B, SNYDER M, SOOKHAI-MAHADEO S, STORMS RK, VÉRONNEAU S, VOET M, VOLCKAERT G, WARD TR, WYSOCKI R, YEN GS, YU K, ZIMMERMANN K, PHILIPPSEN P, JOHNSTON M, DAVIS RW. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* **1999**, 285: 901-6

WIXON J. Featured Organism: *Schizosaccharomyces pombe*, The Fission Yeast. *Comp Funct Genomics.* **2002**, 3(2): 194-204

WOOD V, GWILLIAM R, RAJANDREAM MA, LYNE M, LYNE R, STEWART A, SGOUROS J, PEAT N, HAYLES J, BAKER S, BASHAM D, BOWMAN S, BROOKS K, BROWN D, BROWN S, CHILLINGWORTH T, CHURCHER C, COLLINS M, CONNOR R, CRONIN A, DAVIS P, FELTWELL T, FRASER A, GENTLES S, GOBLE A, HAMLIN N, HARRIS D, HIDALGO J, HODGSON G, HOLROYD S, HORNSBY T, HOWARTH S, HUCKLE EJ, HUNT S, JAGELS K, JAMES K, JONES L, JONES M, LEATHER S, McDONALD S, MCLEAN J, MOONEY P, MOULE S, MUNGALL K, MURPHY L, NIBLETT D, ODELL C, OLIVER K, O'NEIL S, PEARSON D, QUAIL MA, RABBINOWITSCH E, RUTHERFORD K, RUTTER S, SAUNDERS D, SEEGER K, SHARP S, SKELTON J, SIMMONDS M, SQUARES R, SQUARES S, STEVENS K, TAYLOR K, TAYLOR RG, TIVEY A, WALSH S, WARREN T, WHITEHEAD S, WOODWARD J, VOLCKAERT G, AERT R, ROBBEN J, GRYMONPREZ B, WELTJENS I, VANSTREELS E, RIEGER M, SCHÄFER M, MÜLLER-AUER S, GABEL C, FUCHS M, DÜSTERHÖFT A, FRITZC C, HOLZER E, MOESTL D, HILBERT

H, BORZYM K, LANGER I, BECK A, LEHRACH H, REINHARDT R, POHL TM, EGER P, ZIMMERMANN W, WEDLER H, WAMBUTT R, PURNELLE B, GOFFEAU A, CADIEU E, DRÉANO S, GLOUX S, LELAURE V, MOTTIER S, GALIBERT F, AVES SJ, XIANG Z, HUNT C, MOORE K, HURST SM, LUCAS M, ROCHET M, GAILLARDIN C, TALLADA VA, GARZON A, THODE G, DAGA RR, CRUZADO L, JIMENEZ J, SÁNCHEZ M, DEL REY F, BENITO J, DOMÍNGUEZ A, REVUELTA JL, MORENO S, ARMSTRONG J, FORSBURG SL, CERUTTI L, LOWE T, MCCOMBIE WR, PAULSEN I, POTASHKIN J, SHPAKOVSKI GV, USSERY D, BARRELL BG, NURSE P. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*. **2002**, 415(6874): 871-80

WU S, LETCHWORTH GJ. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *Biotechniques*. **2004**, 36(1): 152-4

YIN J, LI G, REN X, HERRLER G. Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *J Biotechnol*. **2007**, 127(3): 335-47

YIN QY, DE GROOT PW, DEKKER HL, DE JONG L, KLIS FM, DE KOSTER CG. Comprehensive proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: identification of proteins covalently attached via glycosylphosphatidylinositol remnants or mild alkali-sensitive linkages. *J Biol Chem*. **2005**, 280(21): 20894-901

YU Q, STAMENKOVIC I. Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev*. **1999**, 13(1): 35-48

YUE L, CHI Z, WANG L, LIU J, MADZAK C, LI J, WANG X. Construction of a new plasmid for surface display on cells of *Yarrowia lipolytica*. *J Microbiol Methods*. **2008**, 72(2): 116-23

ZENG ZS, COHEN AM, GUILLEM JG. Loss of basement membrane type IV collagen is associated with increased expression of metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) during human colorectal tumorigenesis. *Carcinogenesis*. **1999**, 20(5): 749-55

ZHANG W, BEVINS MA, PLANTZ BA, SMITH LA, MEAGHER MM. Modeling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein, the heavy-chain fragment C of botulinum neurotoxin, serotype A. *Biotechnol Bioeng*. **2000**, 70(1): 1-8

ZHANG W, HYWOOD POTTER KJ, PLANTZ BA, SCHLEGEL VL, SMITH LA, MEAGHER MM. *Pichia pastoris* fermentation with mixed-feeds of glycerol and methanol: growth kinetics and production improvement. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **2003**, 30(4): 210-5

ZHANG W, LIU CP, INAN M, MEAGHER MM. Optimization of cell density and dilution rate in *Pichia pastoris* continuous fermentations for production of recombinant proteins. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **2004**, 31(7): 330-4

ZHANG W, SINHA J, SMITH LA, INAN M, MEAGHER MM. Maximization of production of secreted recombinant proteins in *Pichia pastoris* fed-batch fermentation. *Biotechnol Prog.* **2005**, 21(2): 386-93

ZHANG B, CAO X, LIU Y, CAO W, ZHANG F, ZHANG S, LI H, NING L, FU L, NIU Y, NIU R, SUN B, HAO X. Tumor-derived matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) correlates with poor prognoses of invasive breast cancer. *BMC Cancer.* **2008**, 8: 83

ZHENG H, TAKAHASHI H, MURAI Y, CUI Z, NOMOTO K, NIWA H, TSUNEYAMA K, TAKANO Y. Expressions of MMP-2, MMP-9 and VEGF are closely linked to growth, invasion, metastasis and angiogenesis of gastric carcinoma. *Anticancer Res.* **2006**, 26(5A): 3579-83

ZHOU XS, LU J, FAN WM, ZHANG YX. Development of a responsive methanol sensor and its application in *Pichia pastoris* fermentation. *Biotechnol Lett.* **2002**, 24(8): 643-6

ZHU K, CHI Z, LI J, ZHANG F, LI M, YASODA HN, WU L. The surface display of haemolysin from *Vibrio harveyi* on yeast cells and their potential applications as live vaccine in marine fish. *Vaccine.* **2006**, 24(35-36): 6046-52

Veröffentlichungen & Patente

Veröffentlichungen

BREINIG F, **DIEHL B**, RAU S, ZIMMER C, SCHWAB H, SCHMITT MJ. Cell surface expression of bacterial esterase A by *Saccharomyces cerevisiae* and its enhancement by constitutive activation of the cellular unfolded protein response. *Appl Environ Microbiol.* 2006, 72: 7140-47

DIEHL B, MÜLLER NC, SCHMITT MJ. Comparative studies on cell surface expression in *Pichia pastoris* – highly effective immobilization by *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins. Manuskript in Vorbereitung

DIEHL B, HOFFMANN TM, SCHMITT MJ. MMPACE – a novel assay for high through-put screening of potential inhibitors against human matrix metalloproteinases. Manuskript in Vorbereitung

Patente

SCHMITT MJ, **DIEHL B**. MMPACE – ein hefezellbasierter Bioassay zur Hochdurchsatz-Testung spezifischer Inhibitoren gegen humane Matrix-Metalloproteasen. Deutsches Patent- und Markenamt; Aktenzeichen 102008054494.9

Danksagung

Ein ganz besonderer und auch der größte Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn PROF. DR. MANFRED J. SCHMITT, der glücklicherweise ausreichend risikobereit gewesen ist, einen fachfremden Unbekannten in seiner Arbeitsgruppe aufzunehmen. Vielen Dank für die stetige Unterstützung und Förderung weit über das erhoffte Maß hinaus, die verantwortungsvollen Aufgaben, die mir auferlegt sind, und das große Vertrauen, das Sie mir entgegenbringen. Dass Sie mir diese Promotion ermöglicht haben, werde ich Ihnen niemals vergessen.

Herrn PROF. DR. FRIEDRICH GIFFHORN danke ich sehr für die Übernahme des Zweitgutachtens, für sein anhaltendes Interesse an den Fortschritten meiner Arbeit, die freundliche Zusammenarbeit und die informativen fachlichen Unterhaltungen.

Ebenso Dank an Herrn PROF. DR. GOTTFRIED UNDEN vom Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der Universität Mainz für die kurzfristige Bereitschaft zur Erstellung des Drittgutachtens.

Ein besonderer Dank auch meinem Beinahe-Doktorvater PROF. DR. RÜDIGER MUES dafür, dass er mich nicht nur hat ziehen lassen, sondern mich in dieser Entscheidung stets bekräftigt und meine Arbeit bis heute mit großen Interesse als Freund begleitet hat. „Eine Blüte ist eine Sprossachse begrenzten Wachstums mit Sporophyllen!“

Vielen Dank an meine Lieblings-Diplomanden JULIA KESSLER, THORSTEN HOFFMANN, BJÖRN BECKER und NINA MÜLLER, die ausnahmslos hervorragende Leistungen erbracht und damit ganz entscheidend zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben. Ich bin stolz, Euer Meister gewesen zu sein.

Meinem brillanten Labor: ESTHER GIESSELMANN, THORSTEN HOFFMANN, BJÖRN BECKER und NINA MÜLLER will ich dafür danken, dass sie mich so gut kennen und sich immer so viel Mühe für mich gemacht haben (insbesondere was Geburtstagsgeschenke angeht). Ich habe mich jeden morgen auf Euch gefreut.

Ebenso vielen Dank an...

... DR. FRANK BREINIG für seine fachliche Anleitung und die viele Zeit, die er in meine Labor-Grundausbildung investiert hat.

.... MARC LIND für das stets geduldige Coaching, die bestechende Ehrlichkeit und zahlreiche Tipps und Tricks für den Labor-Alltag. Ei jo, es leuchtet!

... meine (F-)Praktikanten NINA MÜLLER, BENEDIKT MÜLLER, BJÖRN BECKER, JULIE KOENIG, MELANIE WEISS, GUILLAUME WENDT und SEBASTIAN THEWES für die stets motivierte Arbeit, auch wenn die Ergebnisse mal auf sich warten ließen.

... unsere technischen Assistentinnen, vor allem ANDREA KARRENBAUER und SABINE PREDIGER für ihre engagierte Mitarbeit bei diversen *Pichia*-Kultivierungen, Western-Blots und Zymographien.

... JENS BURKHART vom Lehrstuhl für Organische Chemie für die bisherige und hoffentlich auch weitere kollegiale Zusammenarbeit beim MMP-Inhibitor-Screening.

... DR. ERIC W. HOWARD vom Department of Cell Biology, University of Oklahoma für die freundliche Bereitstellung der MMP-cDNA.

... PROF. DR. HELMUT SCHWAB vom Institut für Biotechnologie, TU Graz, für die Bereitstellung des Esterase A-Gens.

... meiner Lieblings-Ex-Mitbewohnerin DR. TANJA SENDZIK, ohne die ich erst gar nicht auf die Idee gekommen wäre, diesen Weg zu gehen.

... DAGMAR VÖSSING von der Patent-Verwertungs-Agentur der Universität des Saarlandes für die schnelle und kompetente Bearbeitung unseres Antrages.

... meine Lieblings-Kollegin NATALIA JIMÉNEZ BECKER für eine großartige Laborzeit.

... meine Chef-Korrekturleser THORSTEN HOFFMANN und SABINE JOHN, die ihre knapp bemessene Freizeit geopfert haben, um meinem engen Zeitplan gerecht zu werden.

... NICOLE JUNDEL und ihren Assistenten für die hervorragende Arbeit in der Verwaltung und die unterhaltsame Zusammenarbeit.

... meine ehemaligen Weggefährten DR. CHRISTIAN ZIMMER, DR. BEATA STOSIK, DR. FRANK POWILLEIT, DR. SUSANNE HEILIGENSTEIN, DR. DIANE DRESCHER-PETERSEN, GEORG BERNARDY und EVA DÜPPRE.

... den Rest der Arbeitsgruppen MOLEKULAR- UND ZELLBIOLOGIE und MIKROBIOLOGIE und alle anderen, die mich bis hierhin begleitet haben!

Danke an meine Sauna-Jungs und besten Freunde PATRICK FELD, PATRIK WOLF und MICHAEL KINNEN dafür, dass sie immer da waren, insbesondere für das Verständnis und den Rückhalt in den schwierigen Zeiten.

Letztendlich vielen Dank meiner FAMILIE, besonders meinen Eltern, meinen Omas, meinem Bruder und meiner Schwester für die Unterstützung, das Mitfreuen und das Mitleiden. Ihrer Geduld, Beharrlichkeit und Aufopferung verdanke ich all die Möglichkeiten, die mich bis hierhin geführt haben. Danke.

*Was ich im Inneren bin, zählt nicht.
Nur das, was ich tue, zeigt wer ich bin.*

Batman