

1 Einleitung

1.1 Matrix Metalloproteinasen

Die Proteinfamilie der Matrix Metalloproteinasen (MMPs, auch Matrixine genannt) übernimmt wichtige Funktionen in Ab- und Umbau der Extrazellulären Matrix (ECM/ dem Apoplasten in Pflanzen entsprechend) in Säugetieren. Insbesondere durch die proteolytische Degradierung der ECM nehmen sie massiven Einfluss auf zahlreiche biologische Prozesse, wie etwa Embryogenese, Organogenese und Wundheilung (Nagase und Woessner, 1999; McCawley und Matrisian, 2001). Die Regulation erfolgt auf Transkriptionsebene und durch Aktivierung des sogenannten Zymogens durch Abspaltung der inhibitorisch wirksamen Prodomäne. Darüber hinaus interagieren MMPs mit den sie umgebenden Komponenten der ECM und ihre Aktivität wird durch spezifische Inhibitoren beeinflusst (Tissue Inhibitors of Metalloproteinasen, TIMPs; Gomez *et al.*, 1997). Die Induzierbarkeit der Matrixin-Gene durch Wachstumsfaktoren, Cytokine, physikalischen Stress u.a. Faktoren ist ein wesentliches Merkmal dieser Genfamilie (Nagase und Woessner, 1999). Eine Störung dieser Regulierung führt bei Vertebraten zu Krankheiten wie Arthritis, Nephritis, Fibrosis und Arteriosklerose, insbesondere aber Krebs (Visse und Nagase, 2003). Bei Krebs erscheinen MMPs in aller Regel hochreguliert; ihre Erforschung spielt daher in der Medizin eine überaus wichtige Rolle. Die direkte Umgebung von Tumoren ist stark geprägt von unkontrollierter Proteolyse, und hier insbesondere durch von MMPs beeinflusste Signalwege und Zellteilungen (Kessenbrock *et al.*, 2010). Aktuell scheinen hier Behandlungsansätze durch den Einsatz natürlicher TIMPs oder synthetischer Inhibitoren vielversprechend (Egeblad *et al.*, 2002; Tallant *et al.*, 2010).

1.1.1 Struktur und Funktion

Allen bisher beschriebenen MMPs ist eine Minimal-Struktur gemein (Massova *et al.*, 1998) (siehe Abb. 1.1, A). Diese beinhaltet das N-terminale Signalpeptid für Eintritt in den sekretorischen Weg, das Propeptid (~ 80 AS) mit der Thiol- Gruppe im Motiv PRCGXPD, sowie die konservierte katalytische Domäne (~ 170 AS) mit dem Zink-Binde-Motiv HEXGHXXGXXH und einem den „Met-turn“ bildenden Methionin (Bode *et al.*, 1998). Der „Met-turn“ und das Zink-Binde-Motiv (siehe Abb. 1.2) sind charakteristisch für die konservierte katalytische Domäne der Metzinkine, welche

neben den MMPs auch die Astacine, die Serralysine und die Schlangengift-Endopeptidasen umfasst (Bode *et al.*, 1993; Stöcker *et al.*, 1995).

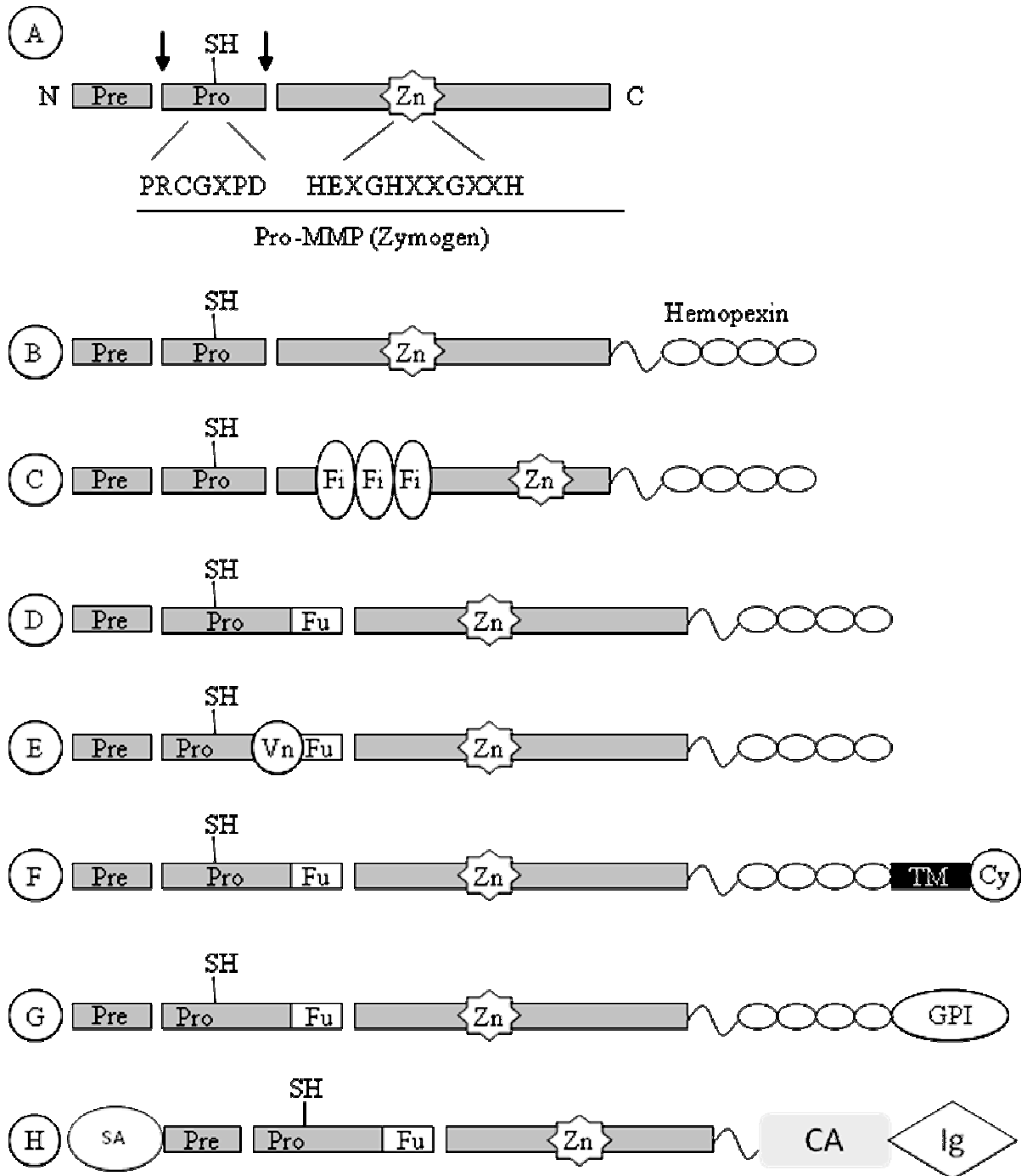


Abb. 1.1: Übersicht über verschiedene Gruppen von MMPs. Pre = Signalpeptid, Pro = Propeptid mit Cysteinswitch (-SH-Gruppe) im Motiv PRCGXPD, Zn = Zink im Motiv HEXGHXXGXXH in katalytischer Domäne, Fi = Fibronectin, Fu = Erkennungsmotiv für Furin-ähnliche Signal-Proteinasen, Vn = Vitronectin, TM = Transmembrandomäne, Cy = Cytoplasmatische Domäne, GPI = GPI-Anker, SA = Signal-Anker, CA = „cysteine array“, Ig = Immunoglobulin-ähnliche Domäne. Verändert nach Egeblad *et al.*, 2002.

Aufgrund ihrer über die Minimal-Struktur hinausgehenden Domänen werden die Matrix Metalloproteinasen in acht Klassen eingeteilt (Egeblad *et al.*, 2002; Nagase

und Woessner, 1999; Visse und Nagase, 2003). Neben den Minimal-Domänen-MMPs werden hierbei unterschieden:

- MMPs mit einer einfachen Hemopexin-Domäne am C-Terminus (Abb. 1.1, B)
- Gelatinolytische MMPs mit Collagen-bindenden Fibronectin-Insertionen (C)
- sekretierte MMPs mit Furin-Erkennungsmotiv zwischen Propeptid und katalytischer Domäne (D, Aktivierung durch Furin-ähnliche Serin-Proteinasen)
- MMPs mit Vitronectin-ähnlichen Insertionen und Furin-Erkennungsmotiv (E)
- Membran-gebundene MMPs (membrane-type MMPs/ MT-MMPs), verankert
 - durch C-terminale Transmembrandomäne (F)
 - durch GPI-Anker (G)
 - durch N-terminalen Signal-Anker (SA, Typ II Transmembranproteine), mit „cysteine array“ und „immunoglobulin (Ig)-like domains“ (H)

Für alle Matrix Metalloproteinasen gilt, dass der Cystein-Rest des Propeptids mit dem Zinkion der katalytischen Domäne interagiert und damit dieses sogenannte Zymogen in einem inaktiven Zustand hält. Zerstörung dieser Interaktion aktiviert die Protease, in der Regel geschieht dies durch die Abspaltung des Propeptids. Dabei wird das Propeptid zunächst in der Mitte gespalten, hieraus resultiert eine Konformationsänderung die die Abspaltung des kompletten Propeptids erlaubt (Nagase 1997; Visse und Nagase, 2003). Die Aktivierung findet zumeist erst nach Sekretion statt, in Ausnahmefällen werden einige MMPs aber auch intrazellulär aktiviert (Nagase 1997).

Eine Dissoziation des Cystein-Rests von dem Komplex („Cystein-Switch“; Van Wart und Birkedal-Hansen, 1990) kann aber nicht nur durch proteolytische Abspaltung, die häufig durch andere MMPs aber z.T. auch autokatalytisch erfolgt (Rozanov und Strongin, 2003), sondern auch durch Chemikalien erfolgen (Nagase 1997). So aktivieren Thiol-modifizierende Reagenzien wie z.B. HgCl_2 Pro-MMPs ebenso wie SDS und reaktive Sauerstoffe (reactive oxygen species, ROS) sowie niedrige pH-Werte und Hitze (Visse und Nagase, 2003).

Mit Ausnahme von MMP7 besitzen alle MMPs aus Vertebraten eine Hemopexin-Domäne, welche die Interaktion mit TIMPs, Molekülen

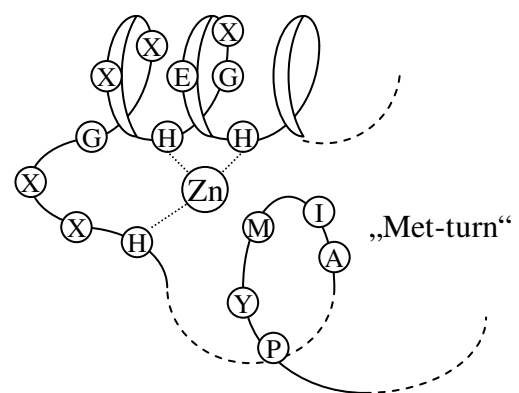


Abb. 1.2: Modell des konservierten Zink-Binde-Motivs der Metzinkine. Verändert nach Bode *et al.*, 1993.

der Zelloberfläche und den Substraten maßgeblich beeinflusst (Egeblad *et al.*, 2002). Substrate von MMPs finden sich vorwiegend in der ECM, doch werden auch Substrate anderer Zellkompartimente gespalten (McCawley und Matrisian, 2001).

In Vertebraten konnten bisher 24 verschiedene MMPs nachgewiesen werden, 23 davon finden sich beim Menschen. Von den sechs MT-MMPs sind vier mit einer Transmembrandomäne verankert und zwei über einen GPI-Anker (Itoh *et al.*, 1999; Kojima *et al.*, 2000; Overall 2002; Osenkowski *et al.*, 2004).

Die Membranständigkeit über Transmembrandomäne, Glycosyl-Phosphatidylinositol-(GPI-) Anker (siehe 1.2) oder N-terminalen Signal-Anker kennzeichnet zahlreiche MMPs und bietet diverse und komplexe, erst ansatzweise verstandene Möglichkeiten der Regulation durch kontrollierte Abspaltung der Proteine von der Plasmamembran oder die Organisation in sogenannten „Lipid Rafts“ innerhalb der Membran (Toth *et al.*, 2002; Toth *et al.*, 2006; Fernández-Messina *et al.*, 2010).

Aufgrund ihrer medizinischen Relevanz finden Matrix Metalloproteinasen vor allem in Wirbeltieren Beachtung, dennoch sind weitere Vertreter auch in anderen Organismen beschrieben worden, wie etwa im Seeigel das Envelysin (Lepage und Gache, 1989; Nomura *et al.*, 1997), im Nematoden *C.elegans* (Wilson *et al.*, 1994) oder in Hydra (*Hydra vulgaris*), in der durch Inhibierung der MMP eine Beteiligung an Morphogenese, Zell-Differenzierung und Regeneration nachgewiesen werden konnte (Leontovich *et al.*, 2000).

1.1.2 MMPs aus Pflanzen

Der detaillierten Charakterisierung von MMPs in tierischen Systemen steht die Beschreibung in Pflanzen bei weitem nach. Die Zahl wissenschaftlicher Veröffentlichungen ist überschaubar und kann daher hier weitgehend komplett Berücksichtigung finden. Das Spektrum reicht dabei von den zu erwartenden Modellpflanzen *Arabidopsis thaliana* und Tabak über Kürbis, Soja, Gurke, Kiefer und Buchweizen bis hin zur einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*. Daher liegt eine ubiquitäre Verbreitung von MMPs auch in Pflanzen nahe (Hara und Matsubara, 1980; Bond und Bowles, 1983; Ratnaparkhe *et al.*, 2007 und Dalkin *et al.*, 1983).

Allen pflanzlichen MMPs gemein ist das Fehlen der Hemopexin-Domäne. Dieses Charakteristikum teilen sie mit *C.elegans* und der MMP-7 (Matrylisin) aus Vertebraten (Massova *et al.*, 1998; Maidment *et al.*, 1999). Strukturell weisen die bekannten pflanzlichen MMPs die die Proteinfamilie kennzeichnenden Domänen

Signalpeptid, Propeptid und katalytische Domäne auf. Damit ist für alle Vertreter von extrazellulärer Lokalisation auszugehen, aus der Rolle fällt nur *At4*-MMP, welches zwar über ein N-terminales Signalpeptid verfügt, das aber wahrscheinlich nicht abgespalten werden kann. Daher darf die Retention im Endoplasmatischen Retikulum vermutet werden (Maidment *et al.*, 1999).

Die apoplastische Lokalisation pflanzlicher MMPs konnte für zahlreiche der Enzyme experimentell bestätigt werden, so z.B. die Membranständigkeit für *Nt*MMP1 als erste in Tabak gefundene MMP (Schiermeyer *et al.*, 2009). Unterschieden werden muss auch zwischen der Bindung an die Zellwand, der Lokalisation in der Membran und der Sekretion löslichen Proteins in den Apoplasten. In älteren Blättern der Sojabohne z.B. konnten für *Gm*MMP1 (= SMEP) zwei Varianten extrazellulärer Lokalisation, nämlich die Bindung an die Zellwand und die Löslichkeit im Apoplasten, nachgewiesen werden (Graham *et al.*, 1991; Huangpu *et al.*, 1996; Pak *et al.*, 1997).

Daneben sind von einigen pflanzlichen MMPs die Expressionsmuster in der Pflanze, sowohl nach Organen als auch zeitlich differenziert, bekannt. Dies gilt insbesondere für die fünf in *Arabidopsis thaliana* identifizierten MMPs (*At1*-MMP - *At5*-MMP; Maidment *et al.*, 1999). Der Nachweis gelang sowohl in Blättern, Blüten, Wurzeln und Stängeln der Pflanzen. Näher charakterisiert wurde bisher nur *At2*-MMP (Golldack *et al.*, 2002). Es zeigte sich durch Transkriptanalyse v.a. die Expression in Blättern und Wurzeln vier Wochen alter Pflanzen, durch *in situ* Hybridisierung konnte außerdem die Expression in Phloem- und Xylemzellen sowie der Epidermis, anliegenden Mesophyllzellen, Blüten, Stempeln, Samenanlagen und Blütenboden gezeigt werden. Für *At2*-MMP steht darüber hinaus der bisher einzig bekannte knockout-Phänotyp für *Arabidopsis*-MMPs zur Verfügung; die entsprechende tDNA-Insertionsmutante (*At2*-MMP1) entwickelt sich zunächst normal, zeigt dann aber mit Beginn der regenerativen Phase reduziertes Wachstum von Wurzeln, Blättern und Sprossen, endend in verspätetem Blühen.

In vivo-Substrate sind bisher von keiner pflanzlichen MMP bekannt, doch erlaubte die Expression in *E.coli* die Analyse der Aktivität für einige der Proteine. Für *Gm*MMP2 aus Soja (*Glycine max*) konnte so die Spaltung von Myelin nachgewiesen werden (Graham *et al.*, 1991). Myelin wird ebenfalls von *At1*-MMP aus *Arabidopsis* gespalten, daneben wurden drei weitere MMP-Peptidsubstrate gespalten, nicht jedoch Gelatine oder Casein (Maidment *et al.*, 1999). *At1*-MMP zeigte darüber hinaus autokatalytische Eigenschaften und wurde durch einige humane TIMPs inhibiert. Wie das Gameten-lysierende Enzym (GLE) aus *Chlamydomonas* (Kinoshita *et al.*, 1991)

zeigt Cs1-MMP aus Gurke (*Cucumis sativus* L. cv Marketmore) auf Sequenzebene große Ähnlichkeit mit tierischen Collagenasen, die Spaltung von Collagen und dreier weiterer Peptidsubstrate durch rekombinantes Enzym konnte außerdem gezeigt werden (Delorme *et al.*, 2000). Von zwei hochmolekularen Strukturproteinen der Zellwand von Chlamydomonas ist die Spaltung durch GLE bekannt (Imam und Snell, 1988; Buchanan und Snell, 1988; Imam *et al.*, 1985). Es konnte die *in vitro*-Aktivierung des Enzyms durch Ultraschall und Gefrieren/Tauen vegetativer Zellen geteigt werden, die vermuten lässt, dass es durch Konformationsänderung zu autokatalytischer Aktivierung kommt (Matsuda *et al.*, 1987; Kinoshita *et al.*, 1991).

Auch ohne (von At2-MMP abgesehen) weitere auffällige Mutanten lassen sich aus der vorliegenden Literatur Schlüsse für mögliche Funktionen pflanzlicher MMPs ziehen. So fällt die für At2-MMP und Cs1-MMP aus Gurke sowie GmMMP1 aus Soja die mit zunehmendem Alter der Pflanzen verstärkte Synthese der entsprechenden MMPs auf. Dies gibt deutliche Hinweise auf eine Beteiligung an Prozessen der Seneszenz, bei der eine Degradierung der ECM und Zelltodereignisse stattfinden (Pak *et al.*, 1997; Delorme *et al.*, 2000; Golldack *et al.*, 2002).

Alle weiteren Befunde deuten auf eine Funktion von pflanzlichen MMPs in der Reaktion auf biotische und abiotische Stressfaktoren hin. Zum Teil konnte dies in Zellsuspensionskulturen von Soja und Tabak nach Kontamination mit Bakterien festgestellt werden (Graham *et al.*, 1991; Schiermeyer *et al.*, 2009), ebenso gelang der Nachweis erhöhter Akkumulation des Transkripts von GmMMP2 nach Pathogenbefall (durch *Phytophthora sojae* sowie *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*) und Verwundung (Liu *et al.*, 2001). Das rekombinante, aufgereinigte Enzym aus Soja inhibierte zusammen mit Protein-Extrakten aus den Pflanzen das Wachstum von Pathogenen stark, zuletzt genannte Autoren vermuten daher eine Abspaltung antimikrobieller Substanzen oder die Freisetzung extrazellulärer Elicitoren durch die MMP. Schiermeyer *et al.* spekulieren für NtMMP1 über eine ähnliche Funktion in Pathogenerkennung und –abwehr. Auch eine Funktion in symbiotischen Prozessen ist möglich, MtMMPL1 aus *Medicago truncatula* ist als ein frühes Nodulin der Leguminose bekannt, Ausschalten der MMP durch RNA-Interferenz führte über eine Störung des Infektionsprozesses mit Rhizobien zu einer Reduktion der Anzahl ausgebildeter Knötchen (Combier *et al.*, 2007).

Neben diesen biotischen Induktoren konnte außerdem die Induzierbarkeit durch abiotische Faktoren gezeigt werden. So wird die mRNA von GLE nicht nur während Wachstum und mitotischer Zellteilung verstärkt gebildet, sondern auch unter

Stickstoffmangel (Matsuda *et al.*, 1987; Kinoshita *et al.*, 1991). Durch Applikation von Methyljasmonat, dem Schwermetall Cadmium oder NaCl gestresste Arabidopsis-Pflanzen zeigten massiv ansteigende Transkriptmengen von *At2MMP* (Golldack *et al.*, 2002).

Zusammenfassend lässt sich daher trotz der bisher geringen Anzahl näher beschriebener pflanzlicher Matrix Metalloproteinasen von einer Beteiligung an vielfältigen Prozessen in der Pflanze ausgehen. Neben Funktionen in der normalen Entwicklung der Pflanze, insbesondere mit fortschreitendem Alter bis hin zur Seneszenz, scheinen MMPs die Reaktion auf Pathogenbefall sowie abiotischen Stress maßgeblich zu beeinflussen.

1.1.3 *SIMMP1*

Mit den zuvor beschriebenen Vertretern und ihren Funktionen in Verbindung gebracht werden konnte die erste Matrix-Metalloproteinasen aus Tomate (*Solanum lycopersicum*, früher *Lycopersicon esculentum*), nachdem zunächst die Induktion des Enzyms durch das Pilztoxin Fusicoccin über Microarray-Analyse beobachtet worden war (Frick und Schaller, 2002).

Die daraufhin entschlüsselte cDNA-Sequenz von *SIMMP1* ist seither bekannt und auf beiden Strängen vollständig bestimmt (EST Klon cLEC15M21, Clemson University). Sie besteht aus 1181 Basenpaaren mit einem offenen Leseraster (ORF) von 1104 Basenpaaren. Das codierte Protein ist 367 Aminosäuren lang bei einem errechneten Molekulargewicht von 40,2 kDa (Frick 2002). Von zwei potentiellen Transmembrandomänen ist eine Teil des N-terminalen Signalpeptides, die andere bildet einen Membrananker am C-Terminus, in dessen Nähe eine ω -site zur Verknüpfung mit einem GPI-Anker prognostiziert wird (Zimmermann 2004). Es findet sich ebenso das Zink-Binde-Motiv HEXGHXXGXXH wie auch der konservierte „Met-turn“ im Motiv AIMYP. Im Propeptid befindet sich ein PRCG(V/N)(P/A)D-Motiv mit dem charakteristischen „Cystein-Switch“ (Abb. 1.3 sowie schematisch Abb. 1.4).

Das in *E.coli* exprimierte und aufgereinigte Enzym (MMP-(His)₆, katalytische Domäne ohne Signal- und Propeptid sowie mit His₆-Tag anstelle der C-terminalen Transmembrandomäne) wurde mittels Zymographie, einem fluorogenen Peptidsubstrat und durch massenspektrometrische Bestimmung der Spaltprodukte synthetischer Peptide auf seine Aktivität hin untersucht. Es konnte neben caseinolytischer auch

```

AGGTTCTGATGAGGATTCCTTTATTCATCGCCATACTTTTGTCTTAGTGTCCATTTTC 60
      M R I P L F I A I L F V L S V P F P 18
-----Signalpeptid Reste 1-21-----
CATCTTCAGCTCATTTCTTCCAAATATTTCTTCAATTCCTCCTAATTTATTGAAACCAA 120
      S S A H F F P N I S S I P P N L L K P N 38
-----↑-----Propeptid Reste 22-150-----
ATGCCACTGCCTGGGATGCTTTTAACAAGTTATTAGGATGCCATTCCGGTCAGACGGTGC 180
      A T A W D A F N K L L G C H S G Q T V D 58
-----
ACGGCTTAGCGAAAATCAAAAAATATTTTCACTACTTTGGATACATTAATAATTCTTCCA 240
      G L A K I K K Y F H Y F G Y I N N S S T 78
-----
CTAACTTCACTGATGATTTTGATGATACTCTTGAATCTGCTCTCAAGACCTACCAGCTTA 300
      N F T D D F D D T L E S A L K T Y Q L N 98
-----
ACTTCAACCTCAACACCACCGGTGTGCTCGACGCGAACACCATTTCAGCATCTCATAAAAC 360
      F N L N T T G V L D A N T I Q H L I K P 118
-----*-----
CCAGATGTGAAACGCTGATGTAGTTAACGGTACTAGTACTATGAACCTCCGGTAAGCCAC 420
      R C G N A D V V N G T S T M N S G K P P 138
-----*-*-*-*-*-----
CGGCAGGTTCTCCGACGATGCACACCGTAGCTCACTACTCCTTCTTTCCGGGAAGTCCAC 480
      A G S P T M H T V A H Y S F F P G S P R 158
-----↑-----
                MMP-(His)6: M A + + + + + + + +
GGTGGCCGGCGAACAAGAGATCTGACATATGCTTTTGCACCGCAGAAATGGACTGACGG 540
      W P A N K R D L T Y A F A P Q N G L T D 178
      + + + + + + + + + + + + + + + + + +
ATGATATTAAGATTGTGTTACACGAGCGTTTGATAGGTGGTCGGAGGTGACTCCATTGA 600
      D I K I V F T R A F D R W S E V T P L T 198
      + + + + + + + + + + + + + + + + + +
CGTTTACTGAAATAGCATCGTACCAATCGGCTGATATTAAGATCGGGTTTTCAGCGGAG 660
      F T E I A S Y Q S A D I K I G F F S G D 218
      + + + + + + + + + + + + + + + + + +
ATCAACAACGATGGAGACCGTTTGATGGTCCATGGGGACATTAGCACACGCGTTTCC 720
      H N D G E P F D G P M G T L A H A F S P 238
      + + + + + + + + + + + + + + + + + +
CACCGCGGGGCATTTTCACTTGGACGGCGAGGAGAACGGGTGATCGACGGTGCGCCGA 780
      P A G H F H L D G E E N W V I D G A P I 258
      + + + + + + + + + + + + + + + + + +
TAGTTGATGGGAATTTCTTTTCTATATGTGCGGCGGTGGACCTTGAATCGGTTGCGGTT 840
      V D G N F F S I L S A V D L E S V A V H 278
      + + + + + + + + + + + + + + + + + +
ATGAAATCGGGCATTTATTGGGTTTGGGTCATTCATCCGTAGAAGATGCTATTATGTACC 900
      E I G H L L G L G H S S V E D A I M Y P 298
      ◆ + + + + + + + + + + + + + + + + + +
CGACTTTAGGAGCGGGTACCCGAAGAGTCGAGCTTAGAAATGATGATATATTGGGAGTCC 960
      T L G A G T R R V E L R N D D I L G V Q 318
      + + + + + + + + + + + + + + + + + +
AGGAGTTATACGGGCTAACCCGAATTATACTGGGCCAAACCCAAATTTGACTCCGAGCC 1020
      E L Y G S N P N Y T G P N P N L T P S Q 338
      + + + + + + + + + + + + + + + + + +
AAGAGAGTGACACAAATGGAGCCCCGATATTTGAGTTATCATGGTTTCATGGGTTTCTTG 1080
      E S D T N G A P I F E L S W F H G F L G 358
      ω?↑ -----Transmembrandomäne--
      + + + + + + + + H H H H H H *
GTTTATCTTTGCTTTGTTTCATTCAACTGTAGTTGATGGCATGATGTGATTATTTTTTAA 1140
      L F F A L F I Q L * 367
--Reste 347-367-----
TACTATATACTTGATTCATCTTTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1181
    
```

Abb. 1.3: cDNA-Sequenz von *S/MMP1* mit abgeleiteter AS-Sequenz. Das Stopcodon ist durch ein * gekennzeichnet, die Schnittstellen sind durch ↑ markiert. Das Signalpeptid (Reste 1-21) ist blau hervorgehoben, das Propeptid (Reste 22-150) rot. Das Motiv PRCG(V/N)(P/A)D („Cystein-Switch“) ist durch * markiert. In der katalytischen Domäne sind die das Zink-Binde-Motiv (blau) kennzeichnenden Histidin-Reste ebenso mit ◆ gekennzeichnet wie das Methionin im Met-turn. Die putative ω-site an Position 343, an der nach dem Abspalten des C-Terminus der vermutete GPI-Anker angehängt wird, ist grün gekennzeichnet, die C-terminale Transmembrandomäne (Reste 347-367) rosa. Gezeigt ist außerdem das Expressionskonstrukt MMP-(His)₆, welches der Aufklärung katalytischer Eigenschaften diene (Frick 2002) und in dieser Arbeit als Positivkontrolle auf Western Blots sowie zur Identifizierung eines *in-vivo*-Substrates von *S/MMP1* eingesetzt wurde.