

Die Rolle der murinen Matrix-Metalloproteinase-13 in der Embryonalentwicklung und epidermalen Wundheilung

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
des Fachbereichs für Biologie

an der

Universität Konstanz

vorgelegt von

Dipl. Biol. Bernd Dittrich

Geboren am 25. Januar 1974 in Stuttgart-Bad Cannstatt

1. Referent: Prof. Dr. Werner Hofer

2. Referent: Prof. Dr. Peter Angel

Tag der Promotion: 1. Juni 2004

Konstanz, März 2004

Die vorliegende Arbeit entstand
in der Abteilung „Signaltransduktion und Wachstumskontrolle“
des Deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg
unter der Anleitung von Prof. Dr. Peter Angel

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Peter Angel für die Aufnahme in seine Abteilung und die Möglichkeit zur Promotion bedanken. Insbesondere bin ich ihm für die Bereitstellung des interessanten Themas und für seine effektive Betreuung besonders am Ende meiner Arbeit dankbar.

Herrn Prof. Dr. Werner Hofer danke ich ganz herzlich für die Übernahme des Referats.

Herrn Prof. Dr. Alexander Bürkle bin ich dafür dankbar, dass er sich bereit erklärt hat, als dritter Prüfer bei meiner Promotion zu fungieren.

Bei Frau Dr. Bettina Hartenstein möchte ich mich für die Übernahme der Betreuung meiner Arbeit und für das Korrekturlesen der Arbeit bedanken.

Ein Dankeschön geht an Herrn Dr. Jochen Hess, dafür dass er sich stets Zeit genommen hat, bei methodischen Problemen Rat zu geben und über Ergebnisse zu diskutieren. Dabei ergaben sich viele hilfreiche Anregungen für meine Arbeit.

Frau Dr. Marina Schorpp-Kistner danke ich für die Hilfe beim Verfassen des Tierversuchsantrags für die Wundheilungsexperimente.

Bedanken möchte ich mich auch herzlich bei Frau Prof. Dr. Cornelia Mauch für die Einführung in die Methodik der Wundheilungsexperimente und für die Hilfe bei der Analyse der Wunden.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht an Sibylle Teurich, die mir bei der Anfertigung der Gefrierschnitte eine sehr große Hilfe war und mir bei Problemen im Labor immer gerne geholfen hat. Ihr danke ich auch für die angenehme Atmosphäre im Labor.

Melanie Sator-Schmitt danke ich für die Hilfestellung bei der Verwundung der Mäuse.

Bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Norbert Fusenig und Prof. Dr. Friedrich Marks bedanke ich mich herzlich für die Bereitstellung von Antikörpern und die Unterstützung mit Protokollen für die immunhistochemischen Färbungen.

Frau PD Dr. Nicole Maas-Szabowski bin ich für das sehr hilfreiche Korrekturlesen der Einleitung dankbar.

Herrn Dr. Dirk Schmidt danke ich für das Korrekturlesen der Diskussion.

Ein Dank gilt auch Herrn Dr. Axel Szabowski für die Hilfe beim Erstellen des Layouts der Arbeit.

Bei meiner Laborbanknachbarin Frau Dr. Hanna Bierbaum bedanke ich mich für die sehr angenehme Zeit im Labor. Ein großes Dankeschön auch für ihre Korrekturvorschläge für meine Arbeit, die mir eine sehr große Hilfe waren.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an Lore Florin, die immer gerne über die Ergebnisse meiner Arbeit diskutiert hat und mir mit Rat und Tat zur Seite stand.

Bei allen Mitarbeitern der Abteilung A100 bedanke ich mich für ihre große Hilfsbereitschaft und die im Laufe meiner Doktorarbeit immer besser werdende Atmosphäre im Labor. Besonders dankbar bin ich in diesem Zusammenhang den Doktoranden der Arbeitsgruppe.

Ein besonderer Dank gilt noch meinen Eltern, die mich stets voll und ganz unterstützt haben.

Abkürzungsverzeichnis

Die verwendeten Einheiten entsprechen dem internationalen Standard (SI-Einheiten)

Abb.	Abbildung	IGF	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
AP-1	Aktivator Protein-1	IGFBP	Insulin-ähnliches Wachstumsfaktor Bindeprotein
α -sma	" α -smooth muscle actin", α -Aktin (der glatten Muskulatur)	IL-1	Interleukin 1
ATBW	Arbeitsgemeinschaft der Tierschutz- beauftragten Baden-Württemberg	JNK	Jun-N-terminale-Kinase
bp	Basenpaar	kb	Kilobasen
BSA	Rinderserumalbumin	kDa	Kilodalton
°C	Grad Celsius	KGF	Keratinocyten Wachstumsfaktor
cDNA	Komplementäre DNA	loxP	"locus of X-ing over of bacteriophage P1"
cm	Zentimeter	M molar	Mol/Liter)
cmv	Cytomegalovirus	mA	Milliampere
cpm	„counts per minute“, Signale pro Minute	MBq	Megabequerel
cre	"cyclization recombination"	MCS	"multiple cloning site"
d	„day“, Tag	mg	Milligramm
d. h.	das heißt	μ l	Mikroliter
DAB	Diaminobenzidin	μ m	Mikrometer
dATP	Adenosin-5'-Triphosphat	min	Minute
dCTP	Cytosin-5'-Triphosphat	mM	Millimolar
DEPC	Diethylpyrocarbonat	mm	Millimeter
dGTP	Guanosin-5'-Triphosphat	MMP	Matrix-Metalloproteinase
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum	mRNA	„Messenger ribonucleic acid“, Boten RNA
DMSO	Dimethylsulfoxid	NaCl	Natriumchlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure	nm	Nanometer
DNase	Desoxyribonuklease	OD	Optische Dichte
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat	PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
dpc	"days post coitum", Tage nach dem Koitus	PCR	Polymerasekettenreaktion
DTT	Dithiothreitol	PDGF	"platelet-derived growth factor", von Thrombozyten gebildeter Wachstums- faktor
dUTP	Uracil-5'-Triphosphat	PEA-3	"polyomavirus enhancer A-binding protein-3"
ECM	extrazelluläre Matrix	PFA	Paraformaldehyd
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	PKC	Proteinkinase C
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor	PTH	Parathormon
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor	RNA	Ribonukleinsäure
g	Gramm	RNase	Ribonuklease
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase	rpm	"rounds per minute", Umdrehungen pro Minute
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie- stimulierender Faktor	RT	Raumtemperatur
h	"hour", Stunde	RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion
H ₂ O	deionisiertes Wasser	s	Sekunde
HB-EGF	Heparin-bindender epidermaler Wachstumsfaktor	SDS	Natriumdodecylsulfat
HE	Hämatoxylin & Eosin		

Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat/EDTA
TRE	TPA responsive element
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
TIE	TGF-b inhibitory element
TIMP	"tissue inhibitor of matrix-metalloproteinase"
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TPA	12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat
TRE	„TPA- responsive element“
Tris	tris-Hydroxymethylaminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	"unit", Einheit
UV	ultraviolette Strahlung
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
Zn	Zink

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	2
2.1	Die Haut	2
2.1.1	Aufbau der menschlichen Haut	2
2.1.2	Aufbau der Maushaut	6
2.2	Wundheilung der Haut	7
2.2.1	Bildung eines Fibrinpflöpfes	7
2.2.2	Entzündungsreaktion	9
2.2.3	Bildung des Granulationsgewebes	9
2.2.4	Reepithelialisierung	10
2.2.5	Wundkontraktion und Vernarbung	10
2.3	Matrix-Metalloproteinasen	11
2.3.1	Einteilung der MMPs	11
2.3.2	Struktur der MMPs	11
2.3.3	Regulation der MMP-Aktivität	13
2.3.4	Die Wirkungsweise der MMPs	14
2.3.5	MMPs in physiologischen Prozessen	16
2.4	Matrix-Metalloproteinase-13	18
2.4.1	Proteinstruktur der MMP-13	19
2.4.2	Regulation der Transkription der MMP-13	19
2.4.3	Regulation der proteolytischen Aktivität der MMP-13	20
2.4.4	Substrate der MMP-13	21
2.4.5	Expression der MMP-13 in physiologischen und pathologischen Prozessen	21
2.5	"Knock-out" Mäuse als Tiermodell	22
2.6	Fragestellung	25
3	Material und Methoden	26
3.1	Material	26
3.1.1	Chemikalien und Bezugsquellen	26

3.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterial	27
3.1.3 Enzyme und Kits	28
3.1.4 Radiochemikalien	29
3.1.5 Antikörper	29
3.1.6 Oligonukleotide für die PCR	30
3.1.7 Proben für Southern-Blot Analysen	30
3.1.8 Proben für Northern-Blot Analysen	30
3.1.9 Hybridisierungssonden für <i>in situ</i> Hybridisierungen	31
3.1.10 Lösungen und Puffer	31
3.1.11 Nährmedium für die Bakterienkultur	31
3.1.12 Bakterienstämme	31
3.1.13 Mäuse	32
3.2 Wundheilungsexperimente	32
3.3 Histologische Methoden	33
3.3.1 Isolierung von Embryonen	33
3.3.2 Isolierung von adulten Knochen	33
3.3.3 Fixierung und Einbettung von Embryonen und adulten Knochen in Paraffin	33
3.3.4 Anfertigen von Paraffinschnitten	34
3.3.5 Isolierung und Fixierung von Wunden	34
3.3.6 Isolierung und Fixierung von Rücken- und Schwanzhaut	34
3.3.7 Anfertigung von Gefrierschnitten	35
3.3.8 Hämatoxylin & Eosin-Färbung	35
3.3.9 Immunhistochemie	35
3.3.10 Indirekte Immunfluoreszenz	37
3.3.11 Phalloidin-Färbung	39
3.3.12 Statistische Auswertung von histologisch gefärbten Schnitten	39
3.3.13 <i>In Situ</i> Hybridisierung an Gewebeschnitten	40
3.4 Allgemeine DNA-Techniken	44
3.4.1 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung	44
3.4.2 Phenol/Chloroform-Extraktion	44
3.4.3 Fällung von Nukleinsäuren	44
3.4.4 Plasmid-DNA Mini-Präparation	45

3.4.5 Plasmid-DNA Maxi-Präparation	45
3.4.6 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen	45
3.4.7 Phosphorylierung von Oligonukleotiden und Linkern	46
3.4.8 Auffüllen von 5'-Überhängen, Abbau von 3'-Überhängen	46
3.4.9 Ligation von DNA-Fragmenten	46
3.4.10 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	46
3.4.11 Isolierung von genomischer DNA	46
3.4.12 Elektrophoretische Auftrennung von DNA	47
3.4.13 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	47
3.4.14 Blotten von DNA-Gelen („Southern Blot“)	48
3.4.15 Hybridisierung der Membran mit einer radioaktiv-markierten Sonde	48
3.4.16 Polymerase-Ketten-Reaktion	48
3.4.17 Herstellung chemo-kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien	49
3.4.18 Transformation kompetenter Bakterien	49
3.5 RNA-Methoden	49
3.5.1 Präparation von Gesamt-RNA aus Geweben	49
3.5.2 RT-PCR	50
3.5.3 Gelelektrophorese von RNA	50
3.5.4 Transfer von RNA auf Nylon-Membranen („Northern Blot“)	50
3.5.5 Hybridisierung der RNA	51
4 Ergebnisse	52
4.1 Herstellung von <i>mmp-13</i> knock-out Mauslinien	52
4.1.1 Genotypisierung der <i>mmp-13</i> -knock-out Mauslinien	54
4.1.2 Überprüfung der Rekombinationseffizienz des geflochtenen <i>mmp-13</i> Allels in den <i>mmp-13</i> knock-out Mauslinien	56
4.1.3 Analyse der Rekombination der geflochtenen <i>mmp-13</i> Allele auf RNA-Ebene	58
4.2 Phänotypische Analyse der MMP-13-defizienten Mäuse	59
4.2.1 Embryonalentwicklung der MMP-13-defizienten Mäuse	59
4.2.2 Phänotyp adulter MMP-13-defizienter Mäuse	62
4.3 Wundheilungsexperimente	67
4.3.1 Durchführung der Wundheilungsexperimente	68

4.3.2 Expression der MMP-13 während der Wundheilung	69
4.3.3 Makroskopische Analyse der Wundheilung	71
4.3.4 Mikroskopische Analyse der Wundheilung	72
4.3.5 Kompensation des Verlustes von MMP-13	90
4.3.6 Wundheilungsexperimente mit MMP-9-defizienten Mäusen	91
5 Diskussion	93
5.1 Herstellung von MMP-13-defizienten Mauslinien	94
5.2 Einfluss der MMP-13 auf die Entwicklung von Knochengewebe	95
5.3 Einfluss der MMP-13 auf die Entwicklung und Homöostase der Haut	97
5.4 Die Funktion der MMP-13 in der Wundheilung der Haut	98
5.4.1 Beschleunigter Wundschluss der MMP-13-defizienten Wunden	98
5.4.2 Untersuchungen des Granulationsgewebes	102
5.4.3 Kompensation der Funktion der MMP-13 in der Wundheilung der Haut	105
6 Literatur	109

1 Zusammenfassung

Matrix-Metalloproteinasen sind an vielen biologischen Prozessen beteiligt, in denen die Umstrukturierung extrazellulärer Matrix benötigt wird. Solche Vorgänge sind zum Beispiel die Embryonalentwicklung, die Bildung und Umstrukturierung von Knochen, die Bildung neuer Blutgefäße, die Metastasierung von Tumorzellen und die Wundheilung der Haut.

In dieser Arbeit wurde die Funktion der Matrix-Metalloproteinase-13 (MMP-13) untersucht. MMP-13 wird in der Embryonalentwicklung und der adulten Maus im Knochengewebe exprimiert. In der normalen Haut kann keine MMP-13-Expression nachgewiesen werden, jedoch wird ihre Expression nach Verwundung der Haut induziert. Um die Funktion der MMP-13 in der Embryonalentwicklung und der Wundheilung der Haut zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit eine aktuell generierte *mmp-13* knock-out Maus detailliert untersucht. Diese MMP-13-defizienten Mäuse sind lebensfähig und unterscheiden sich in Größe und Aussehen nicht von Kontrollmäusen. Für die Knochenentwicklung hat das Fehlen der MMP-13 keine signifikanten Konsequenzen. Die Embryonalentwicklung der Haut und ihre Homöostase in der adulten Maus sind in den MMP-13-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen unverändert. Die in dieser Arbeit durchgeführten Wundheilungsexperimente zeigen einen leicht beschleunigten Wundschluss bei den *mmp-13* knock-out Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen, wobei der zu Grunde liegende molekulare Mechanismus noch ungeklärt ist. Weitere wichtige Parameter der Wundheilung wie die Größe des Granulationsgewebes, das Rekrutieren von inflammatorischen Zellen, die Angiogenese, die Bildung einer neuen Kollagen-Matrix und der Aufbau einer neuen Epidermis mit darunterliegender Basalmembran sind in den MMP-13-defizienten Wunden im Vergleich zu den Kontrollwunden unverändert. Damit wurde gezeigt, dass die MMP-13 in diesen Prozessen entweder nicht benötigt wird oder ihre Funktion kompensatorisch von einer anderen MMP erfüllt wird. Ein möglicher Kandidat hierfür ist die MMP-9, die ein der MMP-13 ähnliches Expressionsmuster in der Wundheilung aufweist. In dieser Arbeit durchgeführte Wundheilungsexperimente mit MMP-9-defizienten Mäusen zeigen einen verlangsamten Wundschluss im Vergleich zu Kontrollmäusen. Dies deutet auf eine beschleunigende Wirkung der MMP-9 auf den Vorgang des Wundschlusses hin. Die in dieser Arbeit nachgewiesene Expression von MMP-9 am Wundrand der MMP-13-defizienten Wunden könnte demnach zu dem beschleunigten Wundschluss bei den MMP-13-defizienten Wunden beitragen.

2 Einleitung

In einem mehrzelligen Organismus gewährleistet die Interaktion und Kommunikation von Zellen untereinander und mit der Umwelt, dass komplexe Aufgaben gemeinsam in einem funktionellen Verband erfüllt werden können. Dabei können Zellen Signale über Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte oder über Signalmoleküle, die an ihre Oberflächenrezeptoren binden, erhalten. An diesen Wegen der Signalübermittlung sind Mitglieder der Familie der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) beteiligt. Zum einen sind sie in der Lage, Komponenten der extrazellulären Matrix zu spalten und dadurch die Interaktion zwischen Matrix und Zelle zu beeinflussen, und zum anderen können sie Signalstoffe wie Wachstumsfaktoren und Zytokine, die an Strukturen der extrazellulären Matrix gebunden sind, freisetzen. Dies spielt besonders dann eine wichtige Rolle, wenn schnelle Änderungen im Organismus nötig sind, wie zum Beispiel im Falle der Verwundung der Haut. Hier ist eine schnelle Reparatur essentiell, um zu verhindern, dass Krankheitserreger über die offene Wunde in den Körper gelangen. Im Umbau der extrazellulären Matrix, der in diesem Prozess eine wichtige Rolle spielt, wird für MMPs ebenfalls eine wichtige Funktion diskutiert. Wie wichtig eine genaue Regulation der Aktivität der MMPs im Prozess der Wundheilung ist, zeigen Untersuchungen, die das Auftreten von chronischen Wunden oder Keloiden (Bindegewebswucherungen im Narbengebiet) in Zusammenhang mit einer Fehlregulation von MMPs bringen können (als Übersichtsartikel: Ravanti und Kahari, 2000). Ein besseres Verständnis der Regulation und Funktion der MMPs in diesem Prozess ist daher für die Entwicklung neuer Behandlungsmethoden solcher chronischen Krankheiten von großer Bedeutung.

2.1 Die Haut

Die Haut bedeckt die gesamte äußere Oberfläche des Körpers und stellt damit sein größtes Organ dar. Sie dient als Barriere gegen das Eindringen von Mikroorganismen, schützt vor mechanischen, chemischen und osmotischen Verletzungen, ist an der Regulation der Körpertemperatur und des Wasserhaushalts beteiligt und besitzt die Fähigkeit der Resorption und Exkretion. Nicht zuletzt stellt die Haut als umfassendes Sinnesorgan ein wichtiges Kommunikationsorgan dar.

2.1.1 Aufbau der menschlichen Haut

Die humane Haut setzt sich aus zwei sehr unterschiedlichen Schichten zusammen, der Epidermis (Oberhaut), die die äußere Schicht der Haut bildet, sowie der unter ihr liegenden dickeren Schicht, der Dermis (Lederhaut). Beide Kompartimente sind durch eine dünne widerstandsfähige Schicht extrazellulärer Matrix, die Basalmembran, getrennt. Unter der Dermis befindet

sich die Subkutis (Unterhaut), die mit ihrem subkutanen Fettgewebe den Übergang zwischen der Haut und den darunterliegenden Sehnen und Muskeln bildet (als Übersichtsartikel: Lever, 1984; Bowden *et al.*, 1987; Fuchs, 1990; Leigh *et al.*, 1994; Holbrook, 1994) (Abb.1).

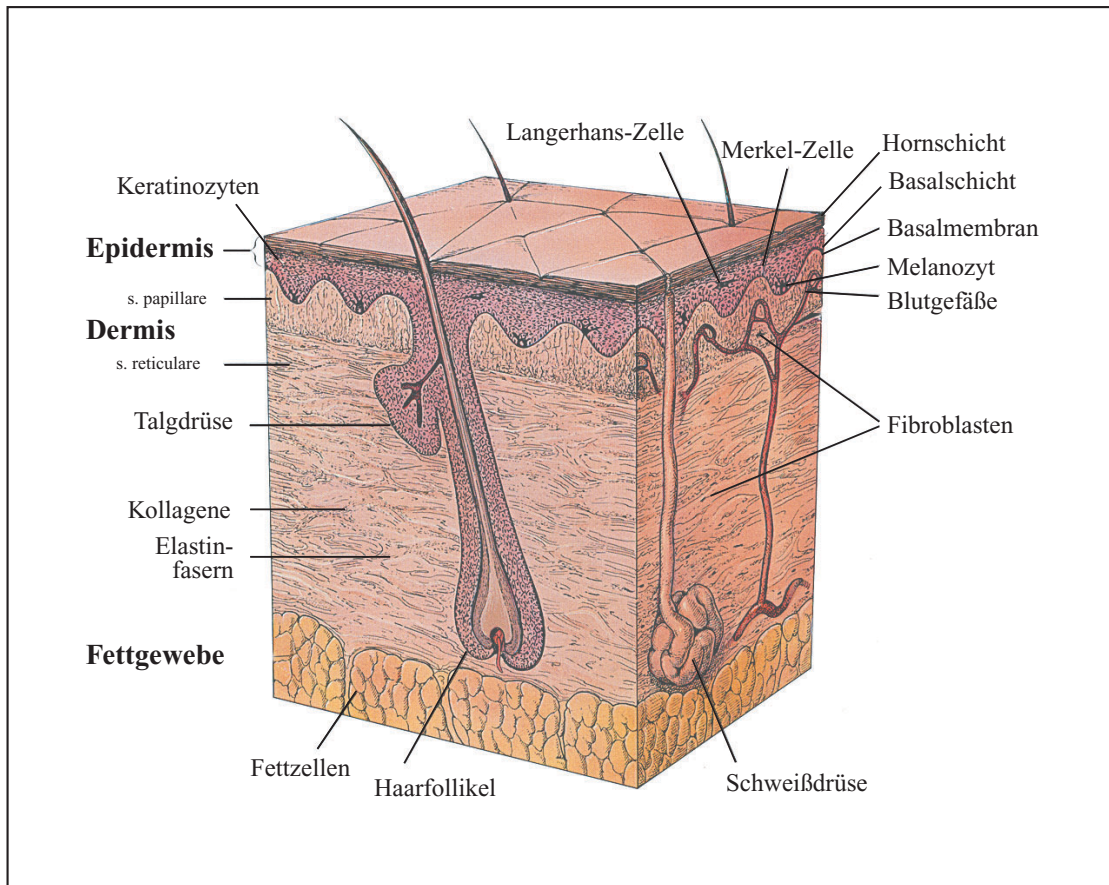


Abb.1 Dreidimensionale Darstellung der menschlichen Haut

Die Epidermis

Die humane Epidermis ist ein mehrschichtiges, zum Teil verhorntes (keratinisiertes) Plattenepithel, das hauptsächlich aus Keratinozyten besteht. Neben den Keratinozyten befinden sich in der Haut Melanozyten, Langerhanszellen und Merkelzellen, die zusammen jedoch weniger als 5 % der Gesamtzellzahl der Epidermis ausmachen. Um ihre Funktion zu erfüllen, d. h. den Körper gegen äußere Einflüsse zu schützen, darf die Epidermis bei gewöhnlicher Belastung nur wenig abgenutzt werden und muss zudem die Fähigkeit besitzen, sich zu erneuern. Sie muss aber auch elastisch genug sein, um die Bewegungen des Körpers nicht zu behindern. Diese Voraussetzungen werden durch das *Stratum corneum* (Hornschicht) erfüllt, einer Deckschicht aus toten Zellen, die der Epidermis aufliegt. Das abschilfernde Hornmaterial des *Stratum corneums* muss während der normalen Homöostase der Haut stets erneuert werden. Hierfür unterliegen die Keratinozyten einem ständigen Proliferations- und Differenzierungsprozess

(Keratinisierung), der die Epidermis in distinkte Schichten unterteilt (Abb.2): Nach der Zellteilung von Basalzellen im *Stratum basale* (Basalschicht), die die unterste Schicht der Epidermis bildet, durchlaufen die Keratinozyten in *Stratum spinosum* (Stachelschicht) und *Stratum granulosum* (Körnerschicht) ansteigende Reifegrade bis sie letztlich terminal differenziert als tote Keratinozyten vom *Stratum corneum* abgestoßen werden (Teraki und Shiohara, 1999; Wehrli *et al.*, 2000).

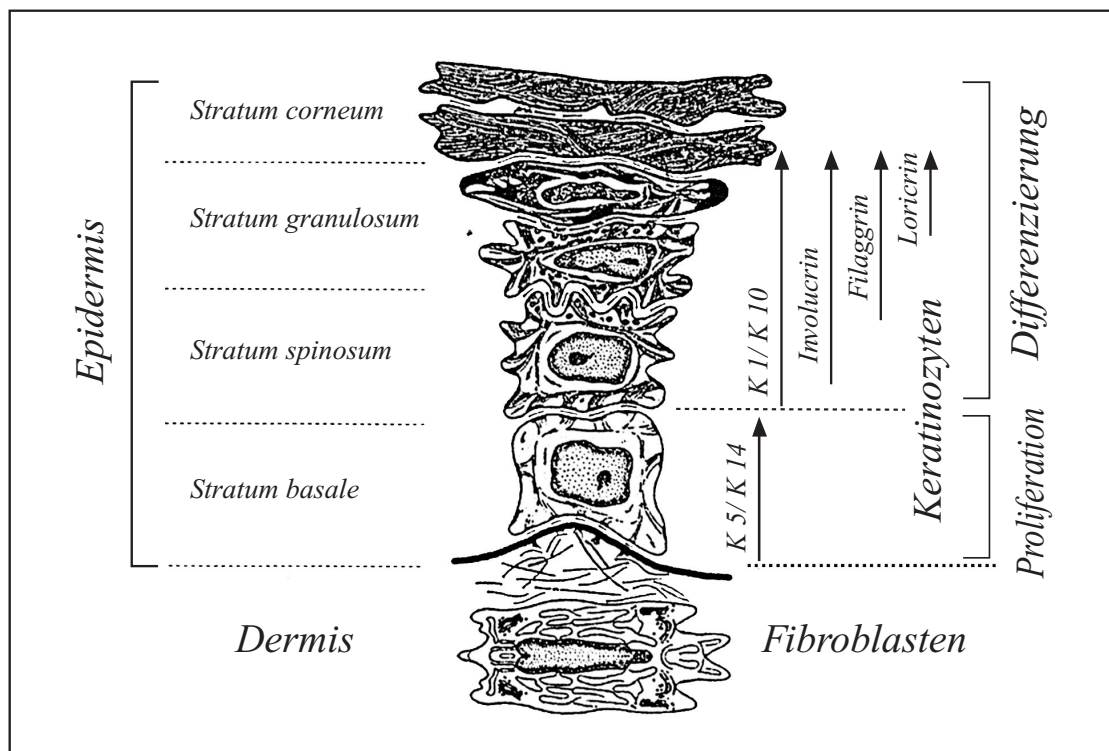


Abb.2 Schematische Darstellung des Aufbaus der menschlichen Haut und Lokalisation der differenzierungsspezifisch exprimierten Proteine (verändert nach Bowden *et al.*, 1987)

Im *Stratum basale* befinden sich epidermale Stammzellen, die kontinuierlich proliferieren. Aus diesen Stammzellen entstehen vorübergehend teilungsaktive Tochterzellen ("transient amplifying cells"), die später in die terminale Differenzierung eintreten. Für jede der Differenzierungsschichten ist die Expression bestimmter Proteine charakteristisch, so z. B. Keratin 5 und 14 für das *Stratum basale*. Diese Keratine werden ab dem *Stratum spinosum* durch Keratine vom Typ 1 und 10 ersetzt. Im *Stratum spinosum* wird zudem das Hüllproteins Involucrin exprimiert. Als charakteristisches Protein des *Stratum granulosum* tritt Filaggrin sowie unmittelbar unterhalb des *Stratum corneums* das Strukturprotein Loricrin auf.

Um diese Homöostase der Haut aufrecht zu erhalten, müssen Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten präzise auf einander abgestimmt sein (Fuchs und Green, 1980; Fuchs *et al.*, 1990). Eine Verschiebung dieses Gleichgewichts zugunsten der Proliferation führt im Falle der Hautkrankheit Psoriasis (Schuppenflechte) zu einer starken Schuppenbildung der Epidermis. An der Regulation dieses Gleichgewichts sind neben Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen auch parakrin wirkende Faktoren beteiligt. Diese Faktoren wirken nicht nur Kompartiment-spezifisch, sondern sind auch in der Lage, Signale zwischen Epidermis und Dermis austauschen. *In vitro*-Studien haben gezeigt, dass Interleukin-1 (IL-1), das von Keratinozyten produziert wird, in dermalen Fibroblasten zur Expression von KGF (keratinocyte growth factor) und GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor) führt. Diese Faktoren wiederum sind an der Regulation des Gleichgewichts von Proliferation und Differenzierung in den Keratinozyten beteiligt, das einen korrekten Aufbau der Epidermis gewährleistet (Szabowski *et al.*, 2000).

Die Dermis

Die Dermis gliedert sich in das *Stratum papillare* (Papillarschicht) und das *Stratum reticulare* (Geflechschicht) (Abb.1). Das *Stratum papillare* enthält Kollagen Typ VII, welches die Dermis mit der Basalmembran verankert und damit eine Verbindung zur Epidermis herstellt. Es stellt ein sehr lockeres Gefüge aus relativ dünnen Kollagenfasern und einem Netz aus Elastinfasern dar. Dagegen ist das tiefer angesiedelte *Stratum reticulare* reich an kräftigen Kollagenfaserbündeln vom Typ I, die der straffen Bindegewebsschicht die charakteristische Festigkeit geben. Zahlreiche Elastinfasern gewährleisten die Zugelastizität der Haut sowie die Rückordnung des Fasergeflechtes nach Dehnung.

Das *Stratum reticulare* grenzt in seinem unteren Bereich an die Subkutis. Die Subkutis enthält das am lockersten gebaute Bindegewebe der Dermis, welches in der Regel von vielen Fettzellen durchsetzt ist. Dieses Fettgewebe dient vor allem als Kälteschutz und Energiespeicher. An die Subkutis grenzt eine Schicht aus Sehnen und Muskeln.

Die Dermis besteht hauptsächlich aus Fibroblasten, die in eine Matrix aus Strukturproteinen wie Kollagen Typ I und III, Elastin und einer amorphen Grundsubstanz aus wasserbindenden Mucopolysacchariden eingebettet sind. Die meisten Komponenten der dermalen Matrix werden von den Fibroblasten selbst produziert. Neben den Fibroblasten befinden sich in der Dermis auch Immunzellen wie Makrophagen und Mastzellen, Blutkapillaren und Nervenendigungen (als Übersichtsartikel: Lever, 1984; Jung, 1995).

Das Netzwerk an Blutkapillaren, das die Dermis durchzieht, sorgt für die Bereitstellung von Nährstoffen für die avaskuläre Epidermis sowie für die Thermoregulation der Haut. Neben diesen Aufgaben stellt die extrazelluläre Matrix (ECM) der Dermis einen Speicherplatz für Signalmoleküle wie Wachstumsfaktoren und Zytokine dar, die durch Spaltung von Kompo-

nennten der extrazellulären Matrix sehr schnell aus dieser freigesetzt werden können. Die Spaltung von Matrixkomponenten wird meist von Matrix-Metalloproteinasen durchgeführt. So wird z. B. die Bindung des bFGF (basic fibroblast growth factor) an Perlecan, einer Komponente der ECM der Dermis, durch den Abbau von Perlecan durch MMP-1 und MMP-3 gelöst und bFGF kann sein Aktivität entfalten (Whitelock *et al.*, 1996). bFGF ist ein Wachstumsfaktor, der unter anderem die Bildung neuer Blutgefäße in Prozessen wie z.B. der Wundheilung der Haut stimuliert.

Die Basalmembran

Die Basalmembran oder Basallamina ist ein Netzwerk aus extrazellulärer Matrix (ECM), das die Epidermis mit der Dermis verbindet. Sie setzt sich aus den Hauptkomponenten Kollagen Typ IV, Laminin 1/10, Entactin und Nidogen zusammen. Diese treten mit Proteoglykanen wie Perlecan oder Integrinen in Kontakt. Die Organisation der Basalmembran wird durch multifunktionelle Aggregationen ihrer verschiedenen Komponenten miteinander bestimmt. Während die basalen Keratinozyten hauptsächlich über Integrine mit der Basalmembran verbunden sind, verankern Fibrillen aus Kollagen Typ VII die Basalmembran mit dem dermalen Bindegewebe. Weitere Haftproteine wie Tenascin, Thrombospondin und Fibronectin sind besonders bei Wachstums- und Regenerationsvorgängen mit der Basalmembran assoziiert (als Übersichtsartikel: Quondamatteo, 2003).

2.1.2 Aufbau der Maushaut

In Aufbau und Struktur unterscheidet sich die Maushaut von der menschlichen Haut nur geringfügig. Die Epidermis der Maushaut ist zwar dünner als ihr menschliches Homolog, die Differenzierung der Keratinozyten läuft jedoch nach demselben Prinzip ab. Man findet in den einzelnen Differenzierungsschichten dieselben charakteristischen Proteine exprimiert.

Die Epidermis ist in der neugeborenen Maus in vier deutlich unterscheidbare Zellagen unterteilt. Zu diesem Zeitpunkt hat die Maushaut mit der menschlichen Haut die meisten Gemeinsamkeiten. In den Wachstumsperioden nach der ersten postnatalen Woche nimmt die Dicke der murinen Epidermis deutlich ab. Allgemein gilt bei der Maus, dass die Epidermis in dicht behaarten Bereichen sehr dünn, in wenig oder nicht behaarten Regionen wie Pfotenballen und Schwanz deutlich dicker ausgebildet ist. In der Bauchhaut des Menschen werden 5-12 Zellagen registriert wohingegen die behaarte Rückenhaut der Maus meist nur 3-4 Zellagen aufweist. Daher lassen sich die verschiedenen Differenzierungsschichten der Epidermis in der Maus lediglich an der stark verhornten Epidermis der Pfotenballen oder der Schwanzhaut detailliert untersuchen (Militzer, 1982). Der Übergang von Epidermis zu Dermis ist in der humanen Haut durch leisten- oder kegelförmige, basale Epidermisporsprünge mit dazwischenragenden Dermisfortsätzen gekennzeichnet. Diese Papillenbildung führt zu einer Oberflächenvergrößerung,

so dass die gefäßlose, dicke Epidermis durch Diffusion von Stoffen aus den Blutgefäßen der Dermis ausreichend ernährt werden kann. Je dünner die betreffende Epidermisregion ist, desto einfacher und flacher fallen diese Papillen aus. In der dünnhäutigen, dicht behaarten Epidermis der Maus fehlen diese Papillen völlig.

Untersuchungen an Maushaut und menschlicher Haut haben gezeigt, dass sich die Erkenntnisse, die an Maushaut gewonnen werden, größtenteils auf die menschliche Haut übertragen lassen.

2.2 Wundheilung der Haut

Die wichtigste Aufgabe der Haut ist es, den Körper gegen die ihn umgebende Umwelt zu schützen. Jegliche Verletzung der Haut muss daher möglichst schnell und effektiv beseitigt werden. Die Wundheilung der Haut ist ein komplexer biologischer Reparaturvorgang, bei dem eine Vielzahl von Zelltypen, Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Proteasen und Bestandteilen der extrazellulären Matrix zusammenwirken (als Übersichtsartikel: Martin, 1997, Singer und Clark, 1999) (Abb.3).

Die meisten Erkenntnisse diesbezüglich wurden durch Wundheilungsexperimente an der Maus gewonnen. Da diese Erkenntnisse weitgehend mit Analysen von histologischen Schnitten humaner Wunden korrelieren, ist die folgende Beschreibung sowohl für den humanen als auch den murinen Wundheilungsprozess zutreffend.

2.2.1 Bildung eines Fibrinfropfes

Den ersten Schritt im Prozess der Wundheilung der Haut stellt die Bildung eines Fibrinfropfes dar. Er dient in erster Linie dazu, die Blutung, die durch die Verletzung von Blutgefäßen auftritt, zu stoppen und die offene Wundfläche vor Verunreinigungen aus der Umwelt zu schützen. Der Fibrinfropf besteht hauptsächlich aus Thrombozyten (Blutplättchen), die in ein Netz aus Fibrinfasern eingebettet sind. Die Fibrinfasern sind dabei aus Spaltung von Fibrinogen durch Thrombin entstanden, das von aktivierten Thrombozyten sezerniert wurde. Weitere Bestandteile des Fibrinfropfes sind Fibronektin, Vitronektin und Thrombospondin. Zusammen bilden sie eine provisorische Matrix für die Migration von Zellen während der Wundheilung. Die Aktivierung der Thrombozyten führt außerdem zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie PDGF (platelet-derived growth factor), IGF-1 (insulin-like growth factor-1), EGF (epidermal growth factor) und TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1). Die Freigabe der Wachstumsfaktoren durch die Thrombozyten stellt den auslösenden Impuls für die folgenden Vorgänge der Wundheilung dar.

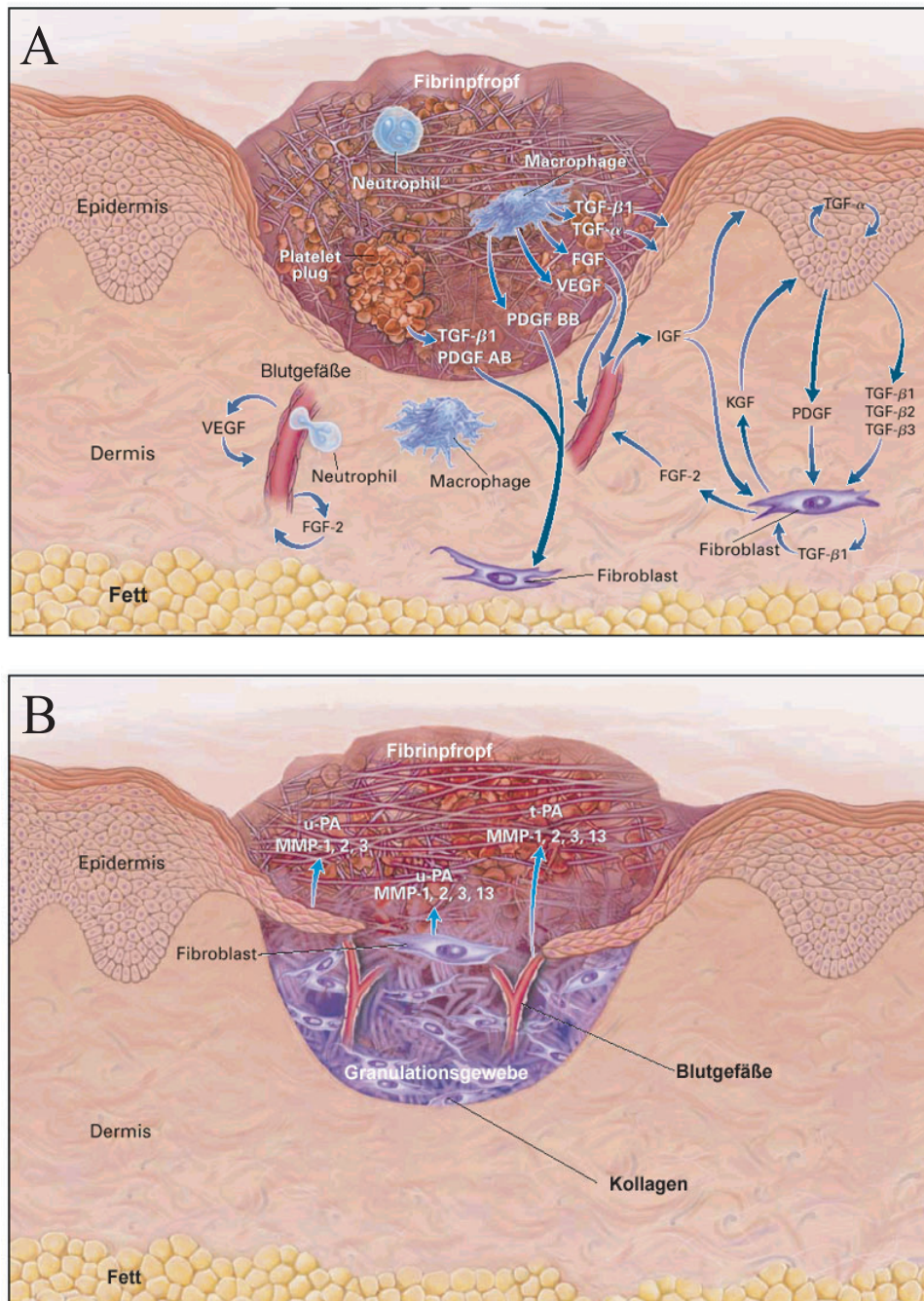


Abb.3 Schematische Darstellung des Wundheilungsprozesses der Haut

(A) Frühe Phase der Wundheilung: Bildung eines Fibrinpfropfes infolge einer Verwundung. Von Thrombozyten produzierte Wachstumsfaktoren und Zytokine locken inflammatorische Zellen wie Makrophagen und neutrophile Granulozyten in die Wunde. Diese wiederum produzieren zusätzliche Wachstumsfaktoren, die für den weiteren Verlauf der Wundheilung essentiell sind. Keratinozyten am Wundrand beginnen ins Wundbett zu migrieren.

(B) Spätere Phase der Wundheilung: Durch Wachstumsfaktoren und Zytokine, die zu Beginn der Wundheilung vor allem von Makrophagen produziert wurden, sind Fibroblasten und neue Blutgefäße in die Wunde migriert und bilden nun das Granulationsgewebe. Keratinozyten wandern so lange zwischen Fibrinpfropf und Granulationsgewebe ein, bis die offene Wundfläche mit einer Schicht an Keratinozyten bedeckt ist (verändert nach Singer and Clark, 1999).

2.2.2 Entzündungsreaktion

Neutrophile Granulozyten und Makrophagen werden nicht nur durch die Zytokine und Wachstumsfaktoren angelockt, die von Thrombozyten ausgeschüttet werden, sondern auch durch Proteolyseprodukte des Fibrins und anderer Matrixkomponenten. Die Hauptaufgabe der neutrophilen Granulozyten besteht darin, die anfängliche Flut an verunreinigenden Bakterien zu beseitigen. Neben dieser Aufgabe sind sie auch eine Quelle für pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- α (tumor necrosis factor- α) und Interleukine, die als sehr frühes Signal für die Aktivierung von Keratinozyten und Fibroblasten dienen. Wenige Tage nach Verwundung endet die Aktivität der neutrophilen Granulozyten und sie werden entweder über den Wundschorf nach außen abgegeben oder von Makrophagen phagozytiert.

Die Aufgabe der Makrophagen besteht darin, übrig gebliebene pathogene Organismen sowie Zell- und Matrixreste zu phagozytieren. Außerdem schütten sie eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren und Zytokinen in die Wunde aus und verstärken dadurch die anfänglichen Signale, die von den Thrombozyten und Granulozyten ausgesendet wurden. Neben TNF- α und IL-1 produzieren die Makrophagen noch weitere Wachstumsfaktoren wie TGF- β 1, TGF- α , bFGF, HB-EGF (heparin-binding epidermal growth factor), PDGF-BB und VEGF (vascular endothelial growth factor), die unter anderem die Migration von Keratinozyten am Wundrand und das Einwandern von Fibroblasten in die Wunde stimulieren.

2.2.3 Bildung des Granulationsgewebes

Vor allem die Wachstumsfaktoren PDGF und TGF- β 1 stimulieren die Fibroblasten am Wundrand zur Teilung und zur Einwanderung in die Wunde. Hierfür müssen die Fibroblasten, die normalerweise in einer Kollagen-Typ-I-reichen Matrix liegen, ihre Bindung an Kollagen durch Reduktion ihrer Kollagen-Rezeptoren verringern und die Expression von Integrinen, die an Fibrin, Fibronectin und Vitronectin binden können, vermehren. Des Weiteren müssen sie Proteasen sezernieren, die ihnen die Migration durch die extrazelluläre Matrix durch Degradation von ECM-Komponenten ermöglichen.

Die Aufgabe der in den Wundbereich eingewanderten Fibroblasten besteht hauptsächlich darin, Komponenten der extrazellulären Matrix wie Fibronectin und Kollagen Typ I für den Aufbau des Granulationsgewebes zu produzieren. Zusammen mit neu in die Wunde einwachsenden Blutgefäßen und den bereits im Fibrinpfropf vorhandenen Makrophagen bilden die Fibroblasten das Granulationsgewebe. Das Einwandern neuer Blutgefäße in die Wunde wird vor allem durch die Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF induziert, die von Makrophagen und von den Endothelzellen der Blutgefäße selbst ausgeschüttet werden. Die einwandernden Blutgefäße gewährleisten eine Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen.

2.2.4 Reepithelialisierung

Um die offene Wundfläche mit einem neuen Epithel zu bedecken, beginnen die Keratinozyten, die sich am Wundrand befinden, in die Wunde einzuwandern. Sobald die Wundoberfläche mit einer neuen Schicht an Keratinozyten bedeckt ist, beenden sie die Migration und bauen ein neues mehrschichtiges Epithel auf. Wichtige Regulatoren in diesem Prozess sind EGF, TGF- α , HB-EGF und KGF.

Die einwandernden Keratinozyten, die während der Homöostase der ruhenden Haut über Integrine fest mit dem Laminin der angrenzenden Basalmembran verbunden sind, lösen diese Verbindungen. Dies geschieht durch einen Wechsel im Expressionsprofil der Integrine. Die Keratinozyten am Wundrand produzieren nun Integrine, die bevorzugt mit Bestandteilen der provisorischen Matrix, wie Fibronectin und Vitronectin interagieren. Nachschub für die Zellen, die in die Wunde einwandern, liefern proliferativ aktive Keratinozyten am Wundrand. Um sich ihren Weg zwischen dem Fibrinpfropf und der Matrix zu bahnen, müssen die Keratinozyten Proteasen produzieren, die die Bestandteile der extrazellulären Matrix beseitigen können. Hierbei spielen sowohl die Serinprotease Plasmin als auch MMPs eine entscheidende Rolle. Über das „Stoppsignal“, das die Keratinozyten dazu bringt, die Migration zu beenden und ein neues mehrschichtiges Epithel aufzubauen, ist bisher noch nichts bekannt.

2.2.5 Wundkontraktion und Vernarbung

Nach dem Schließen der Wunde transformieren einige Fibroblasten zu Myofibroblasten, für die die Expression von α -Aktin (α -smooth muscle actin) charakteristisch ist. α -Aktin verleiht den Myofibroblasten die Fähigkeit, sich und damit die Wunde zu kontrahieren. Zu diesem Zeitpunkt produzieren die Fibroblasten große Mengen an Kollagen Typ I. Bei dieser Kontraktion werden die Kollagenfasern zu einem dichten Geflecht zusammengezogen. Im weiteren Verlauf der Wundheilung verringert sich die Zahl der Fibroblasten durch Apoptose und eine Vielzahl an Blutgefäßen bildet sich zurück. Das so entstandene Narbengewebe ist dadurch gekennzeichnet, dass Kollagen in dichten parallelen Bündeln angeordnet ist. Die Umstrukturierung des Kollagens während des Übergangs von Granulationsgewebe zum Narbengewebe hängt dabei sowohl von einer kontinuierlichen Kollagensynthese als auch vom Kollagenabbau ab. Der Abbau der Kollagenfasern wird dabei größtenteils von MMPs durchgeführt, die von Makrophagen, epidermalen Zellen, Fibroblasten und Endothelzellen produziert werden.

Durch ihre Notwendigkeit beim Migrationsprozess von Zellen während des Wundheilungsprozesses und der Beteiligung an der Umstrukturierung der extrazellulären Matrix kommt den MMPs in der Wundheilung der Haut eine entscheidende Rolle zu.

2.3 Matrix-Metalloproteinasen

Neben den oben beschriebenen Prozessen der Wundheilung sind MMPs an vielen weiteren biologischen Prozessen beteiligt, in denen die Umstrukturierung extrazellulärer Matrix eine wichtige Rolle spielt. Solche Vorgänge sind zum Beispiel die Embryonalentwicklung, die Bildung und Umstrukturierung von Knochen, die Bildung neuer Blutgefäße und die Entstehung und Metastasierung von Tumorzellen (als Übersichtsartikel: Vu und Werb, 2000; Nelson *et al.*, 2000; Sternlicht und Werb, 2001a).

2.3.1 Einteilung der MMPs

MMPs sind eine Gruppe von Enzymen, die alle bekannten Proteinkomponenten der extrazellulären Matrix abbauen können. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt besteht die Familie der MMPs aus 21 Mitgliedern. Die MMPs unterscheiden sich sowohl strukturell als auch in ihrer Fähigkeit, jeweils eine ganz bestimmte Untergruppe an Matrixproteinen zu spalten.

Ursprünglich wurden die MMPs aufgrund ihrer Substratspezifität in Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine und Matrilysine unterteilt. Hinzu kamen die membrangebundenen MMPs, die ebenfalls eine eigene Untergruppe darstellten und die „restlichen“ MMPs, die keiner dieser Untergruppen zugeteilt werden konnten.

Nachdem die Liste der Substrate der MMPs immer weiter zunahm, wurde eine sequenzielle Nummerierung der MMPs eingeführt und die MMPs werden nun aufgrund ihrer Struktur in einzelne Gruppen eingeteilt.

Man unterscheidet nun acht Gruppen der MMPs, von denen fünf sezerniert werden und drei membrangebunden vorliegen (als Übersichtsartikel: Sternlicht und Werb, 2001b; Egeblad und Werb, 2002) (Abb.4).

2.3.2 Struktur der MMPs

MMPs haben eine gemeinsame charakteristische Domänenstruktur. Alle Mitglieder besitzen die Prä-, die Pro- und die katalytische Domäne.

Die N-terminale Prä-Domäne, das Signalpeptid, adressiert das naszierende Protein während der Synthese an das rauhe endoplasmatische Retikulum und kennzeichnet es dadurch als Sekretionsprotein. Auf die Prä-Domäne folgt die Pro-Domäne, die als interner Inhibitor dient. Cysteinreste einer hochkonservierten Sequenz der Pro-Domäne binden an das Zink-Ion des aktiven Zentrums und halten dadurch das Enzym in einem inaktiven Zustand. In dieser Form wird das Enzym auch als Zymogen bezeichnet. Die Aktivierung der Protease erfolgt durch das Aufbrechen der Cystein-Zink-Bindung und dem Abspalten der Pro-Domäne, was zum Freiwerden des aktiven Zentrums und dadurch zur Überführung der MMP in ihre aktive Form führt (Van Wart und Birkedal-Hansen, 1999). Die katalytische Domäne enthält die Bindestelle


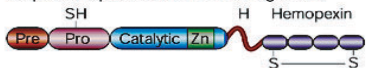




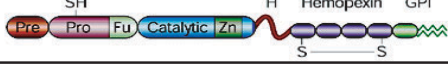

Minimal-domain MMPs 	MMP-7 (matrilysin) MMP-26
Simple hemopexin-domain-containing MMPs 	MMP-1 (collagenase-1) MMP-10 (stromelysin-2) MMP-3 (stromelysin-1) MMP-12 MMP-8 MMP-13 (collagenase-3)
Gelatin-binding MMPs 	MMP-2 (gelatinase A) MMP-9 (gelatinase B)
Furin-activated secreted MMPs 	MMP-11 (stromelysin-3) MMP-28
Vitronectin-like insert MMPs 	MMP-21
Transmembrane MMPs 	MMP-14 (MT1-MMP) MMP-24 MMP-16 (MT3-MMP) MMP-15 (MT2-MMP)
GPI-anchored MMPs 	MMP-17 (MT4-MMP) MMP-25
Type II transmembrane MMPs 	MMP-23

Abb.4 Proteinstruktur der MMPs

MMPs können in acht distinkte strukturelle Gruppen eingeteilt werden, von denen fünf sezerniert werden und drei membrangebunden (MT-MMPs) vorliegen.

Pre = Prä-Domäne, Pro = Pro-Domäne, Catalytic = katalytische Domäne, H = Gelenksregion, Hemopexin = Hemopexin-ähnliche Domäne, Fi = Kollagen Typ II-bindende Wiederholungselemente von Fibronectin, Fu = Furin-Domäne, TM = Transmembrandomäne, Vn = Vitronectin-ähnliche Domäne, Cy = zytoplasmatische Domäne, GPI = Glykosylphosphatidylinositol-verankert, SA = „Signalanker“ (leitet die MMP zur Zellmembran), CA = Cystein Array, Ig-like = Immunglobulin-ähnliche Domäne (verändert nach Egeblad and Werb, 2002)

für Zn^{2+} , dessen Bindung für die proteolytische Aktivität unerlässlich ist. Neben diesen Domänen, die alle MMPs gemeinsam haben, besitzen die meisten MMPs zusätzlich spezifische Domänen, die für ihre Einteilung in acht strukturelle Gruppen herangezogen werden.

Solch eine spezifische Domäne kann eine Hemopexin-ähnliche Domäne sein, die über eine prolinreiche Gelenksregion mit der katalytischen Domäne verbunden ist. Diese Hemopexin-ähnliche Domäne vermittelt Protein-Protein-Interaktionen mit Substraten und den natürlich vorkommenden Inhibitoren der MMPs, den TIMPs (tissue inhibitors of matrix metalloproteinases).

Weitere spezifische Domänen können Kollagen Typ II-bindende Wiederholungselemente von Fibronectin, Transmembrandomänen, Furin-Domänen und Vitronectin-ähnliche Domänen sein, die für einzelne MMPs charakteristisch sind (als Übersichtsartikel: Nagase und Woessner, 1999).

2.3.3 Regulation der MMP-Aktivität

Um ihre spezifische Funktion erfüllen zu können, müssen MMPs sowohl im richtigen Gewebe also auch dort an der passenden Stelle vorhanden sein. Der Zeitpunkt und die Menge ihrer Expression ist für die Ausübung ihrer spezifischen Aufgaben ebenfalls von großer Bedeutung. Um durch zu lange Aktivität keinen Schaden im Gewebe anrichten zu können, ist ihre Inaktivierung nach Ausübung ihrer Funktion unerlässlich (als Übersichtsartikel: Sternlicht und Werb, 2001b).

Die Regulation der MMPs erfolgt auf mehreren Ebenen: (i) Transkription, (ii) Halbwertszeit der mRNA, (iii) Sezernierung, (iv) Lokalisation, (v) Zymogen-Aktivierung und (vi) Inhibition der proteolytischen Aktivität. MMPs besitzen sowohl spezifische Inhibitoren, die TIMPs, als auch einige unspezifische Inhibitoren, wie z. B. das α 2-Makroglobulin.

Bisher konnten vier Mitglieder der TIMP-Familie (TIMP-1, -2, -3 und -4) beschrieben werden. Sie unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit die Aktivität verschiedener MMPs zu hemmen. Einen wichtigen Kontrollmechanismus stellt die Regulation der Transkription der MMPs dar. Im gesunden Organismus wird die Transkription von MMP-Genen durch eine Reihe von Zytokinen und Wachstumsfaktoren wie Interleukine, Interferone, EGF, KGF, bFGF, VEGF, PDGF, TNF- α und TGF- β induziert (als Übersichtsartikel: Fini *et al.*, 1998). Eine Stimulation dieser Gene kann jedoch auch durch UV-Bestrahlung und Ereignissen, die Stress in den Zellen hervorrufen, bewirkt werden. Auch Hormone können die Expression von MMPs stimulieren. So wird z.B. durch das Parathormon (PTH) und 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃ die Expression der interstitiellen Kollagenase in Osteoblasten und osteoblastischen Osteosarkomzellen induziert (Delaisse *et al.*, 1988).

Die oben genannten Wachstumsfaktoren induzieren Signaltransduktionskaskaden, die die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) beinhalten und an deren Endpunkt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 (Aktivatorprotein 1) erfolgt. AP-1 kann entweder aus Homodimeren aus Mitgliedern der Protoonkogenfamilie Jun, oder aus Heterodimeren aus den Protoonkogenfamilien Fos, Jun und ATF zusammengesetzt sein. In Zellkulturexperimenten ist AP-1 ein potenter Transaktivator der MMP-1 und MMP-3 Expression (Angel und Karin, 1992). Die DNA-Bindestelle im MMP-1-Promotor für AP-1 ist eine kurze oktamer Sequenz ATGAGTCA (TRE = "TPA responsive element", Angel *et al.*, 1987). Die transkriptionelle Regulation der MMPs hängt jedoch nicht nur von der Aktivierung durch AP-1 ab, sondern z.B. auch von Mitgliedern der Transkriptionsfaktorfamilie ETS, die an so genannte PEA-3-Elemente ("polyomavirus enhancer A-binding protein-3") in den Promotoren der MMPs binden (Wasylyk *et al.*, 1991).

Die Transkription von MMPs wird durch externe Stimuli auch reprimiert. Substanzen oder Faktoren, welche die Expression von MMPs hemmen, sind Glukokortikoide, Retinoide, TGF- β und Interferon- γ . Im Gegensatz zu Glukokortikoiden, welche über eine direkte Protein/Protein-Interaktion zwischen den Glukokortikoiden und AP-1 MMPs hemmt (Jonat *et al.*, 1990), reprimiert TGF- β deren Expression durch einen AP-1 unabhängigen Mechanismus, an dem ein TGF- β -antwortendes Element (TIE = "TGF- β inhibitory element") im Promotor beteiligt ist (Edwards *et al.*, 1987; Kerr *et al.*; 1989, Kerr *et al.*, 1990).

Posttranskriptionell kann die Aktivität der MMPs über die Halbwertszeit ihrer mRNA reguliert werden. So wird z.B. das Transkript von MMP-13 durch den Wachstumsfaktor PDGF und Glukokortikoide stabilisiert und durch TGF- β destabilisiert (Delany *et al.*, 1995; Vincenti *et al.* 2001).

Die meisten MMPs werden nach ihrer Expression konstitutiv sezerniert. Es gibt jedoch auch MMPs deren Sezernierung kontrolliert wird. MMP-8 und MMP-9 werden von sich differenzierenden Granulozyten in spezifischen Granula gespeichert und infolge der Aktivierung der Granulozyten durch inflammatorische Mediatoren freigesetzt (Hasty *et al.*, 1990; Saarialho-Kere *et al.*, 1995).

Die Lokalisation der MMPs im Gewebe spielt für die Ausübung ihrer spezifischen Aktivität eine wichtige Rolle. Die Mechanismen, die zur exakten Lokalisation der MMPs führen, beinhalten (i) die Expression von membrangebundenen MT-MMPs, (ii) die Bindung von MMPs an Zelloberflächenrezeptoren, (iii) das Vorhandensein von Zelloberflächenrezeptoren von Enzymen wie uPA, Plasmin und Thrombin, die MMPs aktivieren können und (iv) die Konzentration von MMPs an perizellulären Komponenten der extrazellulären Matrix.

Nach ihrer Sezernierung liegen die MMPs in ihrer inaktiven Proform vor. Ein weiterer Regulationsmechanismus besteht in deren Aktivierung. Ein Beispiel hierfür ist die Aktivierung der MMP-2. MT1-MMP liegt zuerst in inaktiver Form gebunden an den Inhibitor TIMP-2 vor. Nach Anlagerung von pro-MMP-2 an TIMP-2 löst sich TIMP-2 von der MT1-MMP und diese kann in ihrer aktiven Form einen großen Teil der Pro-Domäne von MMP-2 spalten. Der Rest der Pro-Domäne wird von bereits aktiver MMP-2 abgespalten, was schließlich zur Aktivierung von MMP-2 führt (Strongin *et al.*, 1995).

2.3.4 Die Wirkungsweise der MMPs

MMPs wirken nicht nur dadurch, dass sie Komponenten der extrazellulären Matrix abbauen. Neben dieser direkten Wirkungsweise können MMPs auch indirekt das Verhalten von Zellen beeinflussen. Diese Mechanismen beinhalten die Veränderung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen, die Aktivierung oder Inaktivierung von Rezeptoren und anderen Zelloberflächenproteinen und das Freisetzen oder Abbauen von Wachstumsfaktoren und anderen Signal-

molekülen (als Übersichtsartikel: Sternlicht und Werb, 2001b) (Abb.5). So wird z.B. durch das Spalten des ECM-Moleküls Decorin durch die MMPs -1, -2, -3, -7 und -9 das an ihm gebundene TGF- β freigesetzt (Imai *et al.*, 1997).

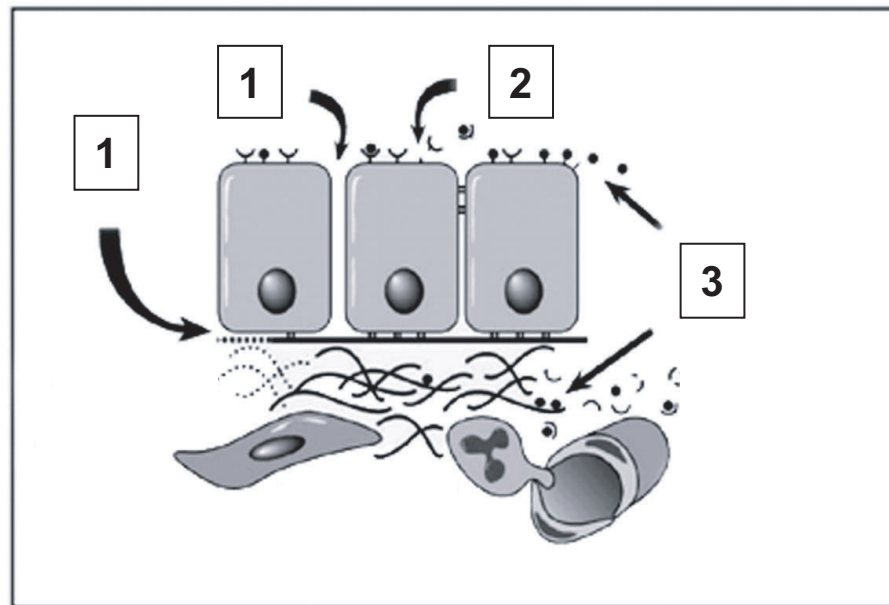


Abb.5 Wirkungsweisen der MMPs

MMPs wirken nicht nur durch Abbauen von Komponenten der extrazellulären Matrix, sondern auch durch [1] Verändern von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen, [2] durch Aktivieren oder Inaktivieren von Rezeptoren und anderen Zelloberflächenproteinen und [3] durch Freisetzen oder Abbauen von Wachstumsfaktoren und anderen Signalmolekülen (verändert nach Sternlicht and Werb, 2001b).

MMPs können jedoch nicht nur Moleküle, die mit Komponenten der extrazellulären Matrix assoziiert sind, freisetzen, sondern auch Moleküle, die an der Oberfläche von Zellen gebunden sind. So kann MMP-3 den an die Zelloberfläche gebundenen Heparin-bindenden EGF-ähnlichen Wachstumsfaktor (HB-EGF) durch seine Spaltung freisetzen (Suzuki *et al.*, 1997). Dabei kann das Freisetzen von Molekülen von der Zelloberfläche nicht nur zu Aktivierung eines Moleküls führen, sondern auch zur Hemmung eines bereits aktiven Moleküls. So wird die Menge an aktivem FGF dadurch reduziert, dass der FGF Rezeptor durch MMP-2 gespalten wird und der freigesetzte Rezeptor an FGF bindet und FGF dadurch inaktiviert wird (Levi *et al.*, 1996)

Des Weiteren können MMPs parakrine Signale durch die Inaktivierung von Signalmolekülen oder der Inaktivierung von Proteinen, die an Signalmolekülen gebunden sind, beeinflussen. Angiotensin I und II, Bradykinin und Substanz P können von MMPs gespalten werden und

verlieren dadurch ihre physiologische Wirkung (Woessner und Nagase, 2000). Im Gegensatz dazu erhöht die Spaltung von Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor-Bindeproteinen (IGFBP) die Verfügbarkeit von IGF (Fowlkes *et al.*, 1999).

Eine weitere Möglichkeit von MMPs, auf das Verhalten von Zellen einzuwirken, ist das Spalten von Nicht-Matrixproteinen, die dadurch ihre Funktion verlieren, ihre Spaltprodukte jedoch vollkommen neue biologische Aktivitäten besitzen. Ein Beispiel dafür sind MMP-2, -7, -9 und -12, die Plasminogen spalten. Durch die Spaltung verliert Plasminogen seine Wirkung und es entsteht der Angiogenese-Inhibitor Angiostatin (Patterson und Sang, 1997; O'Reilly *et al.*, 1999).

2.3.5 MMPs in physiologischen Prozessen

Aufgrund dieser vielfältigen Wirkungsmechanismen ist es nicht verwunderlich, dass MMPs in vielen physiologischen Prozessen eine wichtige Rolle spielen. Erkenntnisse über die Funktionen der MMPs in diesen Prozessen haben Studien gegeben, in welchen MMPs generell oder in spezifischen Geweben transgen exprimiert wurden oder ihre Funktion ausgeschaltet wurde. Bei den Vorgängen, in denen MMPs wichtige Aufgaben erfüllen handelt es sich um die Migration von Zellen, die Entwicklung von Gewebemorphologie, die Knochenentwicklung und die Wundheilung der Haut (als Übersichtsartikel: Vu und Werb, 2000). Die bisher bekannten Funktionen der MMPs in diesen Prozessen sind im Folgenden beschrieben.

Migration von Zellen

MMPs sind für die Migration von Zellen von Bedeutung, insbesondere von Zellen innerhalb der extrazellulären Matrix. Für ihre Migration stellt die extrazelluläre Matrix ein Hindernis dar, das durch die proteolytische Aktivität von MMPs beseitigt werden kann. Außerdem müssen diese Zellen ihren Phänotyp von einem adhärennten zu einem migrierenden wechseln. Das heißt, sie müssen Komponenten des Zytoskelett produzieren, die die Zellbewegung gewährleisten. Weiterhin muss die Zusammensetzung der Oberflächenmoleküle, die mit der extrazellulären Matrix in Verbindung stehen, geändert werden (als Übersichtsartikel: Sternlicht und Werb, 2000).

So spielen MMPs z. B. beim Einwandern von Trophoblasten in das mütterliche Gewebe eine Rolle. Sowohl in Mäusen die den TIMP-1 überexprimieren als auch in Mäusen, die mit einem Inhibitor für Metalloproteasen behandelt werden, kommt es mangels Migration von Trophoblasten zu Defekten in der Entwicklung der Plazenta (Alexander *et al.*, 1996).

Weiterhin ist bekannt, dass MMPs beim Wandern von Endothelzellen während der Angiogenese sowie beim Rekrutieren von Osteoklasten an die Knochenoberfläche während des Knochenumbaus beteiligt sind (Fisher *et al.*, 1994; Hiraoka *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 1998).

Gewebemorphologie

Ein weiterer Vorgang, in dem die MMPs eine wichtige Rolle spielen, ist die Gewebemorphogenese. So wird z.B. für das Entstehen von Verzweigungen des Nierenepithels die Aktivität von Proteasen benötigt. In Organkulturen konnte gezeigt werden, dass es bei Behandlung von Nierengewebe mit MT1-MMP-Antisense-Oligonukleotiden zur Reduktion der Menge an MT1-MMP und parallel dazu zu einer verringerten Ausbildung der Verzweigungen des Nierenepithels kommt (Kanwar *et al.*, 1999).

Auch für die Entwicklung der weiblichen Brustdrüsen sind die MMPs unabdingbar. So zeigen z. B. Stromelysin-1-defiziente Mäuse eine gestörte Entwicklung der Brustdrüsen (Vu und Werb, 2000).

Knochenentwicklung

MMPs sind ebenfalls in der Knochenentwicklung involviert. So führt ein gezieltes Ausschalten von MMP-9 in der Maus zu einem Defekt in der endochondralen Knochenbildung (Ersetzen von Knorpel- durch Knochengewebe) (Vu *et al.*, 1998). Mäuse mit diesem Defekt akkumulieren hypertrophes Knorpelgewebe in der Knochenwachstumszone. Dieser Defekt ist auf ein gestörtes Einwachsen von Blutgefäßen in das hypertrophe Knorpelgewebe zurückzuführen. Die Expression der MMP-13 in hypertrophen Chondrozyten und Osteoblasten während der Embryonalentwicklung und im adulten Knochen lässt auf eine Funktion dieser MMP in der Bildung und Umstrukturierung des Knochens schließen (Gack *et al.*, 1995; Tuckermann *et al.*; 2000).

Wundheilung der Haut

Bei der Wundheilung der Haut handelt es sich um einen Umstrukturierungsprozess, in dem das verletzte Gewebe beseitigt und durch neues Gewebe ersetzt wird. Hierbei spielt auch die Migration verschiedener Zelltypen eine wichtige Rolle. Für beide Prozesse ist ein proteolytischer Abbau extrazellulärer Matrix notwendig. Dass Matrix-Metalloproteinasen dabei eine bedeutende Rolle spielen können, lässt sich aus ihrem spezifischen zeitlichen und räumlichen Expressionsmuster ableiten. So werden MMP-13 und MMP-9 exklusiv von Keratinozyten exprimiert, die sich an der vordersten Front des in die Wunde einwandernden Epithels befinden (Lund *et al.*, 1999). Eine Expression von MMP-13 kann gelegentlich auch in einzelnen Zellen des Granulationsgewebes gefunden werden, wohingegen MMP-2, MMP-11 und MT1-MMP ausschließlich in Fibroblasten des Granulationsgewebes unterhalb des einwandernden Epithels exprimiert werden (Lund *et al.*, 1999). Zu späteren Zeitpunkten wird die Expression dieser drei Proteasen vor allem in Fibroblasten-ähnlichen Zellen direkt unterhalb der neu gebildeten Basalmembran beobachtet. MMP-12 findet man in Makrophagen unterhalb des Fibrinpfropfes exprimiert. In anderen Studien konnte für MMP-3 und MMP-10 ebenfalls eine Prä-

senz in Keratinozyten am Wundrand gezeigt werden (Madlener *et al.*, 1998). Hier wurde die Expression von MMP-9 vor allem in makrophagen-ähnlichen Zellen des Granulationsgewebes gefunden.

Neben der rein deskriptiven Expressionsanalyse konnte für einige MMPs auch eine spezifische Funktion bei der Wundheilung nachgewiesen werden. In MMP-3-defizienten Mäusen scheint der Defekt in der Kontraktion der Wunden dieser Mäuse auf eine fehlerhafte Organisation eines durch Fibroblasten gebildeten Aktinfilamentnetzwerks zurückzuführen zu sein (Bullard *et al.*, 1999). Der Verlust der MMP-9 führt in der Wundheilung der Kornea zu einem beschleunigten Wundschluss, der auf eine gesteigerte Replikationsrate der Keratinozyten am Wundrand zurückzuführen ist (Mohan *et al.*, 2002).

In einer Maus, in der die humanen Kollagenase-1 (MMP-1) in Keratinozyten überexprimiert wird, kommt es nicht zu einem erwarteten beschleunigten, sondern zu einem verlangsamen Wundschluss (Pilcher *et al.*, 1997). In Mäusen, in denen ein mutiertes Kollagen Typ I-Molekül exprimiert wird, das von Kollagenasen nicht mehr gespaltet werden kann, kommt es ebenfalls zu einem verzögerten Wundschluss (Beare *et al.*, 2003). Diese beiden Befunde zeigen, dass sowohl ein verstärkter als auch ein gehemmter Abbau von extrazellulärer Matrix sich negativ auf den Wundschluss auswirkt.

Die Expression der MMP-13 sowohl an der vordersten Front der Keratinozyten, die in die Wunde einwandern als auch in einzelnen Zellen des Granulationsgewebes lässt eine wichtige Rolle dieser MMP im Prozess der Wundheilung vermuten. MMP-13 könnte im Prozess der Reepithelialisierung, in dem extrazelluläre Matrix gespalten werden muss, um Keratinozyten die Migration zu ermöglichen, sowie in der Umstrukturierung der neu gebildeten kollagenreichen Matrix eine entscheidende Rolle spielen.

2.4 Matrix-Metalloproteinase-13

MMP-13, auch Kollagenase-3 genannt, wurde zunächst in der Maus und der Ratte charakterisiert (Henriet *et al.*, 1992; Gack *et al.*, 1994). Sie ist homolog zur menschlichen MMP-13, die mit Hilfe einer humanen Brustkrebs cDNA-Bibliothek kloniert wurde (Freije *et al.*, 1994). In Brustkarzinomen wird MMP-13 in den Tumorzellen und in einzelnen Fällen auch in benachbarten Bindegewebszellen exprimiert (Freije *et al.*, 1994).

Das humane *mmp-13* Gen ist 12,5 kbp lang und gliedert sich in 10 Exons und 9 Introns (Pendas *et al.*, 1997). Es befindet sich zusammen mit mehreren anderen MMPs (MMP-1, -7 -8, -3, -10, -12 und 20) auf Chromosom 11q (Pendas *et al.*, 1995). Aufgrund dieser gemeinsamen Lage im Genom wird auf eine gemeinsame evolutionäre Herkunft dieser Gene geschlossen. Die Expression der MMP-13 führt zu einem 2,7 kbp langen Transkript, das für ein 471

Aminosäuren umfassendes Protein kodiert (Pendas *et al.*, 1997). Mit der Kollagenase-1 (MMP-1) und der Kollagenase-2 (MMP-8) stimmt die MMP-13 in mehr als 50% ihrer Sequenz überein.

In der Maus, in der MMP-13 als das funktionelle Homolog zur menschlichen MMP-1 angesehen wird, stellt MMP-13 die einzige interstitielle Kollagenase dar. Ihr Gen liegt auf Chromosom 9 in der Region A1-A2 (Schorpp *et al.*, 1995). Größe und Exon-Intron-Struktur unterscheiden sich von der humanen MMP-13 nur geringfügig.

2.4.1 Proteinstruktur der MMP-13

Neben der mit allen MMPs gemeinsamen charakteristischen Domänenstruktur, die die Prä-Domäne, die Pro-Domäne und die katalytische Domäne umfasst, besitzt die MMP-13 eine Hemopexin-ähnliche Domäne, die über eine prolinreiche Gelenksregion mit der katalytischen Domäne verbunden ist (Abb.6). Diese zusätzliche Domäne vermittelt Substratspezifität und stellt die Bindestelle der natürlich vorkommenden Inhibitoren der MMPs, den TIMPs dar.

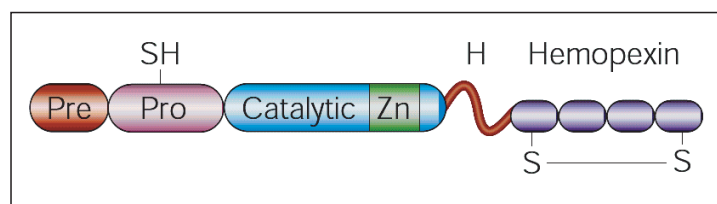


Abb.6 Proteinstruktur der MMP-13

Pre = Prä-Domäne, Pro = Pro-Domäne, Catalytic = katalytische Domäne, H = Gelenksregion, Hemopexin = Hemopexin-ähnliche Domäne

2.4.2 Regulation der Transkription der MMP-13

Die Expression der MMP-13 kann durch Hormone, Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Zell-Matrix-Interaktion beeinflusst werden.

Eine hohe konstitutive Expression der MMP-13 konnte in Osteosarkomen und Chondrosarkomen beobachtet werden, was auf eine Rolle in der Bildung von Knochentumoren hindeutet (Gack *et al.*, 1995; Grigoriadis *et al.*, 1995). Diese Expression der MMP-13 nimmt sowohl *in vivo* als auch in kultivierten primären Knochenzellen und Osteosarkomzellen durch das Parathormon (PTH), einen Hauptregulator der Kalziumhomöostase, deutlich zu (Selvamurugan *et al.*, 1998; Porte *et al.*, 1999; Winchester *et al.*, 2000). Für die Reaktion auf das von PTH ausgelöst Signal ist ein Bereich im Promotor des *mmp-13* Gens unbedingt notwendig, der eine konservierte AP-1-Bindestelle (TRE) und ein Osteoblasten-spezifisches Element 2 (OSE2) enthält (Selvamurugan *et al.*, 1998; Porte *et al.*, 1999), wobei das OSE2 von

Mitgliedern der Cbfa/Runt Transkriptionsfaktor-Familie erkannt wird. Die Kooperation von beiden Elementen ist absolut notwendig für die maximale PTH-abhängige Aktivierung des Promotors. In Übereinstimmung damit ist die Expression von MMP-13 in c-Fos-defizienten Mäusen reduziert und in Cbfa1-defizienten Embryonen vollständig ausgeschaltet (Porte *et al.*, 1999; Jimenez *et al.*, 1999). Die Erhöhung der transkriptionellen Aktivität von MMP-13 als Antwort auf eine PTH-Behandlung erfolgt dabei infolge einer direkten Interaktion der Cbfa/Runt Proteine mit AP-1 (Hess *et al.*, 2001).

Neben Hormonen wie PTH regulieren auch Wachstumsfaktoren die Expression der MMP-13. So hemmt, IGF-1 und -2 die durch Interleukin-1 und Oncostatin M induzierte Expression von MMP-13 in humanen artikulären Chondrozyten (Hui *et al.*, 2001). Auf der anderen Seite induzieren die Wachstumsfaktoren PDGF und bFGF die Transkription von MMP-13, indem sie die Bindung von cFos, FosB, Fra-2, c-Jun und JunB an das TRE des MMP-13 Promotors stimulieren (Rydziel *et al.*, 2000; Varghese *et al.*, 2000).

TGF- β 1 ist ein Beispiel für einen Wachstumsfaktor, der sowohl inhibierend, als auch stimulierend auf die Expression von MMP-13 wirken kann. In Osteoblasten hemmt TGF- β 1 seine Transkription und verkürzt die Halblebenszeit der mRNA (Rydziel *et al.*, 1997). Auf der anderen Seite stimuliert TGF- β 1 die Expression von MMP-13 in humanen KMST Fibroblasten (Uria *et al.*, 1998).

Neben Hormonen und Wachstumsfaktoren können auch Zytokine auf die Transkription von MMP-13 wirken. Die Expression von MMP-13 kann insbesondere durch Interleukin-1 und -6 sowie durch TNF α induziert werden (Kusano *et al.*, 1998; Borden *et al.*, 1996). Es gibt Hinweise darauf, dass die Expression von MMP-13 in Fibroblasten, die sich in der Nähe von Brustkrebszellen befinden, durch IL-1 α und IL-1 β induziert wird (Uria *et al.*, 1997).

In Abhängigkeit von extrazellulären Bedingungen können auch Integrine die Expression von MMP-13 beeinflussen. So wird die Expression von MMP-13 durch ein Signal, das durch den Kontakt von α 1 β 1- und α 2 β 1-Integrin mit dreidimensionalem Kollagen ausgelöst wird, induziert (Ravanti *et al.*, 1999).

2.4.3 Regulation der proteolytischen Aktivität der MMP-13

Eine Aktivierung von MMP-13 durch die proteolytische Abspaltung der Pro-Domäne kann durch MMP-3, MT1-MMP und MMP-2 geschehen, wobei MMP-2 die Aktivierung durch MT1-MMP potenzieren kann (Knäuper *et al.*, 1996a; Knäuper *et al.*, 1996b). Neben den MMPs kann MMP-13 auch durch die Serinprotease Plasmin aktiviert werden (Knäuper *et al.*, 1996b).

Ebenso ist MMP-13 selbst in der Lage, andere MMPs zu aktivieren. So ist bekannt, dass MMP-13 das Pro-MMP-9 in seine aktive Form spalten kann (Knäuper *et al.*, 1997).

Eine Hemmung der Aktivität von MMP-13 erfolgt durch die Interaktion mit TIMPs. Dabei hemmt TIMP-3 die MMP-13 effizienter als TIMP-1. TIMP-1 seinerseits hemmt jedoch mehr als fünf Mal effektiver als TIMP-2 (Knäuper *et al.*, 1996a).

Eine weitere negative Regulation der MMP-13 stellt ihre Bindung an einen Rezeptor dar, die zur Internalisierung und zu ihrer intrazellulären Degradation führt (Walling *et al.*, 1998, Barmina *et al.*, 1999).

2.4.4 Substrate der MMP-13

Biochemische Analysen mit rekombinatem MMP-13 haben gezeigt, dass MMP-13 die native Helix von fibrillärem Kollagen spalten kann, wobei Kollagen Typ II am effizientesten gespalten wird. Die Spaltung resultiert dabei in den typischen $\frac{3}{4}$ und $\frac{1}{4}$ Fragmenten. Etwas weniger wirksam spaltet MMP-13 Kollagen Typ I. Kollagen Typ III wird von MMP-13 am schlechtesten abgebaut (Freije *et al.*, 1994; Knäuper *et al.*, 1996a; Mitchell *et al.*, 1996).

Zusätzlich zu seiner Fähigkeit, fibrilläres Kollagen zu spalten, ist MMP-13 in der Lage Gelatin abzubauen, was darauf hindeutet, dass MMP-13 auch am weiteren Abbau des Spaltproduktes von Kollagen beteiligt ist (Knäuper *et al.*, 1996a). Weitere Substratanalysen ergaben, dass MMP-13 das Proteoglykan Aggrecan ebenso wie weitere extrazellulären Matrixproteine wie Perlecan, Tenascin C, Fibronectin, Fibrillin und Typ IV, IX, X und XIV Kollagen spalten kann (Fosang *et al.*, 1996; Knäuper *et al.*, 1997; Ashworth *et al.*, 1999).

MMP-13 kann durch seine Aktivität neben dem Abbau von Komponenten der extrazellulären Matrix auch durch das Freisetzen von bioaktiven Substanzen wirken. So ist z.B. das Proteoglycan Perlecan in der Lage, bFGF zu binden. Die Spaltung von Perlecan durch MMP-13 führt zur Freisetzung von bFGF und dadurch zur Förderung der Angiogenese (Whitelock *et al.*, 1996).

Die Spaltung von Fibrinogen durch MMP-13 verhindert sein „self-assembly“ und dadurch die Entstehung von großen Protofibrillen und Fibrinfasern. Dadurch kann durch die Aktivität von MMP-13 die Gerinnungsaktivität von Thrombin um bis zu 50% reduziert werden (Hiller *et al.*, 2000).

Neben Komponenten der extrazellulären Matrix kann MMP-13 die Serinproteasen α 2-Antichymotrypsin und den Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI)-2 spalten und damit inaktivieren (Knäuper *et al.*, 1996a).

2.4.5 Expression der MMP-13 in physiologischen und pathologischen Prozessen

Eine bedeutende Rolle wird der MMP-13 vor allem bei der Bildung und Umstrukturierung von Knorpel- und Knochengewebe zugeschrieben. Die MMP-13 wird in hypertrophen Chondrozyten und Osteoblasten während der Embryonalentwicklung und im adulten Knochen

exprimiert (Gack *et al.*, 1995; Tuckermann *et al.*, 2000; Stahle-Backdahl *et al.*, 1997; Johansson *et al.*, 1997a). Aufgrund dieser Expression wird für MMP-13 eine Funktion in der endochondralen Verknöcherung und dem Umbau von Knochengewebe angenommen..

MMP-13-Expression kann auch in vielen verschiedenen Tumoren beobachtet werden (als Übersichtsartikel: Leeman *et al.*, 2002). In Brustkrebs wird MMP-13 sowohl von Zellen des Brustkrebsgewebes exprimiert, als auch in einzelnen Fällen von Zellen des umliegenden Bindegewebes (Freije *et al.*, 1994). In Studien über Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals Bereichs konnte die Expression von MMP-13 mit der Aggressivität des Tumors in Verbindung gebracht werden (Etoh *et al.*, 2000). Expression von MMP-13 konnte hier vor allem in Zellen nachgewiesen werden, die sich an der ins Gewebe einwandernden Front befinden (Johansson *et al.*, 1997b). In Melanomen wird MMP-13 hauptsächlich in Tumoren exprimiert, die einen hohen Grad an Invasivität aufweisen. Auch hier wird MMP-13 an der einwandernden Front exprimiert (Airola *et al.*, 1997, Airola *et al.*, 1999). In Chondrosarkomen zeigen alle bösartigen Kollagen-bildenden Tumore MMP-13-Expression (Uria *et al.*, 1998).

Neben der Expression im Knochengewebe und in Tumorgeweben wird die MMP-13 in Wunden der Haut exprimiert (Madlener *et al.*, 1998; Lund *et al.*, 1999). Eine Expression der MMP-13 zeigt sich hier in Keratinozyten, die nach der Verwundung der Haut vom Wundrand aus in die Wunde wandern, um das offene Wundgewebe mit einer neuen Schicht an Keratinozyten zu bedecken. Nachdem die Wunde geschlossen ist, wird die Expression der MMP-13 von Keratinozyten eingestellt. Ihre Expression kann ab diesem Zeitpunkt in einzelnen Zellen des Granulationsgewebes nachgewiesen werden. Dieses Expressionsmuster und die Fähigkeit der MMP-13 fibrilläres Kollagen zu spalten lässt eine wichtige Funktion der MMP-13 im Prozess der Wundheilung vermuten. Die Untersuchungen, die in dieser Arbeit an einer *mmp-13* knock-out Maus durchgeführt wurden, sollten helfen, diese Funktion der MMP-13 aufzuklären.

2.5 "Knock-out" Mäuse als Tiermodell

Untersuchungen an humanen Geweben können bisher nur Momentaufnahmen liefern, da Gewebeneubildungen im Menschen lediglich an autologen Hauttransplantaten und nach chirurgischen Eingriffen analysiert werden können. Neue immunologische, biochemische und molekularbiologische Techniken geben seit kurzem bei Problemwunden durch die Analyse der Wundflüssigkeit Aufschluss über das Vorhandensein einzelner Zellen bzw. Faktoren, die an der Wundheilung beteiligt sind. Funktionelle Abläufe multifaktorieller Prozesse wie der Wundheilung können jedoch nur durch Untersuchungen an Tiermodellen aufgeklärt werden. Nur aus Untersuchungen an knock-out Mäusen, können Erkenntnisse über die Funktion bestimmter Proteine

im lebenden Gesamtorganismus erlangt werden. Aus Erkenntnissen über die Konsequenzen des Verlustes eines bestimmten Proteins können Rückschlüsse auf seine physiologische Funktion gezogen werden.

Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen zur Funktion der MMP-13 in der Embryonalentwicklung und der Wundheilung der Haut mit Hilfe einer *mmp-13* knock-out Maus durchgeführt.

Diese *mmp-13* knock-out Maus, mit deren Hilfe die Rolle der MMP-13 in der Wundheilung untersucht werden sollte, wurde mit Hilfe des Cre/*lox*-Systems generiert. Beim Cre/*lox*-System wird durch gezielte Rekombination ein Stück DNA aus dem Genom entfernt. Die Rekombination findet dabei zwischen zwei so genannten *loxP*-Sequenzen (locus of X-ing over of bacteriophage P1) statt. Eine *loxP*-Sequenz ist eine 34 Basenpaar (bp) lange Sequenz, die sich aus zwei 13 bp langen Wiederholungssequenzen zusammensetzt, die in umgekehrter Orientierung zu einander angeordnet sind. Diese Wiederholungssequenzen sind durch einen 8 bp langen asymmetrischen Spacer voneinander getrennt (Abb.7) (Sauer *et al.*, 1993).

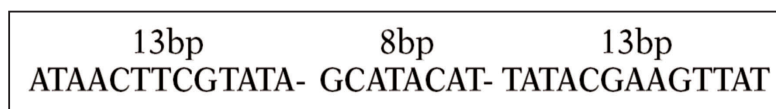


Abb.7 *loxP*-Sequenz

Die 34 bp lange Sequenz setzt sich aus zwei 13 bp langen Wiederholungssequenzen, die in umgekehrter Orientierung zu einander angeordnet sind, zusammen. Diese Wiederholungssequenzen sind durch einen 8 bp langen asymmetrischen Spacer von einander getrennt.

Die Rekombinase Cre ("cyclization recombination"), eine 38 kDa große Rekombinase des Bakteriophagen P1, bindet an diese Wiederholungssequenzen der *loxP*-Sequenzen und katalysiert die Rekombination zwischen den 8 bp langen Spacersequenzen zweier *loxP*-Sequenzen. Sind die beiden *loxP*-Sequenzen in derselben Orientierung in die DNA eingefügt, wird der Bereich zwischen den beiden *loxP*-Sequenzen als kovalent geschlossener Ring entfernt (Abb.8) (Sauer *et al.*, 1993).

Um eine Mauslinie zu generieren, in der ein Gen mit Hilfe des Cre/*lox*-Systems gewebespezifisch ausgeschaltet ist, müssen zuerst zwei verschiedenen Mauslinien hergestellt werden: (i) eine Mauslinie, in der *loxP*-Sequenzen essentielle Teile des betreffenden Gens so flankieren, dass sie die Funktion des Gens nicht beeinflussen. Ein solches Gen wird dann als "gefloxtes" Allel (flankiert von *loxP*-Sequenzen) bezeichnet; (ii) eine Mauslinie, in der die Rekombinase Cre unter der Kontrolle eines gewebe- oder entwicklungspezifischen Promotors exprimiert wird. Nach Verpaarung beider Mauslinien kommt es in den Nachkommen, die das geflochte Allel tragen und die gleichzeitig die Cre-Rekombinase in einem Gewebe oder Zelltyp exprimieren, dort

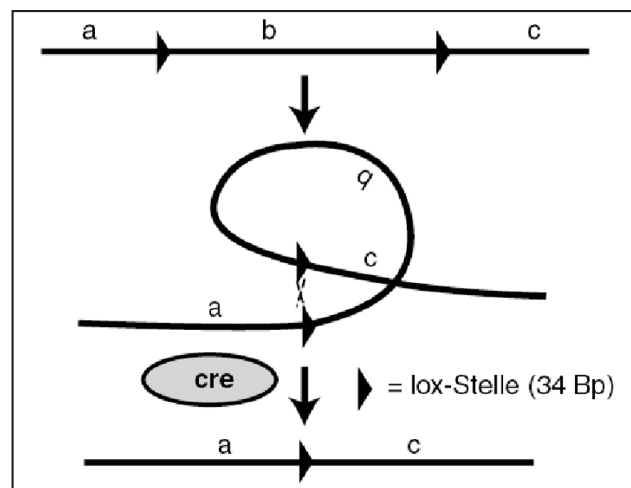


Abb.8 Entfernen eines DNA-Stücks mit Hilfe des Cre/lox-Systems

Mittels Rekombination wird die DNA zwischen zwei loxP-Sequenzen (b), die in derselben Orientierung in die DNA eingefügt wurden, als kovalent geschlossener Ring entfernt. Diese Rekombination wird durch die Cre-Rekombinase katalysiert.

zum Verlust der DNA zwischen den eingefügten loxP-Sequenzen. Ist die Maus homozygot für das geflochte Allel, so führt das zum vollständigen Verlust des Genproduktes („knock-out“) im betreffenden Gewebe oder im betreffenden Entwicklungsstadium (Abb.9) (Sauer *et al.*, 1993).

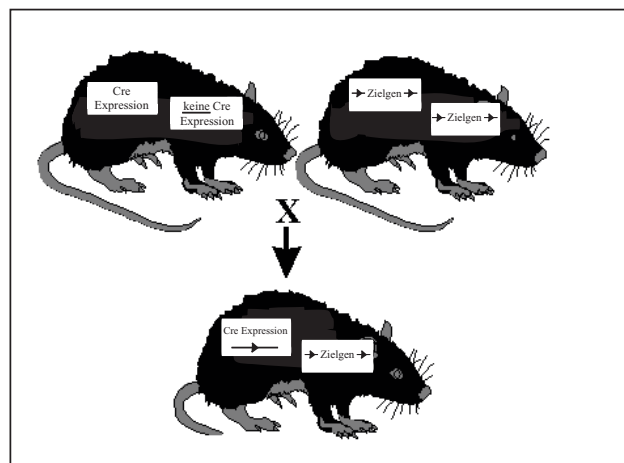


Abb.9 Herstellung einer gewebespezifischen knock-out Maus mit Hilfe des Cre/lox-Systems

Ein gewebespezifischer knock-out eines Gens mit Hilfe des Cre/lox-Systems wird durch die Verpaarung einer Mauslinie, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors exprimiert, mit einer Mauslinie, die das betreffende geflochte Allel trägt, erreicht. In Nachkommen, die homozygot für das geflochte Allel sind und gleichzeitig die Cre-Rekombinase exprimieren, kommt es zum vollständigen Verlust des Genproduktes im betreffenden Gewebe.

Zur Untersuchung der Rolle der MMP-13 in der Wundheilung wurde durch den Einsatz verschiedener Cre-Mauslinien eine Mauslinie hergestellt, in der die MMP-13 spezifisch in der Epidermis der Haut ausgeschaltet werden sollte, und eine, in der die Funktion des *mmp-13* Gens in allen Geweben während allen Entwicklungsstadien fehlen sollte.

Mit der Epidermis-spezifischen *mmp-13*-knock-out Maus sollte eine mögliche Funktion der MMP-13 im Prozess der Wundheilung untersucht werden, die spezifisch auf ihre Expression während dieses Prozesses in der Epidermis zurückzuführen ist.

Der Vergleich von Erkenntnissen aus Wundheilungsexperimenten, die an der Mauslinie, in der MMP-13 in allen Geweben fehlt, gewonnen werden, mit denen aus Wundheilungsexperimenten, die an der Epidermis-spezifischen *mmp-13*-knock-out Maus erzielt werden, sollte Aufschluss über weitere Funktionen der MMP-13 im Prozess der Wundheilung geben, die nicht im Zusammenhang mit ihrer Expression in der Epidermis stehen. Zudem sollte die vollständige *mmp-13*-knock-out Maus Informationen darüber liefern, welche Funktion die MMP-13 während der Embryonalentwicklung ausübt, für die bisher eine Expression ausschließlich im Knochen nachgewiesen werden konnte.

2.6 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollte die Funktion der MMP-13 in Prozessen untersucht werden, in denen bisher lediglich ihre Expression nachgewiesen werden konnte. Zum einen wird die MMP-13 in embryonalem und adultem Knochen in hypertrophen Chondrozyten und Osteoblasten exprimiert und zum anderen findet eine Induktion der Expression der MMP-13 in der verwundeten Haut in Keratinozyten direkt am Wundrand statt.

Durch die Herstellung einer MMP-13-defizienten Maus wurde ein Untersuchungsmodell geschaffen, an welchem die Funktion der MMP-13 in der Embryonalentwicklung und der Wundheilung der Haut direkt am lebenden Organismus untersucht werden konnte. Der Vergleich dieser Prozesse in MMP-13-defizienten Mäusen mit Kontrollmäusen sollte Aufschluss über die Konsequenzen des Fehlens dieses Enzyms im Gesamtorganismus auf diese Prozesse geben.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Bezugsquellen

Allgemein gebräuchliche Chemikalien

Merck, Darmstadt

Roth, Karlsruhe

Serva, Heidelberg

Sigma, Deisenhofen

Fluka, Buchs

Spezielle Chemikalien

Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
2'-Desoxynukleosid-5'-Triphosphate	Roche, Mannheim
Dextransulfat	Sigma, Deisenhofen
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Di-Natriumkarbonat	Merck, Darmstadt
DMSO	Merck, Darmstadt
EDTA	Merck, Darmstadt
Entellan	Merck, Darmstadt
Eosin B	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Formamid	Merck, Darmstadt
Glyzin	Merck, Darmstadt
Hoechstfarbstoff	Calbiochem, Schwalbach
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt
Ketanest	Pharmacia GmbH, Erlangen
Kodak D-13 Entwickler	Kodak, Paris
Kodak-Fixierer	Kodak, Paris

Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Mayer's Hämalaun (Hämatoxylin)	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumazetat	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Fluka, Buchs
NTB-2 Photoemulsion	Kodak, Paris
Nukleosid-5'-Triphosphate	Roche, Mannheim
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Phalloidin	Molecular Probes, MoBiTek, Göttingen
Polyvinylpurrolidone (PVP)	Sigma, Deisenhofen
Rinderserumalbumin, Fraktion V	Sigma, Deisenhofen
RNase A	Sigma, Deisenhofen
Rompun	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
TESPA (3-Aminopropyltriethoxysilane)	Sigma, Deisenhofen
Triethanolamine	Sigma, Deisenhofen
tRNA (from yeast)	Sigma, Deisenhofen

3.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterial

Augengel (Vidisic)	Dr. Mann Pharma, Berlin
Binokular	Leica, Bensheim
Biopsie-Stanze ("Biopsie Punch")	Stiefel Laboratorium GmbH, Offenbach am Main
Cryostat (CM 3050)	Leica, Bensheim
Digitalkamera	Nikon, Düsseldorf
DNA-Engine Opticon	Biozym, Oldenburg
Einbetttschälchen (Tissue Tek® Cyomold)	Vogel, Giessen
Entwicklungsmaschine für Röntgenfilme (Curix 60)	Agfa, München
Faltenfilter Filtrak Qualitativ	neoLab, Heidelberg
Gene Screen-Membran	NEN Life Science Products,
Hybond N ⁺ Membran	Amersham, Freiburg
Leica-Mikroskop	Leica, Bensheim
Mikrotom (RM 2155)	Leica, Bensheim
Nitrocellulose-Membran	Schleicher und Schuell, Dassel
Objekträger (Super Frost)	neoLab, Heidelberg
Pap Pen-Fettstift (Super Pap Pen-Fine Tip)	Polysciences, Inc., Warrington

Parafilm "M"	Peching Plastic Packaging, Chicago
Phosphoimager (Fuji BAS 1500)	Raytest, Straubenhardt
Röntgenfilme (Fuji RX)	Siemens AG, Stuttgart
Skalpell zum Einmalgebrauch, no.20	Pfm, Köln
Spektralphotometer (Gene Quandt pro)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Szintillationsmeßgerät (LS5000TD)	Beckman, München
Tischzentrifuge (Biofuge 13)	Heraeus, Hanau
Tissue Tek® O.C.T.™ Compound	Vogel, Giessen
Titertek Multiscan PLUS MKII	Labsystems, Finnland
Transilluminator	Stratagene, Heidelberg
Ultra-Turrax-T25	Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen
UV-Lampe	Vetter, Wiesloch
UV-Stratalinker 2400	Stratagene, Heidelberg
Vakuum-Konzentrator („speed vac“)	Bachhofer, Reutlingen
Wärmeschrank	Heraeus, Hanau
Wärmetisch	Medax Nagel GmbH, Kiel
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Whatman 3MM Papier	Schleicher und Schuell, Dassel

3.1.3 Enzyme und Kits

AMV reverse Transkriptase	Promega, Madison
DAB Substrate System	Vector Laboratories, Burlingame
DNase I	Promega, Madison
peqGOLD RNAPure™	peqLab, Erlangen
Prime it II	Stratagene, Heidelberg
Proteinase K	Sigma, Deisenhofen
Restriktionsnukleasen	New England Biolabs, Beverly Promega, Madison
RNase A	Roche, Mannheim
RNase Inhibitor	Promega, Madison
Taq DNA Polymerase	Sigma, Deisenhofen
Vectastain ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame
Wizard® DNA Clean-up-Kit	Promega, Madison

3.1.4 Radiochemikalien

α -³²P-dCTP (370 MBq/ml)

α -³⁵S-dUTP (370 MBq/ml)

Alle Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham Pharmacia (Freiburg) bezogen.

3.1.5 Antikörper

primäre Antikörper:

α Ki-67	Novocastra, vertrieben von Medac GmbH, Wedel
α Keratin 5	freundlicherweise von Dr. L. Langbein (DKFZ, Heidelberg, Abteilung Zellbiologie (A010)) zur Verfügung gestellt
α Keratin 10	BAbCO, vertrieben von Hiss Diagnostics GmbH, Freiburg
α Loricrin	BAbCO, vertrieben von Hiss Diagnostics GmbH, Freiburg
α Involucrin	freundlicherweise von Prof. F. Watt (CRUK London Research Institute, London, England) zur Verfügung gestellt
α Smooth muscle actin	Progen, Heidelberg
α CD68	Serotec, Düsseldorf
α Neutrophils	Serotec, Düsseldorf
α CD31	PharMingen, Heidelberg
α Collagen Typ I	Chemicon, Hofheim
α Laminin-5	freundlicherweise von Prof. G. Meneguzzi (Université Nice-Sophia Anitpolis, Faculté de Médecine, Nizza, Frankreich) zur Verfügung gestellt
α α 6-Integrin	freundlicherweise von Prof. Sonnenberg (The Netherlands Cancer Institute, Division of Cell Biology, Amsterdam, Niederlande)
α Laminin	Progen, Heidelberg
α Perlecan	Chemicon, Hofheim
α Nidogen	freundlicherweise von PD. Dr. R. Nischt (Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Universität Köln, Köln) zur Verfügung gestellt

alle genannten Antikörper sind gegen Maus-Antigene gerichtet.

Sekundäre Antikörper:

biotinylierter Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen IgG gerichtet (Vector Laboratories, Burlingame)

Cy3-konjugierter Antikörper aus Esel gegen Ratten-IgG gerichtet (Dianova, Hamburg)

Cy3-konjugierter Antikörper aus Ziege gegen Ratten-IgG gerichtet (Dianova, Hamburg)

Cy3-konjugierter Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen IgG gerichtet (Dianova, Hamburg)

Cy2-konjugierter Antikörper aus Esel gegen Meerschweinchen IgG gerichtet (Dianova, Hamburg)

Alexa-488-konjugierter Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen IgG gerichtet (Molecular Probes, vertrieben von MoBiTec GmbH, Göttingen)

3.1.6 Oligonukleotide für die PCR

coll24: 5'- TGG GTC ACA CTT CTC TGG TGT -3'

coll26: 5'- TGA TGA CGT TCA AGG AAT TC -3'

coll54: 5'- CCC AAA CGA ACT TAA CTT ACA G -3'

coll55: 5'- GGT CTT CAT CGC CTG GAC -3'

cre1: 5'- CAA TTT ACT GAC CGT ACA C -3'

cre2: 5'- TAA TCG CCA TCT TCC AGC AG -3'

tublin-Ex2: 5'- GGA ACA TAG CCG TAA ACT GC -3'

tublin-Ex4: 5'- TCACTGTGCCTGAACTTACC -3'

coll33: 5'- GGT GAT GAT GAT GAT GAT GAC -3'

coll34: 5'- GTT TGG TCC AGG AGG AAA AGC C -3'

3.1.7 Proben für Southern-Blot Analysen

MMP-13: NsiI/BspTI-Fragment aus dem MMP-13-Targeting-Vektor (#732)

3.1.8 Proben für Northern-Blot Analysen

GAPDH: PstI-Fragment des Plasmids pGAPDH-13 (Fort *et al.*, 1985)

MMP-13: XhoI-Fragment der murinen MMP-13 cDNA (Gack *et al.*, 1994)

3.1.9 Hybridisierungssonden für *in situ* Hybridisierungen

MMP-13: Fragment aus der *MMP-13* cDNA:

Für die Herstellung der *MMP-13*-Hybridisierungssonde wurde ein Sequenzbereich von Exon 1 bis Exon 5 der *MMP-13* cDNA mit Hilfe der PCR-Technik amplifiziert. Hierfür wurde der *sense*-Primer „coll33“, der zu einem Sequenzbereich im erste Exon des *mmp-13* Gens komplementär ist, und der *antisense*-Primer „coll34“, der zu einem Sequenzbereich im Exon 5 komplementär ist, verwendet. Das Amplifikationsprodukt wurde in den pGEMT-Vektor kloniert. Dieser Transkriptionsvektor besitzt zwei verschiedene Promotorsequenzen für Phagen-RNA-Polymerasen (SP6 und T7). Zwischen den Promotorsequenzen liegt die "multiple cloning site" (MCS), in welche das cDNA Fragment kloniert wurde. Dieser Vektor (#759) wurde durch einen Verdau mit dem Restriktionsenzym *Stu I*, für welches sich eine Schnittstelle in Exon 3 der *MMP-13* cDNA befindet, linearisiert. Die *in vitro*-Transkription mit der Phagenpolymerase Sp6 lieferte dann die 246 bp große Hybridisierungssonde, welche komplementär zu einem Sequenzbereich von Exon 3 bis Exon 5 ist.

MMP-9: BamHI/XbaI-Fragment aus der *MMP-9* cDNA (Reponen *et al.*, 1995)

3.1.10 Lösungen und Puffer

PBS:	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 0,7 mM CaCl ₂ ; 0,6 mM MgCl ₂ ; 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,6
20x SSC:	3 M NaCl; 0,25 M Na-Citrat; pH 6,5
TBE:	90 mM Tris; 90 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA
TE:	10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA
10x DNA Ladepuffer:	0,25% (w/v) Bromphenolblau; 0,25% (w/v) Xylen Cyanol FF; 30% (v/v) Glycerol
NTE:	0,5 N NaCl; 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 5 mM EDTA

3.1.11 Nährmedium für die Bakterienkultur

TY-Medium: 1% Bacto-Trypton; 1% Hefeextrakt; 0,1% Casaminosäuren; 5% NaCl

Bakterienplatten wurden durch Zugabe von 15 g Bacto-Agar/Liter Medium hergestellt.

3.1.12 Bakterienstämme

E. coli XL1 blue: Genotyp: F'::Tn10 *proAB+lacI^q* DZM15, *recA1, endA1, gyrA96, (Nal^r), thi, hsdR17 (r_K⁻, m_K⁺), supE44, relA1, lac*

3.1.13 Mäuse

Alle Mäuse wurden im zentralen Tierlabor des DKFZ unter SPF-(spezifiziert pathogenfreien)-Bedingungen in einem 12-stündigen Lichtzyklus gehalten. Die Tiere hatten freie Verfügung über Futter (Purina Chow 5008) und Wasser. Die Durchführung der tierexperimentellen Arbeiten erfolgte in Übereinstimmung mit den Empfehlungen der ATBW (Arbeitsgemeinschaft der Tierschutzbeauftragten in Baden-Württemberg). Unter Einhaltung der Bestimmungen des Tierschutzgesetzes.

Die Embryonenentnahme war dem Regierungspräsidium angezeigt (DKFZ 124).

Die durchgeführten Wundheilungsexperimente erfolgten in Rahmen eines genehmigten Tierversuchsvorhabens (144/01).

mmp-9 knock-out Mäuse (Dubois *et al.*, 1999) und *cmv-cre* Mäuse (Schwenk *et al.*, 1995) wurden freundlicherweise von Dr. Bernd Arnold, DKFZ in Heidelberg, zur Verfügung gestellt. *keratin-14-cre* Mäuse (Huelsenken *et al.*, 2000) wurden freundlicherweise von Dr. Jörg Huelsenken, MDC in Berlin, zur Verfügung gestellt.

3.2 Wundheilungsexperimente

Für die Wundheilungsexperimente wurden stets 7-8 Wochen alte, weibliche Mäuse verwendet. Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurden die Tiere durch intraperitoneale Injektion von Ketanest (1 mg/100 µl/10 g Maus) und Rompun (100 µl 0,2% Lösung/10 g Maus) betäubt. Im narkotisierten Zustand wurde den Mäusen die Rückenhaut mit einem elektrischen Rasierapparat rasiert. Danach wurde die rasierte Rückenhaut mit 70% Ethanol desinfiziert. Anschließend wurde die Rückenhaut zu einer Falte geformt, deren Mitte die Längsachse der Maus bildete, und zwei Mal mit einer Biopsie-Stanze ("Biopsy Punch", Durchmesser 4 mm) durchstoßen, so dass vier kreisrunde Wunden entstanden. Von diesen vier Wunden lagen jeweils zwei symmetrisch zur Wirbelsäule der Mäuse. Bis zum Aufwachen aus der Narkose wurden die Mäuse auf einen Wärmetisch (37°C) gelegt. Um ein Austrocknen der Augen zu verhindern, wurden ihre Augen mit Augengel behandelt. Nach dem Aufwachen aus der Narkose wurden die Mäuse wieder in ihre Käfige zurückgesetzt. Zu definierten Zeitpunkten (1, 2, 3, 5, 7, 10 bzw. 14 Tagen) nach der Wundsetzung wurden die Mäuse nach Betäubung durch CO₂ durch zervikale Dislokation getötet.

Äußerliche Dokumentation der Wunden

Nach dem Töten der verwundeten Mäuse wurden ihre Wunde mit einer an ein Binokular angeschlossenen Digitalkamera mit gleicher Vergrößerung fotografiert.

3.3 Histologische Methoden

3.3.1 Isolierung von Embryonen (E16.5)

Um Embryonen des Embryonalstadiums E16.5 zu erhalten wurden weibliche MMP-13-defiziente Mäuse oder Kontrollmäuse mit männlichen Tieren der jeweils gleichen Mauslinie am späten Nachmittag verpaart. Bei Vorhandensein eines Vaginalpfropfs ("vaginal plug") am folgenden Morgen wurde der Mittag als Stadium der Embryonalentwicklung *0.5 dpc* ("0.5 days post coitum") definiert, da die cervixstimulierte Ovulation der weiblichen Mäuse, die in einem 12 Stundentag-Rhythmus gehalten werden, in der Mitte der Dunkelphase stattfindet.

16 Tage später wurden die schwangeren Mäuse zur Isolierung der Embryonen durch Genickbruch getötet, median an der Peritonealhöhle aufgeschnitten und die 16.5 Tage alten Embryonen isoliert. Die Föten wurden von sämtlichen embryonalen Hüllen (Dottersack und Amnion) befreit, sowie die Plazenten an der Nabelschnur entfernt.

3.3.2 Isolierung von adulten Knochen

Zur Isolierung von adulten Knochen, wurden die Mäuse durch Genickbruch getötet und beide Hinterbeine vom Körper der Mäuse abgetrennt. Die Knochen der Hinterbeine (Tibia und Femur) wurden anschließend von Sehnen und Muskelgewebe befreit.

3.3.3 Fixierung und Einbettung von Embryonen und adulten Knochen in Paraffin

Sowohl die isolierten Embryonen als auch die adulten Knochen wurden über Nacht bei 4°C in 4% Paraformaldehyd/1xPBS fixiert. Am nächsten Tag wurden sie für 30 min bei 4°C in 1xPBS gewaschen. (Sonderbehandlung der adulten Knochen: die adulten Knochen wurden nach dem Waschschrift zur Dekalzifizierung des Gewebes für 10 Tage bei 4°C in Dekalzifizierungspuffer (0,5 M EDTA in 1xPBS) inkubiert. Dabei wurde der Dekalzifizierungspuffer alle 3 Tage erneuert.) Es folgte nun ein 30-minütiger Waschschrift bei 4°C in 0,85% NaCl. Anschließend wurde das Gewebe zwei Mal für 15 min in 0,85% NaCl/Ethanol (1:1) bei Raumtemperatur inkubiert. Diesen Schritten schloss sich eine Inkubation für 15 min und anschließend für zusätzliche 30 min in 70% Ethanol/1xPBS bei Raumtemperatur an. Zur weiteren Entwässerung des Gewebes folgten Inkubationen in 80% und 95% Ethanol/1xPBS für jeweils 60 min bei Raumtemperatur. Abschließend wurde das Gewebe bei Raumtemperatur drei Mal für 60 min in 100% Ethanol, zwei Mal für 30 min in Xylol und schließlich über Nacht in Xylol inkubiert. Zur Einbettung wurden die Gewebe für eine Stunde bei 56°C in Paraffin/Xylol (1:1) und drei Mal für eine Stunde bei 56°C in Paraffin inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe in Paraffin eingebettet und bei 4°C gelagert.

3.3.4 Anfertigen von Paraffinschnitten

Zur Herstellung von Gewebeschnitten wurden die Paraffinblöcke in die Halterung eines Mikrotoms (RM 2155, Leica) eingespannt und parallel zum Messer ausgerichtet. Es wurden dann Schnitte von 8 μm angefertigt. Diese wurden in einem Wasserbad bei 42°C geglättet und auf beschichtete Objektträger (siehe "Behandlung von Objektträgern") transferiert. Die Objektträger wurden anschließend über Nacht in einem Wärmeschrank bei 42°C getrocknet. Die Aufbewahrung der Schnitte erfolgte bei 4°C.

3.3.5 Isolierung und Fixierung von Wunden

Zu definierten Zeitpunkten (1, 2, 3, 5, 7, 10 bzw. 14 Tagen) nach der Wundsetzung wurden die Mäuse nach Betäubung durch CO₂ durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurde der Wundbereich rechteckig im Abstand von 1 mm zum Wundrand ausgeschnitten. Die Wunden wurden mit einer Pinzette vorsichtig vom darunterliegenden Gewebe abgehoben. Wenn nötig wurde das Abheben der Wunden sehr vorsichtig mit einer stumpfen Schere unterstützt. Die so vom Tier entfernte Wunde wurde auf eine Nylonmembran (Hybond N⁺) aufgebracht. Das Aufbringen auf die Nylonmembran erfolgte so, dass die Morphologie der Wunde der auf dem Tierrücken entsprach. Die so auf die Membran aufgezoogene Wunde wurde so lange auf Trockeneis gelegt, bis das Gewebe vollständig durchgefroren war. Dann wurde die Wunde mit einem Einmal-Skalpell der Stärke 20 in zwei gleich große Hälften geschnitten. Der Schnitt verlief dabei parallel zu Haarwuchsrichtung des Fells. Die beiden Wundhälften wurden jeweils mit der offenen Wundseite nach unten senkrecht in ein mit O.C.T.TMCompound gefülltes Einbetttschälchen gestellt. Das Einbetttschälchen wurde zusammen mit der Wunde auf Trockeneis gestellt, so dass das O.C.T.TMCompound langsam fest wurde. Dadurch konnte die Ausrichtung der Wunde sehr kontrolliert senkrecht zum Boden des Einbetttschälchens gehalten werden. Nachdem die Wunde vollständig von festem Tissue Tek umgeben war, wurde das Einbetttschälchen mit der Wunde in flüssigen Stickstoff eingetaucht, um sicher zu gehen, dass sowohl Gewebe als auch Einbettmedium vollständig durchgefroren waren. Die eingebetteten Wunden wurden bei - 80°C aufbewahrt.

3.3.6 Isolierung und Fixierung von Rücken- und Schwanzhaut

Die Mäuse wurden nach Betäubung durch CO₂ durch zervikale Dislokation getötet. Zum Einbetten der Rücken- und Schwanzhaut, wurden zuerst die Fellhaare mit einem elektrischen Rasierapparat entfernt. Rücken- und Schwanzhaut wurden von der Maus abgezogen und für Gefrierschnitte in Einbetttschälchen mit Hilfe von O.C.T.TMCompound (Einbettmedium) eingebettet. Hierfür wurde

das in Einbettmedium liegende Gewebe zuerst auf Trockeneis langsam tiefgefroren und anschließend kurz in flüssigem Stickstoff weiter abgekühlt. Das eingebettet Gewebe wurde bei -80°C aufbewahrt.

3.3.7 Anfertigung von Gefrierschnitten

Die Gefrierproben wurden mittels eines Cryostaten in 5 µm dicke Präparate bei -20°C bis -30°C geschnitten, auf beschichtete Objektträger aufgebracht, 2 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet und schließlich bei -80°C gelagert.

3.3.8 Hämatoxylin & Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) von Gewebeschnitten stellt eine Standardmethode in der Histologie dar. Bei dieser Färbetechnik werden basophile Zellkerne mit Hämatoxylin blau und eosinophile Strukturen wie das Zytoplasma, Kollagen oder Muskeln mit Eosin rosa bis rot gefärbt. Die HE-Färbung ist sowohl für Gefrier- als auch für Paraffinschnitte geeignet.

Die in Paraffin fixierten Gewebeschnitte wurden in einer Xylol/Ethanolreihe deparaffiniert. Hierzu wurden die Schnitte 10 min in Xylol und je 2 min in 100%, 95%, 90%, 80%, 70%, 50% und 30% Ethanol inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte für 5 min in Mayers Färbelösung überführt. Die Färbung wurde durch Waschen (1 min) unter fließendem Leitungswasser gestoppt und die Präparate 20 Sekunden in HCl-Ethanol differenziert. Nach 10 min Wässern unter fließendem Leitungswasser wurden die Schnitte 20 Sekunden in 0,5% Eosin gefärbt. Danach wurden die Präparate 3x kurz in Aqua bidest getaucht. Anschließend erfolgte die Entwässerung der Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe: 3x kurz in 70% Ethanol, 1 min in 95% Ethanol, 1 min 100% Ethanol. Nach 2 min Waschen in Xylol wurden die Schnitte in Entellan eingedeckt.

Die Gefrierschnitte wurden zunächst 2 Stunden bei Raumtemperatur aufgetaut. Danach wurden die Schnitte für 10 min in 1% Paraformaldehyd fixiert und 2 min in Aqua bidest gewaschen. Die HE-Färbung erfolgte wie für Paraffinschnitte beschrieben.

3.3.9 Immunhistochemie

Für die Immunfärbung von Gefrierschnitten wurden die bei -80°C gelagerten Objektträger auf Raumtemperatur gebracht und die Gewebeschnitte mit einem Pap Pen-Fettstift umrandet. Zunächst wurden die Schnitte für 5 min in 100% kaltem Methanol (4°C) und für 10 min in kaltem Aceton (4°C) fixiert. Anschließend wurden die Objektträger 10 min in PBS gewaschen. Zur Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität wurden die Schnitte 10 min in frischem 3% Wasserstoffperoxid in Methanol inkubiert. Hieran schlossen sich 5 min Wasch-

schritte in Aqua bidest und PBS an. Nach dem vollständigen Abklopfen der überschüssigen Waschflüssigkeit wurden die unspezifischen Bindungskapazitäten durch einstündige Inkubation in Blocklösung (1% BSA in PBS) abgesättigt. Nach dem Abklopfen der Blocklösung erfolgte die Inkubation der Gewebeschnitte mit dem primären Antikörper in einer feuchten Kammer (Inkubationszeiten und eingesetzte Verdünnungen der eingesetzten primären Antikörper siehe Tab.1). Der primäre Antikörper wurde in Blocklösung verdünnt.

Die Gewebeschnitte wurden drei Mal 5 min in PBS gewaschen. Danach wurde der biotinylierte sekundäre Antikörper (biotinylierter Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen IgG gerichtet, Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories) 1:100 in Blocklösung verdünnt auf die Schnitte aufgetragen und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. An die Antikörperinkubation schlossen sich drei 5 min Waschschrte in PBS an. Zur Verstärkung des zu erwartenden Signals wurden die Schnitte für 30 min mit ABC-Reagent (Vectastain ABC Kit, Vector: 5 ml Blocklösung + 2 Tropfen Reagent A + 2 Tropfen Reagent B), welches 30 min vor dem Auftragen auf die Schnitte angesetzt werden muss, inkubiert. Auf diese Inkubation folgten erneut drei 5 min Waschschrte in PBS.

Für die Substratreaktion mit Diaminobenzidin (DAB) wurden die Gewebeschnitte unter regelmäßiger mikroskopischer Betrachtung mit ca. 100 µl DAB-Lösung (DAB Substrate Kit, Vector: 5 ml Aqua bidest + 2 Tropfen buffer stock solution + 4 Tropfen DAB stock solution+ 2 Tropfen hydrogen peroxid solution) pro Gewebeschnitt bei Raumtemperatur lichtgeschützt so lange inkubiert bis ein möglichst starkes Signal und gleichzeitig möglichst geringer unspezifischer Hintergrundfärbung zu sehen war (maximal 20 Minuten). Zum Abstoppen der Färbereaktion wurde die Substratlösung abgeklopft und die Schnitte 10 min in Leitungswasser gewaschen. DAB-Abfälle wurden als Karzinogenabfall entsorgt.

Danach erfolgte eine Gegenfärbung des Gewebes mit Hämalaun. Zur Färbung der Zellkerne wurden die Objektträger 5 min in frisch filtrierte Mayers Färbelösung getaucht, anschließend 1 min unter fließendem Leitungswasser abgespült und danach zur Differenzierung 20 Sekunden in saures Ethanol überführt (0,5% HCl in 70% Ethanol, v/v).

Nach 10 min Spülen unter fließendem Leitungswasser wurden die Schnitte je 2 min in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 80%, 90%, 95% und 100%) entwässert. Zur Vorbehandlung für das Eindecken in dem Xylol-haltigen Einbettmittel Entellan wurden die Schnitte anschließend 5 min in Xylol inkubiert.

Antigen	hergestellt in	Verdünnung	Inkubation
Ki-67	Kaninchen	1:750	30 min bei RT
Keratin-10	Kaninchen	1:250	1 Stunde bei RT
Loricrin	Kaninchen	1:100	1 Stunde bei RT
α -sma*	Maus	1:500	über Nacht bei 4°C

* der primäre Antikörper, der gegen α -smooth muscle actin gerichtet war, war direkt biotinyliert. In diesem Fall fiel die Inkubation der Schnitte mit einem sekundären Antikörper weg. Auf die Inkubation mit dem primären Antikörper folgte direkt die Inkubation mit dem ABC-Reagent.

Tab.1: Primäre Antikörper, welche für die Immunhistochemie eingesetzt wurden

3.3.10 Indirekte Immunfluoreszenz

Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden die bei -80°C gelagerten Objektträger auf Raumtemperatur gebracht, die Gewebeschnitte mit einem Pap Pen-Fettstift umrandet und fixiert. Je nach nachzuweisendem Antigen variiert die Fixiermethode (Tab.2). Danach wurden die Objektträger 10 min in PBS gewaschen. Vor der Inkubation mit dem primären Antikörper wurden die Schnitte für 30 min mit Blocklösung (1% BSA in PBS; Ausnahme: Keratin 10, Loricrin und Involucrin mit 10% Ziegen Serum in PBS blockieren) benetzt. Die primären Antikörper wurden in der Blocklösung verdünnt. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer (Inkubationszeit und eingesetzte Verdünnung des primären Antikörpers siehe Tab.2).

Nach dem drei Mal 5 min Waschen der Präparate in PBS wurde der sekundäre Antikörper (1:400) zusammen mit Hoechstfarbstoff (1:1000) in Blocklösung verdünnt auf die Schnitte aufgetragen. Mit dem Hoechstfarbstoff wurden die Zellkerne blau gegengefärbt. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln für eine Stunde bei Raumtemperatur. Vor dem Eindecken mit dem Einbettmedium Mowiol wurden die Schnitte drei Mal 5 min im Dunkeln mit PBS gewaschen und kurz in Aqua bidest eingetaucht. Bis zur Auswertung der Färbung wurden die Präparate im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

Antigen	hergestellt in	Verd.	Fixierungsart	Inkubation	sekundärer Antikörper
α6-Integrin	Ratte	1:400	1 min Methanol (4°C), 2 min Aceton (-20°C)	2 h bei RT	Cy3-konjugierter Antikörper aus Esel gegen Ratten IgG
CD31	Ratte	1:100	5 min 80% Methanol (4°C), 2 min Aceton (-20°C)	über Nacht bei 4°C	Cy3-konjugierter Antikörper aus Ziege gegen Ratten IgG
CD68	Ratte	1:100	5 min 80% Methanol (4°C), 2 min Aceton (-20°C)	über Nacht bei 4°C	Cy3-konjugierter Antikörper aus Ziege gegen Ratten IgG
Collagen I	Kaninchen	1:100	5 min 80% Methanol (4°C), 2 min Aceton (-20°C)	über Nacht bei 4°C	Cy3-konjugierter Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen IgG
Involucrin	Kaninchen	1:800	keine Fixierung	über Nacht bei 4°C	Cy3-konjugierter Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen IgG
Keratin 10	Kaninchen	1:250	2 min Aceton (-20°C)	1 h bei RT	Cy2-konjugierter Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen IgG
Keratin 5	Meer- schweinchen	1:500	2 min Aceton (-20°C)	über Nacht bei 4°C	Cy2-konjugierter Antikörper aus Esel gegen Meerschweinchen IgG
Laminin	Kaninchen	1:200	1 min Methanol (4°C), 2 min Aceton (-20°C)	2 h bei RT	Alexa-488-konjugierter Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen IgG
Laminin-5	Kaninchen	1:2000	1 min Methanol (4°C), 2 min Aceton (-20°C)	2 h bei RT	Alexa-488-konjugierter Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen IgG
Loricrin	Kaninchen	1:100	2 min Aceton (-20°C)	1h bei RT	Cy3-konjugierter Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen IgG
Neutrophils	Ratte	1:100	5 min 80% Methanol (4°C), 2 min Aceton (-20°C)	über Nacht bei 4°C	Cy3-konjugierter Antikörper aus Ziege gegen Ratten IgG
Nidogen	Kaninchen	1:2000	1 min Methanol (4°C), 2 min Aceton (-20°C)	2 h bei RT	Alexa-488-konjugierter Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen IgG
Perlecan	Ratte	1:4000	1 min Methanol (4°C), 2 min Aceton (-20°C)	2 h bei RT	Cy3-konjugierter Antikörper aus Esel gegen Ratten IgG

Tab.2: Primäre Antikörper, die für die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt wurden

Verd.=Verdünnung, h=Stunde, min=Minute, RT=Raumtemperatur

Die spezifisch gebundenen Fluorochrom-konjugierten Antikörper wurden auf den Schnitten mit Hilfe des Fluoreszenz-Mikroskopes DMLB (Leica) betrachtet. Für die verschiedenen Fluorochrome wurden folgende Filter verwendet:

Fluorochrom	Farbe	Filter	Hersteller
Hoechstfarbstoff	blau	A	Leica
Cy3	rot	N2.1	Leica
Cy2	grün	I3	Leica
Alexa-488	grün	I3	Leica

Tab.3: Liste der Filter, mit denen die einzelnen Fluorochrome unter dem Mikroskop betrachtet wurden

3.3.11 Phalloidin-Färbung

Phalloidin ist ein zyklisches Peptidtoxin des grünen Knollenblätterpilzes *Amanita phalloides*. Seine Eigenschaft an polymerisiertes F-Aktin zu binden, wird dazu verwendet, Aktinfilamente sichtbar zu machen. Das verwendete Phalloidin war mit dem Fluorochrom Alexa-488 konjugiert (Molecular Probes) und führte dadurch zu einer grünen Färbung der Aktinfilamente auf den Gewebeschnitten.

Für die Phalloidin-Färbung wurden die bei -80°C gelagerten Objektträger 2 Stunden bei Raumtemperatur aufgetaut und getrocknet. Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit einem Pap Pen-Fettstift umrandet und fixiert. Die Fixierung erfolgte für 10 min in 4% Paraformaldehyd/1x PBS bei Raumtemperatur. Es folgten drei 5-minütige Waschschrte in 1x PBS. Anschließend wurden die Schnitte nochmals für 5 min in kaltem Aceton (-20°C) fixiert. Danach wurden die Schnitte erneute drei Mal für 5 min in 1x PBS gewaschen. Die Schnitte wurden nun in eine feuchte Kammer (3MM-Papier mit 1x PBS angefeuchtet) gelegt und für eine Stunde mit Blocklösung (1% BSA in 1x PBS) bedeckt. Anschließend wurde die Blockierlösung abgeklopft und die Schnitte mit je 20 μl Alexa-488-konjugiertes Phalloidin (5 μl Phalloidin in 200 μl Blocklösung + 0,2 μl Hoechstfarbstoff) bedeckt. Nach 20-minütiger Inkubation wurden die Schnitte drei Mal für 5 min in 1x PBS gewaschen. Zum Eindecken wurden die Objektträger kurz in Aqua bidest getaucht und anschließend die Schnitte mit Mowiol eingedeckt.

3.3.12 Statistische Auswertung von histologisch gefärbten Schnitten

Vermessung des Abstandes der Wundränder

Zur Vermessung des Abstandes zwischen den Wundrändern wurden Gefrierschnitte von Wunden 1, 2, 3, 5 bzw. 7 Tage nach Verwundung in 50-facher Vergrößerung mit einer mit einem Mikroskop verbundenen Digitalkamera fotografiert. Auf dem digitalen Bild der jeweiligen Wunde wurde der Abstand zwischen den Wundränder mit Hilfe der Software "Adobe Photoshop 7.0" ausgemessen. Hierfür wurde das "Messwerkzeug" verwendet. Zur Umrechnung der erhaltenen Messdaten auf die Einheit [mm], wurde eine definierte 1 mm lange Strecke mit Hilfe des Messwerkzeugs ausgemessen. Der so erhaltene Messwerte diente zur Umrechnung der Wund-Messwerte auf die Einheit [mm].

Bestimmung der Größe des Granulationsgewebes

Zur Vermessung der Größe des Granulationsgewebes wurden Gefrierschnitte von Wunden 1, 3,5,7,10 bzw.14 Tage nach Verwundung mit einer an ein Binokular angebrachten Digitalkamera fotografiert. Mit Hilfe der Software "Adobe Photoshop 7.0" wurde die Fläche des jeweiligen Granulationsgewebes bestimmt. Hierfür wurde mit dem Werkzeug "Lasso" die Fläche des Granulationsgewebes eingekreist. Unter "Histogramm" konnte die Anzahl der Pixel, welche in

der mit dem Lasso eingekreisten Fläche enthalten war, abgelesen werden. Durch die Bestimmung der Pixelzahl eines definierten Quadratmillimeters konnten die bestimmten Pixelzahlen auf [mm²] umgerechnet werden.

3.3.13 *In Situ* Hybridisierung an Gewebeschnitten (Wilkinson und Green, 1990)

Behandlung von Objektträgern

Die Objektträger wurden durch aufeinanderfolgendes Eintauchen in 10% HCl/70% Ethanol, Aqua bidest und 100% Ethanol gespült und anschließend bei Raumtemperatur trocknen lassen. Die Beschichtung erfolgte durch 10-sekündiges Eintauchen der Objektträger in eine 2% TESPA/Aceton-Lösung. Nach zweimaligem Waschen in 100% Aceton und einmal Waschen in Wasser wurden die Objektträger getrocknet.

Radioaktive Markierung von RNA durch *in vitro* Transkription

Die *in vitro* Transkription wurde zur Herstellung von „*antisense*“ und „*sense*“ RNA-Sequenzen von einem Transkriptionsvektor (pGEM-4, Promega, Mannheim) durchgeführt. Die Transkriptionsvektoren besitzen zwei verschiedene Promotorsequenzen für Phagen-RNA-Polymerasen (SP6, T7 bzw. T3). Zwischen den Promotorsequenzen liegt die „multiple cloning site“ (MCS), in welche das cDNA Fragment kloniert worden war. Die cDNA-Sequenz wird nun an beiden Seiten von den Promotoren flankiert, so dass eine „*sense*“- und „*antisense*“-Transkription möglich wird. Durch Linearisierung der Transkriptionsplasmide mittels Restriktionsendonukleasen, deren Erkennungsstellen in der MCS distal von den Promotorsequenzen liegen, wurde der nicht für die Transkription benötigte Promotor von der cDNA-Sequenz abgetrennt. Dadurch konnten durch zwei Linearisierungsansätze von einem Transkriptionsvektor zwei Matrizen hergestellt werden, die jeweils für die „*sense*“ oder „*antisense*“ Transkription benutzt werden konnten. Das „*sense*“-Transkript wurde als Kontrolle für das Vorhandensein von Hintergrundsignal verwendet.

Die *in vitro* Transkription wurde in Anwesenheit von α -³⁵S-UTP und unmarkiertem ATP, CTP und GTP durchgeführt.

Linearisierung der Transkriptions-Plasmide

Zur Linearisierung wurde eine wässrige Plasmid-DNA-Lösung durch Zugabe von 10-fach konzentrierten Puffer/Salz-Lösungen ein für die jeweilige Restriktionsendonuklease notwendiges Milieu, entsprechend den Herstellerangaben, eingestellt. Pro μ g DNA wurden 2-3 U Restriktionsendonuklease zugegeben. Das Reaktionsvolumen betrug dabei mindestens das 10-fache des Volumens der zugesetzten Enzym/Glycerin-Lösung. Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte (wenn vom Hersteller nicht anders empfohlen) bei 37°C für mindestens 2 h.

Nach dem Verdau wurden die linearisierten Plasmide mit Phenol/Chloroform extrahiert und präzipitiert. Nach dem Waschen und Trocknen der DNA wurden sie in sterilem Wasser gelöst und ihre Konzentration auf 1 µg/µl eingestellt.

In vitro Transkription

Zur radioaktiven Markierung des Transkripts wurde α -³⁵S-UTP als Nukleotid verwendet. In einem 20 µl Transkriptionsansatz wurden 1 µg/µl DNA in 1x TSC-Puffer (40 mM Tris pH 8, 10 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 10 mM NaCl, 4 mM Spermidin, 50 µg/ml BSA) mit 20 mM DTT, 2 U RNasin, 625 µM rNTPs (ohne UTP), 50 µCi α -³⁵S-UTP und 30 U Phagenpolymerase (T7, T3 oder SP6) 1 Stunde 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Darauf wurde die Plasmid DNA 15 min bei 37°C unter Zugabe von 30 µg tRNA und 3 U RQ1 DNase verdaut. Es folgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion, um die Proteine zu extrahieren. Das RNA-Transkript wurde zur Entfernung nicht eingebauter Nukleotide zweimal mit 2 M NH₄Ac und 2,5 Volumen Ethanol gefällt. Nach der letzten Zentrifugation (10 min bei 13000 rpm, Eppendorf-Tischzentrifuge) wurde das Pellet getrocknet und in 50 µl 100 mM DTT aufgenommen. 1 µl davon wurde in 3 ml Szintillationslösung gemessen. Die restliche Probe wurde wieder in 2 M NH₄Ac und 2,5 Volumen Ethanol aufgenommen und bis zum Gebrauch bei -80°C aufbewahrt.

Vorbehandlung der Gewebeschnitte: „Prähybridisierung“

Bei dieser Behandlung wurden die angefertigten Schnitte für die Hybridisierung mit der RNA-Probe derart vorbereitet, dass die aufgetragene Probe in das Gewebe eindringen kann, unspezifische Bindungen vermieden werden und das RNA:RNA-Hybrid nicht aus dem Gewebe diffundieren kann.

Die Objektträger mit Gewebeschnitten, die zur Hybridisierung vorgesehen waren, wurden in ein Glasfärbegestell transferiert. Die Prähybridisierung der Schnitte erfolgte durch Eintauchen der Gestelle in die mit 250 ml der folgenden Lösungen vorbereiteten Glasküvetten:

Nachdem die Gefrierschnitte auf Raumtemperatur (RT) gebracht worden waren (ca. 2h auftauen bei RT), wurden die Schnitte zur Fixierung für 20 min in frisch hergestelltem 4% Paraformaldehyd (PFA) in 1x PBS inkubiert. Nach zweimal Waschen in 1x PBS (je 5 min) erfolgte ein Verdau im Gewebe mit Proteinase K (10 mg/ml, Endkonzentration: 500 µl/250 ml) in 1x PBS für 15 min bei RT. Darauf erfolgte eine weitere Fixierung in 4% Paraformaldehyd/1x PBS für 5 min und Waschen in 1x PBS für 5 min. Die darauf folgende 10-minütige Inkubation in einer Triethanolamin/Essigsäureanhydridlösung (3,125 ml:0,625 ml/250ml Wasser) diente zur Neutralisierung positiver Ladungen und damit zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen.

Nach 5 min Waschen in 1x PBS wurden die Gewebeschnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 1 min in 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% Ethanol), entwässert und danach bei RT getrocknet.

Hybridisierungsreaktion

Die in Ethanol aufbewahrte radioaktiv markierte RNA Probe (siehe "*In vitro* Transkription") wurde 10 min bei 13000 rpm (Eppendorf-Tischzentrifuge) abzentrifugiert und einmal mit 70% Ethanol gewaschen und nochmals zentrifugiert. Das Präzipitat wurde getrocknet und in 100 mM DTT (1/10 des Hybridisierungsvolumens) aufgenommen. Dabei wurde die spezifische Aktivität der RNA-DTT-Lösung auf $1,5 \times 10^6$ cpm/ μ l eingestellt (entspricht $1,5 \times 10^5$ cpm/ μ l in der Gesamthybridisierungslösung).

Die Hybridisierungslösung enthielt folgende Bestandteile: 1x Hyb-Salz (10x Hyb-salt: 0.2% Polyvinylpurrolidone, 0.2% Ficoll, 0.38% NaH_2PO_4 pH 6.8, 50 mM EDTA, 3 M NaCl, 0.1 M Tris pH 8), 50% Formamid, 10% Dextransulfat, 10 mM DTT, 10 μ l tRNA (10 mg/ml) und 10% RNA-DTT-Lösung ($1,5 \times 10^5$ cpm/ μ l). Um die Probe vollständig zu denaturieren, wurde die Hybridisierungslösung vor dem Auftragen auf die Gewebeschnitte 3 Minuten bei 90°C inkubiert und auf Eis abgeschreckt.

Die vorhybridisierten Schnitte wurden mit einem Pap-Pen-Fettstift kreisförmig umrundet, um ein Mischen von verschiedenen Hybridisierungslösungen auf demselben Objektträger zu vermeiden.

20 μ l Hybridisierungslösung wurden auf einen vorhybridisierten Schnitt gleichmäßig verteilt und mit einem Stück Parafilm abgedeckt. Wenn möglich wurden auf einen Objektträger sowohl ein Schnitt mit der *antisense*-Probe und der Parallelschnitt mit der entsprechenden *sense*-Probe hybridisiert.

Zur Inkubation der Objektträger wurde eine Plastikschiene mit 3MM Whatman-Filter und einer Lage Aluminiumfolie ausgelegt. Das Filterpapier wurde mit 2x SSC, 50% Formamid getränkt. Die Objektträger wurden in die Schiene gelegt, diese mit einem Deckel abgedichtet und über Nacht bei 55°C in einem Wärmeschrank inkubiert.

Waschen der hybridisierten Gewebeschnitte

Nach der Inkubation wurden die Objektträger aus der feuchten Kammer genommen und wieder in die Glasfärbegestelle gestellt. Das Waschen der Schnitte erfolgt unter stringenten und ^{35}S -stabilisierenden Bedingungen. Dieses wurde durch die hohe Formamidkonzentration (50%), die den Schmelzpunkt der RNA:RNA-Duplexe herabsetzt, durch die relativ hohe Temperatur von 65°C und durch die Anwesenheit von β -Mercaptoethanol, welches vor der Oxidation des Schwefels schützt, erreicht.

Die Färbegestelle mit den Objektträgern wurden in die mit 250 ml der folgenden Lösungen vorbereiteten Glaskästen eingetaucht:

2x SSC, 50% Formamid, 20 mM β -Mercaptoethanol bei 37°C	15 min
2x SSC, 50% Formamid, 20 mM β -Mercaptoethanol bei 65°C	30 min
2x SSC, 50% Formamid, 20 mM β -Mercaptoethanol bei 37°C	2 h
NTE (0,5 M NaCl, 10 mM Tris pH 8.0, 5 mM EDTA) bei 37°C	15 min
NTE mit RNase (Endkonz.: 20 μ g/ml) bei 37°C	15 min
NTE bei 37°C	15 min
2x SSC, 50% Formamid, 20 mM β -Mercaptoethanol bei 37°C	30 min
2x SSC bei RT	15 min
0.1x SSC bei RT	15 min
Eine Entwässerung der Schnitte erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe:	
30% Ethanol, 0.25 M NH_4OAc	2 min
50% Ethanol, 0.25 M NH_4OAc	2 min
70% Ethanol, 0.25 M NH_4OAc	2 min
80% Ethanol	2 min
90% Ethanol	2 min
95% Ethanol	2 min
100% Ethanol	2 min

Anschließend wurden die Objektträger bei RT getrocknet, mit einem Klebeband in einer Expositionskassette befestigt, und über Nacht ein Röntgenfilm aufgelegt.

Beschichten der Objektträger mit einer Photoemulsion

Die NTB-2 Photoemulsion (Kodak) wurde in einer Dunkelkammer in einem Wasserbad bei 42°C geschmolzen und 5 ml davon mit 0,6 M NH_4Ac 1:1 verdünnt. Das Gemisch wurde dann möglichst blasenfrei in ein Gefäß eingefüllt, das speziell zur Beschichtung der Objektträger angefertigt wurde. Diese Vorrichtung wurde dann in das Wasserbad (42°C) gestellt, um die Photoemulsion flüssig zu halten. Nach Entfernen der Blasen aus der Photoemulsion wurden die Objektträger nacheinander durch Eintauchen in die Photoemulsion beschichtet. Dabei sollte die Photoemulsion so gleichmäßig wie möglich auf den Objektträgern verteilt sein. Die beschichteten Objektträger wurden im Dunkeln 2 h getrocknet. Danach wurden sie in Polyoxymethylen Färbegestelle gestellt, in die entsprechenden Färbetröge eingepackt und mit Aluminiumfolie umwickelt. Die Objektträger wurden mehrere Tage (wenigstens 5, höchstens

15) bei 4°C exponiert. Die Expositionsdauer wurde von der Stärke des Signals, welches auf dem über Nacht angelegten Röntgenfilm (siehe "Waschen der hybridisierten Gewebeschnitte") zu sehen war, abhängig gemacht.

Entwickeln, Färben und Mikroskopieren der Schnitte

Nach Ablauf der Expositionsdauer wurden die Objektträger in folgenden Lösungen entwickelt:

Kodak D-19 Entwickler (50 ml + 200 ml Leitungswasser)	3 min
Kodak-Fixierer (250 ml + 250 ml Leitungswasser)	4 min
Leitungswasser	2 x 5 min

Die Schnitte wurden getrocknet und mit Hämatoxylin-Eosin gegengefärbt (siehe "Hämalaun-Eosin-Färbung"). Nach Trocknen der Objektträger wurden sie mit dem Eindeckmittel Entellan eingedeckelt.

3.4 Allgemeine DNA-Techniken

3.4.1 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte über die Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm im Abgleich gegen das verwendete Lösungsmittel. Einer OD 260 = 1 entsprechen 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml RNA bzw. 33 µg/ml einzelsträngiger Oligonukleotid-DNA. Zur Bestimmung der Verunreinigung mit Proteinen wurde außerdem die OD bei 280 nm bestimmt. Bei einem Quotienten OD 260 / OD 280 zwischen 1,6 und 2,0 kann die DNA ohne weitere Reinigung verwendet werden.

3.4.2 Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Reinigung von Nukleinsäure-Lösung von Proteinen wurde diese mit dem gleichen Volumen eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (50:49:1) gut gemischt. Zur Phasentrennung wurde 3 Min bei 13000 rpm und RT in der Heraeus-Tischzentrifuge zentrifugiert, die obere Phase abgenommen und noch einmal mit dem gleichen Volumen Chloroform auf die gleiche Weise extrahiert.

3.4.3 Fällung von Nukleinsäuren

Die gelöste DNA wurde mit 1/10 des Volumens 3 M Natriumazetatlösung (pH 4,8) und dem 2,5-fachen Volumen Ethanol gemischt. Das Präzipitat wurde bei 13000 rpm in der Heraeus-Tischzentrifuge, 10 min pelletiert. Zur Entfernung von Salzresten mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend im Vakuum getrocknet.

3.4.4 Plasmid DNA Mini-Präparation

Die Bakterienkolonie wurde in 2 ml Nährmedium mit dem Antibiotikum Ampicillin (100 µg/ml) über Nacht bei 37°C geschüttelt. 1,5 ml der Kultur wurden bei 13000 rpm in der Heraeus-Tischzentrifuge 1 Minute pelletiert. Das Pellet wurde in 125 µl Puffer P1 (50 mM Tris pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A) resuspendiert. Nach Zugabe von 125 µl Puffer P2 (alkalischer Lösung: 0,2 M NaOH; 1% SDS) und Mischen wurden 125 µl Puffer P3 (3 M Natriumazetat (pH 4,8)) zugegeben. Anschließend wurde im Überstand mit 0,7-fachem Volumen Isopropanol die Plasmid-DNA präzipitiert und durch 10 min Zentrifugation bei 13000 rpm in der Tischzentrifuge sedimentiert. Abschließend wurde die Plasmid-DNA getrocknet und in 50 µl Aqua bidest gelöst.

3.4.5 Plasmid-DNA Maxi-Präparation mittels Ionenaustauscher-Säulen- chromatographie

200 ml Selektionsmedium (TY + 100 µg/ml Ampicillin) wurden mit dem gewünschten Bakterienklon angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde 10 min bei 4000 x g sedimentiert, das Pellet in 10 ml Puffer P1 (50 mM Tris pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A) resuspendiert und die Bakterien in 10 ml P2 (0,2 M NaOH; 1% SDS) für 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Das Bakterienlysat wurde mit 10 ml P3 (3 M Kaliumazetat pH 4,8) neutralisiert (10 min auf Eis), bei 4°C und bei 2000 x g 30 min lang zentrifugiert. Die Gewinnung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe von „Quiagen-tip-500“ Säulen (Quiagen Inc.) laut Herstellerprotokoll. Nach Elution der Plasmid-DNA von der Säule wurde diese mit dem 0,7-fachen Volumen Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt, bei 10000 x g und RT pelletiert, mit 70% Ethanol gewaschen, das Präzipitat im Vakuum getrocknet und anschließend in 500 µl Wasser gelöst.

3.4.6 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Eine Einheit (1U) einer Restriktionsendonuklease ist definiert als die Enzymmenge, die 1 µg DNA des Phagen I in einer Stunde verdaut. In der Regel wurde ein 2-3facher Überschuss an Enzym verwendet, um einen vollständigen Verdau zu gewährleisten. In einer wässrigen DNA-Lösung wurden durch Zugabe von 10-fach konzentrierten Puffer/Salzlösungen die Bedingungen für die jeweilige Restriktionsendonuklease entsprechend den Herstellerangaben eingestellt. Pro µg DNA wurden 2-3 U Restriktionsendonuklease zugegeben. Das Reaktionsvolumen betrug mindestens das 10-fache des Volumens der zugesetzten Enzym/Glyzerin-Lösung. Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte (wenn vom Hersteller nicht anders empfohlen) bei 37°C für 1-2 h.

3.4.7 Phosphorylierung von Oligonukleotiden und Linkern

Etwa 2 µg Oligonukleotid- oder Linker-DNA wurden mit 1 µl 10 mM ATP und 1 µl T4-Polynukleotid-Kinase (10 U/µl) in einem Endvolumen von 10 µl mit Kinase-Puffer (66 mM Tris pH 7,6; 10 mM MgCl₂; 15 mM DTT; 1 mM Spermidin; 0,2 mg/ml BSA) versetzt. Die Reaktion erfolgte eine Stunde lang bei 37°C und wurde durch Einfrieren bei -20°C abgestoppt.

3.4.8 Auffüllen von 5'-Überhängen, Abbau von 3'-Überhängen

Die DNA wurde mit 2 µl 10 mM DTT, 1 µl 10 mM dNTP-Mix (je 10 mM dATP; dCTP, dGTP und dTTP in 10 mM Tris pH 7,5), 2 µl 10 x Polymerasepuffer (70 mM Tris pH 7,5; 70 mM MgCl₂; 500 mM NaCl) und 1 µl *E. coli* DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment, 5 U/µl) in einem Endvolumen von 20 µl versetzt. Nach 30 min Reaktion bei RT erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion.

3.4.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden mit 2 µl 10 x Ligationspuffer (50 mM Tris pH 7,4; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 1 mM Spermidin; 1 mM ATP) und 1 µl T4-DNA-Ligase (2 U/µl) versetzt und in einem Endvolumen von 20 µl 4 h bei 16°C inkubiert.

3.4.10 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung eines bestimmten DNA-Fragmentes wurde die DNA-Lösung in einem Agarosegel entsprechender Konzentration aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel im UV-Durchlicht sichtbar gemacht, die gewünschte Bande ausgeschnitten und mit Hilfe des „Qiaquick Gel Extraction Kits“ (Qiagen) aufgereinigt.

3.4.11 Isolierung von genomischer DNA

Für die Bestimmung des Genotyps der Nachkommenschaft der Mauslinien wurde zunächst aus Schwanzbiopsien der zu untersuchenden Tiere genomische DNA isoliert. Dazu wurden die Biopsien in 700 µl „Tailbuffer“, (50 mM Tris-HCl, pH 8; 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS) und Zugabe von 50 µl Proteinase K (10 mg/ml) bei 56°C über Nacht verdaut. Durch Zugabe von 250 µl 6 M NaCl-Lösung und anschließendem 2-minütigen Schütteln die Proteine ausgefällt und durch Zentrifugation (13000 rpm, 7 min) abgetrennt. Der Überstand wurde mit 500 µl Isopropanol versetzt und für 2 min durch Schütteln bei RT inkubiert. Durch 10-minütige Zentrifugation wurde die ausgefallene genomische DNA pelletiert, für eine Stunde an der Luft getrocknet und in 500 µl Aqua bidest aufgenommen.

Die Isolierung genomischer DNA aus Epidermis und Dermis erfolgte ebenfalls nach diesem Protokoll (zur Trennung von Epidermis und Dermis wurde die Schwanzhaut vom Schwanz der Maus abgezogen und für 15 Sekunden in ein 58°C - 60°C warmes Wasserbad eingetaucht. Anschließend konnte die Epidermis mit Hilfe einer Pinzette von der Dermis abgezogen werden).

3.4.12 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden, je nach Größe der zu trennenden Fragmente, horizontale Agarosegele mit 0,4% bis 2% Agarosegehalt eingesetzt. Die entsprechende Agarosemenge wurde dafür in TBE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst, verdampftes Wasser ersetzt und Ethidiumbromid zu einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugegeben. Nach Abkühlen auf etwa 60°C wurde das Gel in das Gelbett mit Kamm gegossen. Die Proben wurden mit 1/10-Volumen 10x Auftragungspuffer (25% (w/v) Ficoll 400, 0,25% (w/v) Bromphenolblau und 0,25% (w/v) Xylencyanol) versetzt und in die ausgesparten Geltaschen aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei etwa 100 V. Nach der elektrophoretischen Auftrennung konnten die DNA-Fragmente im UV-Durchlicht sichtbar gemacht und zur Dokumentation fotografiert werden.

3.4.13 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Für die Hybridisierung von Southern Blots und Northern Blots wurden DNA-Proben nach dem "*random priming*"-Verfahren nach Feinberg und Vogelstein (1983) radioaktiv markiert. Hierfür wurde das "prime it" Kit der Firma Stratagene eingesetzt.

30 ng linearisierte DNA wurden in 23 µl Aqua bidest aufgenommen, mit 10 µl Primerlösung versetzt und zur Denaturierung für 5 min bei 100°C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 10 µl 5x dCTP-Reaktionspuffer, 5 µl α -³²P-dCTP (370 MBq/ml) und 2 µl T7-DNA-Polymerase (1U/µl) wurde der Ansatz für 10 min bei 37°C inkubiert. Die Abtrennung nicht eingebauter Radionukleotide erfolgte mit Hilfe des Wizard® DNA Cleanup-Kits (Promega) nach dem Protokoll des Herstellers. Dabei wird die radioaktiv markierte DNA an eine Säulenmatrix gebunden, gereinigt und anschließend durch Elution gewonnen. Der Einbau der radioaktiv markierten Nukleotide wurde durch Messen von 1 µl des Eluates im Szintillationszähler (LS5000TD, Beckman) bestimmt. Unmittelbar vor ihrem Einsatz wurde die radioaktiv markierte Probe für 3 min bei 100°C denaturiert.

3.4.14 Blotten von DNA-Gelen ("Southern Blot")

Mit spezifischen Restriktionsenzymen verdaute, genomische DNA wurde auf einem Agarosegel geeigneter Konzentration aufgetrennt. Nach dem Lauf wurde das Gel mit einem seitlich angelegten Lineal fotografiert. Anschließend wurde das Gel 30 min in 0,25 N HCl denaturiert und 30 min in 0,4 NaOH neutralisiert. Zum Transfer der DNA aus dem Agarosegel auf eine Hybond N⁺-Nylonmembran (Amersham) wurde die Kapillarblottechnik (Southern, 1975) verwendet. Der Transfer wurde mit 20x SSC über Nacht bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurde nach kurzem Spülen der Membran in 2x SSC, die DNA durch Bestrahlung mit UV-Licht (Stratalinker 2400-Autocrosslink-Modus) kovalent an die Membran gebunden.

3.4.15 Hybridisierung der Membran mit einer radioaktiv markierten Sonde

Die Nylonmembran wurde in einer Hybridisierungsröhre mit 20 ml Hybridisierungslösung ("Church-Gilbert-Puffer": 1 mM EDTA, 0,25 M Phosphatpuffer, 7 % SDS) für 2 Stunden bei 65°C im Hybridisierungsofen (Bachofer, Reutlingen) vorhybridisiert. Die Hybridisierungslösung wurde anschließend durch 5 ml frische ersetzt und 2-5 x 10⁶ cpm hitzedenaturierte Probe (5 min bei 100°C) hinzugegeben. Die Röhre wurde über Nacht bei 65°C inkubiert. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Radioaktivität wurde die Membran unter Rotieren der Röhre wie folgt gewaschen: 20 Minuten 2x SSC/0,1% SDS, 20 Minuten 1x SSC/0,1% SDS und 20 Minuten 0,5x SSC/0,1% SDS. Anschließend wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und je nach Stärke des Signals mit Verstärkerfolie bei -80°C belichtet.

3.4.16 Polymerase-Ketten-Reaktion („polymerase-chain-reaction“, PCR)

In der Polymerase-Ketten-Reaktion wurden ausgehend von zwei sequenzspezifischen Oligonukleotiden (Primer), die komplementär zu den Endbereichen der vorgelegten Matrizen-DNA sind, DNA-Fragmente, die innerhalb der Primer liegen, mit der temperaturbeständigen Taq-Polymerase kopiert und amplifiziert. Die Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl unter den folgenden Bedingungen in einem „Hybaid-Cycler“ (Biozym, Hess. Oldendorf):

2 µl	10 x PCR-Puffer (166 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 670 mM Tris-HCl pH 8,8, 67 mM MgCl ₂ , 50 mM β-Mercaptoethanol, 67 mM EDTA)
2 µl	DMSO
1 µl	25 mM dNTP-Lösung (dATP; dCTP; dGTP; dTTP; pH 7,0)
je 0,5 µl	Primer (50 pmol/µl)
0,5 µl	Taq-Polymerase (2,5 Units; Sigma, Deisenhofen)
1 µl	genomische DNA (Schwanzbiopsie) bzw. 10-500 ng cDNA
	mit Aqua bidest auf 20 µl aufgefüllt

Die Denaturierung der DNA erfolgte bei 94°C für 2 min, die Hybridisierung bei der für die verwendeten Primer optimalen Temperatur für 1 min 30 sek und die DNA-Synthese bei 65°C (als Faustregel gilt, dass die Taq-Polymerase pro Minute DNA-Fragmente von 1 kb synthetisieren kann). Die Amplifikationsprodukte wurden durch gelelektrophoretische Auftrennung und Anfärben mit Ethidiumbromid kontrolliert.

3.4.17 Herstellung chemo-kompetenter *E.coli* Bakterien

100 µl des Bakterienstamm *E.coli* XL1blue wurden in 5 ml LB-Medium gegeben und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden die 5 ml Bakterienkultur mit 100 ml LB-Medium verdünnt. Diese Kultur wurde unter Schütteln bei 37°C bis zu einer $OD_{600} = 0,5 - 0,8$ inkubiert (ca. 2 Stunden). Nach 15-minütigem Abkühlen auf Eis folgte eine Zentrifugation bei 5000 rpm für 10 min bei 4°C (Beckmann-Zentrifuge, JCL-Rotor). Das Pellet wurde mit 50 ml steriler 0,1 M $CaCl_2$ -Lösung durch sehr vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vollständig resuspendiert und auf zwei Zentrifugenröhrchen verteilt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien abzentrifugiert (4000 rpm, 5 min, 4°C, Heraeus-Megafuge). Die Pellets wurden in je 2,5 ml 0,1 M $CaCl_2$ /10% (v/v) Glycerin-Lösung vorsichtig resuspendiert und vereinigt. 100 µl Aliquots dieser Bakterienlösung wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80°C gelagert.

3.4.18 Transformation kompetenter Bakterien

45 µl kompetente Bakterien wurden mit 5 µl eines Ligationsansatzes gemischt und 20 min auf Eis gestellt. Nach einem Hitzeschock bei 37°C für 3 min und Inkubation für 3 min auf Eis, wurden 300 µl TY-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) zugegeben und die Kultur für 20 min bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurde der Ansatz für 2 min zentrifugiert (4000 rpm in einer Tischzentrifuge). 250 µl des Überstandes wurden anschließend abgenommen. Nach Resuspendieren des Pellets wurde der Ansatz auf einer Agarplatte (1,5% Bacto-Agar in TY-Medium + 100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und bis zum Erscheinen makroskopischer Kolonien bei 37°C inkubiert.

3.5 RNA-Methoden

3.5.1 Präparation von Gesamt-RNA aus Geweben

Zur Präparation von Gesamt-RNA aus Gewebe wurde das peqGOLD RNAPure™-Kit (peqLab) verwendet. Das jeweilige Gewebe (Wunden, Knochen) wurde in Corex-Röhrchen mit Hilfe eines Ultra-Turrax-T25-Homogenisators (Janke & Kunkel, IKA Labortechnik) in PeqGold-Lösung (peqGOLD RNAPure™) homogenisiert und anschließend 5 min auf Eis

stehen lassen. Nach Zugabe von 1/5 Ausgangsvolumen Chloroform wurde das Homogenat 15 Sekunden lang geschüttelt. Anschließend wurde das Gemisch für 10 min auf Eis stehen lassen. Es folgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 12000 g (Kühlzentrifuge, Eppendorff). Danach wurde der wässrige Überstand entfernt und die RNA durch Zugabe von 1/2 Ausgangsvolumen Isopropanol bei -20°C über Nacht ausgefällt. Die ausgefällte RNA wurde am nächsten Tag für 10 min mit 12000 g abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet getrocknet. Anschließend wurde die RNA in Aqua bidest resuspendiert. Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion wurde die RNA erneut ausgefällt und in DEPC-behandeltem Aqua bidest aufgenommen. Von der RNA-Lösung wurde nun die Konzentration bestimmt ("Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung") und anschließend ihre Qualität mittels Gelelektrophorese überprüft (siehe "Gelelektrophorese von RNA")

3.5.2 RT-PCR (Reverse Transkriptase PCR)

Jeweils 1-2 µg denaturierte Gesamt-RNA (70°C für 3 Min) wurde in einem Volumen von 20 µl mit den Oligonukleotid-Primern „Oligo dT“ (Gibco) wie folgt revers transkribiert: 5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1 mM Desoxynukleotid-triphosphate, 50 pmol Primer, 2,5 U AMV-Reverse Transkriptase sowie 1,7 U RNase-Inhibitor. Der Ansatz wurde 40 Min bei 41°C und 10 Min bei 65°C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt.

3.5.3 Gelelektrophorese von RNA

15 µg Gesamt-RNA wurde in Denaturierungspuffer (21% deionisierte Glyoxallösung, 73% DMSO, 15 mM Na₂HPO₄ pH 6,9) aufgenommen, für 8 min bei 50 C inkubiert und anschließend für 5 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 1/6 Volumen RNA-Ladepuffer (50% Glycerin, 10 mM Na₂HPO₄, 0,4% Bromphenolblau, 0,5 µg/µl Ethidiumbromid) wurden die Proben in einem 1,4% Agarosegel in 10 mM Na₂HPO₄ pH 6,9 aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte für 2-3 Stunden bei einem Stromfluss von 80 mA bis die Bromphenolblaufront ca. 6 cm weit gewandert war. Während der Elektrophorese wurde der Laufpuffer zwischen Anode und Kathode zirkuliert.

3.5.4 Transfer von RNA auf Nylon-Membranen („Northern-Blot“)

Das RNA-Gel wurde nach beendeter Elektrophorese unter UV-Licht mit einem Lineal fotografiert. Das Gel wurde auf eine Glasplatte platziert, worauf sich drei Lagen mit 10x SSC (1,5 M NaCl; 0,15 M Na₃Citrat x 2 H₂O) getränktes 3-MM-Papier befanden, die in ein mit 10x SSC gefülltes Reservoir hineinragten. Auf das Gel wurde Luftblasen frei die Nylon-Membran gelegt, auf diese wiederum 3-lagig 3-MM-Papier (ebenfalls mit 10x SSC getränkt), über welches ein Kleenex-Stapel geschichtet wurde. Dieser wurde mit einem Gewicht beschwert. Mittels Kapillarkräfte wurde die Flüssigkeit nach oben gesaugt und somit die RNA auf die Mem-

bran transferiert. Das „Blotten“, erfolgte über Nacht; anschließend wurde die Membran in 2x SSC gewaschen. Zur kovalenten Fixierung der RNA an die Membran, wurde die Membran mit UV bestrahlt (Stratalinker 2400-Autocrosslink-Modus).

3.5.5 Hybridisierung der RNA

Nach der kovalenten Fixierung der RNA an die Membran wurde diese in einer Röhre mit 15 ml Hybridisierungslösung ("Church-Gilbert-Puffer": 1 mM EDTA, 0,25 M Phosphatpuffer, 7 % SDS) in einem Ofen bei 65°C unter Rotation für mindestens eine Stunde prähybridisiert. Danach wurde die Hybridisierungslösung durch 5 ml neue Hybridisierungslösung ausgetauscht und diese mit ca. 1×10^6 cpm/ml radioaktiv-markierter Probe, die zuvor 3 Minuten bei 100°C denaturiert wurde, versetzt. Die Hybridisierung erfolgte bei 65°C über Nacht. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Radioaktivität wurde die Membran unter Rotieren der Röhre wie folgt gewaschen: 20 Minuten 2x SSC/0,1% SDS, 20 Minuten 1x SSC/0,1% SDS und 20 min 0,5x SSC/0,1% SDS. Anschließend wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und je nach Stärke des Signals mit Verstärkerfolie bei -80°C belichtet. Sollte eine Membran nach Hybridisierung mit einer anderen Probe hybridisiert werden, so wurde die ursprüngliche Probe durch 10-minütige Inkubation in kochender 0,1% SDS-Lösung entfernt. Die erneute Hybridisierung erfolgte dann wie oben beschrieben.

4 Ergebnisse

Die Wundheilung der Haut ist ein komplexer Vorgang, der mehrere Prozesse beinhaltet, in denen der Auf- und Abbau von extrazellulärer Matrix eine wichtige Rolle spielt. So muss extrazelluläre Matrix abgebaut werden, um Keratinozyten die Migration in die Wunde zu ermöglichen, während für das Einwandern von Fibroblasten und inflammatorischen Zellen in den Wundbereich eine provisorische Matrix aus Fibrinfasern aufgebaut wird (als Übersichtsartikel: Martin, 1997; Singer und Clark, 1999).

Beim spezifischen Abbau extrazellulärer Matrix spielen die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) eine zentrale Rolle (Matrisian *et al.*, 1990). Sie sind in der Lage die Komponenten der extrazellulären Matrix zu spalten. In den einzelnen Phasen der Wundheilung zeigen die verschiedenen MMPs sowohl zeitlich als auch örtlich ein spezifisches Expressionsmuster. Dies weist auf eine starke Beteiligung der MMPs bei der Wundheilung hin (Madlener *et al.*, 1998).

Insbesondere die Matrix-Metalloproteinase-13 (MMP-13) scheint hierbei eine wichtige Rolle zu spielen. Aufgrund ihres Expressionsmusters und der Fähigkeit, fibrilläres Kollagen zu spalten (Freije *et al.*, 1994; Knäuper *et al.*, 1996a; Mitchell *et al.*, 1996) wird vermutet, dass die MMP-13 extrazelluläre Matrix abbaut, um Zellen, wie Keratinozyten, Fibroblasten und inflammatorischen Zellen die Migration während der Wundheilung zu ermöglichen.

Die Mechanismen, die während der Wundheilung zur Aktivierung des *mmp-13* Gens führen, und die Frage, welche konkrete Funktion diese Protease in diesem Prozess übernimmt, konnten bisher noch nicht geklärt werden.

Um die Rolle der MMP-13 in der Wundheilung zu untersuchen, wurde eine MMP-13-defiziente Maus hergestellt. Mit dieser Mauslinie wurden Wundheilungsexperimente durchgeführt, um die Auswirkungen des Verlustes der MMP-13 auf den Wundheilungsprozess zu untersuchen.

4.1 Herstellung von *mmp-13* knock-out Mauslinien

Zur Analyse der Funktion der MMP-13 in der Wundheilung wurde durch den Einsatz verschiedener Cre-Mauslinien eine Mauslinie hergestellt, in der die MMP-13 spezifisch in der Epidermis der Haut ausgeschaltet werden sollte, und eine, in der die Funktion des *mmp-13* Gens in allen Geweben während allen Entwicklungsstadien fehlen sollte.

In der geflochtenen *mmp-13* Maus (*mmp-13*^{flox/flox} = ▷/▷; hergestellt von Dr. B. Hartenstein, DKFZ, Heidelberg, in Zusammenarbeit mit Prof. Z. Werb, University of California, San Francisco), die zur Herstellung der beiden *mmp-13*-knock-out Mauslinien verwendet wurde, trägt das *mmp-13* Gen eine *loxP*-Sequenz im Intron zwischen Exon 2 und Exon 3 (Abb.10). Des Weiteren befindet sich ein von zwei *loxP*-Sequenzen flankiertes Neomycin-Minigen (Neo-

minigen) im Intron zwischen Exon 5 und Exon 6. Da die Exons 3, 4, und 5 für die katalytische Domäne der MMP-13 kodieren, wird im Falle einer vollständigen Rekombination durch Cre die katalytische Funktion der Protease zerstört.

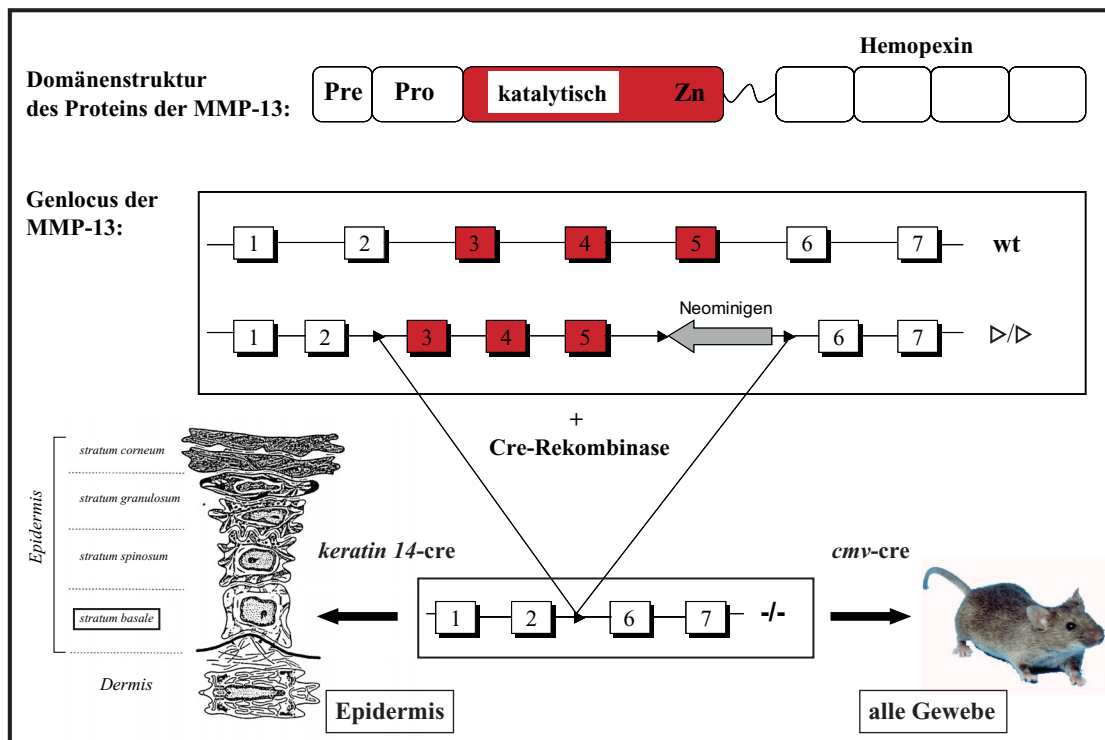


Abb.10 Herstellung von *mmp-13*-knock-out Mauslinien mit Hilfe des Cre/lox-Systems

Die Rekombination der loxP-Sequenzen, die die Exons 3 und 5 des *mmp-13* Gens flankieren, durch die Rekombinase Cre führt zum Verlust der proteolytischen Funktion der MMP-13, da die Exons 3, 4 und 5 für die katalytische Domäne der Protease kodieren. Wird Cre unter der Kontrolle des *keratin 14*-Promotors exprimiert, der im *Stratum basale* der Epidermis aktiv ist, führt dies zu einem Epidermis-spezifischen knock-out der MMP-13. Die Expression von Cre unter der Kontrolle des *cmv*-Promotors, der bereits in sehr frühen Phasen der Embryonalentwicklung aktiv ist, führt zu einem vollständigen Verlust der Funktion der MMP-13 in allen Geweben. wt = Wildtyp; Δ/Δ = gefloxt; $-/-$ = durch Cre rekombiniert.

Die Epidermis-spezifische *mmp-13*-knock-out Maus wurde durch Verpaarung der *mmp-13*^{fllox/fllox} Maus mit einer Mauslinie, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des endogenen *keratin 14*-Promotors exprimiert, generiert (die *keratin 14-cre* Maus wurde freundlicherweise von Dr. J. Huelsken, Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin in Berlin, zur Verfügung gestellt; Huelsken *et al.*, 2002). Der *keratin 14*-Promotor ist spezifisch in den Keratinozyten des *Stratum basale* aktiv. Dies führt dazu, dass die MMP-13 nach erfolgter Rekombination in der gesamten Epidermis fehlt, da alle Schichten der Epidermis aus den Keratinozyten der Basalschicht hervorgehen (Abb.10).

Für die Herstellung der Mauslinie, in der die Expression von MMP-13 in allen Geweben ausgeschaltet ist, wurde die *mmp-13^{flox/flox}* Maus mit einer Mauslinie verpaart, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des menschlichen Cytomegalovirus (*cmv*) minimal-Promotors exprimiert (*cmv-cre*). Dieser Promotor ist bereits in sehr frühen Phasen der murinen Embryogenese aktiv (Schwenk *et al.*, 1995), was zur Rekombination des geflochtenen *mmp-13* Allels in allen Zellen des Körper führt (die *cmv-cre* Maus wurde freundlicherweise von Dr. B. Arnold, DKFZ, Heidelberg zur Verfügung gestellt) (Abb.10).

Für die folgenden Untersuchungen wurden jeweils Mäuse eingesetzt, die homozygot für das geflochte *mmp-13* Allel waren und die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des entsprechenden Promotors exprimierten („*mmp-13^{flox/flox}/k14-cre*“ und „*mmp-13^{flox/flox}/cmv-cre*“).

4.1.1 Genotypisierung der *mmp-13*-knock-out Mauslinien

Für die Herstellung der MMP-13-defizienten Mauslinien wurde die geflochte *mmp-13* Mauslinie mit der entsprechenden Cre-Mauslinie verpaart (*keratin 14-cre* bzw. *cmv-cre*). Für die genotypische Analyse ihrer Nachkommen wurde die PCR-Technik verwendet. Hierfür wurde der *sense*-Primer „coll26“, der zu einem Sequenzbereich im fünften Exon des *mmp-13* Gens komplementär ist, und der *antisense*-Primer „coll24“, der zu einem Sequenzbereich im Exon 6 komplementär ist, verwendet. Mit Hilfe dieser spezifischen Primer wurden PCR-Reaktionen mit DNA, die aus Schwanzbiopsien der Nachkommen der angesetzten Verpaarungen isoliert wurde, durchgeführt. Durch gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Reaktionen konnte das 2,7 kb große Amplifikationsprodukt des geflochtenen *mmp-13* Allels ($\triangleright/\triangleright$) vom 1,2 kb großen Amplifikationsprodukt des Wildtyp *mmp-13*-Allels (*wt/wt*) unterschieden werden. Durch das Fehlen von Exons 5 im rekombinierten *mmp-13* Allel (*-/-*) ergibt sich hierfür kein Amplifikationsprodukt (Abb.11A).

Zum Nachweis des rekombinierten *mmp-13* Allels wurde der *sense*-Primer „coll54“, der zu einem Sequenzbereich im zweiten Exon komplementär ist, und der *antisense*-Primer „coll55“, der zu einem Sequenzbereich im sechsten Exon komplementär ist, verwendet. Die Fotografie der gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Reaktionen in Abbildung 11B zeigt das 1,3 kb große Amplifikationsprodukt des rekombinierten *mmp-13* Allels. Für das Wildtyp und das geflochte *mmp-13* Allel erhält man kein PCR-Produkt, da die Entfernung zwischen dem *sense*- und dem *antisense*-Primer für eine Amplifikation unter den gewählten PCR-Bedingungen zu groß ist.

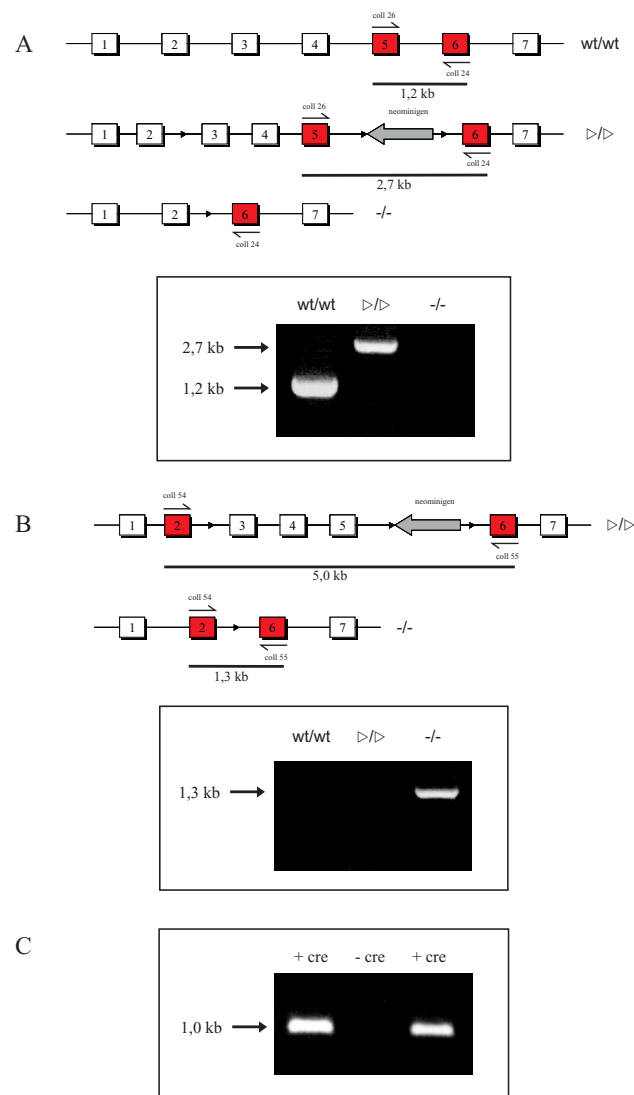


Abb.11 Prinzip der genotypischen Analyse der Nachkommenschaft der Mäuse aus den Verpaarungen $mmp-13^{\text{flox/flox}}$ x $keratin\ 14\text{-cre}$ und $mmp-13^{\text{flox/flox}}$ x $cmv\text{-cre}$

Der Wildtyp, der gefloxt und der durch Cre rekombinierte Locus des *mmp-13* Gens sind bei den Abbildungen (A) und (B) mit dem jeweils verwendeten Primer-Paar (durch Pfeile gekennzeichnet) schematisch dargestellt.

(A) Gelelektrophoretisch aufgetrennte PCR-Reaktionen, die mit Hilfe der Primer „coll24“ und „coll26“ durchgeführt wurde. Bei Mäusen, die das Wildtyp *mmp-13* Allel tragen (wt/wt), kann ein Amplifikationsprodukt von 1,2 kb und bei Mäusen, die das gefloxt *mmp-13* Allel tragen (Δ/Δ) ein Amplifikationsprodukt von 2,7 kb nachgewiesen werden. Für das durch Cre rekombinierte *mmp-13* Allel (-/-) ergibt sich kein Amplifikationsprodukt, da Exon 5 als komplementäre Sequenz des Primers „coll26“ fehlt.

(B) zeigt die im Agarosegel aufgetrennte PCR-Reaktionen, die mit den Primern „coll54“ und „coll55“ mit DNA einer wt/wt, Δ/Δ und -/- Maus durchgeführt wurden. Bei Verwendung der DNA der -/- Maus kann ein 1,3 kb großes Fragment amplifiziert werden. Für die DNAs der wt/wt und Δ/Δ Mäuse ergibt sich kein Amplifikationsprodukt, da unter den gewählten Bedingungen die Entfernung der Primer für eine Amplifikation zu groß ist.

(C) zeigt die gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Reaktionen, die mit den Primern „cre1“ und „cre2“ durchgeführt wurden. Ist die untersuchte Maus Träger des cre Gens (+cre) so ergibt sich ein 1,0 kb großes Amplifikationsprodukt.

Zum Nachweis des Gens der Cre-Rekombinase wurde eine PCR-Reaktion mit dem *anti-sense*-Primern "cre1" und dem *sense*-Primer "cre2" durchgeführt, die zu Sequenzbereichen des transgenen Konstruktes komplementär sind. Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Reaktion zeigt ein 1,0 kb großes Amplifikationsprodukt (Huelsenken *et al.*, 2002) (Abb.11C).

4.1.2 Überprüfung der Rekombinationseffizienz des geflochten *mmp-13* Allels in den *mmp-13* knock-out Mauslinien

Die Rekombinationseffizienz der Cre-Rekombinase in den generierten Mauslinien wurde mit Hilfe des *Southern Blot* Verfahrens mit DNA aus verschiedenen Geweben überprüft. Die DNA aus Schwanzbiopsien bzw. Epidermis und Dermis wurde hierfür mit dem Restriktionsenzym Pst I verdaut und elektrophoretisch aufgetrennt. Als Sonde für die Hybridisierung diente ein 1,3 kb großes Fragment, das einen Bereich von Exon 1 und Exon 2 überspannte und durch den Verdau mit den Restriktionsenzymen Nsi I und BspT I aus der DNA des Targeting Vektors gewonnen wurde. Mit dieser Sonde kann für das geflochte *mmp-13* Allel eine Fragment mit einer Größe von 4,95 kb und für das durch Cre rekombinierte *mmp-13* Allel mit einer Größe von 2,3 kb detektiert werden (Abb.12A).

Mit der DNA aus einer Schwanzbiopsie einer *mmp-13^{flox/flox}* Maus, die als Kontrolle diente, konnte im Autoradiogramm eine Hybridisierungsbande der Größe des geflochtenen *mmp-13* Allels (4,95 kb) nachgewiesen werden (Abb.12B). In der Epidermis und Dermis der *mmp-13^{flox/flox}/k14-cre* Maus wurde jeweils eine schwache Hybridisierungsbande der Größe des durch Cre rekombinierten *mmp-13* Allels (2,3 kb) und eine starke Hybridisierungsbande der Größe des geflochtenen *mmp-13* Allels detektiert. Dies zeigt, dass die Rekombinase der geflochtenen *mmp-13* Allele in den Keratinozyten der Epidermis nur unvollständig erfolgt ist. In der Dermis als Kontrollgewebe wäre nur eine Hybridisierungsbande der Größe des geflochtenen *mmp-13* Allels zu erwarten gewesen. Die schwache Hybridisierungsbande der Größe des durch Cre rekombinierten *mmp-13* Allels ist auf eine Verunreinigung der Dermis-Fraktion durch Keratinozyten der Haarfollikel zurückzuführen, die in die Dermis hineinragen. Die DNA der *mmp-13^{flox/flox}/cmv-cre* Mauslinie, in der die Expression von Cre zu einer Rekombination des geflochtenen *mmp-13* Allels in allen Geweben führt, zeigt wie erwartet ausschließlich eine Hybridisierungsbande von 2,3 kb (Abb.12B). In dieser Linie hat eine Rekombination der geflochtenen *mmp-13* Allele demnach vollständig stattgefunden (*mmp-13^{flox/flox}/cmv-cre* = *mmp-13⁻/cmv-cre*).

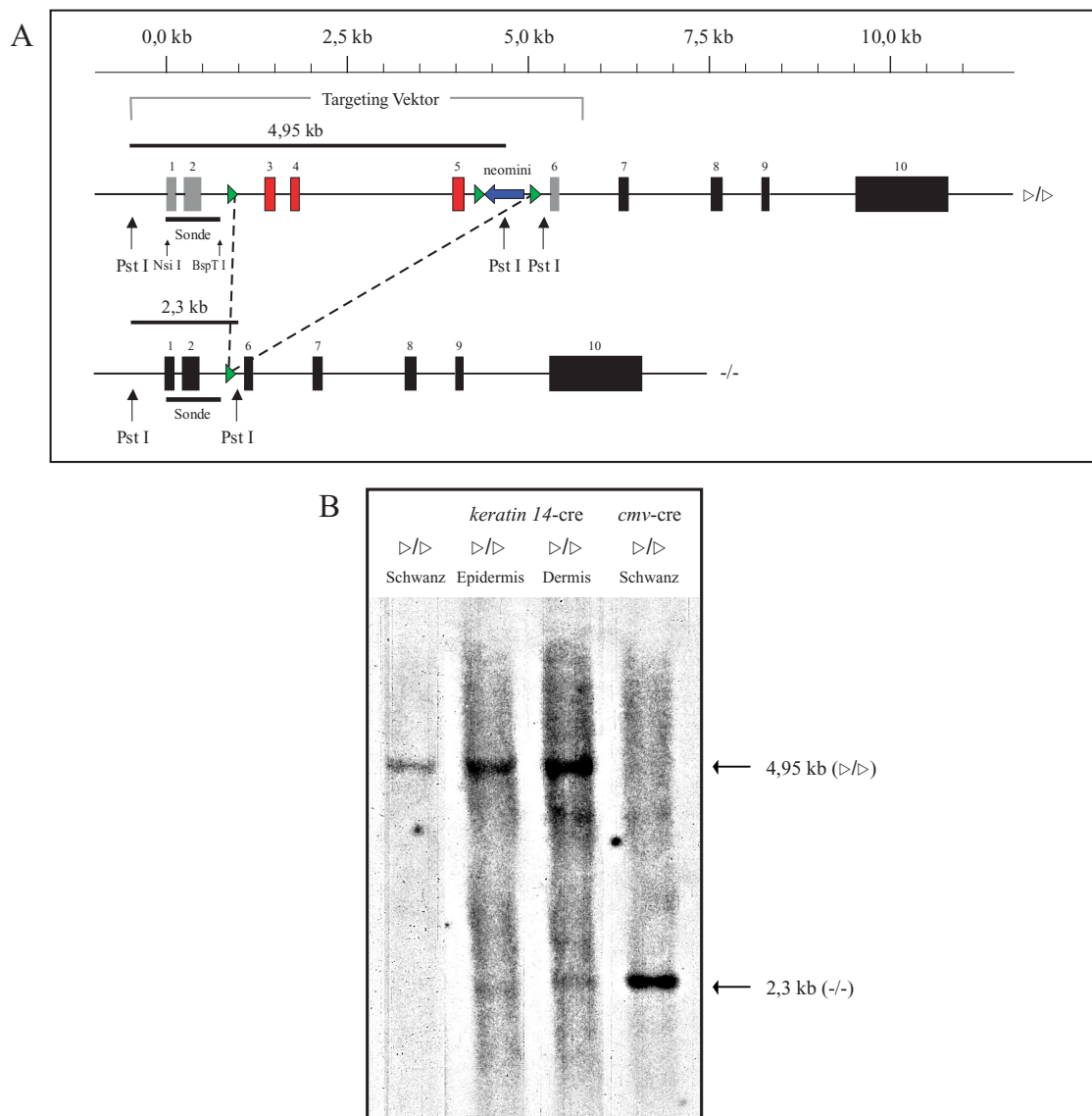


Abb.12 Analyse der Rekombinationseffizienz des geflochten *mmp-13* Allels in den generierten *mmp-13* knock-out Mäusen

(A) Schematische Darstellung des geflochtenen *mmp-13* Allels (Δ/Δ) und des durch Cre rekombinierten *mmp-13* Allels (-/-). Δ = *loxP*-Sequenz

(B) zeigt das Autoradiogramm eines Southern Blots, der zur Analyse der Rekombinationseffizienz in den generierten *mmp-13*-knock-out Mauslinien durchgeführt wurde. Es wurde DNA aus einer Schwanzbiopsie einer *mmp-13^{flx/flx}* Maus, DNA aus Epidermis und Dermis einer *mmp-13^{flx/flx}/keratin 14-cre* Maus und DNA aus einer Schwanzbiopsie einer *mmp-13^{flx/flx}/cmv-cre* Maus isoliert, mit dem Restriktionsenzym Pst I verdaut und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde, die zu einem Sequenzbereich von Exon 1 bis Exon 2 komplementär ist, zeigt für die *mmp-13^{flx/flx}* Maus eine Hybridisierungsbande der Größe des geflochtenen *mmp-13* Allels (4,95 kb), für Epidermis und Dermis der *mmp-13^{flx/flx}/keratin 14-cre* Maus eine starke Hybridisierungsbande der Größe des geflochtenen *mmp-13* Allels und eine schwache Hybridisierungsbande der Größe des durch Cre rekombinierten *mmp-13* Allels (2,3 kb). Für die *mmp-13^{flx/flx}/cmv-cre* Maus kann ausschließlich eine Hybridisierungsbande der Größe des durch Cre rekombinierten *mmp-13* Allels nachgewiesen werden.

Aufgrund der unvollständigen Rekombination des geflochten *mmp-13* Allels in der Epidermis der *mmp-13^{flox/flox}/k14-cre* Mauslinie wurde diese Mauslinie für keine weiteren Untersuchungen verwendet. Alle folgenden Analysen in dieser Arbeit wurden mit der *mmp-13^{-/-}/cmv-cre* Mauslinie durchgeführt.

Da die Rekombination des geflochten *mmp-13* Allels in der *mmp-13^{-/-}/cmv-cre* Mauslinie in allen Zelltypen stattfindet, also auch in den Keimzellen, ergeben sich aus Verpaarungen zweier *mmp-13^{-/-}/cmv-cre* Mäuse auch ohne die Expression der Cre-Rekombinase stets vollständige *mmp-13*-knock-out Mäuse. Daher wurde bei der Züchtung der *mmp-13*-knock-out Mäuse ab der 2. Generation auf die Expression der Cre Rekombinase verzichtet. Es wurden nur noch *mmp-13*-knock-out Mäuse verwendet, die das Gen für die Cre-Rekombinase nicht mehr besaßen (*mmp-13^{-/-}* = MMP-13-defizient = *mmp-13*-knock-out).

Als Kontrollmäuse wurden in allen Untersuchungen *mmp-13^{flox/flox}* Mäuse verwendet.

4.1.3 Analyse der Rekombination der geflochten *mmp-13* Allele auf RNA-Ebene

Nachdem auf DNA-Ebene bestätigt wurde, dass die Rekombination des geflochten *mmp-13* Allels in der Schwanzbiopsie der MMP-13-defizienten Mauslinie vollständig stattgefunden hat, wurde die Expression des rekombinierten *mmp-13* Gens zusätzlich auf RNA-Ebene analysiert (Abb.13).

Hierfür wurde Gesamt-RNA aus Femur und Tibia der Hinterbeine von *mmp-13^{-/-}* Mäusen und von Kontrollmäusen isoliert und mit Hilfe der *Northern Blot* Methode analysiert. Es wurde RNA aus Knochengewebe verwendet, da die MMP-13 im Knochen, nicht jedoch in der unverwundeten Haut exprimiert wird (Gack *et al.*, 1995; Madlener *et al.*, 1998; Tuckermann *et al.*, 2000). Als Hybridisierungssonde diente ein MMP-13-cDNA-Fragment (Gack *et al.*, 1994). Zur Quantifizierung der aufgetragenen mRNA-Menge wurde die Membran mit der GAPDH-cDNA hybridisiert (Fort *et al.*, 1985).

Wie in Abbildung 13 gezeigt, konnte im Gegensatz zu Kontrollmäusen in Knochen von MMP-13-defizienten Mäusen kein Transkript für MMP-13 detektiert werden, auch kein, wie vom rekombinierten Locus erwartetes, trunkiertes Transkript. Das Fehlen des trunkierten Transkriptes in der *mmp-13*-knock-out Maus deutet darauf hin, dass dieses instabil ist und sehr schnell abgebaut wird.

Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass in der MMP-13-defizienten Maus weder MMP-13 Transkripte noch MMP-13 Protein vorhanden sind.

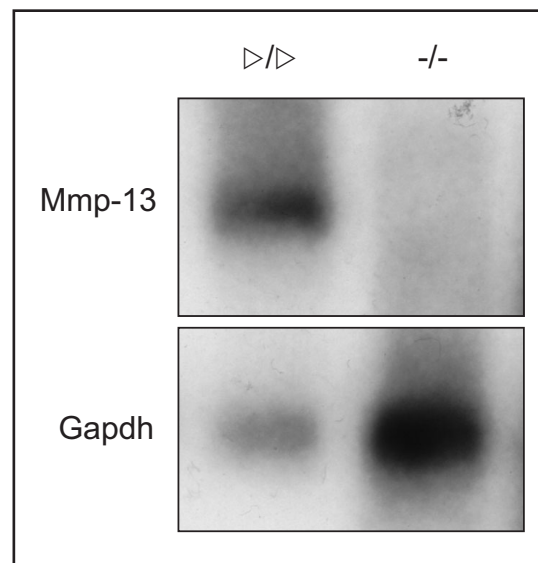


Abb.13 Analyse der vollständigen Rekombination des geflochten *mmp-13* Allels der MMP-13-defizienten Maus auf RNA-Ebene

Nach Isolierung von Gesamt-RNA aus Femur und Tibia der Hinterbeine einer Kontrollmaus (Δ/Δ) und einer *mmp-13*^{-/-} Maus ($-/-$) wurden diese gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Nach der Hybridisierung mit der radioaktiv markierter MMP-13 cDNA folgte eine Kontrollhybridisierung mit der GAPDH-cDNA der Ratte. Im Knochen der *mmp-13*^{-/-} Maus kann kein Transkript der MMP-13 nachgewiesen werden.

4.2 Phänotypische Analyse der MMP-13-defizienten Mäuse

Anhand der Analysen der DNA und RNA konnte deutlich gezeigt werden, dass in der MMP-13-defizienten Mauslinie das geflochte *mmp-13* Allel vollständig rekombiniert wurde und die Expression dieses durch Cre rekombinierten *mmp-13* Allels zu keinem stabilen Transkript führt. Diese Mauslinie wurde daher für die folgenden Untersuchungen zur Funktion der MMP-13 verwendet.

4.2.1 Embryonalentwicklung der MMP-13-defizienten Mäuse

Erste MMP-13 Expression kann am Tag 14.5 der Embryonalentwicklung der Maus in einzelnen Zellen des Hinterhauptbeins gezeigt werden (Gack *et al.*, 1995). Am Tag 16.5 kann zum ersten Mal eine starke Expression der MMP-13 ausschließlich in Röhren- und Schädelknochen gezeigt werden (Gack *et al.*, 1995).

Um zu untersuchen, ob sich der Verlust der MMP-13 auf die Embryonalentwicklung der Maus auswirkt, wurde daher die Morphologie von 16.5 Tage alten Embryonen von MMP-13-defizienten Mäusen mit der von Kontrollmäusen verglichen (Abb.14). Hierfür wurden Embryonen von *mmp-13*-knock-out Mäusen und Kontrollmäusen in Paraformaldehyd fixiert, durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und in Paraffin eingebettet. Von den eingebetteten

Embryonen wurden 8 µm dicke Schnitte angefertigt und auf beschichtete Objektträger aufgezogen. Die Analyse histologisch (Hämatoxylin & Eosin = HE) gefärbter Gewebeschnitte zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den *mmp-13*-knock-out Embryonen und den Kontrollembryonen.

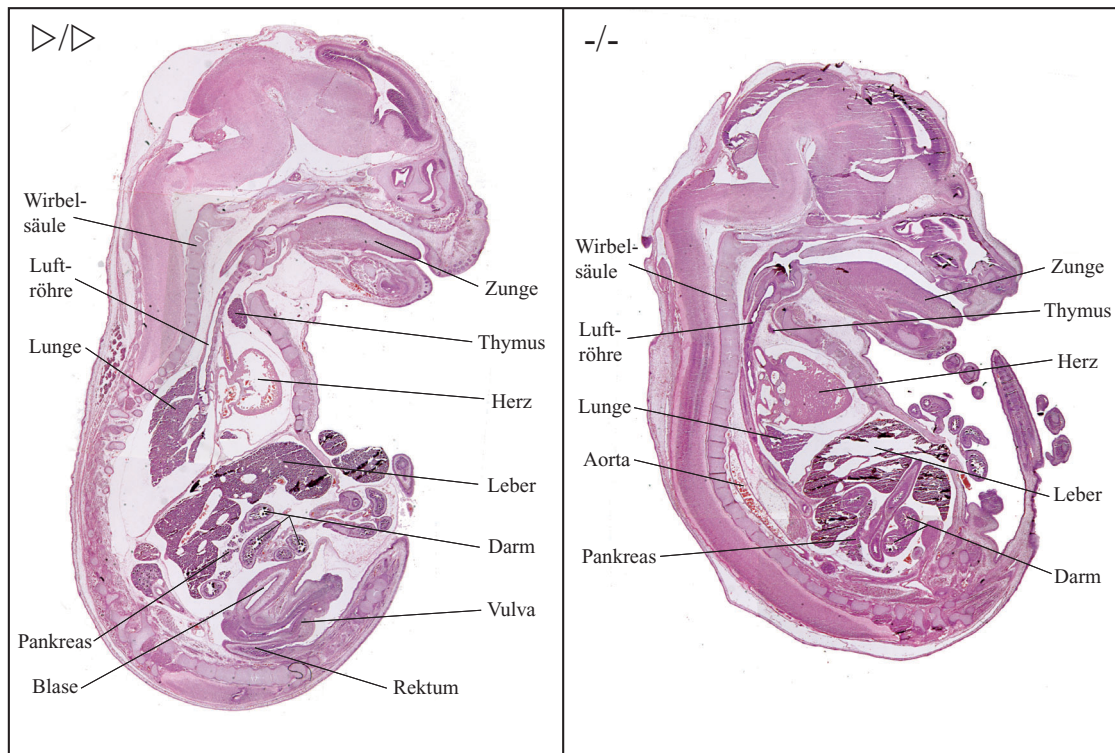


Abb.14 Embryonen am Tag 16.5 der Embryonalentwicklung

16.5 Tage alte Embryonen von Kontroll- (Δ/Δ) und *mmp-13*-knock-out ($-/-$) Mäusen wurden in Paraformaldehyd fixiert, durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und in Paraffin eingebettet. Von den eingebetteten Embryonen wurden 8 µm dicke Schnitte angefertigt und histologisch (HE) gefärbt. Der Vergleich der Embryonen zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den *mmp-13*-knock-out Mäusen und den Kontrollmäusen.

Embryonalentwicklung des Knochens

Am Tag 16.5 der Embryonalentwicklung wird die MMP-13 in Röhren- und Schädelknochen und dort spezifisch in hypertrophen Chondrozyten der Knochenwachstumszone und Osteoblasten exprimiert (Gack *et al.*, 1995).

Zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung hat der Prozess der endochondralen Ossifizierung in einigen Knochen, wie z. B. dem Oberschenkelknochen der Hinterbeine (Femur) bereits eingesetzt. In diesem Vorgang wird Knorpelgewebe, das bereits die Form des späteren Knochens besitzt, nach und nach durch Knochensubstanz ersetzt. Proliferierende Chondrozyten im zentralen Teil des Knorpels differenzieren zu so genannten hypertrophen Chondrozyten. Diese Zellen sezernieren eine Knorpel-ECM, die die Invasion von Blutgefäßen erlaubt. Nach erfolg-

reicher kapillarer Versorgung der Region der hypertrophen Chondrozyten, sterben diese ab und werden durch Osteoblasten ersetzt, die durch die Blutgefäße in die Knochenanlage gelangen. Die hypertrophe Knorpelmatrix im Zentrum des Knochenmodells wird während der Vaskularisierung degradiert und durch von Osteoblasten sezernierte, knochenspezifische Matrix ersetzt.

Um zu untersuchen, ob der Verlust der MMP-13 Auswirkungen auf diesen Prozess hat und es dadurch zu einer morphologischen Veränderung der Knochenanlage des Femur kommt, wurde dieser auf den angefertigten Gewebeschnitten der 16.5 Tage alten Embryonen im Detail analysiert (Abb.15). Der Vergleich des Femurs eines *mmp-13*-knock-out Embryos mit einem Kontrollembryo in Abbildung 15 zeigt keine gravierenden Unterschiede in ihrer Morphologie. Lediglich die Zone der hypertrophen Chondrozyten im zentralen Bereich der Knochenanlage ist im Femur des MMP-13-defizienten Embryos im Vergleich zu dem Kontrollembryo geringfügig vergrößert. Ob dieser geringfügige Unterschied auf Schwankungen zwischen einzelnen Embryonen oder auf den Verlust der MMP-13 zurückzuführen ist, müssen Untersuchungen einer größeren Anzahl an Embryonen zeigen. Dieser nur geringfügige Unterschied in der zellulären Zusammensetzung der Knochenanlage lässt vermuten, dass die MMP-13 in diesem Prozess entweder keine essentielle Aufgabe erfüllt, oder ihre Funktion während der Knochenentwicklung von einer anderen MMP kompensatorisch übernommen wird.

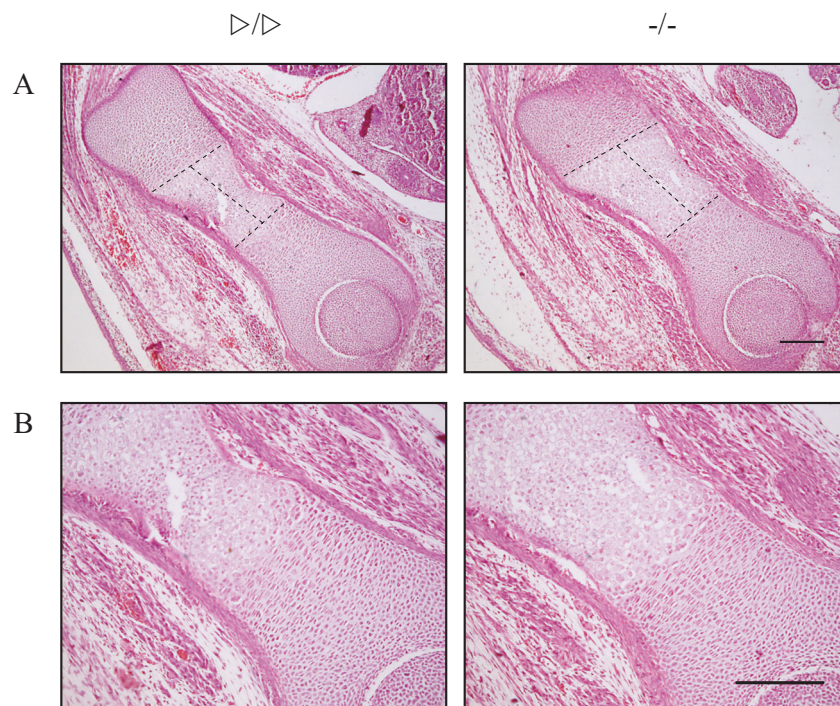


Abb.15 Embryonale Knochenentwicklung der *mmp-13*-knock-out Mäuse ist nicht gravierend verändert im Vergleich zu den Kontrollmäusen

(A) und (B) zeigen histologisch (HE) gefärbte Gewebeschnitte des Oberschenkelknochens (Femur) am Tag 16.5 der Embryonalentwicklung von Kontroll- (Δ/Δ) und *mmp-13*-knock-out ($-/-$) Mäusen in unterschiedlicher Vergrößerung. (----) markiert die Zone der hypertrophen Chondrozyten. Balken entspricht 500 μm .