

Embryonalentwicklung der Haut

Ab dem Tag 15.5 der Entwicklung der Maus sind alle epidermalen Schichten angelegt und die Verhornung setzt ein. Zu diesem Zeitpunkt besteht die Epidermis aus einer Schicht säulenförmiger Basalzellen und meist drei bis vier darüberliegenden Zellschichten (Militzer, 1982). Um die Entwicklung der Haut in den *mmp-13*-knock-out Mäusen zu analysieren, wurde die Haut auf den angefertigten Gewebeschnitten der 16.5 Tage alten Embryonen im Detail untersucht (Abb.16). Der Vergleich der embryonalen Haut der MMP-13-defizienten Mäuse mit den Kontrollmäusen zeigte hierbei keine Unterschiede. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit Untersuchungen, die gezeigt haben, dass die MMP-13 während der Embryonalentwicklung nicht in der Haut exprimiert wird (Gack *et al.*, 1995).

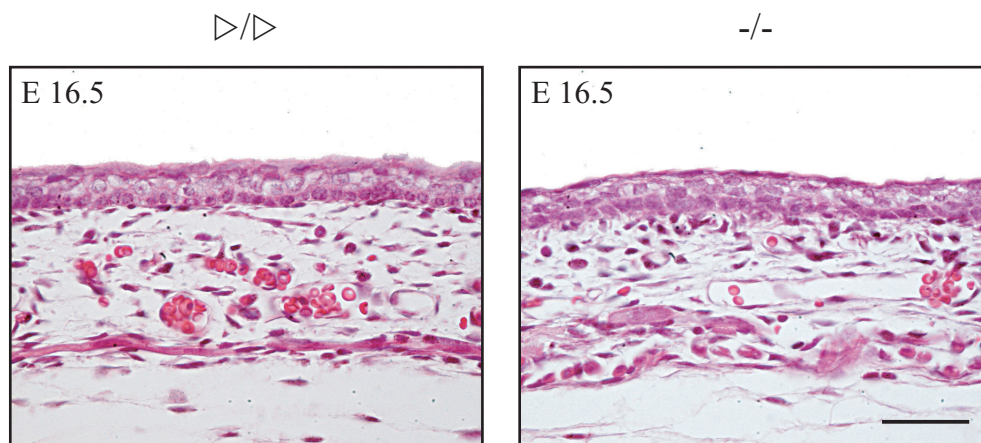


Abb.16 Aufbau der Haut am Tag 16.5 der Embryonalentwicklung

Der Vergleich von Rückenhäuten auf histologisch (HE) gefärbten Paraffinschnitten von 16.5 Tage alten Kontroll- (>/>) und *mmp-13*^{-/-} Embryonen (-/-) zeigt keine signifikanten Unterschiede. Balken entspricht 100 µm

4.2.2 Phänotyp adulter MMP-13-defizienter Mäuse

In der adulten Maus wird MMP-13 ebenso wie während der Embryonalentwicklung im Knochengewebe exprimiert (Tuckermann *et al.*, 2000). Ob sich der Verlust von MMP-13 auf das Längenwachstum der Mäuse auswirkt, wurde untersucht, indem im Alter von 5 Wochen MMP-13-defiziente Mäuse und Kontrollmäuse bezüglich ihrer Körpergröße verglichen wurden (Abb.17). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in Größe und Aussehen der Mäuse.



Abb.17 Größe und Morphologie adulter *mmp-13*-knock-out Mäuse unterscheiden sich nicht signifikant von Kontrollmäusen

Die Abbildung zeigt den Vergleich einer 5 Wochen alten *mmp-13*-knock-out Maus (-/-) mit einer 5 Wochen alten Kontrollmaus (Δ/Δ).

Morphologie adulter Knochen

Um auch in der adulten Maus die Auswirkungen des Verlustes der MMP-13 auf den Knochen, in dem sie konstitutiv exprimiert wird, zu untersuchen, wurden von in Paraffin eingebetteten Oberschenkelknochen von zwölf Wochen alten, weiblichen MMP-13-defizienten Mäusen und Kontrollmäusen Gewebeschnitte angefertigt und histologisch (HE) gefärbt (Abb.18). Auf diesen Schnitten wurde insbesondere die Wachstumszone des Knochens untersucht, die, wie im Folgenden beschrieben, entsteht:

Während der Embryonalentwicklung schreitet vom verknöcherten Zentrum des anfänglichen Knorpels nach beiden Seiten jeweils eine Ossifizierungsfront voran, auf deren proximaler Seite sich die Osteoblasten und auf der distalen Seite sich die hypertrophen Chondrozyten befinden, die aus dem distalen Chondrozytenreservoir differenzieren. Die hypertrophen Chondrozyten induzieren die kapillare Angiogenese, sterben ab und werden durch Osteoblasten ersetzt. Dadurch wird die Ossifizierungsfront immer weiter zentripetal verschoben. Nach einiger Zeit beginnen die Chondrozyten distal der Ossifizierungsfront zu proliferieren, bevor sie in hypertrophe Chondrozyten differenzieren. Sie bilden einen epiphysären Knorpel. Dadurch werden

die knorpeligen Enden des Röhrenknochens vorwärts geschoben, während das eigentliche Längenwachstum des Knochens an der Stelle der proliferierenden Chondrozyten stattfindet. Die Zone der Osteoblasten, der hypertrophen Chondrozyten und proliferierenden Chondrozyten wird als Wachstumszone bezeichnet. Die Chondrozyten des epiphysären Knorpels hypertrophieren nach einiger Zeit ebenfalls und leiten die Bildung eines sekundären Ossifikationszentrums ein. Blutgefäße wandern in diesen Bereich ein und Osteoblasten beginnen mit der Sekretion von Knochenmatrix, die nachfolgend mineralisiert.

Die Expression der MMP-13 in hypertrophen Chondrozyten und Osteoblasten lässt eine Funktion in der endochondralen Ossifizierung des Knochens vermuten.

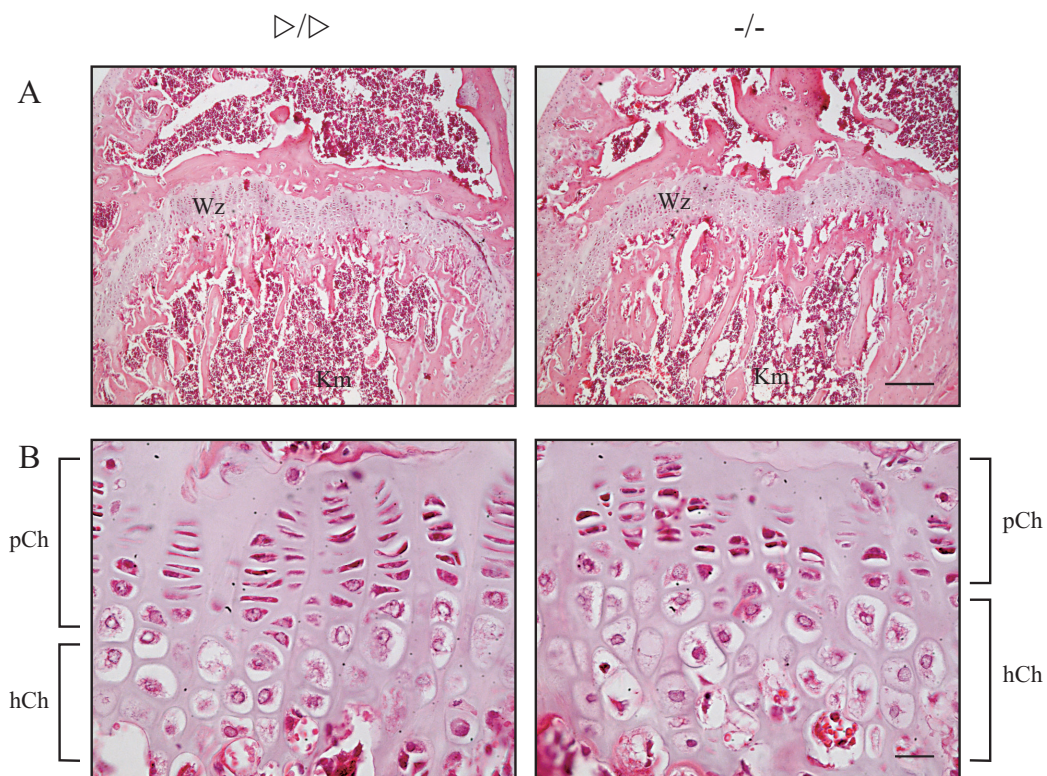


Abb.18 Knochenwachstumszone 12 Wochen alter Mäuse

Von in Paraffin eingebetteten Oberschenkelknochen von 12 Wochen alten Kontroll- (Δ/Δ) und *mmp-13*-knock-out ($-/-$) Mäusen wurden Gewebeschnitte angefertigt und histologisch (HE) gefärbt.

(A) zeigt Übersichtsaufnahmen von den Wachstumszonen der Oberschenkelknochen. In der Breite der Wachstumszone ist kein Unterschied festzustellen.

(B) zeigt Detailaufnahmen der Wachstumszonen der Oberschenkelknochen. Die Wachstumszone des *mmp-13*-knock-out Knochens setzt sich aus verhältnismäßig mehr hypertrophen Chondrozyten zusammen als die des Kontrollknochens. Wachstumszone (Wz), Knochenmark (Km), proliferative Chondrozyten (pCh), hypertrophe Chondrozyten (hCh). Balken entspricht in (A) 500 μ m und in (B) 50 μ m

Die mikroskopische Analyse der Wachstumszone zeigte keine gravierenden Unterschiede zwischen den MMP-13-defizienten Knochen und den Kontrollknochen. Wie in der embryonalen Knochenanlage scheint lediglich die Zone der hypertrophen Chondrozyten in den MMP-13-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen etwas vergrößert zu sein. Auch hier müssen jedoch Untersuchungen von einer größeren Anzahl an Mäusen zeigen, ob dieser Befund auf den Verlust der MMP-13 zurückzuführen ist, oder ob es sich um Schwankungen handelt, die von Maus zu Maus auftreten können. Die veränderte Größe der Zone der hypertrophen Chondrozyten hat jedoch keine gravierenden Auswirkungen auf das Wachstum der Knochen, was der Größenvergleich der adulten Mäuse in Abbildung 17 zeigt.

Morphologie und epidermale Differenzierung in der adulten Haut

Die kollagenhaltige Dermis der Haut befindet sich in einem präzise regulierten Gleichgewicht zwischen Kollagenproduktion und -abbau. Bei dem kollagenabbauenden Enzym des Menschen handelt es sich um die MMP-1, als deren funktionelles Homolog die MMP-13 der Maus angesehen wird. Um zu untersuchen, ob der Verlust der MMP-13 zur Entwicklung einer Fibrose der Haut führt, die durch einen verminderten Abbau des Kollagens zustande kommen könnte, wurde die Morphologie der Rückenhaut von 8 Wochen, 6 Monate und 1 Jahr alten

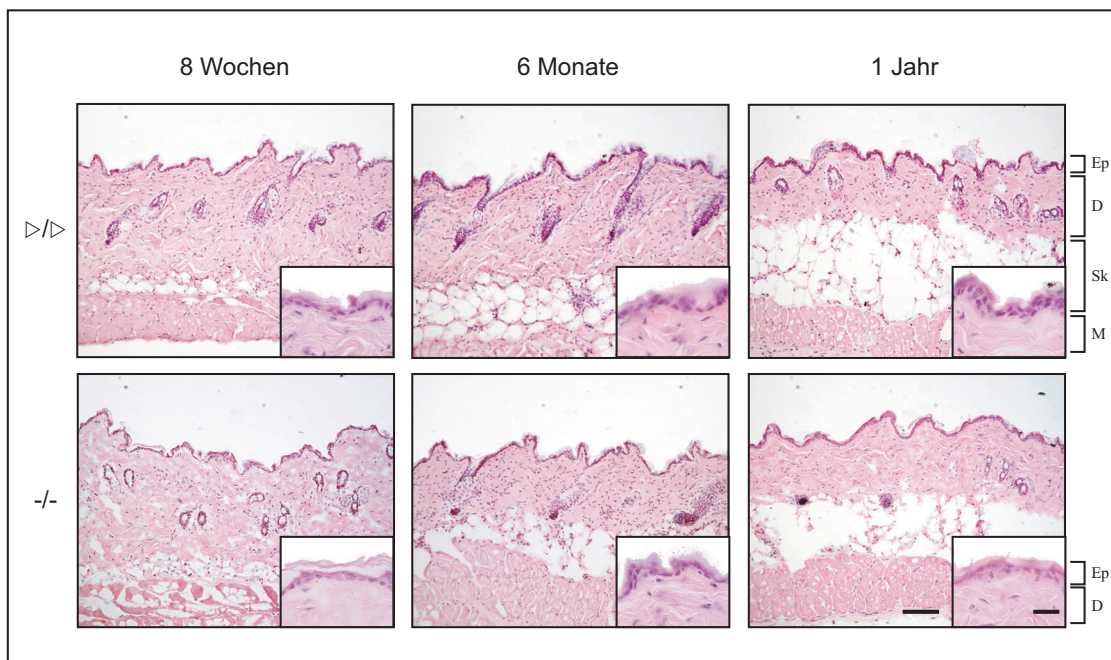


Abb.19 Rückenhaut von 8 Wochen, 6 Monate und 1 Jahre alten Mäusen

Der Vergleich von histologisch (HE) gefärbten Gefrierschnitten von Rückenhäuten von 8 Wochen, 6 Monate und 1 Jahr alten *mmp-13*^{-/-} Mäusen (-/-) und Kontrollmäusen (Δ/Δ) zeigt keine signifikanten Unterschiede. Die kleinen Bildauschnitte zeigen die Epidermis in höherer Vergrößerung. (Ep) Epidermis, (D) Dermis, (Sk) Subkutis, (M) Muskelgewebe. Balken in der Übersichtsaufnahme entspricht 250 μm; Balken in der Detailaufnahme entspricht 50 μm.

MMP-13-defizienten Mäusen und Kontrollmäusen mit Hilfe histologischer (HE) Färbung von Gewebeschnitten analysiert (Abb.19). Dabei zeigte sich zwischen der Haut der MMP-13-defizienten Mäuse und der der Kontrollmäuse kein signifikanter Unterschied in der Morphologie.

Infolge des Alterungsprozesses, in dem es zu einer Verschiebung des Gleichgewichts von Kollagensynthese und Kollagenabbau zugunsten des Kollagenabbaus kommt, reduziert sich der dermale Anteil der Haut. Diese Tendenz ist in der 6 Monate alten Haut bereits zu erkennen und wird in der 1 Jahr alten Haut ganz deutlich sichtbar. Dass in diesem Prozess kein Unterschied zwischen den MMP-13-defizienten Mäusen und den Kontrollmäusen festzustellen ist, lässt darauf schließen, dass weder die Produktion von Kollagen durch die Fibroblasten noch der Abbau von Kollagen durch Proteasen in den MMP-13-defizienten Mäusen gestört ist. Dieser Befund gilt sowohl für die Rückenhaut der Mäuse, als auch für ihre Schwanzhaut.

Der Befund, dass es keine Auffälligkeiten in der Entwicklung der Haut der MMP-13-defizienten Mäuse gibt, wurde durch die Analyse von Markerproteinen der epidermalen Differenzierung untermauert. Hierfür wurden diese Markerproteine auf Schnitten der Schwanzhaut von MMP-13-defizienten Mäusen und Kontrollmäusen mit Hilfe immunhistologischer Färbung und mittels Immunfluoreszenz sichtbar gemacht (Abb.20). Für diese Analysen wurde Schwanzhaut verwendet, da hier die Epidermis mehr Zellagen aufweist als die der Rückenhaut und dadurch die Analysen erleichtert. Für die verschiedenen Differenzierungsphasen der Epidermis ist die Expression von bestimmten Komponenten des Zytoskeletts charakteristisch.

Als Markerprotein für die Basalschicht der Epidermis diente Keratin 5. Als frühe Marker der Differenzierung, die in allen suprabasalen Schichten exprimiert werden, wurden Keratin 10 und Involucrin verwendet. Als später Marker der Differenzierung diente das Strukturprotein Loricrin. Als Marker zum Nachweis proliferierender Zellen wurde Ki-67 verwendet, das von Zellen exprimiert wird, die sich in der Zellteilung befinden.

Bei keinem von diesen Markern konnte in seiner Expression ein Unterschied zwischen den *mmp-13^{-/-}* Mäusen und den Kontrollmäusen festgestellt werden (Abb.20). Keratin 5 wird in beiden Fällen ausschließlich von Keratinozyten der Basalschicht exprimiert. Im Anteil an proliferierenden Keratinozyten in der Basalschicht zeigt sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied. Die Expression des späten Markers Loricrin beschränkt sich auf das *Stratum corneum* und Keratin 10 und Involucrin werden in beiden Linien von allen suprabasalen Schichten exprimiert.

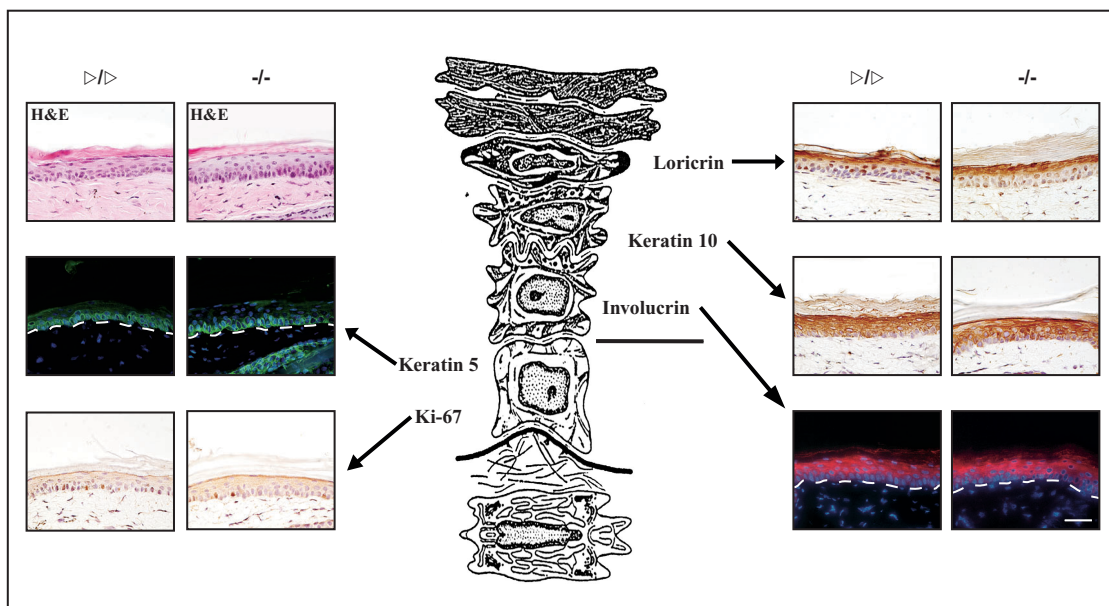


Abb.20 Epidermale Differenzierung der *mmp-13*-knock-out Mäuse ist unverändert

Querschnitte von Schwanzhäuten 7 bis 8 Wochen alter *mmp-13*-knock-out Mäuse (-/-) und Kontrollmäuse (Δ/Δ) wurden histologisch (HE) gefärbt und sowohl das proliferationspezifische Protein Ki-67 (braun) als auch die differenzierungsspezifischen Proteine Keratin 5 (grün), Involucrin (rot), Keratin 10 (braun) und Loricrin (braun) mittels Immunfluoreszenz bzw. Immunhistochemie sichtbar gemacht. Die Zellkerne wurde bei den Immunfluoreszenz-Nachweisen mit Hoechstfarbstoff (blau) und bei den immunhistochemischen Nachweisen mit Hämatoxylin (blau) gegengefärbt. Balken entspricht 100 μm.

Die Analyse der MMP-13-defizienten Mäuse zeigt, dass das Fehlen der MMP-13 zu keinem gravierenden Unterschied in der Embryonalentwicklung führt. Im adulten Zustand zeigen diese ebenfalls keinen auffälligen Phänotyp. In der Haut konnte zwischen MMP-13-defizienten Mäusen und Kontrollmäusen weder in der Entwicklung noch in der Homöostase ein Unterschied festgestellt werden.

4.3 Wundheilungsexperimente

Die Expression von MMP-13 während der Wundheilung der Haut deutet auf eine wichtige Funktion dieser Protease in diesem Prozess hin (Madlener *et al.*, 1998). In einer heilenden Wunde wird MMP-13 an der vordersten Front des in die Wunde einwandernden Epithels von Keratinozyten exprimiert. Diese Expression lässt auf eine Rolle von MMP-13 im Abbau extrazellulärer Matrix schließen, um den am Wundrand befindlichen Keratinozyten die Migration zu ermöglichen. Zu späteren Zeitpunkten, wenn die Wunde bereits geschlossen ist, wird die MMP-13 von einzelnen Zellen des Granulationsgewebes gebildet. Es wird diskutiert, dass die MMP-13 am Umbau der neu gebildeten Kollagenmatrix im Wundbereich beteiligt ist.

Die Mechanismen, die während der Wundheilung zur Aktivierung des *mmp-13* Gens führen, und die Frage, welche Funktion diese Protease in diesem Prozess übernimmt, sollten in dieser Arbeit durch die Auswertung von Wundheilungsexperimenten mit den MMP-13-defizienten Mäusen besser verstanden werden.

4.3.1 Durchführung der Wundheilungsexperimente

Zur Untersuchung des Wundheilungsprozesses wurde die Rückenhaut von MMP-13-defizienten Mäusen und Kontrollmäusen verwundet (Abb.21). Hierfür wurden 7 bis 8 Wochen alte weibliche Mäuse narkotisiert, die Rückenhaut rasiert und mit Hilfe einer Biopsie-Stanze vier Exzisionswunden mit einem Durchmesser von 4 mm so gesetzt, dass jeweils zwei der vier Wunden bezüglich der Wirbelsäule symmetrisch zueinander lagen. Nach 1, 2, 3, 5, 7, 10 bzw. 14 Tagen wurden die verwundeten Mäuse getötet. Die äußerliche Morphologie wurde durch Fotografieren der Wunden dokumentiert. Zwei der vier Wunden wurden anschließend für histologische Analysen eingebettet, während die anderen beiden Wunden für die Präparation von RNA verwendet wurden (detaillierte Beschreibung siehe Material und Methoden).

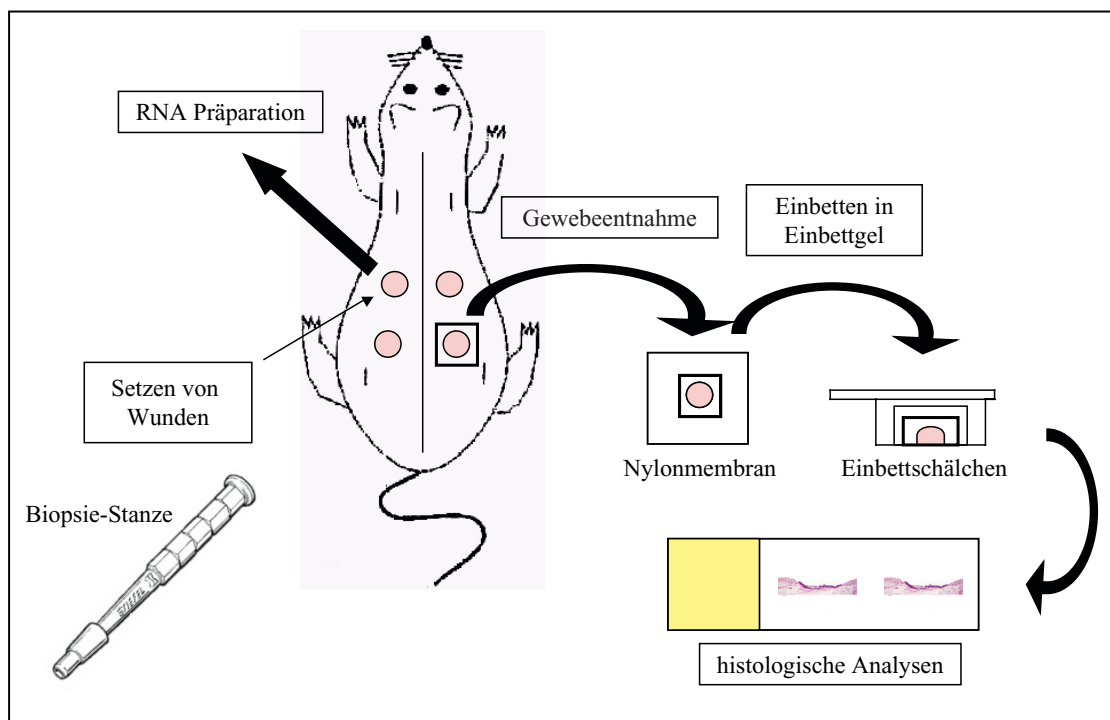


Abb.21 Schematische Darstellung der Durchführung der Wundheilungsexperimente

7 bis 8 Wochen alte weibliche Mäuse werden narkotisiert, die Rückenhaut rasiert und mit Hilfe einer Biopsie-Stanze vier Exzisionswunden mit einem Durchmesser von 4 mm so gesetzt, dass jeweils zwei der vier Wunden bezüglich der Wirbelsäule symmetrisch zueinander liegen. Nach definierten Zeitpunkten werden die verwundeten Mäuse getötet. Zwei der vier Wunden werden für histologische Analysen eingebettet, während die anderen beiden Wunden für die Präparation von RNA verwendet werden.

4.3.2 Expression der MMP-13 während der Wundheilung

Um zu zeigen, dass in den Wunden, die in dieser Arbeit untersucht wurden, MMP-13, wie in anderen Arbeiten beschrieben (Madlener *et al.*, 1998; Lund *et al.*, 1999), am Wundrand von Keratinozyten und zu späteren Zeitpunkten in einzelnen Zellen des Granulationsgewebes exprimiert wird, und diese Expression in den MMP-13-defizienten Wunden nicht mehr vorhanden ist, wurde die Expression der MMP-13 auf Gefrierschnitten von Wunden 1 und 7 Tage nach Verwundung mit Hilfe der *in situ* Hybridisierungstechnik nachgewiesen. Mit dieser Technik lässt sich die Expression von Genen direkt im entsprechenden Gewebe auf Einzelzellebene nachweisen. Als Sonde für die Hybridisierung diente ein 246 bp großes RNA-Transkript, das zu einem Sequenzbereich von Exon 3 bis Exon 5 des MMP-13 Transkriptes komplementär ist (*antisense*-Probe).

In den Wunden der Kontrollmäuse konnte am Tag 1 nach Verwundung eine Expression von MMP-13 in Keratinozyten am Wundrand beobachtet werden. In den Wunden der MMP-13-defizienten Mäuse konnte hingegen keine Expression von MMP-13 nachgewiesen werden (Abb.22A). Am Tag 7 konnte im Gegensatz zu den *mmp-13^{-/-}*-Mäusen in den Kontrollmäusen eine Expression von MMP-13 in wenigen Zellen des Granulationsgewebes detektiert werden (Pfeil; Abb.22C).

Der Befund, dass die MMP-13-defizienten Mäuse auch während der Wundheilung keine MMP-13 exprimieren, wurde mit Hilfe der *RT-PCR*-Technik bestätigt (Abb.22B). Hierzu wurde Gesamt-RNA aus Wunden ein Tag nach Verwundung von drei verschiedenen MMP-13-defizienten Mäusen und drei verschiedenen Kontrollmäusen isoliert und mittels reverser Transkription in cDNA-Sequenzen übersetzt. Als Nachweis der erfolgreichen cDNA-Synthese und zur Überprüfung der cDNA auf Kontamination durch genomische DNA, wurde eine PCR-Reaktion zum Nachweis des Transkriptes von β -Tubulin durchgeführt. Hierfür wurde der *sense*-Primer "Tubulin-Ex2", der zu einem Sequenzbereich in Exon 2 komplementär ist, und der *antisense*-Primer "Tubulin-Ex4", der zu einem Sequenzbereich in Exon 4 komplementär ist, verwendet. Durch gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Reaktion erhält man für die cDNA ein 300 bp großes Amplifikationsprodukt. Bei einer Kontamination durch genomische DNA würde man noch ein zusätzliches 900 bp großes Amplifikationsprodukt erhalten, was in diesem Experiment nicht der Fall war. Für die PCR-Reaktion zum Nachweis des MMP-13-Transkriptes 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 gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Reaktionen zeigt bei den drei Kontrollwunden das 480 bp große Amplifikationsprodukt, nicht jedoch bei den drei MMP-13-defizienten Wunden.

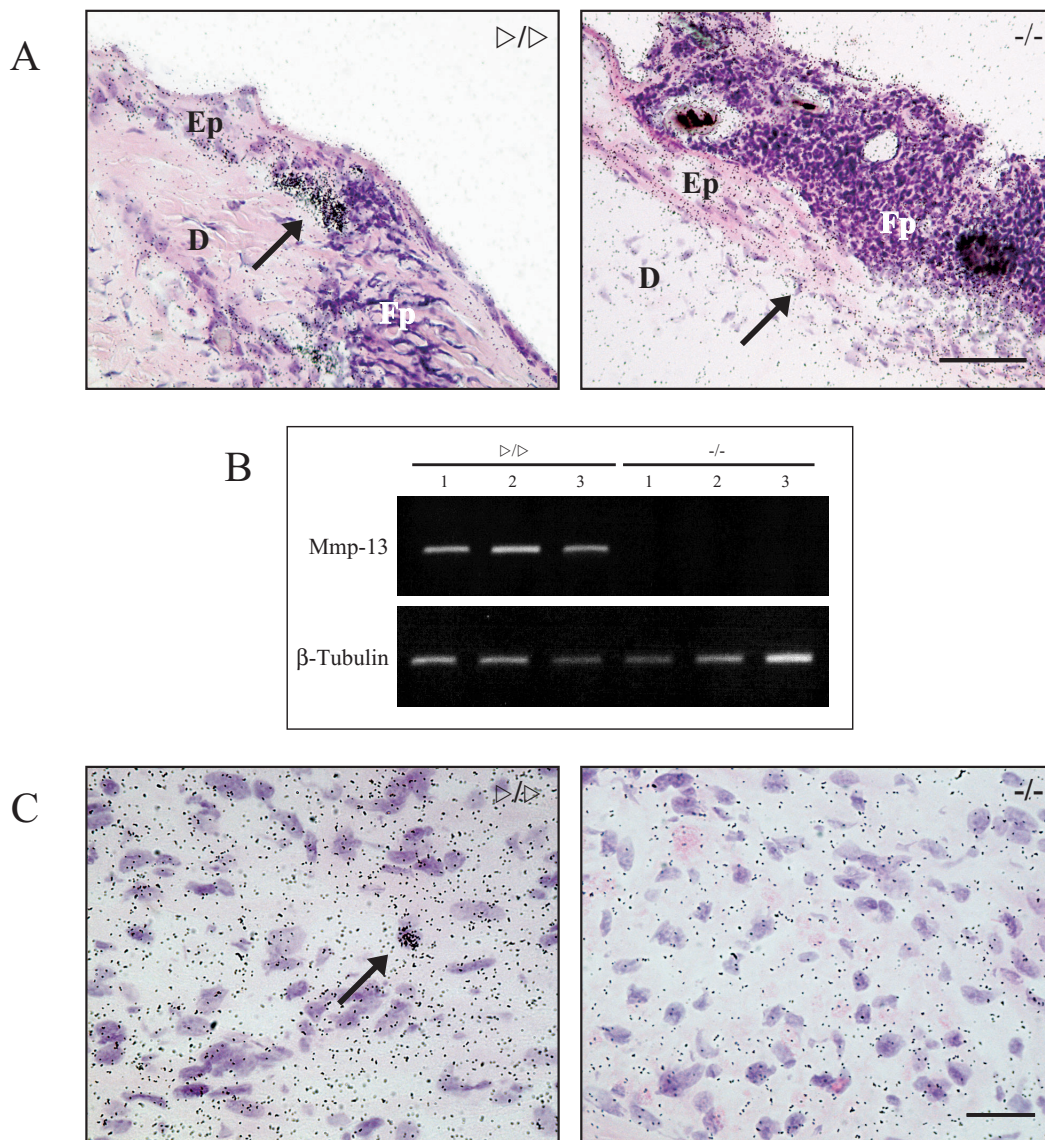


Abb.22 Keine Expression von MMP-13 in *mmp-13*-knock-out Wunden 1 und 7 Tage nach Verwundung

Auf Gefrierschnitten von Wunden (A und C) wurde die Expression von MMP-13 mittels *in situ* Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten antisense-Probe für MMP-13 sichtbar gemacht.

(A) zeigt die Expression von MMP-13 (Pfeil) am linken Rand einer Kontrollwunde (Δ/Δ) und den entsprechenden Bereich einer *mmp-13*-knock-out ($-/-$) Wunde einen Tag nach Verwundung. (Ep) Epidermis, (D) Dermis, (Fp) Fibrinpfropf. Der Pfeil deutet jeweils auf den Wundrand. Balken entspricht 100 μ m.

(B) Nachweis der Expression von MMP-13 in Wunden ein Tag nach Verwundung mittels RT-PCR mit Gesamt-RNA von jeweils drei Kontroll- (Δ/Δ) und *mmp-13*-knock-out ($-/-$) Wunden. Als Beweis der erfolgreichen cDNA-Synthese wurde eine PCR-Reaktion zum Nachweis des Transkriptes von β -Tubulin durchgeführt.

(C) zeigt einen Ausschnitt des Granulationsgewebes einer Kontroll- (Δ/Δ) und einer *mmp-13*-knock-out ($-/-$) Wunde 7 Tage nach Verwunden. Der Pfeil zeigt auf eine MMP-13 exprimierende Zelle. Balken entspricht 50 μ m.

4.3.3 Makroskopische Analyse der Wundheilung

Um zu untersuchen, ob ein Unterschied in der Wundheilung zwischen den MMP-13-defizienten Mäusen und Kontrollmäusen besteht, wurden Wunden 1, 2, 3, 5, 7, 10 und 14 Tage nach der Verwundung durch Fotografieren makroskopisch dokumentiert (Abb.23). Einen Tag nach Verwundung hat sich in beiden Linien stets ein Fibrinpfropf gebildet, der die Wundfläche bedeckt und als provisorische Matrix für die Migration an der Wundheilung beteiligter Zellen dient.

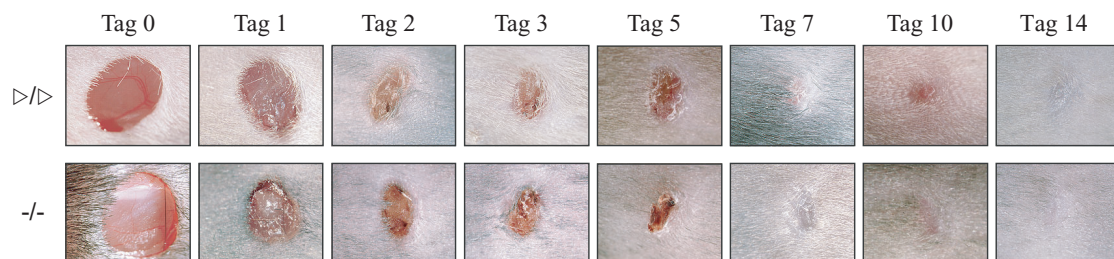


Abb.23 Makroskopische Betrachtung des Wundheilungsprozesses

Wunden von Kontroll- (▷/▷) und *mmp-13*-knock-out Mäusen (-/-) wurden 1, 2, 3, 5, 7, 10 und 14 Tage nach Verwundung mit gleicher Vergrößerung fotografiert.

Zwischen dem Verlauf der Wundheilung der Kontrollmäuse und der *mmp-13*-knock-out Mäuse ist hierbei kein signifikanter Unterschied festzustellen.

Am Tag 2 nach der Verwundung ist eine Wundkontraktion und eine damit verbundene Reduktion der Wundfläche sowohl bei den Wunden der MMP-13-defizienten Mäusen als auch bei den Kontrollmäuse zu erkennen.

Am Tag 3 und Tag 5 nach der Verwundung verringert sich die Wundfläche durch die Wundkontraktion geringfügig weiter. Am Tag 7 hat sich sowohl bei den Wunden der MMP-13-defizienten Mäuse als auch bei denen der Kontrollmäuse der Wundschorf abgelöst und die verschlossene Epidermis kommt darunter zum Vorschein. Zu diesem Zeitpunkt sind sowohl die Wunden der MMP-13-defizienten Mäuse als auch die der Kontrollmäuse geschlossen. Am Tag 10 und Tag 14 schreitet die Heilung der Wunde weiter voran, so dass die ehemalige Wundfläche kaum mehr sichtbar ist.

Durch diese äußerer Betrachtung der Wunden konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Wundheilung der MMP-13-defizienten Mäuse und der Kontrollmäuse festgestellt werden.