
Ein transgenes Mausmodell zur Untersuchung des Einflusses von Matrix Metalloproteinase-2 und -14 auf die Leber

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Erik Meyer
geboren in Mainz

Mainz, April 2003

Dekan:

Univ.-Prof. Dr. J. Markl

Tag der mündlichen Prüfung:

3. Juni 2003

1. Einleitung	1
1.1 Matrix Metalloproteinasen	1
1.1.1 Unterfamilien der Matrix Metalloproteinasen	1
1.1.2 Struktur der Matrix Metalloproteinasen	5
1.1.3 Transkription von Matrix Metalloproteinasen	6
1.1.4 Aktivierung von Matrix Metalloproteinasen	6
1.1.5 Inhibition von Matrix Metalloproteinasen	7
1.2 MMPs in der Leberfibrose und Leberzirrhose	8
1.3 MMPs in der Tumorentstehung, -ausbreitung und –metastasierung	10
1.4 Einfluß der Extrazellulären Matrix auf Wanderprozesse im Embryo	11
1.5 Bedeutung von Zellwanderung für die Morphogenese des Gesichts	11
1.6 Das Cre-LoxP-Rekombinationssystem zum Studieren der Funktion von Homöostase und Entwicklungsprozessen in transgenen Mäusen	12
1.7 Zielsetzung der Arbeit	13
1.7.1 Entwicklung von Mausmodellen zum Studium des Einflusses von MMP-2 und MMP-14 auf die Entwicklung und die Gewebshomöostase der Leber	13
2. Material und Methoden	15
2.1 Material	15
2.1.1 Versuchstiere	15
2.1.2 Klonierungsvektoren	15
2.1.3 Bakterienstämme	15
2.1.4 Chemikalien, Proteine und Nukleotide	15
2.1.5 Oligonukleotide	16
2.1.5.1 Insulator (Ins) 1 (KpnI/XhoI)	16
2.1.5.2 Insulator 2 (SpeI/SacII)	16
2.1.5.3 Insulator 3 (KpnI/KpnI)	16
2.1.5.4 Insulator 4 (SacII/SacII)	16
2.1.5.5 Sequenzierprimer für Insulatoren in pBluescript	16
2.1.5.6 Membrantyp1-Matrixmetalloproteinase (MMP-14)	17
2.1.5.7 Sequenzierprimer für MMP-14 in pBluescript	17
2.1.5.8 Primer zur Bestimmung MMP-14 transgener Tiere	17
2.1.5.9 Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2)	18
2.1.5.10 Sequenzierprimer für MMP-2 in pBluescript	18
2.1.5.11 Primer zur Bestimmung MMP-2 transgener Tiere	18

2.1.5.12 Primer zur Bestimmung der Cre-vermittelten Rekombination bei MMP-2	19
2.1.5.13 RT-PCR-Primer zur Bestimmung der transgenspezifischen MMP-2-mRNA-Expression	19
2.1.5.14 Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9)	19
2.1.5.15 Sequenzierprimer für MMP-9 in pBluescript	19
2.1.5.16 Primer zur Bestimmung Cre transgener Tiere	20
2.1.6 Geräte und sonstige Materialien	20
2.1.7 Häufig verwendete Puffer und Lösungen	22
2.2 Methoden	24
2.2.1 DNA-Präparation	24
2.2.1.1 DNA-Präparation aus Blut	24
2.2.1.2 Plasmid-DNA Präparation	24
2.2.1.3 DNA-Präparation aus Gewebe	25
2.2.3 DNA-Restriktion und Gelelektrophorese	25
2.2.4 Subklonierung von DNA-Fragmenten	26
2.2.5 Isolierung von RNA aus Geweben (Chomczynski und Sacchi)	26
2.2.6 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	26
2.2.7 X-Gal-Färbung	27
2.2.8 Generierung transgener Mäuse	27
2.2.8.1 Präparation des Expressionsvektors zur Pronukleusinjektion	27
2.2.8.2 Mikroinjektion	28
2.2.8.3 Zucht und Selektion transgener Tiere	28
2.2.9 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten (Feinberg und Vogelstein, 1983)	29
2.2.10 Southern-Blot Analyse (Southern, 1975)	29
2.2.11 Anfertigung von Gefrierschnitten	29
2.2.12 Anfertigung von Paraffinschnitten	29
2.2.13 Histologische Färbungen	30
2.2.14 Northern-Blot Analyse	30
2.2.15 Activity-Assay für MMP-2	30
2.2.16 Activity-Assay für MMP-13	31
2.2.17 Activity-Assay für MMP-14	32
2.2.18 Präparation von Embryonen	33

2.2.19 Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH)	33
3. Ergebnisse	34
3.1 Expressionsvektor	34
3.1.1 Insulatoren	34
3.1.2 Leberspezifität	35
3.1.3 Induzierbarkeit	37
3.1.4 Expressionsvektoren für MMP-2, MMP-9 und MMP –14	38
3.2 Charakterisierung MMP-14 transgener Mäuse	40
3.2.1 Founder	40
3.2.2 Analyse der Reportergenexpression	40
3.2.2.1 Expressionsstärke des Reportergens in einzelnen Linien	40
3.2.2.2 Organspezifität der Transgenexpression	41
3.2.3 Rekombination	42
3.2.4 MMP-14-mRNA-Expression	46
3.2.5 MMP-14-Protein-Expression	47
3.2.6 Integrationsort	48
3.2.7 Biologische Aktivität überexprimierter MP-14	50
3.2.7.1 Induktion der MMP-2 Aktivität	50
3.2.7.2 Induktion der MMP-13 Aktivität	51
3.2.8 Lebergewicht	52
3.2.9 Histologie der Leber	53
3.3 Charakterisierung MMP-2 transgener Mäuse	55
3.3.1 Founder	55
3.3.2 Rekombination	55
3.3.2.1 Rückkreuzungen mit Wildtyp- und Actin-Cre Tieren	55
3.3.2.2 Zeitpunkt der embryonalen Letalität	56
3.3.2.3 Bestimmung der Cre-vermittelten Rekombination bei doppelt transgenen Embryonen	58
3.3.4 Nachweis der MMP-2-mRNA Expression durch RT-PCR	59
3.3.5 Phänotyp von Embryonen mit rekombiniertem Transgen	60
3.3.5.1 Äußerliche Auffälligkeiten MMP-2 überexprimierender Embryonen	60
3.3.5.2 Histologische Veränderungen MMP-2 überexprimierender Embryonen	61
4. Diskussion	63
4.1 Generierung transgener Mauslinien	63

4.2 Phänotyp MMP-14 transgener Mäuse	67
4.3 Einfluss der MMP-14 Überexpression auf die Leber von Mäusen	69
4.4 Phänotyp MMP-2 transgener Mäuse	70
5. Zusammenfassung	74
6. Literatur	75
7. Abkürzungsverzeichnis	90
8. Anhang	93

1. Einleitung

1.1 Matrix-Metalloproteinasen

Die Extrazelluläre Matrix (ECM) formt das externe Gerüst, das die Gewebe zusammenhält und in dem die Zellen eingebettet sind. Außerdem werden Basalmembranen, denen die Epithelien und Endothelien aufsitzen von einer dichten Schicht ECM gebildet. Eine intakte extrazelluläre Matrix ist für das Aufrechterhalten zahlreicher Zellfunktionen und Zell-Zellkontakte wichtig. Die Matrix wird aus Strukturelementen wie Kollagenen, Proteoglycanen und Glycoproteinen zusammengesetzt (Lukashev and Werb 1998).

Die Degradation der Extrazellulären Matrix ist ein essentieller Schritt bei vielen physiologischen Prozessen, z.B. während der Ovulation, der Embryonalentwicklung, der Rückbildung der Uterusschleimhaut, der Angiogenese, der Wanderung von Immunzellen oder der Wundheilung (Chambers and Matrisian 1997). Auf der anderen Seite spielt die exzessive Proteolyse der ECM eine wichtige Rolle unter pathologischen Bedingungen wie rheumatoider Arthritis, Osteoarthritis, pulmonärer Emphyse, pemphigoider Hauterkrankungen und Parodontose (Duffy, Maguire et al. 2000).

Es gibt zwei Hauptgruppen von Matrix abbauenden Proteasen. Die Gruppe der sauren Proteasen, deren Mitglieder bei niedrigem pH arbeiten und hauptsächlich in die intrazelluläre Proteolyse innerhalb von Lysosomen involviert sind und die Gruppe der neutralen Proteasen, deren Mitglieder bei neutralem pH aktiv sind und zu extrazellulärer Proteolyse führen (Curran and Murray 1999). Die Gruppe der sauren Proteasen unterteilt sich in die Aspartatenzyme und die Cysteineenzyme. Die neutrale Gruppe setzt sich aus den serinabhängigen Proteasen und den metallatomabhängigen Proteasen zusammen. Zu den metallatomabhängigen Proteasen gehören unter anderem auch die Matrix Metalloproteinasen (MMPs) (Nagase, Meng et al. 1999).

Tumorinvasion und Metastasierung sind von der Degradation der ECM abhängig. Obwohl Repräsentanten aller Gruppen von proteolytischen Enzymen mit Tumorinvasion und Metastasierung in Verbindung gebracht wurden, scheinen die MMPs hierbei eine besondere Rolle zu spielen (Nagase, Meng et al. 1999). So wurde gezeigt, dass eine erhöhte Expression von MMPs mit der Invasion und Metastasierung von malignen Tumoren assoziiert ist (Basset, Bellocq et al. 1997; Basset, Okada et al. 1997; Johnsen, Lund et al. 1998).

1.1.1 Unterfamilien der Matrix Metalloproteinasen

Die Schwänze der Larven von Fröschen haben zur Versteifung einen sehr hohen Anteil von fibrillären Kollagenfasern. Bei der Metamorphose der Larve zum Frosch müssen diese

abgebaut werden. In den sechziger Jahren des vorigen Jahrhunderts zeigten Jerome Gross und Kollegen zum ersten mal, dass Explantate aus den sich zurückbildenden Schwänzen von Larven des *Xenopus laevis* die Fähigkeit besitzen eine Unterlage aus Kollagenfasern abzubauen. Aus den Schwänzen konnte ein Enzym mit der beschriebenen Aktivität isoliert werden. Dies wurde das erste Mitglied der Familie der Matrix Metalloproteinasen, die interstitielle Kollagenase (MMP-1) (Gross, J et al., 1962).

Die MMPs sind eine Familie von mindestens 24 zinkabhängigen Endopeptidasen, die in ihrer Gesamtheit zur Degradation aller Komponenten der ECM in der Lage sind (Kahari and Saarialho-Kere 1997; Johnsen, Lund et al. 1998; Woessner 1998).

Entsprechend ihrer Substratspezifität werden die Mitglieder dieser Familie in Kollagenasen, Stromelysine, Gelatinasen, Membrane-Typ (MT) -MMPs und andere MMPs unterteilt. Die Substratspezifität der verschiedenen MMPs wurde bei *in vitro* Studien bestimmt. Direkte Hinweise auf das Degradationsverhalten *in vivo* sind die Ausnahmen (Kleiner and Stetler-Stevenson 1999; Westermarck and Kahari 1999) (Tab. 1).

Kollagenase-1 (MMP-1), -2 (MMP-8), und -3 (MMP-13) können den Abbau fibrillärer Kollagene der Typen I, II, III und V initiieren. Die beim Abbau entstehenden Fragmente werden durch andere MMPs, z.B. Gelatinasen weiter abgebaut (Kahari and Saarialho-Kere 1997; Johnsen, Lund et al. 1998; Woessner 1998).

Die Stromelysin-Untergruppe enthält Stromelysin-1 (MMP-3), Stromelysin-2 (MMP-10) und zwei andere MMPs mit ähnlicher Substratspezifität, die aber strukturell nicht eng verwandt sind: Matrilysin (MMP-7) und die Makrophagen-Metalloelastase (MMP-12). MMP-7 und MMP-12 können Elastin degradieren (Kahari and Saarialho-Kere 1997; Johnsen, Lund et al. 1998; Woessner 1998).

MMP-2 (72 kDa Gelatinase A) wird von einer Vielzahl normaler und transformierter Zellen exprimiert. MMP-9 (92 kDa Gelatinase B) wird von Keratinozyten, Monozyten, Alveolarmakrophagen und einer großen Zahl maligner Zellen produziert (Westermarck and Kahari 1999). MMP-2 und MMP-9 degradieren Kollagen IV, -V, -VII, -IX, -X, Gelatine, Laminin und Nidogen; MMP-2 degradiert auch natives Typ-I-Kollagen. MMP-2 kann MMP-9 und -13 proteolytisch aktivieren (Basset, Bellocq et al. 1997; Basset, Okada et al. 1997; Murphy and Knauper 1997).

Die Membrantyp (MT) -MMPs 1-6 (MMP-14-17, MMP-24 und MMP-25) sind membranständige Proteasen mit unterschiedlichen, teilweise noch unbekanntem Substratspezifitäten. So degradiert MMP-14 die Kollagene I, II und III. Fibronectin wird von MMP-14 und MMP-15 abgebaut. ProTNF wird von MMP-14 und MMP-17 aktiviert. MMP-

14, -15, -16 und -24 können MMP-2 spalten und MMP-14 spaltet zusätzlich noch MMP-13. Weitere Substrate von MMP-14 sind Gelatine, Kasein, Elastin, Laminin-B-Kette, Vitronektin, Aggrekan und Dermatansulfat-Proteoglycan (Roeb, Dietrich et al. 2001; Roeb and Matern 2001).

Tabelle 1: Matrix Metalloproteinasen (MMP) und ihre Substrate

Familie	MMP-Nr.	Namen	Substrate
Kollagenasen	MMP-1	Interstitielle Kollagenase	Kollagene I, II, III, VII, X, Gelatine, Aggrecan, Kasein, α_1 -Proteinase-Inhibitor, Versican, Proteoglycan-Link-Protein, α_2 -Makroglobulin, Pregnancy-Zone-Protein, Ovostatin, Nidogen, Myelinbase-Protein, proTNF, L-Selektin, MMP-2, MMP-9
	MMP-8	Neutrophile Kollagenase	Kollagene I, II, III, V, VIII, X, Gelatine, Aggrecan, α_1 -Proteinase-Inhibitor, α_2 -Antiplasmin, Fibronektin
	MMP-13	Kollagenase 3	Kollagene I, II, III, IV, Gelatine, Aggrecan, Perlecan, Tenascin
Gelatinasen	MMP-2	Gelatinase A	Kollagene I, IV, V, VII, X, XI, XIV, Gelatine, Elastin, Fibronektin, Aggrecan, Versican, Proteoglycan-Link-Protein, Myelinbase-Protein, B Amyloid, APP 695, proTNF, α_1 -Proteinase-Inhibitor, MMP-9, MMP-13
	MMP-9	Gelatinase B	Kollagene IV, V, VII, X, XIV, Gelatine, Elastin, Aggrecan, Versican, Proteoglycan-Link-Protein, Fibronektin, Nidogen, Myelinbase-Protein, proTNF, α_1 -Proteinase-Inhibitor
Stromelysine	MMP-3	Stromelysin 1	Kollagene III, IV, IX, X, Gelatine, Aggrecan, Versican, Perlecan, Proteoglycan-Link-Protein, Fibronektin, Laminin, Elastin, Kasein, α_1 -Proteinase-Inhibitor, Myelinbase-Protein, proTNF, MMP-1, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-13
	MMP-10	Stromelysin 2	Kollagene III, IV, V, Gelatine, Casein, Aggrecan, Elastin, Proteoglycan-Link-Protein, Fibronektin, MMP-1, MMP-8
	MMP-11	Stromelysin 3	α_1 -Proteinase-Inhibitor
	MMP-7	Matrilysin	Kollagene IV, X, Gelatine, Aggrecan, Proteoglycan-Link-Protein, Fibronektin, Laminin, Entactin, Elastin, Kasein, Transferrin, Myelinbase-Protein, α_1 -Proteinase-Inhibitor, proTNF, MMP-1, MMP-2, MMP-9
	MMP-12	Metalloelastase	Kollagen IV, Gelatine, Elastin, α_1 -Proteinase-Inhibitor, Fibronektin, Vitronektin, Laminin, proTNF, Myelinbase-Protein
Membran-gebundene	MMP-14	MT1-MMP	Kollagen I, II, III, Gelatine, Kasein, Elastin, Fibronektin, Laminin-B-Kette, Vitronektin, Aggrecan, Dermatansulfat-Proteoglycan, MMP-2, MMP-13, proTNF
	MMP-15	MT2-MMP	MMP-2, Gelatine, Fibronektin, Tenascin, Nidogen, Laminin
	MMP-16	MT3-MMP	MMP-2
	MMP-17	MT4-MMP	Fibrinogen, Fibrin, proTNF
	MMP-24	MT5-MMP	ProMMP-2
	MMP-25	MT6-MMP	
Nicht klassifiziert	MMP-18	RASI-1	
	MMP-19	RASI-1	Aggrecan, cartilage oligomeric matrix protein (COMP)
	MMP-20	Enamelysin	Aggrecan, cartilage oligomeric matrix protein (COMP)
	MMP-21		
	MMP-22		
	MMP-23		

1.1.2 Struktur der Matrix Metalloproteinasen

Die generelle Struktur der MMPs umfasst ein Signalpeptid, eine Propeptidregion, eine katalytische Domäne mit einer hoch konservierten zinkbindenden Region und eine Hämopexindomäne, welche mit der katalytischen Domäne über die so genannte Hinge-Region verbunden ist. Zusätzlich enthalten MMP-2 und MMP-9 einen Fibronectin-Typ-II-Insert innerhalb der katalytischen Domäne. MT-MMPs enthalten eine Transmembrandomäne und daran anschließend eine zytoplasmatische Domäne, am C-terminalen Ende der Hämopexindomäne. In der kleinsten MMP, Matrilysin (MMP-7), fehlt die Hämopexindomäne. Alle MMPs haben innerhalb ihrer katalytischen Domäne ein Zinkatom gebunden (Ray and Stetler-Stevenson 1995; Kahari and Saarialho-Kere 1999) (Abb. 1.1).

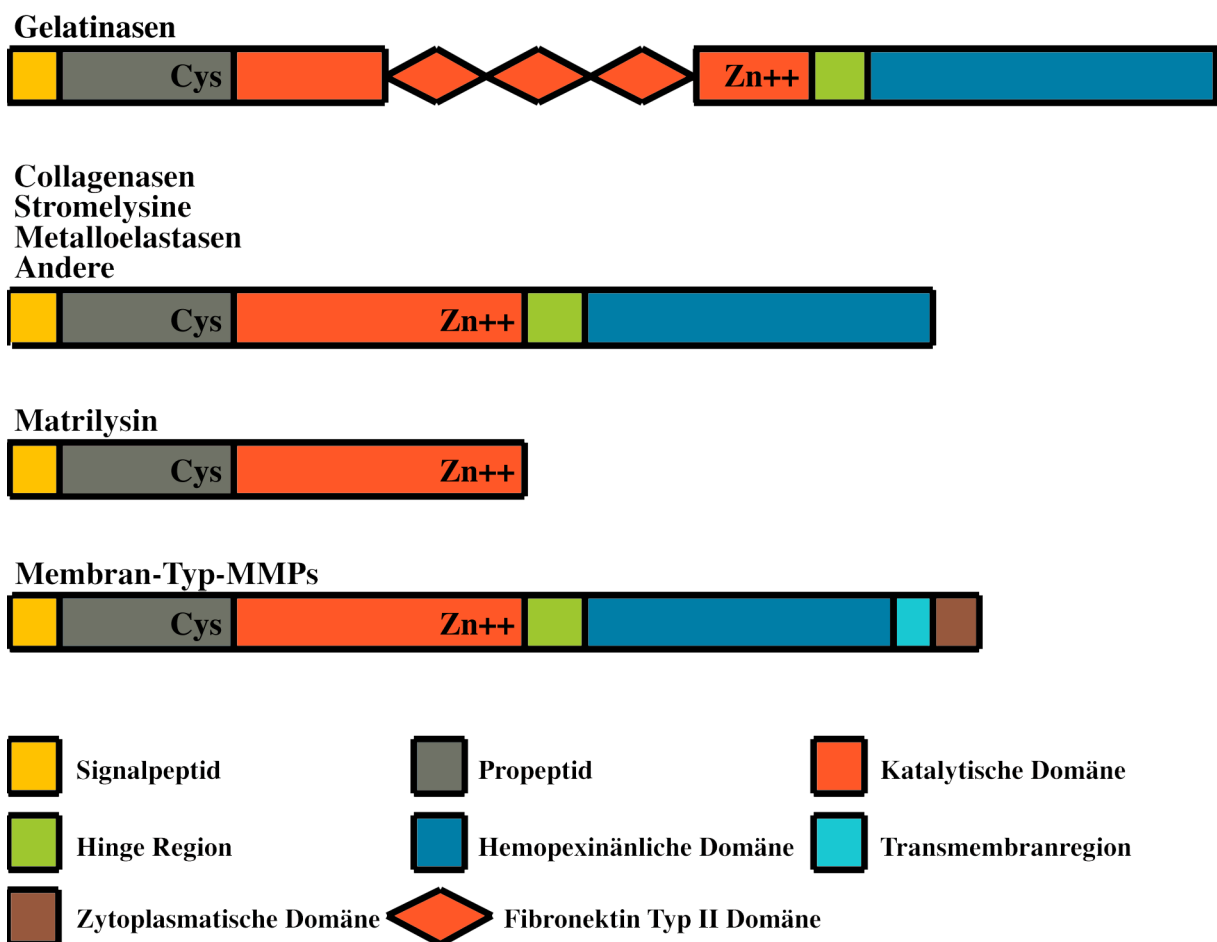


Abb. 1.1: Struktur der Matrix Metalloproteinasen

Ein innerhalb der katalytischen Domäne gebundenes Zinkatom (Zn^{++}) vermittelt die enzymatische Aktivität der Matrix Metalloproteinasen. Die Proregion koordinativ mit einem konservierten Cysteinrest (Cys) an das katalytische Zentrum und inaktiviert so die MMPs. Durch proteolytischer Abspaltung der Proregion werden die MMPs aktiviert.

1.1.3 Transkription von Matrix Metalloproteinasen

MMPs werden sowohl auf der Ebene der Transkription, wie auch der Proteinaktivierung streng reguliert. Die transkriptionelle Kontrolle der MMP-Gene wird durch ein AP-1-Regulatorelement in der proximalen Promotorregion, ca. 70 Basenpaare oberhalb des Transkriptionsstarts vermittelt (Benbow and Brinckerhoff 1997; Fini, Cook et al. 1998). In der Regel werden MMP-Gene *in vivo* nicht konstitutiv exprimiert. Auch in Zellkultur ist die basale Expression niedrig (Shapiro 1998; Kahari and Saarialho-Kere 1999). MMP-Gentranskription wird durch eine Vielzahl extrazellulärer Stimuli, wie Zytokinen (Interleukin-4 und Interleukin-10), Wachstumsfaktoren (Epidermal-Growth-Factor, Transforming-Growth-Factor- α , Basic Fibroblast-Growth-Factor) und Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Kontakte induziert (Aoudjit, Potworowski et al. 1998; Janowska-Wieczorek, Marquez et al. 1999). Transforming-Growth-Factor- β , Retinoide und Glucokortikoide können die Transkription von MMPs unterdrücken (Benbow and Brinckerhoff 1997). Bindung der stimulatorischen Liganden an ihre Rezeptoren startet eine Kaskade intrazellulärer Reaktionen, welche durch mindestens drei Klassen mitogenaktivierter Protein (MAP) -Kinasen vermittelt wird: extrazelluläre signalregulierte Kinase, stressaktivierte Proteinkinase/Jun N-terminale Kinasen und p38 (Reddy, Keshamouni et al. 1999; Reddy, Krueger et al. 1999). Aktivierung dieser Kinasen führt unter anderem zur Aktivierung eines nuklearen AP-1-Transkriptionsfaktors. Dieser bindet an das AP-1 Element. Folge ist die Transkription des zugehörigen MMP-Gens (Sato, Tanaka et al. 1997; Sato, Kawamata et al. 1997).

1.1.4 Aktivierung von Matrix Metalloproteinasen

Die meisten MMPs werden als inaktive Vorstufen (Zymogene) sezerniert. Sie vermitteln ihre proteolytische Aktivität über ein im katalytischen Zentrum gebundenes Zinkatom. Ein Cysteinrest, welcher innerhalb der Propeptidregion, in einer hoch konservierten Aminosäuresequenz (PRCGVPDV) liegt, bindet koordinativ an das katalytische Zinkatom und inaktiviert die MMPs. Im Extrazellularraum wird die Propeptidregion von Serinproteasen, wie Plasmin und Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA), partiell proteolytisch gespalten und so die koordinative Bindung zwischen dem Cysteinrest und dem katalytischen Zentrum getrennt. Dies führt zur Aktivierung der MMPs (Nagase 1997; Murphy, Stanton et al. 1999). Im Fall von MMP-11 und MMP-14 erfolgt die proteolytische Aktivierung bereits im Golgiapparat. Dort werden sie vor ihrer Sekretion von Golgi-assoziierten, furinähnlichen Proteasen gespalten und so aktiviert (Kahari and Saarialho-Kere 1997; Murphy and Knauper 1997; Shapiro 1998; Woessner 1998).

MMPs können auch durch andere MMPs proteolytisch gespalten und aktiviert werden und so ein Netzwerk bilden. Außer den Membrantyp-MMPs können auch andere proteolytisch aktive MMPs auf der Zelloberfläche lokalisiert sein, indem sie an Membranmoleküle gebunden sind. Dies führt dann zu einer direkteren Degradation der ECM. Zum Beispiel kann funktionell aktives MMP-2 an Integrin $\alpha_5\beta_3$ binden (Brooks, Stromblad et al. 1996) und proteolytisch aktives MMP-9 kann sich in ähnlicher Weise an CD44 anlagern (Yu, Cheng et al. 1999).

In Immunzellen wie Makrophagen und neutrophilen Granulozyten können MMPs in sekretorischen Granula gespeichert und bei Bedarf freigesetzt werden (Edwards, Leco et al. 1996; Gomez, Alonso et al. 1997).

1.1.5 Inhibition von Matrix Metalloproteinasen

Einmal sezerniert werden MMPs sowohl unspezifisch durch Proteaseinhibitoren wie α_2 -Makroglobulin und α_1 -Antitrypsin, als auch durch ihre spezifischen Inhibitoren, die Tissue Inhibitors of MMPs (TIMPs), gehemmt. TIMPs binden in äquimolaren Mengen an die Hämopexindomäne und gleichzeitig nicht kovalent an die hoch konservierte Zinkbinderegion. Dort inhibieren Sie die katalytische Aktivität der MMPs. Außerdem können sie die Aktivierung vieler ProMMPs verhindern (Will, Atkinson et al. 1996; Gomez, Alonso et al. 1997; Blavier, Henriot et al. 1999; Bode, Fernandez-Catalan et al. 1999; Bode, Fernandez-Catalan et al. 1999; Henriot, Blavier et al. 1999). Die TIMP-Genfamilie besteht aus vier strukturell verwandten Mitgliedern, TIMP-1, -2, -3 und -4, die auf der Ebene der Aminosäuren eine bis zu 40%ige Identität aufweisen und 12 konservierte Cysteinreste besitzen (Gomez, Alonso et al. 1997). TIMP-1, -2 und -4 werden in ihrer löslichen Form sezerniert. TIMP-3 ist mit der ECM assoziiert. TIMPs haben außer ihrer MMP-Inhibitor-Funktion noch andere biologische Eigenschaften; z.B. induzieren sie Veränderungen der Zellmorphologie, unterstützen Steroidgenese und Keimzellentwicklung, sind Wachstumsstimulatoren und inhibieren die Angiogenese (Nemeth, Rafe et al. 1996; Anand-Apte, Pepper et al. 1997; Gomez, Alonso et al. 1997; Yoshiji, Buck et al. 1998).

Paradoxerweise inhibiert TIMP-2 nicht nur die Aktivität von MMPs, sondern ist auch an der Aktivierung von MMP-2 durch MMP-14 beteiligt. MMP-14 formt einen Komplex mit TIMP-2, welcher dann als ein Rezeptor für ProMMP-2 dient. Ein zweites ungebundenes MMP-14-Molekül, welches diesem Komplex benachbart ist, konvertiert dann ProMMP-2 in seine aktive Form. (Seiki 1999) (Abb. 1.2).

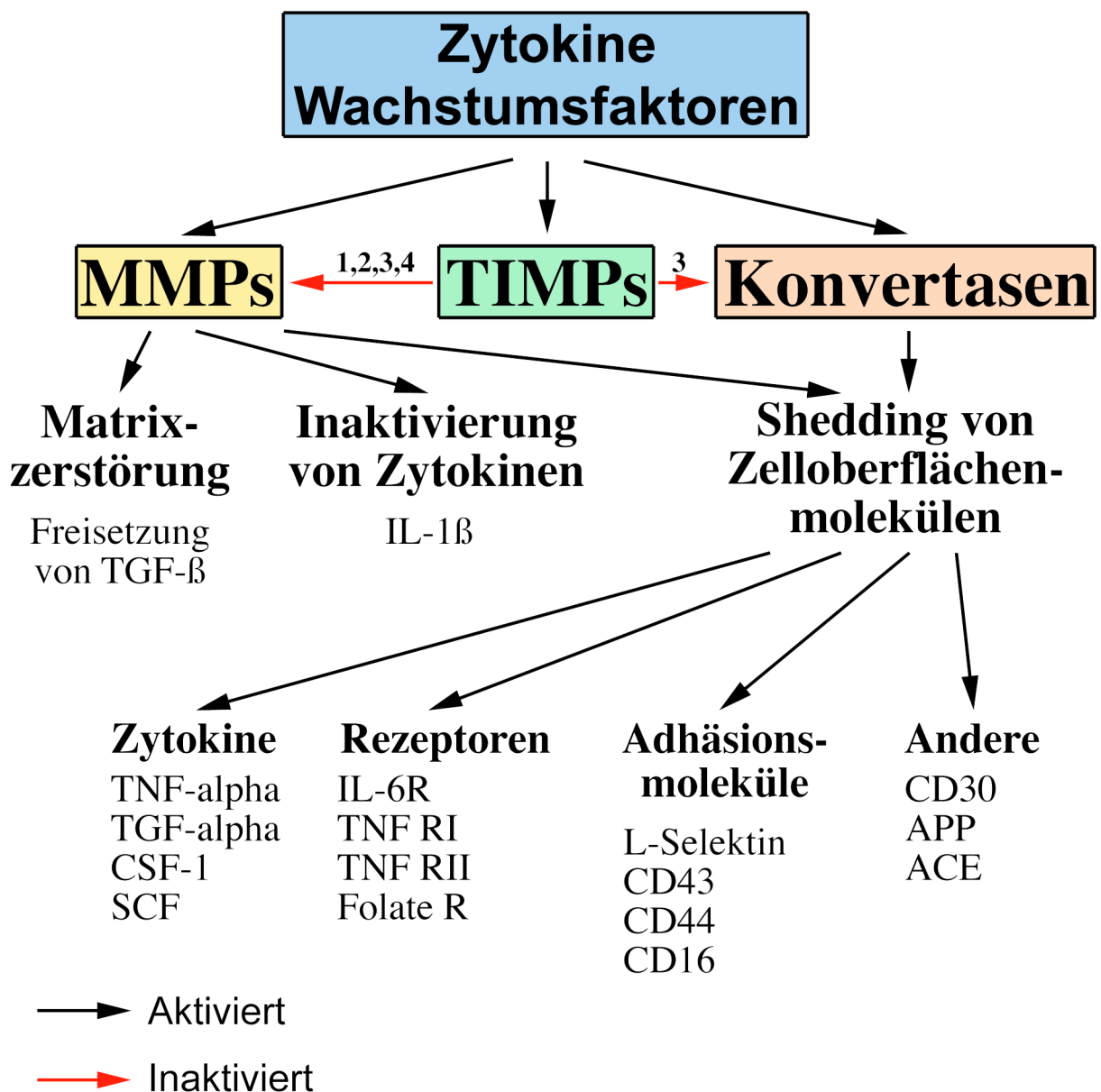


Abb. 1.2: Zytokinnetzwerk der Matrix Metalloproteinasen (MMPs)

Zytokine und Wachstumsfaktoren können MMPs sowohl aktivieren als auch indirekt durch die Aktivierung von Tissue Inhibitors of MMPs (TIMPs) hemmen. Aktivierte MMPs können nun die Matrix abbauen und Zytokine durch proteolytische Spaltung inaktivieren. Außerdem können sie wie auch andere Konvertasen Zelloberflächenmoleküle von der Zelloberfläche abspalten (shedding) und so Signalkaskaden oder Zell-Zell- und Zell-Matrixkontakte unterbrechen.

1.2 MMPs in der Leberfibrose und Leberzirrhose

Leberfibrose wird klassischerweise als ein fortschreitender, pathologischer Prozess betrachtet, welcher vielfältige zelluläre und molekulare Ereignisse beinhaltet, die schließlich zur Ablagerung überschüssiger Matrixproteine im extrazellulären Raum führen. Wenn dieser

Prozess gepaart ist mit ineffektiver Regeneration und Reparatur wird die normale Leberarchitektur immer weiter beeinträchtigt und es kommt schließlich zur Leberzirrhose. Die Leberzirrhose stellt eine bindegewebige Vernarbung der Leber dar, die im Endstadium zum Leberversagen führen kann (Friedman 1993). Hauptsyntheseort der ECM in der Leber sind die hepatischen Sternzellen (HSC). In letzter Zeit wurde Ihre Rolle in diesem Zusammenhang immer weiter untersucht und ließ Zweifel an der Unidirektionalität dieses Prozesses aufkommen. Neuere Erkenntnisse belegen, dass der Prozess der Leberfibrose dynamisch und bidirektional mit Phasen von Progression und Regression ist (Arthur 2000). Zusätzlich zur vermehrten Matrixsynthese gibt es große Veränderungen in der Regulation des Matrixabbaus. Im extrazellulären Raum wird die normale Matrix hauptsächlich von Mitgliedern der Familie der MMPs abgebaut. Die wichtigsten sind in diesem Zusammenhang MMP-2, MMP-3, MMP-9 und MMP-14 (Arthur, Friedman et al. 1989; Winwood, Schuppan et al. 1995; Takahara, Furui et al. 1997).

In normaler Leber haben hepatische Sternzellen (HSC) einen ruhenden nichtfibrogenen Phänotyp. Dies liegt zum Teil daran, dass sie in engem Kontakt mit einer komplexen Extrazellulären Matrix (ECM) aus Kollagen IV, Laminin und Proteoglykanen stehen. Wenn HSCs aus dieser Umgebung entfernt werden, bekommen sie einen aktivierten profibrogenen, Phänotyp wie er typischerweise in fibrotischen Lebern gesehen wird. Sie lagern jetzt vor allem Kollagen I und Kollagen III im Extrazellulärraum ab (Arthur 2000).

Als Antwort auf eine Leberschädigung kommt es zuerst zum teilweisen Abbau der normalen Lebermatrix. Folge dieser Matrixremodellierung kann die Aktivierung von HSCs sein mit der Folge einer zunehmenden Fibrosierung der Leber.

Es wurde gezeigt, dass MMPs, welche normale Lebermatrix abbauen können, bei Leberschädigungen und Leberfibrose vermehrt nachgewiesen werden können (Takahara, Furui et al. 1995; Takahara, Sollberg et al. 1995). MMP-2 wird an der Zellmembran von MMP-14 aktiviert wo es dann Matrixbestandteile abbauen kann (Takahara, Furui et al. 1997). CD 44 ist ein Zelloberflächenrezeptor, der vor allem auf Epithelzellen, Keratinozyten, aktiven Leukozyten und Tumorzellen vorkommt (Naor, Nedvetzki et al. 2002). Hier interagiert CD44 mit der ECM (Lesley, Hyman et al. 1993). CD44 spielt eine Rolle bei Zellmigration, Apoptose, Zellüberleben und Zellproliferation (Naor, Nedvetzki et al. 2002). Zudem wird MMP-9 über CD44 an die Zelloberfläche gebunden. Hier kann MMP-9 im Rahmen der Spaltung der ECM die daran gebundenen latenten Wachstumsfaktoren Transforming-Growth-Factor- β 1, 2 und 3 (TGF- β 1, 2, 3) sowohl freisetzen als auch aktivieren. Diese aktivieren dann die HSCs. So können MMPs neben fibrolytischer Aktivität unter Umständen auch zur

Matrixablagerung beitragen und so eine profibrogenetische Aktivität haben (Yu and Stamenkovic 2000).

Ist die Leberfibrose noch nicht in eine Leberzirrhose übergegangen, kann der Prozess der Fibrogenese durch erfolgreiche Behandlung der chronischen Lebererkrankung (z.B. durch Beendigung des Alkoholmissbrauchs) umgekehrt werden (Iredale, Benyon et al. 1996). Wesentliche kollagene Bestandteile der Leberfibrose sind hauptsächlich die Kollagene I und III im extrazellulären Raum. Diese sind Substrate von MMP-13 (MMP-1 beim Menschen) und MMP-14 (Ohuchi, Imai et al. 1997; Hironaka, Sakaida et al. 2000). Die Expression von MMP-13 wird weder während der Leberfibrogenese unterdrückt, noch während der Regressionsphase erhöht. Dafür wird die Expression der TIMPs -1 und -2 während der Progression der Leberfibrose verstärkt und kurz nach Beenden der chronischen Lebererkrankung herunterreguliert (Iredale, Goddard et al. 1995; Iredale, Benyon et al. 1996; Kossakowska, Edwards et al. 1998).

Bei vielen dieser Daten handelt es sich um *in vitro* Befunde oder um deskriptive Daten aus Untersuchungen an Patienten. Die Rolle von MMPs im Rahmen der Leberfibrogenese ist unklar und es ist denkbar, dass ihnen eine duale Rolle zukommt: In der Frühphase der Leberfibrogenese könnten MMPs über Freisetzung von profibrogenetischen Zytokinen aus der ECM sowie Abbau von Basalmembranen durchaus eine profibrogenetische Rolle spielen. Bei pathogenetischer Leberschädigung könnte dann eine Herunterregulation von MMPs bzw. eine zunehmende Komplexisierung von MMPs durch vermehrt exprimierte TIMPs zu einem reduzierten Abbau von ECM und somit Zunahme der Fibrose führen. Die Rolle der MMPs zwischen Matrixabbau und Fibrogenese bedarf noch der Klärung *in vivo*.

1.3 MMPs in der Tumorentstehung, -ausbreitung und -metastasierung

Starker Matrixabbau ist eine wichtige Komponente des Prozesses der Tumorprogression (Fidler IJ et al., 1997). Wenn eine Tumorzelle die Möglichkeit bekommt in normales Gewebe einzudringen und dieses zu zerstören, nennt man dies malignes Wachstum. Die Fähigkeit an entfernten Stellen Tumoren zu bilden (Metastasierung) ist charakteristisch für hoch maligne Tumore mit einer schlechten Prognose (McCawley and Matrisian 2000). Damit es zu Invasion und Metastasierung kommen kann, muss die Tumorzelle zunächst die Basalmembran passieren. Die Basalmembran ist eine spezialisierte Struktur, die extrazelluläre Matrix (ECM)-Komponenten enthält und ein stabiles Fundament bildet, auf dem normale epitheliale Zellen adherieren (Schwarzbauer 1999; Schwarzbauer and Sechler 1999). Obwohl die ECM normale Zellen eng an ihrem Platz hält, ermöglicht sie den Zugriff auf Nährstoffe, Immunzellen und

lösliche Faktoren für Gewebsaufrechterhaltung und -wachstum. Auch Blutgefäße werden von einer Basalmembran umgeben. Während der Invasion wandern die Tumorzellen durch die ECM. Anschließend penetrieren sie die Basalmembranen der Gefäße, um sich entweder durch das Blutgefäß- oder das lymphatische System in andere Gewebe zu verbreiten. Das Eindringen in das Blutgefäßsystem nennt man Intravasation. Um sich nun an einer entfernten Stelle zu etablieren, muss die Tumorzelle wieder die Basalmembran durchdringen. Wenn die Tumorzellen sich in diesem neuen Gewebe etablieren, entstehen klinisch bedeutsame Metastasen (Stetler-Stevenson 1996; Stetler-Stevenson, Hewitt et al. 1996).

Therapien mit Inhibitoren von MMPs und somit des Matrixabbaus können folglich eine wichtige therapeutische Option zur Kontrolle der Ausbreitung von Krebs sein.

1.4 Einfluss der Extrazellulären Matrix auf Wanderprozesse im Embryo

Die ECM spielt bei der Pfadfindung der Zellen während ihrer morphogenetischen Wanderbewegungen eine wichtige Rolle (Bronner-Fraser 1982). Die Matrix enthält adhäsive Substanzen, aber auch Fasern, die die wandernden Zellen entlang bestimmter Bahnen führen. Mehrere extrazelluläre Glycoproteine, darunter Laminin und Fibronectin, unterstützen die Zellbewegungen, indem sie die Zellen an die ECM binden (Newgreen, Jahnke et al. 1980; Sternberg and Kimber 1986; Sternberg 1986; Perris, Krotoski et al. 1991). Andere Komponenten der ECM wie Aggrecan und Versican bewirken eine korrekte Pfadfindung, indem sie eine abweichende Wanderung hemmen (Tan, Scammell et al. 1987; Landolt, Vaughan et al. 1995; Pettway, Domowicz et al. 1996). Während ihrer gerichteten Wanderung im Embryo erhalten die Zellen Richtungsinformationen aus der unmittelbaren Umgebung, die sie über Integrine an ihrer Oberfläche erkennen (Noden 1978; Noden 1983; Noden 1988; Delannet, Martin et al. 1994; Lallier, Deutzmann et al. 1994; Stepp, Urry et al. 1994; Couly, Coltey et al. 1995; Kil and Bronner-Fraser 1996; Kil, Lallier et al. 1996). Die Zusammensetzung der ECM entlang der Wanderstrecke kann also die Wanderung von Zellen fördern bzw. hemmen.

1.5 Bedeutung von Zellwanderung für die Morphogenese des Gesichts

Die Zusammensetzung der ECM und ihre Beeinflussung durch MMPs können eine bedeutende Rolle beim Wandern von Neuralleistenzellen und bei der Morphogenese des Gesichts und anderer embryonaler Strukturen haben.

Die Strukturen des Gesichts werden von den fazialen Anlagen gebildet, welche ursprünglich als kleine Knospen die primitive Mundhöhle umgeben. Die Mundhöhle wird von einem

mesenchymalen Zentralbereich, der von Neuralleiste und Mesoderm abstammt gebildet. Bedeckt wird dieser von einem Epithel aus Ektoderm und Entoderm (Noden DM et al., 1978; Noden DM et al., 1983; Noden DM et al., 1988; Couly G et al., 1995).

Zellen der Neuralleiste werden in der dorsalen Mitte des embryonalen Neuralrohrs von Stammzellen gebildet, die auch Melanozyten, Neuron- und Gliazellen bilden (Stemple and Anderson 1992).

Die Neuralleiste spaltet sich vom Neuralrohr durch Transformation epithelialer Zellen zu mesenchymalen Zellen in Richtung des zellfreien Raumes unter dem Oberflächenektoderm ab (Duband, Belkin et al. 1992). Die Neuralleistenzellen migrieren dann peripher bevor sie zu einer Vielzahl von Geweben und Organen, wie z.B. den zukünftigen fazialen Anlagen beitragen (Johnston 1966; Weston 1970; Le Lievre 1978; Scherson, Serbedzija et al. 1993). Der Unterkiefer wird von den paarigen Mandibelvorläufern gebildet, während der Oberkiefer aus den vorderen und mittleren Nasalmassen und den Maxillenvorläufern hervorgeht (Francis-West, Ladher et al. 1998). Das Mesenchym der vorderen Nasalmasse geht wiederum auf Zellen der Groß- und Mittelhirnleiste zurück (Osumi-Yamashita, Ninomiya et al. 1994). Interessant ist auch, dass Odontoblasten, die von Neuralleistenzellen abstammen in den Zahnanlagen wieder einen epithelialen Charakter annehmen.

1.6 Das Cre-*LoxP*-Rekombinations-System zum Studieren der Funktion von Homöostase und Entwicklungsprozessen in transgenen Mäusen

Das Cre-*LoxP*-Rekombinationssystem des Bakteriophagen P1 hat in den letzten Jahren die Untersuchung der Funktion bestimmter Gene in Mäusen revolutioniert (Cre: causes recombination; Lox: locus of crossing over). Cre-Rekombinase katalysiert gerichtete DNA-Rekombination zwischen zwei Erkennungssequenzen (*LoxP*-Sites) (Sternberg, Hamilton et al. 1981; Sauer and Henderson 1988; Sauer and Henderson 1988). Wenn zwei *LoxP*-Sites in derselben Orientierung in einen genomischen Locus eingebracht werden führt die Expression von Cre zur Deletion der *LoxP* flankierten (gefloxten) DNA-Sequenz. Die Cre-vermittelte Rekombination kann für verschiedene Arten der Genmanipulation, sowohl in Zellkultur als auch in transgenen Tieren eingesetzt werden. So können gentechnisch in das Genom eingeführte Selektionsmarker oder die Transkription unterbindende Elemente wieder entfernt werden (Gu, Zou et al. 1993). Auch können große genomische Regionen deletiert werden, um dort Gene, ganze Genkluster oder Steuerelemente wie Enhancer, Silencer oder Locus Control Regionen auszuschalten, und deren Funktion zu untersuchen (Kuhn, Schwenk et al. 1995; Schwenk, Baron et al. 1995). Durch die Verwendung von Cre-transgenen Mäusen mit

unterschiedlichen Promotoren kann man die Cre-vermittelte Rekombination auf bestimmte Gewebe beschränken. Durch Einführen von induzierbaren Systemen in die gewebsspezifische Cre-Expression kann zusätzlich der Zeitpunkt der Rekombination in diesen Geweben beeinflusst werden (Lakso, Sauer et al. 1992; Orban, Chui et al. 1992; Gu, Marth et al. 1994; Kuhn, Schwenk et al. 1995). Dies bietet nun die Möglichkeit Veränderungen des Genoms zu studieren, bei denen sich aufgrund von Letalität keine Linien etablieren lassen. Darüber hinaus ist es möglich kompensatorische Effekte, die während der Embryonalentwicklung der Maus aufgrund der Expression des Transgens auftreten, zu vermeiden (Copp 1995; Kuhn, Schwenk et al. 1995).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

1.7.1 Entwicklung von Mausmodellen zum Studium des Einflusses von MMP-2 und MMP-14 auf die Entwicklung und die Gewebshomöostase der Leber

Der Einfluss von MMPs auf die Entwicklung und die Gewebshomöostase der Leber ist bis heute nicht vollständig verstanden. Auch ihr Einfluss auf bestimmte Krankheitsbilder wie die Entwicklung von Leberfibrose und Leberzirrhose oder auch die Entstehung, maligne Konversion und Metastasierung von Tumoren ist noch unklar. Zwar gibt es gute Daten aus der Untersuchung von Patienten, welche auf Zusammenhänge zwischen diesen Erkrankungen und der Expression von MMPs hinweisen, doch sind diese meist deskriptiv, lassen also keinen Rückschluss auf Ursache und Wirkung zu (Sato, Takino et al. 1994; Benyon, Iredale et al. 1996; Takahara, Furui et al. 1997). Auch gibt es viele Hinweise aus *in vitro* Studien (Brown, Levy et al. 1990; Kerkvliet, Docherty et al. 1999). Jedoch sind diese Systeme nur bedingt auf die Zusammenhänge *in vivo* übertragbar.

In dieser Arbeit sollte der Einfluss von MMP-2 und MMP-14 auf die Entwicklung und die Gewebshomöostase der Leber von Mäusen untersucht werden. Auch sollte ein Modellsystem generiert werden, das es ermöglicht, bestimmte leberspezifische Krankheitsverläufe in transgenen Mäusen zu untersuchen. Zur leberspezifischen Expression des Transgens wurde der Albuminpromotor der Maus gewählt, der eine konstitutive und gewebespezifische Expression in Hepatozyten vermittelt (Gorski, Carneiro et al. 1986). Da Albumin schon ab dem Tag 6 post coitum der Embryonalentwicklung in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden kann (Trojan, Naval et al. 1995) und kann auch der hier verwendete Albuminpromotor schon frühembryonal aktiv sein. Da Matrix Metalloproteinasen während der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle spielen bestand die Gefahr, dass die transgene Expression von MMPs zumindest teilweise letal sein könnte. Transgene Ansätze beruhen auf

Zufallsintegration des Transgens in das Genom und somit kann jede Linie aufgrund des Integrationsortes einen anderen Phänotyp aufweisen. Deshalb müssen mindestens zwei unabhängige, stabile, transgene Linien etabliert werden. Eine embryonale Letalität des Transgens würde die Etablierung transgener Linien unmöglich machen.

Es sollte deshalb ein auf dem *Cre-Lox*-System beruhendes Vektorsystem kloniert werden, welches die Induktion der Transgenexpression in der Leber zu einem gewünschten Zeitpunkt ermöglicht.

In dem hier vorgestellten System sollte zwischen Promotor und Transgen ein „gefloxtes“ *LacZ*-Reportergen integriert werden, das von einer polyA Induktions-Site gefolgt wird und somit die Expression des MMP-Transgens verhindert. Dieses System würde die Etablierung transgener Linien erlauben, die sich hinsichtlich Start und Stärke der Expression des Reportergens charakterisieren ließen. Tiere dieser Linien sollten dann mit Cre-Effektormäusen gekreuzt werden, um die MMP-Expression durch Deletion des Reportergens zu aktivieren. Auch wenn die Expression des MMP-Transgens embryonal letal wäre, würde sich so der Phänotyp untersuchen und anhand der Zahl der zur Verfügung stehenden Tiere statistisch belegen lassen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Die für die Herstellung transgener Mäuse verwendeten Mausstämme und F1-Kreuzungen (FVB/NHSD und C57BL/6J x C3H) entstammten aus der Zucht des Tierstalls der ZVTE (Zentrale Versuchstiereinrichtung) des Hochhauses am Augustusplatz, Mainz (Taketo, Schroeder et al. 1991; Nishioka 1995). Die zur Aktivierung des MMP-14 Transgens verwendeten Nestin-Cre Effektormäuse waren auf einem C57Bl/6J Hintergrund (Betz 1995) und wurden freundlicherweise von Dr. Ernesto Bockamp, Institut für Virologie, Universität Mainz zur Verfügung gestellt. Die zur Aktivierung des MMP-2 Transgens verwendeten Actin-Cre Mäuse waren auf einem FVB/NHSD Hintergrund (Sakai and Miyazaki 1997) und wurden freundlicherweise von Dr. Reifenberg zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Klonierungsvektoren

Als Klonierungsvektoren wurden das Derivat pBR322*3 des pBR322 (Aat II/Nde I Fragment von pBR322 mit Polylinker aus pBluescript) (Blessing, Nanney et al. 1993) und pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA USA) eingesetzt.

2.1.3 Bakterienstämme

Zur Vermehrung der in Plasmidvektoren klonierten DNA-Fragmente dienten die Bakterienstämme *E. coli* HB101 und JM10 (Invitrogen, Groningen, Niederlande).

2.1.4 Chemikalien, Proteine und Nukleotide

Wenn nicht anders vermerkt, wurden Enzyme der Firma New England Biolabs GmbH (Schwalbach) verwendet. Chemikalien wurden von der Firma Riedel-de Haen (Selze), Sigma (Deisenhofen), Difco (Detroit, USA), DAKO (Hamburg), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Biomol (Hamburg) bezogen. Radioaktive Nukleotide stammten von Amersham-Buchler (Braunschweig).

2.1.5 Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden bei der Firma Metabion (Heidelberg) synthetisiert.

2.1.5.1 Insulator (Ins) 1 (KpnI/XhoI)

Ins1/KpnI (Accession: x54282; 1601-1620):

5' - atatggtacctatgctaattagcttgatag -3'

Ins1/XhoI (Accession: x54282; 2408-2389):

5' - atatctcgagggttatgacctaattagagg -3'

2.1.5.2 Insulator 2 (SpeI/SacII)

Ins2/SpeI (Accession: x54282; 1601-1620):

5' - atatactagttatgctaattagcttgatag -3'

Ins2/SacII (Accession: x54282; 2408-2389):

5' - atatccgcggggttatgacctaattagagg -3'

2.1.5.3 Insulator 3 (KpnI/KpnI)

Ins3/KpnI-1 (Accession: x54282; 1601-1620):

5' - atatggtacctatgctaattagcttgaatag -3'

Ins3/KpnI-2 (Accession: x54282; 2407-2389):

5' - tataggtaccggttatgacctaattagagg -3'

2.1.5.4 Insulator 4 (SacII/SacII)

Ins4/SacII-1 (Accession: x54282; 1601-1620):

5' - atatccgcggtatgctaattagcttgatag -3'

Ins4/SacII-2 (Accession: x54282; 2408-2389):

5' - atatccgcggggttatgacctaattagagg -3'

2.1.5.5 Sequenzierprimer für Insulatoren in pBluescript

M13-*universal* (Accession: x52328; 600-615):

5' - gtaaaacgacggccag -3'

M13-*reverse* (Accession: x52328; 828-812):

5' - caggaaacagctatgac -3'

2.1.5.6 Membrantyp1-Matrixmetalloproteinase (MMP-14)

MMP-14-vor (Accession: u54984 (244-271):

5'- atatagcccgggccgccaccatgtctcccgccctcgaccctccc -3'

MMP-14-rev (Accession: u54984 (1995-1973):

5'- atatagtcgaccagacctgtccagcagcgaac -3'

2.1.5.7 Sequenzierprimer für MMP-14 in pBluescript

MMP-14-seq1 (Accession: u54984; 765-784):

5'- cgagtatgggagagtgccac -3'

MMP-14-seq2 (Accession: u54984; 785-766):

5'- cgtggcactctccatactc -3'

MMP-14-seq3 (Accession: u54984; 1206-1225):

5'- caaccagaactacctctcg -3'

MMP-14-seq4 (Accession: u54984; 1225-1206):

5'- cgagaggtagtcttctgggtg -3'

MMP-14-seq5 (Accession: u54984; 1651-1670):

5'- cagtggacagcaggtaccct -3'

MMP-14-seq6 (Accession: u54984; 1660-1641):

5'- ctgtccactgcctgaattc -3'

M13-*universal* (Accession: x52328; 600-615):

5'- gtaaaacgacgccag -3'

M13-*reverse* (Accession: x52328; 828-812):

5'- caggaaacagctatgac -3'

2.1.5.8 Primer zur Bestimmung MMP-14 transgener Tiere

MMP-14 (Accession: u54984; 1651-1670):

5'- cagtggacagcaggtaccct -3'

pA-revII (Accession: ng001334; 7019-7002):

5'- ctgtccactgcctgaattc -3'

2.1.5.9 Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP-2)

MMP-2-vor (Accession: M84324; 37-65)

5'- atatagcccgggccccaccatggaggcagcagtgctggg -3'

MMP-2-rev (Accession; M84324; 2092-2073)

5'- atatagtcgactcagcagcccagccagctctgat -3'

2.1.5.10 Sequenzierprimer für MMP-2 in pBluescript

MMP-2-seq1 (Accession: M84324; 1533-1552)

5'- ggacagtgcaccacgtgac -3'

MMP-2-seq2 (Accession: M84324; 1552-1533)

5'- gtcacgtggtgtcactgtcc -3'

MMP-2-seq3 (Accession: M84324; 342-361)

5'- caagatgtggcaaccagat -3'

MMP-2-seq4 (Accession: M84324; 745-726)

5'- cttgcagtactcgccatcag -3'

MMP-2-seq5 (Accession: M84324; 940-959)

5'- cacctctacaacagctgta -3'

MMP-2-seq6 (Accession: M84324; 1318-1309)

5'- tgggttaggttagataggg -3'

M13-*universal* (Accession: x52328; 600-615):

5'- gtaaacgacggccag -3'

M13-*reverse* (Accession: x52328; 828-812):

5'- caggaaacagctatgac -3_

2.1.5.11 Primer zur Bestimmung MMP-2 transgener Tiere

MMP-2 (Accession: M84324; 1533-1552):

5'- ggacagtgcaccacgtgac -3'

pA-revII (Accession: ng001334; 7019-7002):

5'- ctgtccactgcctgaattc -3'

2.1.5.12 Primer zur Bestimmung der Cre-vermittelten Rekombination bei MMP-2 transgenen Tieren

2r2 (Accession: A84324; 325-308):

5'- tcgatggtgttctgtgcaag -3'

β2 (Accession: künstliche Sequenz):

5'- tggcaaagaattctgcagcc -3'

2.1.5.13 RT-PCR-Primer zur Bestimmung der transgenspezifischen MMP-2-mRNA-Expression

RT1 (Accession: M14768; 173-192):

5'- tcaccttcctatcaacccc -3'

2r1 (Accession: M84324; 383-364):

5'- ggaagaagttgtagttggcc -3'

2.1.5.14 Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9)

MMP-9-vor (Accession: Z27231; 16-41)

5'- atatagatatcccgccaccatgagtcctggcagcccctgc -3'

MMP-9-rev (Accession: Z27231; 2212-2191)

5'- atatagtcgactcaagggcactgcaggaggtcg -3'

2.1.5.15 Sequenzierprimer für MMP-9 in pBluescript

MMP-9-seq1 (Accession: Z27231; 643-662)

5'- gttgtggtcgtgggcaaag -3'

MMP-9-seq2 (Accession: Z27231; 662-643)

5'- ctttgcccagcgaccacaac -3'

MMP-9-seq3 (Accession: Z27231; 1706-1725)

5'- catagaggaagcccattaca -3'

MMP-9-seq4 (Accession: Z27231; 1726-1707)

5'- ctgtaatgggtctctctat -3'

MMP-9-seq5 (Accession: Z27231; 347-366)

5'- acctcaaaggcctcaagtg -3'

MMP-9-seq6 (Accession: Z27231; 932-913)

5'- tagtggtgcaggcagagtag -3'

M13-*universal* (Accession: x52328; 600-615):

5' - gtaaacgacggccag -3'

M13-*reverse* (Accession: x52328; 828-812):

5' - caggaaacagctatgac -3'

2.1.5.16 Primer zur Bestimmung Cre transgener Tiere

Cre Ia (Accession: x03453; 900-919):

5' - gcactgatttcgaccaggtt -3'

Cre IIb (Accession: x03453; 1208-1189):

5' - cccggcaaacaggtagta -3'

2.1.6 Geräte und sonstige Materialien

Bakterienschüttler Certomat	B. Braun, Melsungen
Brutschrank Cellstar	Nunc, Wiesbaden
Brutschrank, Trockenofen WTC	WTB Binder Labortechnik GmbH, Tuttlingen
cDNA Synthese Kit	Stratagene, La Jolla, CA, USA
<i>DigiScan</i>	Asys Hitech GmbH, Austria
Digitales Kamerasystem Cybertech CSI	Hitachi, Japan
DNA-Ligations-Kit	TaKaRa Biomedicals, Japan
Durchlichtmikroskop CK2	Olympus, Hamburg
Eindeckmedium (Aqua Polymount)	Polyscience Inc.
Einfriermedium	Jung
Elektrophoreseapparaturen	OWL Scientific über Labotec, Wiesbaden
Elektro-4	Thermo Hybaid, GB
Entellan	Merck, Darmstadt
Fast Prep FP120	Qbiogene/Bio 101, Thermo Savant
Fluoreszenzmikroskop AX70	Olympus, Hamburg
X174 DNA Hae III	MBI Fermentas, ST. Leon-Rot
GeneClean Spin Kit	Bio 101, CA, USA
GeneQuant pro	Biochrome
Haltekapillaren	Leica, Bensheim
Hybridisierungsofen OV-1	Biometra, Göttingen
Hybond N+ Membran	Amersham-Buchler GmbH, Braunschweig
Immobilon-P Transfer Membran	Millipore, USA

Injektionskapillaren	Harry Fein, World Precision Instruments, Berlin
Invers-Mikroskop Diaphot 200	Nikon GmbH, Düsseldorf
Kryostat CM1900	Leica, Bensheim
Kunststoffware	Eppendorf, Hamburg
	Nunc, Wiesbaden
	Greiner, Frickenhausen
	Becton Dickinson Labware, NJ, USA
Lysing Matrix D	Bio 101 Inc., CA, USA
-DNA/BstE II-geschnitten	NewEnglandBiolabs GmbH, Schwalbach/Taunus
M 2-Medium	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
M 16-Medium	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Micropipette-Puller	Sutter Instruments Co, CA USA
Mikromanipulator	Leica, Bensheim
Mini Protean II Elektrophoresekammer	Biorad, München
Mini Trans Blot Transfer Cell	Biorad, München
Nick Columns Sephadex G50	Amersham-Buchler GmbH, Braunschweig
Nucleospin-Extract-Kit	Macherey & Nagel, Düren
Objektträger	Menzel Gläser
P67E Drucker	Mitsubishi, Japan
Phospho Imager Storm 860	Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA
Phospho Imager Screen	Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA
Photoprinter, XLS 8600PS	Kodak, Rochester, USA
Plasmid Midi- und Maxipräparationskit	Qiagen, Hilden
Plasmid Minipräparationskit	Macherey & Nagel, Düren
Polyvinylid-difluorid-Membran	Gelman Science, Ann Arbor, MI USA
PowerPack P25	Biometra
PowerPack 300	BioRad
Qiagen Midi- oder Maxi-Kit	Qiagen, Hilden
Röntgenfilm Kodak BioMax MR-1	Kodak über Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Sonorex RK 510S	Bandelin, Berlin
Stereomikroskop MZ-APO	Leica, Bensheim
Stereomikroskop SZ 40	Olympus, Hamburg
Sterilbank Microflow	Nunc, Wiesbaden
Thermocycler PTC-200	MJ Research, MC, USA

Thermocycler Techne Genius	Thermodux, Wertheim
Transfer-Kapillaren	Promochem GmbH, Wesel
Transilluminator (312nm)	Janke& Kunkel IKA-Labortechnik, Staufen i. Br.
UV-Stratalinker 2400	Stratagene, Heidelberg
VM920E-Monitor	Hitachi, Japan
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg
	Heraeus, Hanau
	Sorvall Du Pont, Bad Homburg

2.1.7 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

Blocklösung (Western-Blot):	5% Milchpulver gelöst in 1x PBS
10x DNA-Probenpuffer:	30% Ficoll 7,5% SDS 200 mM EDTA 100 mM TrisHCl pH 7,5 0,125% Orange G
DNA-/RNA-Hybridisierungspuffer: (Church und Gilbert, 1984)	500 mM NaPi pH 7,2 7% SDS 1% BSA 1 mM EDTA
Injektionspuffer:	5 mM Tris/HCl pH 7,5 0,02 mM EDTA pH 8,0
LB-Agar:	LB-Medium mit 15 g/l Agar
LB-Medium:	10 g/l NaCl 10 g/l Casein 5 g/l Hefeextrakt auf pH 7,5 einstellen

10x MOPS-Puffer:	200 mM MOPS 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA auf pH 7,0 einstellen
10x PBS:	1,5 M NaCl 1 M Natriumphosphat auf pH 7,2 einstellen
Proteinase K-Lösung:	100 mM Tris/HCl pH 8,4 200 mM NaCl 5 mM EDTA 0,1% SDS 2 µg Proteinase K
2x SDS Gel-Ladepuffer:	100 mM Tris/HCl pH 6,8 200 mM β-Mercaptoethanol 4% SDS 0,02% Bromphenolblau 20% Glycerol
20x SSC:	3 M NaCl 0,3 M Na-Citrat auf pH 7,0 einstellen
50x TAE-Puffer:	2 M Tris/Acetat 50 mM EDTA auf pH 8,0 einstellen
10x TBE:	890 mM Tris 890 mM Borsäure 20 mM EDTA

TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl pH 8,0 1 mM EDTA
Transferpuffer (Western-Blot):	39 mM Glycin 48 mM Tris-Base 0,037% SDS 20% Methanol
Medium für Embryonen:	DMEM 5 % fötales Kälberserum 1 mM CaCl 0,1 mM MgCl
Waschpuffer für Embryonen:	PBS 1 % fötales Kälberserum 1 mM CaCl 0,1 mM MgCl

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Präparation

2.2.1.1 DNA-Präparation aus Blut

10 ml humanes Blut wurden bei 1500 U/min abzentrifugiert und das Pellet in 1,2 ml SSC resuspendiert. Anschließend wurden 370 µl 0,2 M NaAcetat (pH 7,0), 25 µl 10%iges SDS und 15 µl 10 mg/ml Proteinase K zugegeben. Nach einer Stunde Inkubation bei 56°C wurde eine Phenol/Chlorophorm-Extraktion durchgeführt. Dann wurde die DNA mit Ethanol gefällt, zweimal gewaschen, das Pellet getrocknet und in 100 µl 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) gelöst.

2.2.1.2 Plasmid-DNA-Präparation

E. coli-Bakterien wurde durch alkalische Lyse (Birnboim and Doly 1979) aufgeschlossen und so die enthaltene Plasmid-DNA freigesetzt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe der Anionenaustauschchromatographie gewonnen. Die Präparation erfolgte entsprechend den Angaben der Hersteller (Macherey & Nagel, Qiagen) für diese Säulen.

2.2.1.3 DNA-Präparation aus Gewebe

Zur Isolierung genomischer DNA aus Gewebe wurden entweder Ohrbiopsien mit 20 µl Proteinase K-Lösung oder Leberproben mit ca. 500 µl Proteinase K-Lösung über Nacht bei 55°C verdaut. Ohrbiopsien wurden dann auf 500 µl mit H₂O aufgefüllt und hiervon 1 µl als Template für die PCR eingesetzt. Für Southern-Blot Analysen wurde die DNA aus den Proteinase K verdauten Leberproben zweimal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert, mit Isopropanol gefällt und anschließend mit 70% Ethanol gewaschen.

2.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR) (Saiki, Scharf et al. 1985)

Für die PCR mit genomischer DNA wurden ca. 50 ng DNA in 50 µl 1x Polymerasepuffer mit je 1 pM Primer, 0,02 mM dNTPs und 2 U Polymerase amplifiziert. Die jeweiligen Primerpaare und deren Annealing-Temperatur sind unter 2.1.7 aufgeführt. Nach einer 5 minütigen Denaturierung bei 95°C wurde die PCR unter folgenden Bedingungen mit 35 Zyklen durchgeführt:

Denaturierung:	30 sec bei 95°C
Annealing:	60 sec bei 37-68°C
Elongation:	60 sec bei 72-74°C (je nach verwendeter Polymerase)

Anschließend wurde noch einmal 8 min bei 72-74°C polymerisiert. Die PCR-Ansätze wurden nach Zugabe von 10x DNA-Probenpuffer auf Agarosegelen aufgetrennt.

2.2.3 DNA-Restriktion und Gelelektrophorese

Die Restriktion von DNA wurde mit Hilfe von 2 U Restriktionsenzym pro µg DNA im entsprechenden Restriktionspuffer für 1-2 h bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur durchgeführt.

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 0,8 bis 2 %igen horizontalen Agarosegelen, die mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt wurden. Vor der Elektrophorese wurde die DNA mit 1/10 Vol. DNA-Probenpuffer versetzt. Als Elektrophoresepuffer diente entweder 1x TAE für Southern-Blot Gele oder 0,5x TBE für alle anderen DNA-Gele. Als Molekulargewichtsmarker wurden BstE II-geschnittene λ-DNA und Hae III-geschnittene X174-DNA benutzt. Die Dokumentation erfolgte auf einem UV-Transilluminator mittels digitaler Kamera und Thermodrucker.

2.2.4 Subklonierung von DNA-Fragmenten

Der jeweilige Vektor und das entsprechende DNA-Fragment (jeweils ca. 2 - 10 µg) wurden mit dem entsprechenden Restriktionsenzym verdaut. Die DNA-Fragmente wurden über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt und die Banden von Interesse mit einem Skalpell ausgeschnitten. Aus den Agarosestücken wurde die DNA mit dem „Nucleospin-Extract-Kit“ nach Angaben des Herstellers wiedergewonnen. Für die Ligationsreaktion von Vektor- und Insert-DNA wurden 400 U T4-DNA-Ligase benutzt (Sambrock et al., 1989). Herstellung und Transformation kompetenter Bakterienzellen erfolgte nach der im Labor etablierten Methode (Hanahan 1983).

2.2.5 Isolierung von RNA aus Geweben (Chomczynski and Sacchi 1987)

50-100 mg Gewebeprobe wurden in 1 ml *Tri Reagent* (Sigma, Deisenhofen) in *Lysing Matrix D* (BIO101 inc., CA, USA) mit Hilfe eines *FastPrep* FP120 Homogenisators für 30 s bei Stufe 5 homogenisiert. Gewebetrümmer wurden 5 min bei 14000 Upm abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte die RNA Präparation nach den Angaben des Herstellers für *Tri Reagent*. Die Qualität der RNA wurde auf einem herkömmlichen 1%igen Agarosegel überprüft und die Quantität und Reinheit mit einem Photometer bestimmt.

2.2.6 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die reverse Transkriptasereaktion wurde entweder mit den random-primers oder mit den oligo-dT-Primers des RT-PCR-Kits von Stratagene (Stratagene, Heidelberg) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die anschließende PCR wurde Vent-Polymerase (Vent-PCR-Polymerase, New England Biolabs) verwendet. Nach 5 minütiger Denaturierung wurde folgendes Protokoll in 35 Zyklen wiederholt:

Denaturierung:	30 s bei 95°C
Annealing:	60 s bei 37 - 65°C (die genaue Temperatur ist unter 2.1.7 angegeben)
Elongation:	60 s bei 74°C

Abschließend erfolgte eine 8 minütige Elongation bei 74°C.

Die jeweiligen Primerpaare sind unter 2.1.7 aufgeführt.

2.2.7 X-Gal-Färbung

Zellkulturen bzw. Gefrierschnitte wurden zunächst 20 Minuten in Fixierlösung fixiert und zweimal 10 Minuten in Waschpuffer gewaschen. Die Färbung erfolgte eine Stunde bis über Nacht bei 37°C in X-Gal-Färbelösung. Anschließend wurde kurz mit Waschpuffer gewaschen.

Fixierlösung: 1ml 25% Glutaraldehyd
 25ml 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,3
 6,25 ml 0,1 M EGTA pH 8,0
 0,25 ml 1 M MgCl₂
 mit H₂O ad 125 ml auffüllen

Waschlösung: 100 ml 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,3
 1 ml 1 M MgCl₂
 50 g NaDeoxycholat
 0,1 ml Nonidet NP40
 mit H₂O ad 500 ml auffüllen

X-Gal-Stammlösung: 25 mg/ml X-Gal in DMF

Färbelösung: 40 mg Kaliumferricyanid
 40 mg Kaliumferrocyanid
 1 ml X-Gal-Stammlösung
 mit H₂O ad 25 ml auffüllen

2.2.8 Generierung transgener Mäuse

2.2.8.1 Präparation des Expressionsvektors zur Pronukleusinjektion

Für alle Lösungen wurde doppelt destilliertes Wasser (aqua ad injectabilia, Braun) sowie endotoxinfreie Einwegkunststoffmaterialien (Eppendorf, Hamburg) verwendet. Nach Restriktion mit SfiI wurde die DNA auf einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt und die Bande mit der Expressionskassette ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte mit dem Gene-Clean-Spin-Gelextraktionskit (Qbiogene/Bio101, Heidelberg) nach den Angaben des Herstellers. Das Eluat enthielt etwa 70 ng/µl DNA und wurde bei -20°C gelagert. Am Tag der Pronukleusinjektion wurde die DNA aufgetaut und auf 1 ng/µl mit Injektionspuffer

eingestellt. Die DNA-Lösung wurde 10 min bei 14000 Upm zentrifugiert, um Partikel zu sedimentieren. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Gefäß überführt.

Injektionspuffer: 100 ml Embryonenwasser (Sigma, Deisenhofen)
5 mM Tris pH 7,5
0,15 mM EDTA

2.2.8.2 Mikroinjektion

Die Mikroinjektion wurde im Wesentlichen wie von Hogan et al. beschrieben durchgeführt (Hogan, 1994). Für die Pronukleusinjektion wurden befruchtete Eizellen von FVB/NHSD-Tieren verwendet. Um eine Superovulation zu induzieren, wurde 3-6 Wochen alten Weibchen 4 Tage vor Entnahmen der Eizellen Pregnant Mare Serum (PMS) intraperitoneal injiziert (7,5 U, Sigma, Deisenhofen). 47 Stunden danach wurden 7,5 U humanes Choriongonadotropin (hCG) injiziert (Primogonyl-5000, Schering Pharma). Die Weibchen wurden am gleichen Tag mit fertilen Männchen verpaart. Am nächsten Tag wurden die Eizellen in M2-Medium (Sigma, Deisenhofen) isoliert und durch kurze Inkubation mit Hyaluronidase (10 mg/ml, Sigma, Deisenhofen) von den Kumuluszellen befreit.

Außerhalb des Brutschrankes wurden die Eizellen in M2-Medium und innerhalb des Brutschrankes (37°C, 5% CO₂) in M16-Medium gelagert. Nach der Mikroinjektion der Vektor-DNA in den männlichen Pronukleus der befruchteten Eizelle wurden diese in das linke Ovidukt von Leihmüttern (C57BL/6JxC3H-F1-Weibchen) transferiert. Die Reproduktionsorgane der Leihmütter wurden durch vorherige Verpaarung mit sterilisierten Männchen auf die transferierten Eizellen vorbereitet.

2.2.8.3 Zucht und Selektion transgener Tiere

Transgene Foundertiere wurden mit FVB/NHSD-Tieren verpaart, um transgene Linien zu etablieren. Für die Untersuchung der transgenen *LacZ*-Expression wurden Mäuse der jeweiligen Linie ebenfalls mit FVB/NHSD-Tieren verpaart.

Zur Cre-Rekombination und somit Aktivierung des Transgens wurden Tiere der jeweiligen Linie (FVB/NHSD) mit Nestin/Cre-Tieren (C57BL/6J) verpaart. Die Nachkommen hatten also einen definierten, heterozygoten F1-Hintergrund (C57BL/6JxFVB/NHSD).

2.2.9 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten (Feinberg and Vogelstein 1983)

Für die Markierung von DNA-Fragmenten nach der „random primed oligo labeling“-Methode wurde ein Markierungssystem (Prime it II-Kit, Stratagene, Heidelberg) verwendet. Hierbei wurden ca. 25 ng DNA und 50 µCi ³²P-dATP eingesetzt. Nicht eingebaute Nukleotide wurden über eine Gelfiltrationssäule (Nick Columns Sephadex G50, Amersham-Buchler GmbH, Braunschweig) abgetrennt. Das Eluat wurde thermisch denaturiert und zur Hybridisierung eingesetzt.

2.2.10 Southern-Blot Analyse (Southern, 1975)

Nach Verdau mit dem entsprechenden Restriktionsenzym wurde die DNA auf 1%igen Agarosegelen aufgetrennt.

Die aufgetrennte DNA wurde über Kapillartransfer (Sambrook und Russel, 2001) unidirektional auf Nylonfilter übertragen. Die DNA wurde durch Bestrahlung des getrockneten Filters mit UV-Licht (1,5 kJ/m²) fixiert.

Die Filter wurden mindestens 2 Stunden in Hybridisierungspuffer (Church und Gilbert, 1984) bei 65°C prähybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte in Hybridisierungspuffer unter Zusatz der denaturierten radioaktiv markierten Sonde bei 65°C über Nacht. Gewaschen wurde zunächst 2-3x in 2 x SSC, 0,1% SDS und anschließend 2-3 x in 0,1 x SSC, 0,1% SDS. Die Filter wurden mit Hilfe von Phosphoimagerscreens über Nacht autoradiographiert und die Screens dann in einem Phosphoimager ausgelesen.

2.2.11 Anfertigung von Gefrierschnitten

Gefrierschnitte wurden in einer Dicke von 5 µm angefertigt und auf polylysierte Objektträger überführt. Alle Färbe- und Waschschrte wurden in Glasküvetten durchgeführt. Anschließend wurden die Schnitte nach Bedarf mit hydrophilem (Aquamount) oder mit hydrophobem Eindeckmedium (Entellan) eingedeckt.

2.2.12 Anfertigung von Paraffinschnitten

Für die Anfertigung von Paraffinschnitten wurden in Formalin fixierte Leberproben zunächst über eine aufsteigende Alkoholreihe (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%; je 30 min) dehydriert und anschließend in Xylol überführt. Nach 2 x 3 h Xylol wurden sie über Nacht bei 55°C in Xylol/Paraffin-Gemisch (1/1) inkubiert. Nach 2 x 3 h Inkubation in Paraffin wurden die Leberproben in Paraffinformen gegossen und nach dem Abkühlen aufgeblickt. Es wurden Schnitte von 5 µm Dicke angefertigt, die 2 x 5 min in Xylol gewaschen und über eine

MMP-2-Standard:	Pro MMP-2 in 50 mM Tris HCl, pH 7,6 1,5 mM NaCl 0,5 mM CaCl 1 μ M ZnCl ₂ 0,01 % Brij™ 35 0,01 % Gelatine
Waschpuffer:	0.01 M PBS, pH 7,0 0,05 % Tween™ 20
MMP-2-Assaypuffer:	50 ml Tris/HCl, pH 7,6 1,5 mM NaCl 0,5 mM CaCl 1 μ M ZnCl ₂ 0,01% Gelatine 0,01% Brij™ 35
Detektionsenzym:	50 ml Tris/HCl, pH 7,6 modifizierte Urokinase 1,5 mM NaCl 0,5 mM CaCl 1 μ M ZnCl ₂ 0,01% Brij™ 35
Substrat:	S-2444™ Peptidsubstrat in MMP-2-Assaypuffer

2.2.16 Activity-Assay für MMP-13

50 mg Lebergewebe wurden in 1 ml MMP-13-Assaypuffer homogenisiert. Standard und Probe wurden mit einem anti-MMP-13 Antikörper inkubiert und dann auf einer mit anti-Maus Zweitantikörper beschichteten Mikrotiterplatte immobilisiert. Anschließend wurden alle nicht gebundenen Bestandteile heruntergewaschen und der Standard mit p-Aminophenylmercuric Acetat (APMA) in Assaypuffer aktiviert. Eine modifizierte Urokinase wird als MMP-13-spezifisches Detektionsenzym zugegeben. Dieses spaltet nach proteolytischer Aktivierung durch MMP-13 wiederum ein Substrat, welches dann bei 405 nm meßbar wird.

MMP-13-Assaypuffer:	50 ml Tris/HCl, pH 7,6 0,15 mM NaCl 1 mM CaCl 0,5 µM ZnCl ₂ 0,01% Brij™ 35
MMP-13-Standard:	Pro MMP-13 in MMP-13-Assaypuffer
MMP-13-Antikörper:	anti-MMP-13 in MMP-13-Assaypuffer
Waschpuffer	0.01 M PBS, pH 7,0 0,05 % Tween™ 20
Detektionsenzym:	modifizierte Urokinase in MMP-13-Assaypuffer
Substrat:	S-2444™ Peptidsubstrat in MMP-13-Assaypuffer

2.2.17 Activity-Assay für MMP-14

50 mg Lebergewebe wurden in 1 ml MMP-14-Extraktionspuffer homogenisiert. MMP-14-Standard und Probe wurden auf einer mit MMP-14-Antikörper beschichteten Mikrotiterplatte inkubiert. Anschließend wurden alle nicht gebundenen Bestandteile heruntergewaschen und der Standard mit p-Aminophenylmercuric Acetat (APMA) in Assaypuffer aktiviert. Eine modifizierte Urokinase wird als MMP-14-spezifisches Detektionsenzym zugegeben. Dieses spaltet nach proteolytischer Aktivierung durch MMP-14 wiederum ein Substrat, welches dann bei 405 nm meßbar wird.

MMP-14-Extraktionspuffer:	50 ml Tris/HCl, pH 7,6 1,5 mM NaCl 0,5 mM CaCl 1 µM ZnCl ₂ 0,01% Brij™ 35 0,25% Triton™ X-100
---------------------------	---

MMP-14-Standard:	Pro MMP-14 50 mM Tris HCl, pH 7,6 1,5 mM NaCl 0,5 mM CaCl 1 μ M ZnCl ₂ 0,01 % Brij TM 35 0,25 % Triton TM X-100
Waschpuffer:	0.01 M PBS, pH 7,0 0,05 % Tween TM 20
MMP-14-Assaypuffer:	50 ml Tris/HCl, pH 7,6 1,5 mM NaCl 0,5 mM CaCl 1 μ M ZnCl ₂ 1 Unit/ml Heparin 0,01% Brij TM 35
Detektionsenzym:	modifizierte Urokinase in MMP-14-Assaypuffer
Substratlösung:	S-2444 TM Peptidsubstrat in MMP-14-Assaypuffer

2.2.18 Präparation von Embryonen

Die Embryonen wurden in Embryonenmedium aus den Deziduae herauspräpariert. 6,5 und 7,5 Tage pc alte Embryonen wurden anschließend in Embryonenwaschlösung gewaschen und mit Tripur die RNA und DNA aus den ganzen Embryonen präpariert. 8,5 -12,5 Tage pc alte Embryonen wurden in Embryonenmedium von ihren extraembryonalen Hüllen befreit und in Embryonenwaschlösung gewaschen. Anschließend wurden sie in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die extraembryonalen Hüllen wurden mit Proteinase K verdaut.

2.2.19 Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH)

Milzzellen wurden vereinzelt und in Kultur genommen. Aus den Zellen wurden Metaphasechromosomen präpariert. Diese wurden mit einer LacZ-spezifischen, fluoreszenzmarkierten Sonde hybridisiert. Die Gegenfärbung erfolgte mit DAPI. Die Identifizierung der Chromosomen erfolgte anhand ihres Bandenmusters.

3. Ergebnisse

3.1 Expressionsvektor

Es sollte ein von Positionseffekten unabhängiges, induzierbares und leberspezifisches Expressionssystem entwickelt werden, um mit diesem verschiedene Matrix-Metalloproteinasen und auch andere Proteine in Mäusen über zu exprimieren.

3.1.1 Insulatoren

Insulatoren sind natürlich vorkommende DNA-Sequenzen, die Transgene vor genomischen Positionseffekten schützen können indem sie unabhängige funktionelle Regionen innerhalb des Chromosoms ausbilden (Geyer 1997). Die hier verwendeten Insulatoren entstammen dem humanen β -Globincluster. Da der 5'-Insulator Lokuskontrollelemente enthält und somit Enhanceraktivität besitzt wurde der 3'-Insulator gewählt (Fleenor, Hickman et al. 1992; Li and Stamatoyannopoulos 1994).

Zunächst wurde DNA aus humanem Blut aufgereinigt. Diese diente als Template zur Herstellung der vier Insulatoren (1-4). Mit Hilfe der PCR wurden unter Verwendung der Primerpaare Ins1/KpnI + Ins1/XhoI (Primer siehe: 2.1.5.1), Ins2/SpeI + Ins2/SacII (Primer siehe: 2.1.5.2), Ins3/KpnI-1 + Ins3/KpnI-2 (Primer siehe: 2.1.5.3) und Ins4/SacII-1 + Ins4/SacII-2 (Primer siehe: 2.1.5.4) die vier Insulatoren amplifiziert, mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und in einen entsprechend restringierten pBluescript-Vektor inkloniert. Die so erhaltenen Insulatoren wurden sequenziert (Primer siehe: 2.1.5.5) und anschließend in der Reihenfolge 2, 3, 4, 1 in einen pBR322*3-Vektor (Blessing, Nanney et al. 1993) inkloniert (Abb. 3.1). Der in dieser Art gefertigte Insulatorenvektor **-I-** enthielt nun neben dem prokaryotischen Anteil jeweils zwei tandemorientierte, identische Insulatoren, welche eine „multiple cloning site“ (mcs) flankieren.

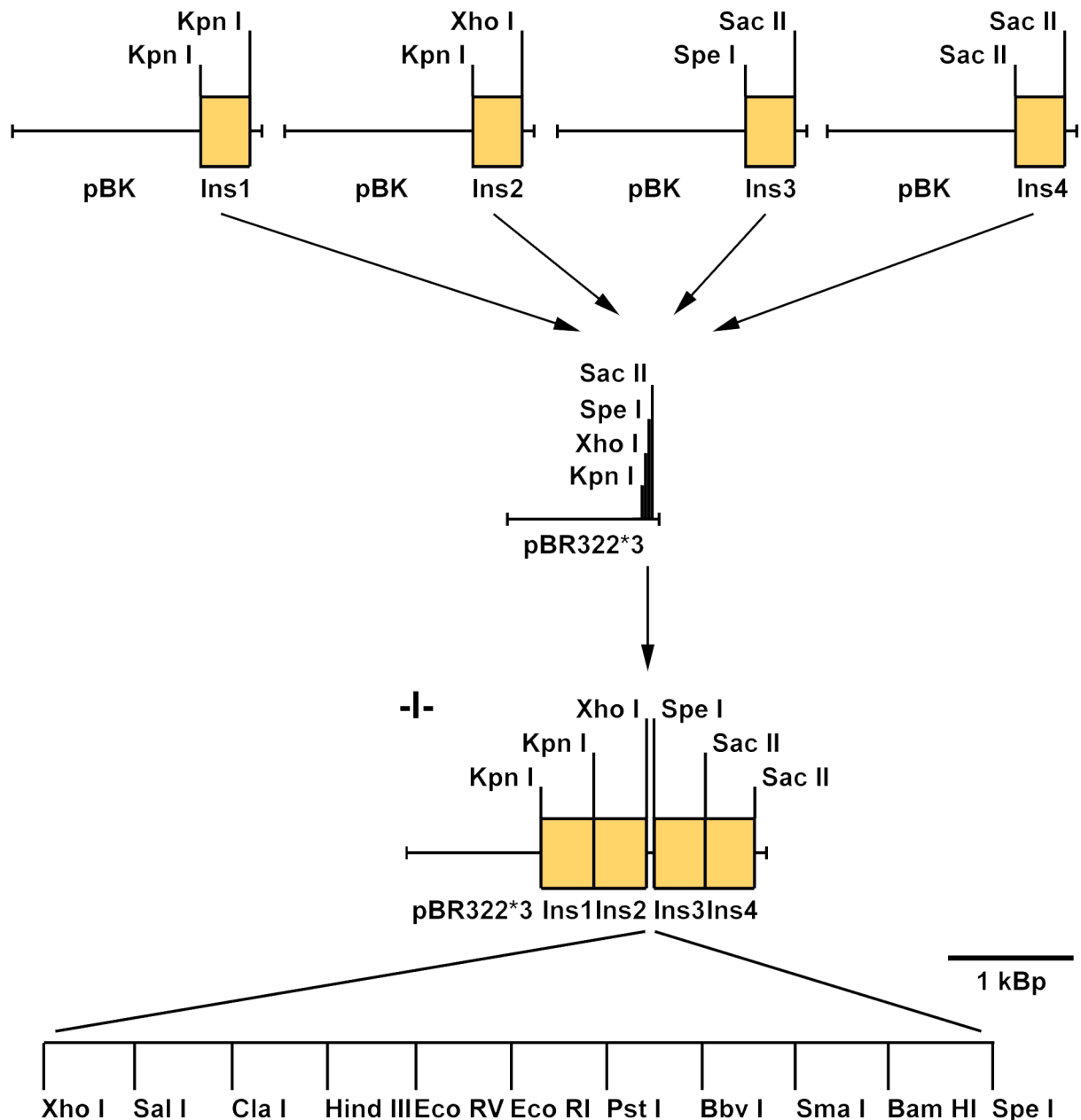


Abb. 3.1: Zusammenfügen des Insulatorenvektors -I-

Die einzelnen Insulatorelemente wurden mit Primern, welche zusätzlich noch die entsprechenden Schnittstellen enthielten, mittels PCR aus dem 3'-Bereich des humanen β -Globinclusters amplifiziert und in pBlueskript subkloniert. Die in pBluescript subklonierten Insulatorelemente wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen ausgeschnitten und in der Reihenfolge 2, 3, 4, 1 in einen pBR322*3-Vektor einkloniert. Der so erhaltene Insulatorenvektor -I- enthielt zwischen den flankierenden, paarig angeordneten Insulatoren eine „multiple cloning site“.

3.1.2 Leberspezifität

Um eine leberspezifische Expression zu erreichen, wurde die Promotorsequenz mit der dazugehörigen Enhancersequenz des murinen *Albumin*-Gens gewählt (Gorski, Carneiro et

al. 1986). Diese standen in unserem Labor in dem pBluescript-basierten Expressionsvektor U3 (freundlicherweise zu Verfügung gestellt von Prof. Dr. Lohse) zur Verfügung, welcher außerdem das β -Globin-Intron-2 des Kaninchens und das Polyadenylierungssignal aus dem Gen für das humane Wachstumshormon (human Growth Hormone, hGH) enthielt. Diese Expressionskassette wurde zunächst mit Kpn I aus dem Vektor U3 ausgeschnitten und mit Klenow-Enzym inkubiert. Anschließend wurde das so erhaltene Fragment mit Sal I geschnitten und in den Xho I/Sma I geschnittenen Insulatorenvektor I ligiert (Abb. 3.2). Der so entstandene pBR322*3-basierte Vektor **-IA-** enthielt nun zwei Paare tandem angeordneter Insulatoren, welche eine Expressionskassette mit Albuminpromotor, Albuminenhancer, polyA-Site und β -Globulintron-2 flankieren.

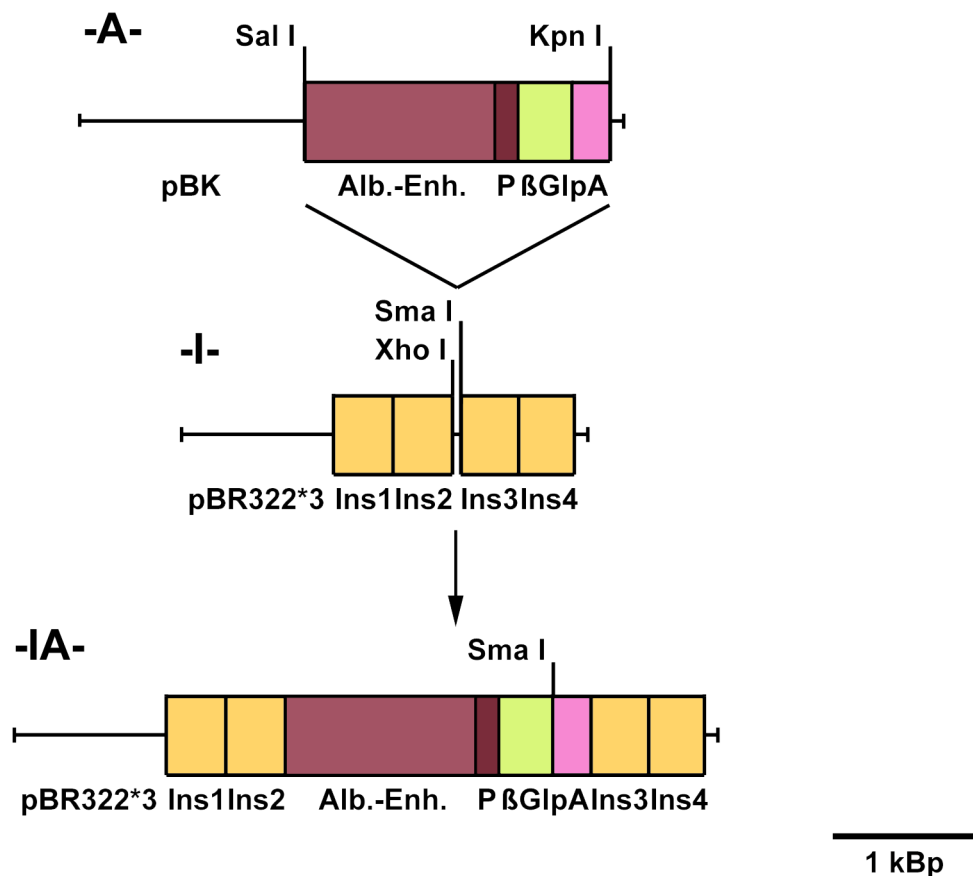


Abb. 3.2: Zusammenfügen von Insulatorenvektor -I- und Albumin-Expressionskassette -A-

Der die Albumin-Expressionskassette enthaltende pBluescript-Vektor wurde zunächst Kpn I restringiert, mit Klenow-Enzym inkubiert und anschließend mit Sal I geschnitten. Die so ausgeschnittene Albumin-Expressionskassette wurde in den Xho I/Sma I geöffneten Insulatorenvektor ligiert. Die entstandene von Insulatoren flankierte Albumin-Expressionskassette **-IA-** enthält nun eine Sma I-Schnittstelle für die Klonierung verschiedener

3.1.3 Induzierbarkeit

Da die Überexpression von Matrix Metalloproteinasen und anderen Proteine möglicherweise embryonal letal ist, sollte ein nachträglich induzierbares System entwickelt werden. Dieses musste außerdem über ein Reporter gen verfügen, um in den transgenen Tieren schon vor Induktion der Expression des Transgens Positions- und Integrationseffekte untersuchen zu können. Hierzu wurde mir freundlicherweise von Dr. B. Klopčič (Klopčič B, 2002) ein pBR322*3 basierter Vektor **-L-** zur Verfügung gestellt. Dieser enthielt ein von zwei gleich orientierten *LoxP*-Sites des Bakteriophagen P1 flankiertes *LacZ*-Gen aus *Escherichia coli* mit einem SV40-„nuclear localizing signal“ (nls, pPD16.43) (Fire, Harrison et al. 1990) und einer eigenen poly-A-Site. Diese Kassette wurde mit den Restriktionsenzymen Sac II und Apa I aus dem Vektor L ausgeschnitten, mit Klenow-Enzym behandelt und in den Sma I restringierten Vektor **-IA-** ligiert (Abb. 3.3). Der so entstandene Vektor **-IAL-** enthält nun das Reporter gen *Lac-Z* mit nls und poly-A-Site, flankiert von zwei gleich orientierten *LoxP*-Sites. Vorgeschaltet sind der Albuminhancer, der Albuminpromotor und ein β -Globin intron, nachgeschaltet eine poly-A-Site. Die Expressionskassette wird flankiert von jeweils zwei Paaren tandem angeordneter, gleich orientierter Insulatoren.

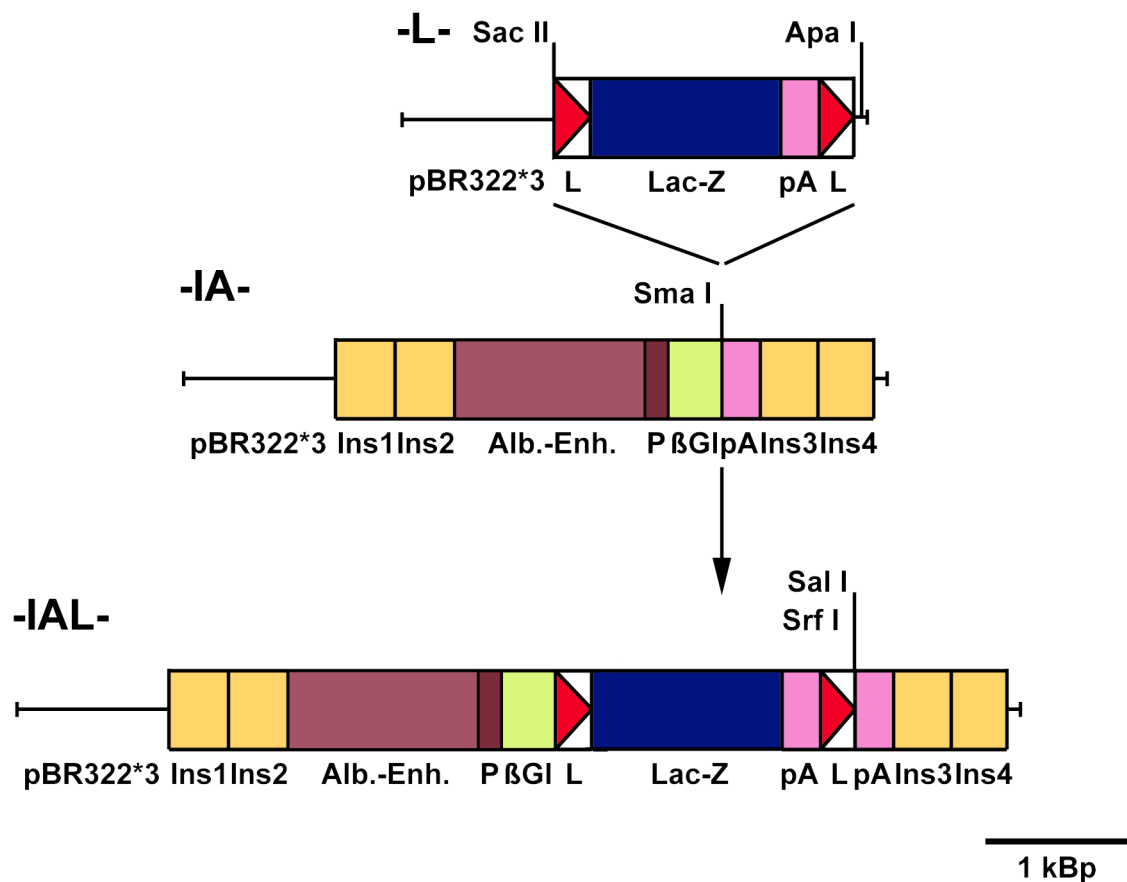


Abb. 3.3: Einfügen des *LoxP*-Sites flankierten *LacZ*-Gens in den Vektor -IA-

Das *LoxP*-Sites flankierte *LacZ*-Gen wurde Sac II/Apa I aus dem pBR322*3-Vektor ausgeschnitten und mit Klenow-Enzym behandelt. Anschließend wurde es in den Sma I restringierten Vektor -IA- ligiert. Der so zusammengesetzte Expressionsvektor -IAL- ist durch Cre-vermittelte Rekombination induzierbar und enthält *LacZ* als Reportergen. In die Schnittstellen Srf I und Sal I können beliebige cDNAs einkloniert

3.1.4 Expressionsvektoren für MMP-2, MMP-9 und MMP-14

Die cDNAs für murines MMP-2, MMP-9 und MMP-14 wurden über RT-PCR aus Lebergewebe gewonnen. Die Primer wurden so gewählt, dass am 5'-Ende eine Srf I-Schnittstelle (Eco-RV für MMP-9) und eine nach Kozak (Kozak, 1987) abgeleitete Translations-Initiations-Konsensussequenz (5'-GCCCGG**GCCGCC**ACCATG-3'), sowie am 3'-Ende eine Sal I-Schnittstelle eingefügt wurden (Primer siehe: 2.1.5.6; 2.1.5.9; 2.1.5.14). Durch die Verwendung von Vent-Exo⁺-Polymerase hatte das PCR-Produkt an beiden Enden ein „Blunt-End“. Zur gerichteten Klonierung wurde das PCR-Produkt noch mit Sal I verdaut. Anschließend wurde das PCR-Fragment in einen Sma I/Sal I geschnittenen pBluescript-Vektor subkloniert und sequenziert (Primer siehe: 2.1.5.7; 2.1.5.10; 2.1.5.15). Die cDNAs für MMP-2, MMP-14 und MMP-9 wurden dann mit Srf I (Eco-RV für MMP-9) und

Sal I ausgeschnitten und in den Srf I/Sal I restringierten IAL-Vektor ligiert. Hierbei wurden im Fall von MMP-9 sowohl die Srf I als auch die Eco RV-Schnittstelle zerstört. Auf diese Art entstanden die Expressionssysteme IAL-MMP-2, IAL-MMP-9 und IAL-MMP-14 für die induzierbare, leberspezifische Expression von MMP-2, MMP-9 und MMP-14 (Abb. 3.4).

Zur Anfertigung der Injektions-DNA für die Mikroinjektion wurden die eukaryotischen Expressionssysteme mit Sfi I aus den prokaryotischen Vektoren ausgeschnitten und aufgereinigt.

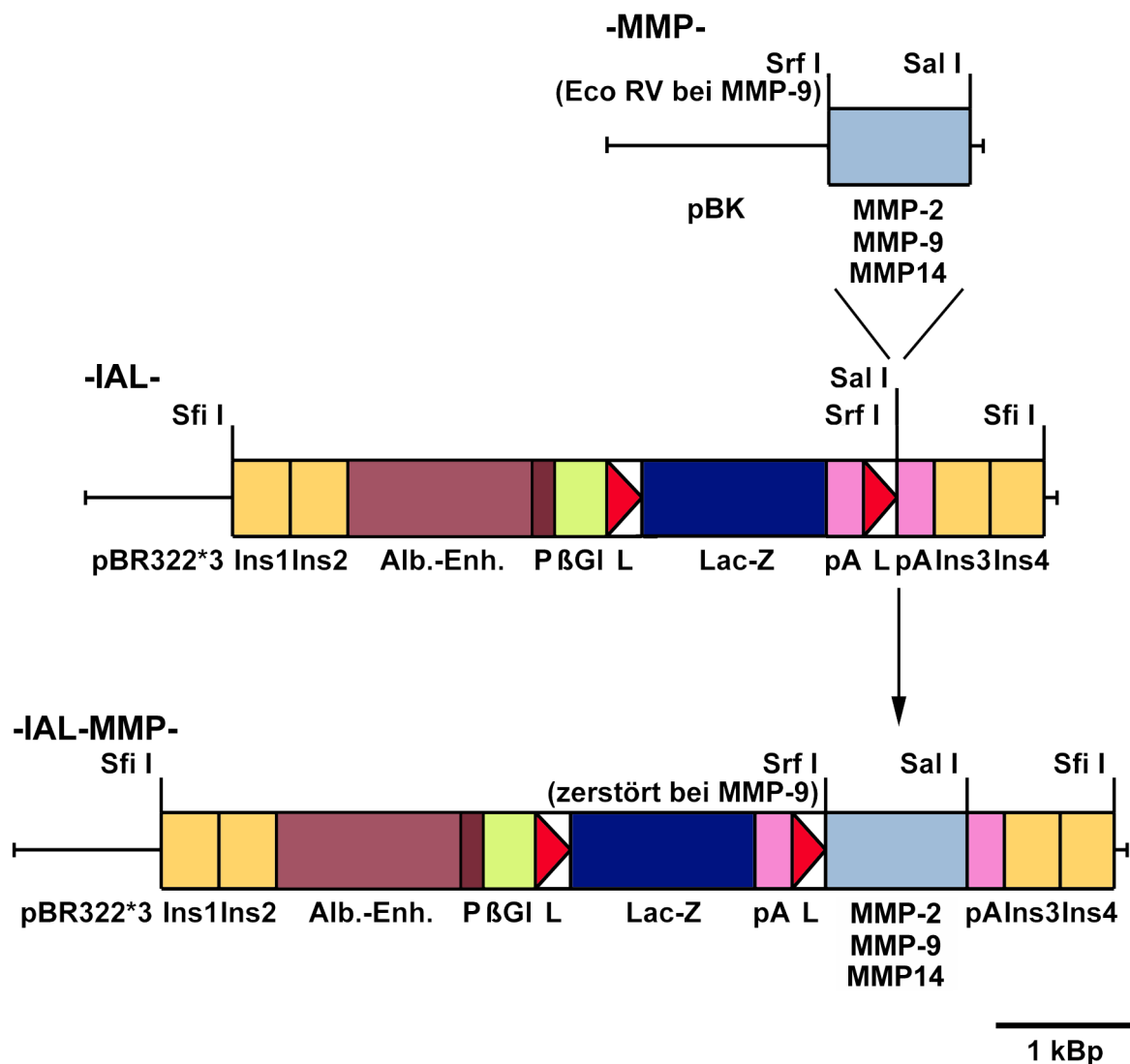


Abb. 3.4: Einfügen der MMP-cDNAs in den Expressionsvektor -IAL-

Die mit Hilfe der RT-PCR amplifizierte und in pBluescript subklonierten cDNAs für MMP-2, MMP-9 und MMP-14 wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen ausgeschnitten und in den Srf I/Sal I geöffneten Expressionsvektor -IAL- ligiert. Die leberspezifischen, induzierbaren Expressionssysteme für die einzelnen MMPs (IAL-MMP-2, IAL-MMP-9 und IAL-MMP-14) wurden nun mit Sfi I ausgeschnitten und für die Pronukleusinjektion

3.2. Charakterisierung MMP-14 transgener Mäuse

3.2.1 Founder

Durch Mikroinjektion der IAL-MMP-14-Vektor-DNA konnten 13 transgene Foundertiere (MMP-14 A, B, ..., M) generiert werden, mit denen sich neun transgene Linien züchten ließen. Die Genotypisierung der Tiere erfolgte durch PCR, wobei der sense Primer (MMP-14) im 3'-Bereich der MMP-14-cDNA liegt und der antisense Primer (pA-revII) im Polyadenylierungssignal des humanen Wachstumshormons (Primer siehe: 2.1.5.8). Transgene Tiere konnten durch eine Bande von 733 Basenpaaren identifiziert werden (Abb. 3.5).

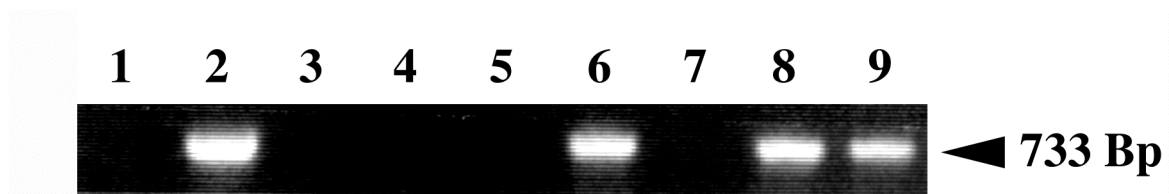


Abb. 3.5: PCR zur Bestimmung MMP-14 transgener Tiere

Zur Identifizierung MMP-14 transgener Nachkommen wurden Ohrbiopsien von den Tieren angefertigt, mit Proteinase K verdaut, und als Template für eine PCR verwendet. Durch Verwendung der transgenspezifischen Primer, MMP-14 und pA-revII, konnten transgene Tiere durch eine Bande von 733 Basenpaaren identifiziert werden. Die Tiere 2, 6, 8 und 9 waren transgen. Die Abbildung zeigt die Analyse eines typischen Wurfs.

3.2.2 Analyse der Reportergenexpression

3.2.2.1 Expressionsstärke des Reportergens in einzelnen Linien

Von F1-Tieren der einzelnen Linien wurden Leberproben entnommen, Kryoschnitte angefertigt und diese mit X-Gal gefärbt. Hierbei zeigten vier Linien (MMP-14 E, G, J und L) eine starke Expression in den meisten Nuklei von Hepatozyten. Die Linien MMP-14 C, D und K zeigten eine Expression in den Nuklei einzelner Hepatozyten und die Linien MMP-14 F und I zeigten keine Expression (Abb. 3.6). Die nukleäre Lokalisation der Färbung lässt sich gut erkennen.

Für die weiteren Versuche wurden die stark exprimierenden Linien MMP-14 E, G, J und L verwendet.

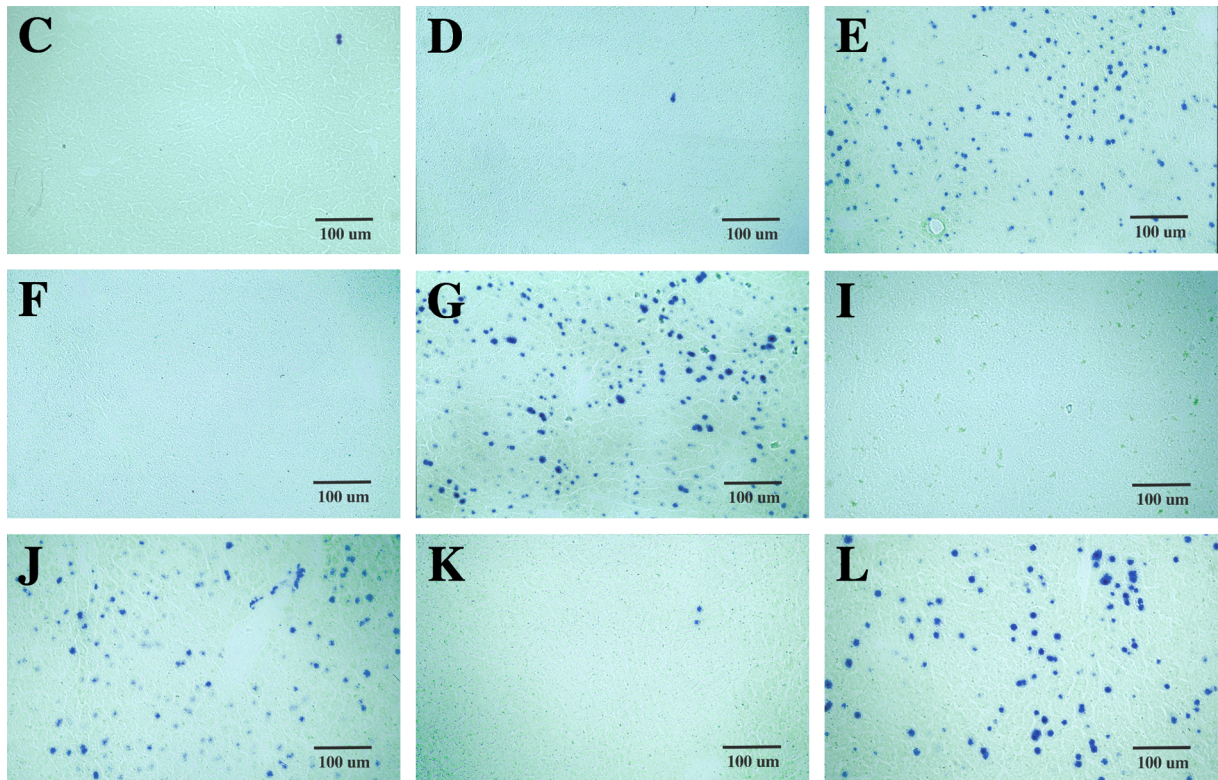


Abb. 3.6: X-Gal-Färbungen von Leberschnitten MMP-14 transgener Tiere

F1-Tieren der durch Pronukleusinjektion generierten MMP-14 transgenen Linien wurden Leberproben entnommen und von diesen Kryoschnitte angefertigt. Durch X-Gal-Färbung konnte die Menge *LacZ*-exprimierter β -Galaktosidase in den Nuklei nachgewiesen werden. Die Linien E, G, J und L zeigten eine starke Färbung in den Nuklei, die Linien C, D und K in den Nuklei einzelner Zellen eine Färbung und die Linien F und I keine Färbung

3.2.2.2 Organspezifität der Transgenexpression

Da vom murinen Albuminpromotor bekannt ist, dass er nicht nur in der Leber, sondern auch in anderen Geweben aktiv sein kann, wurden Kryoschnitte von Blase, Dickdarm, Dünndarm, Harnleiter, Herz, Leber, Milz, Niere und Pankreas eines Tieres der Linie G angefertigt. Diese wurden anschließend mit X-Gal gefärbt (Abb. 3.7). Außer in der Leber zeigte sich auch eine deutliche, aber nicht kontinuierliche Färbung im äußeren Bereich des Harnleiters. Auch in einzelnen Zellen der Blase ist eine Färbung zu erkennen.

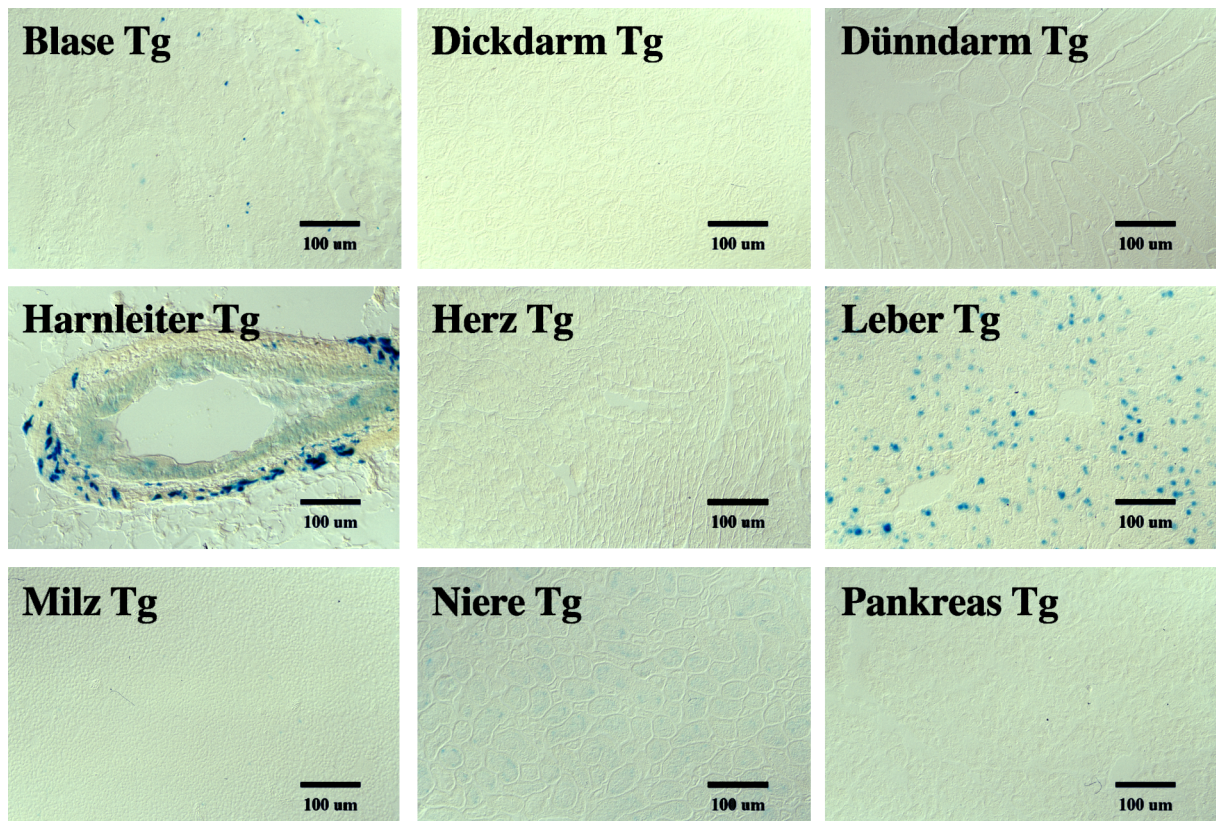


Abb.:3.7: X-Gal-Färbung zum Nachweis der Organspezifität des Albuminpromotors

Von verschiedenen Organen (Blase, Dickdarm, Dünndarm, Harnleiter, Herz, Leber, Milz, Niere und Pankreas) eines Tieres der Linie MMP-14 G wurden Kryoschnitte angefertigt und diese X-Gal gefärbt. Außer in der Leber konnte eine Expression der β -Galaktosidase im Harnleiter und vereinzelt in Zellen der Blase nachgewiesen werden. In den anderen untersuchten Organen konnte keine β -Galaktosidase gezeigt werden.

3.2.3 Rekombination

Tiere der Linien MMP-14 E, G, J und L wurden mit Nestin-Cre Effektormäusen verpaart. Bei Nestin-Cre Effektormäusen handelt es sich um einen Balancerstamm, der frühembryonal Cre-Rekombinase in allen Geweben exprimiert (Betz, Voshenrich et al. 1996). Die Genotypisierung erfolgte zunächst durch PCR. Da das für die Identifizierung der transgenen Tiere mit dem Primerpaar MMP-14/pArevII (Primer siehe: 2.1.5.8) amplifizierte Fragment außerhalb der *LoxP*-Sequenzen liegt, wurde auch im Falle einer Cre-vermittelten Rekombination bei transgenen Tieren ein Signal von 733 Basenpaaren erwartet. Cre transgene Tiere wurden mit dem Primerpaar Cre Ia/Cre IIb (Primer siehe: 2.1.5.16) durch ein PCR-Produkt von 308 Basenpaaren identifiziert (Abb. 3.8). Für MMP-14/Cre doppelt transgene Tiere wurde bei beiden Reaktionen ein entsprechendes Produkt erwartet. Bei allen vier untersuchten Linien MMP-14 E, G, J und L entsprach die Verteilung von nicht-, einfach Cre- bzw. einfach MMP-14- und doppelt transgenen Tieren nach der Kreuzung von heterozygoten Cre-transgenen Tieren mit heterozygoten MMP-14-transgenen Tieren den Erwartungen.

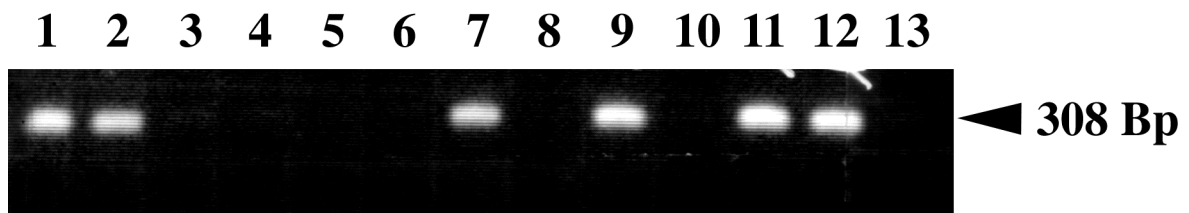


Abb. 3.8: PCR zur Bestimmung Nestin-Cre transgener Tiere

Zur Identifizierung Nestin-Cre transgener Nachkommen wurden den Tieren Ohrbiopsien entnommen, mit Proteinase K verdaut und als Template für eine PCR eingesetzt. Durch Verwendung der Cre-spezifischen Primer, Cre Ia und Cre IIb, konnten transgene Tiere durch eine Bande von 308 Basenpaaren identifiziert werden. Die Tiere 1, 2, 7, 9, 11 und 12 waren transgen für Nestin-Cre. Die Abbildung zeigt die Analyse eines typischen

Der Nachweis der Rekombination erfolgte durch Southern-Blot. Bei Verdau genomischer DNA mit Hind III und Hybridisierung mit einer Sonde, die Teile des transgenen Enhancers, Promotors, des Introns und einer *LoxP*-Site umfasste (2 kBp Hind III/Sma I-Fragment), wurde für nicht rekombinierte Vektorfragmente ein Signal bei 5,2 kBp und für rekombinierte bei 3,8 kBp erwartet (Abb. 3.9).

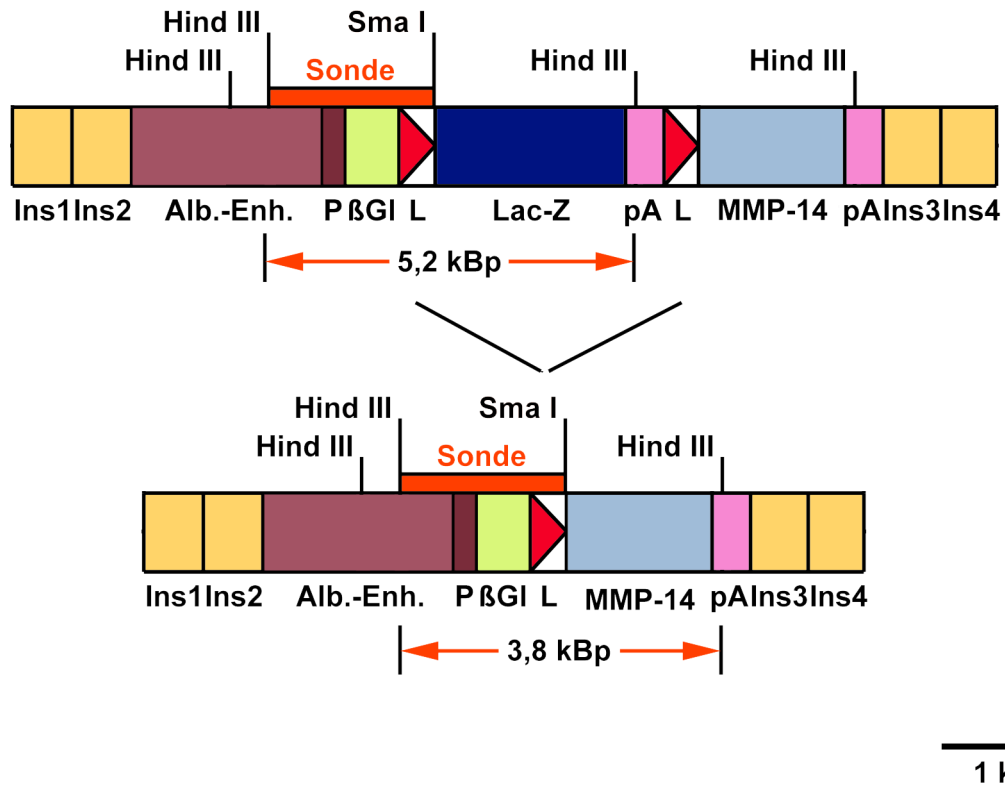


Abb. 3.9: Schema der Cre-vermittelten Rekombination

Nach Hind III Verdau genomischer DNA eines MMP-14 transgenen Tieres lässt sich mit Hilfe der Methode des Southern-Blot ein 5,2 Kilobasenpaare großes Fragment nachweisen. Als Sonde (hier orange markiert) für den Southern-Nachweis der transgenen DNA diente ein Sma I/Hind III restringiertes Fragment des transgenen Konstruktes. Die Cre-Rekombinase rekombiniert die beiden gleich orientierten *LoxP*-Sites so, dass der dazwischen liegende DNA-Bereich durch Cre-vermittelte Rekombination herausgeschnitten wird und nur noch eine *LoxP*-Site übrig bleibt. So geht unter anderem die 5'-polyA-Site verloren und mit ihr eine Hind III-Schnittstelle. Schneidet man nun die Cre-rekombinierte genomische DNA eines Nestin-Cre/MMP-14 transgenen Tieres, so kann man im Southern-Blot, mit der selben Sonde, ein 3,8 Kilobasenpaare großes Fragment nachweisen.

Der Versuch wurde mit genomischer DNA aus Lebergewebe durchgeführt. Bei den untersuchten doppelt transgenen Tieren der Linien MMP-14 E, G, J und L konnte die erfolgte Rekombination auf diese Weise nachgewiesen werden. Die Signale bei den MMP-14/Cre doppelt transgenen Tieren der Linien E, G und L waren deutlich schwächer als bei den jeweiligen MMP-14 transgenen Geschwistertieren. Doppelt transgene Tiere der Linie J hatten ein ungefähr gleich starkes Signal wie einfach MMP-14 transgene Geschwistertiere. Nicht rekombinierte Vektorfragmente waren bei den meisten untersuchten doppelt transgenen Tieren nicht nachweisbar. Als Ladekontrolle diente das Foto des Agarosegels (Abb. 3.10).

MMP-14

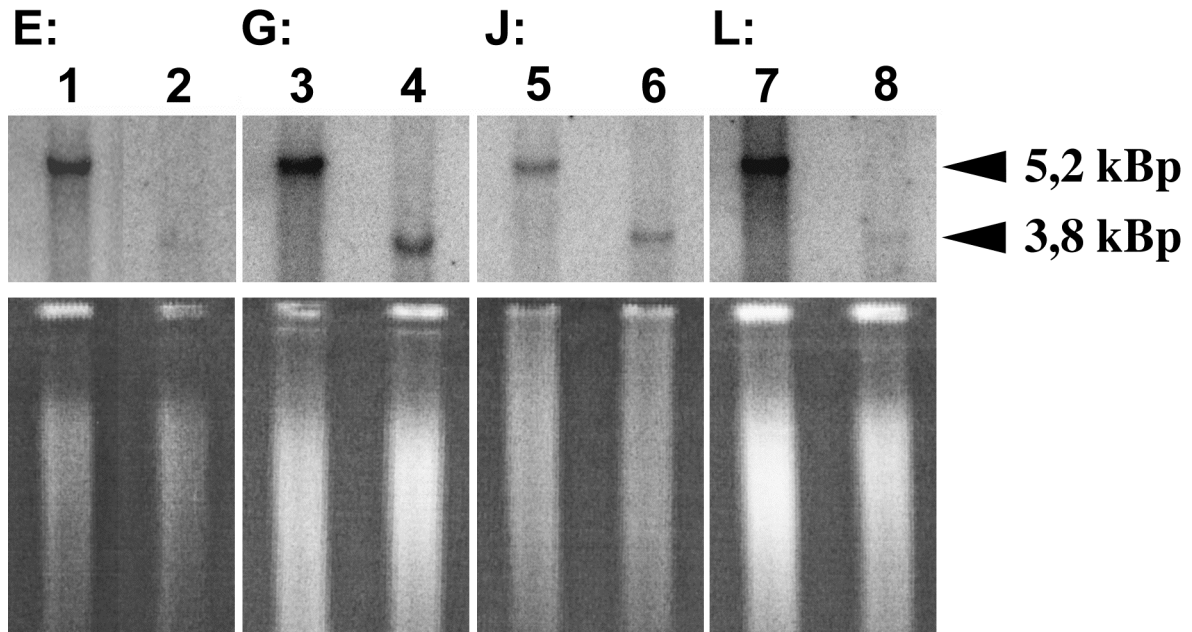


Abb. 3.10: Southern-Blot zum Nachweis der Cre-vermittelten Rekombination

Einfach MMP-14 transgenen Tieren und doppelt MMP-14/Nestin-Cre transgenen Tieren der Linien E, G, J und L wurden die Leber entnommen und hieraus genomische DNA gewonnen. Diese wurde mit Hind III verdaut und für einen Southern-Blot eingesetzt. Als Sonde diente ein 2 Kilobasenpaare langes Sma I/Hind III-Fragment der Konstrukt-DNA, welches außerhalb der beiden *LoxP*-Sites lag. Für nicht Cre-rekombinierte DNA wurde ein Signal von 5,2 kBp und für Cre-rekombinierte DNA ein Signal von 3,8 kBp erwartet. In den Spuren 1, 3, 5 und 7 wurde jeweils die Hind III verdaute genomische DNA einfach MMP-14 transgener Tiere und in den Spuren 2, 4, 6 und 8 die Hind III verdaute genomische DNA MMP-14/Nestin-Cre doppelt transgener Tiere aufgetragen. Die einfach transgenen Tiere zeigen ein Signal in Höhe von 5,2 kBp und die doppelt transgenen Tiere ein meist schwächeres in Höhe von 3,8 kBp.

Um zu überprüfen ob sich in Geweben, in denen der Albuminpromotor aktiv ist, nicht rekombinierte Vektorkopien finden, wurden Kryoschnitte von Blase, Harnleiter und Leber doppelt transgener Tiere angefertigt und diese X-Gal gefärbt. Entsprechend den Ergebnissen der Southern-Analysen, zeigten doppelt transgene Tiere keine detektierbare β -Galaktosidase-Expression (Abb. 3.11).

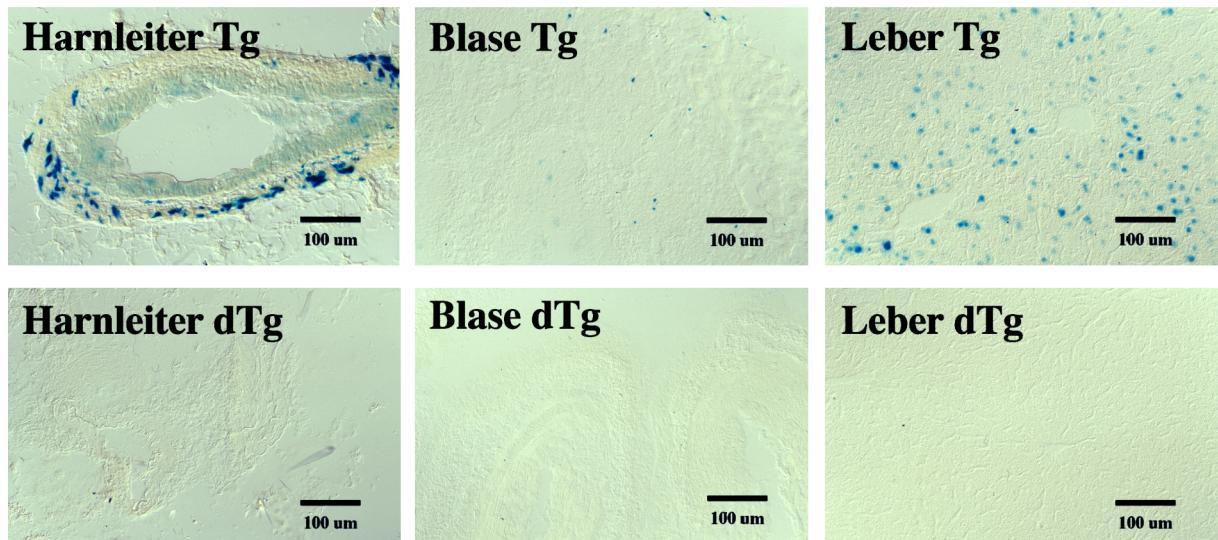


Abb. 3.11: Nachweis der Cre-vermittelten Rekombination durch Verlust der β -Galaktosidaseexpression

Von einem einfach MMP-14 transgenen (TG) und einem doppelt MMP-14/Nestin-Cre transgenen (dTG) Tier der Linie G wurden Kryoschnitte von Harnleiter, Blase und Leber angefertigt. Anschließend wurden die Schnitte X-Gal gefärbt. Die deutliche Blaufärbung von Zellkernen in den hier untersuchten Geweben von einfach transgenen Tieren ist bei doppelt transgenen Tieren vollständig verschwunden.

3.2.4 MMP-14-mRNA-Expression

Der Nachweis der MMP-14-Überexpression erfolgte durch Northern-Analyse von RNA aus Lebergewebe von einfach MMP-14-transgenen und doppelt MMP-14/Nestin-Cre transgenen Tieren der Linien E, G, J und L. Als Sonde diente die MMP-14-cDNA, welche mit Srf I und Sal I aus dem Vektor pBK-MMP-14 ausgeschnitten wurde. Es konnte bei doppelt transgenen Tieren ein Produkt mit der erwarteten Größe von ca. 1.9 kB gezeigt werden. Bei einfach MMP-14 transgenen Tieren war auf diese Weise weder eine endogene, noch eine transgene MMP-14-mRNA-Expression nachweisbar. Auch war die Expression nur für alle doppelt transgenen Tiere der Linie G nachweisbar. Bei doppelt transgenen Tieren der Linien E, J und L war nur bei einzelnen Tieren eine MMP-14-mRNA-Expression nachweisbar. Außerdem war sie bei doppelt transgenen Tieren der Linie G erheblich stärker als bei doppelt transgenen Tieren anderer Linien. (Abb. 3.12).

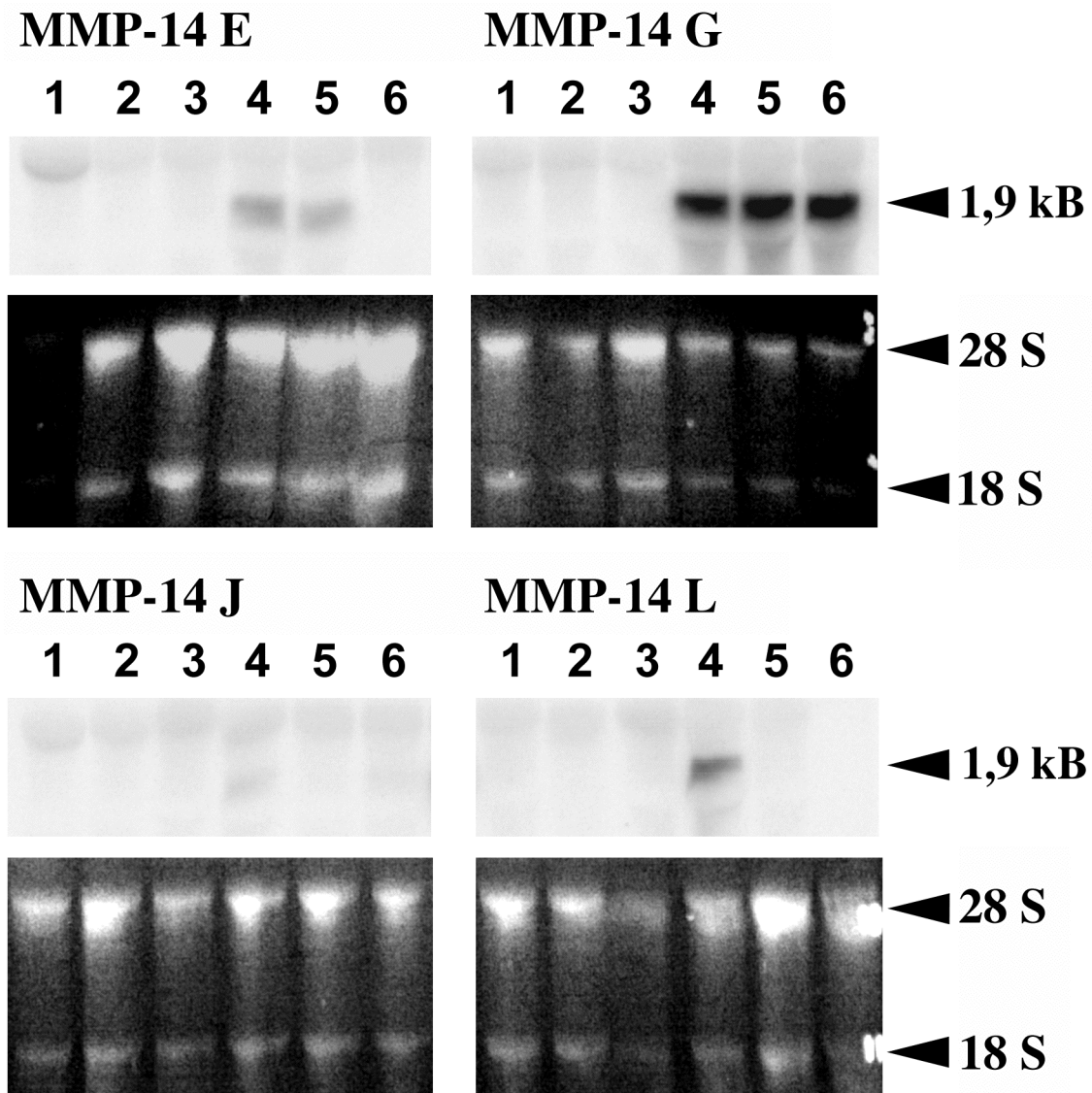


Abb. 3.12: Northern-Blot zum Nachweis der Überexpression von MMP-14-mRNA

Gesamt-RNA wurde aus Lebergewebe aufgereinigt und für einen Northern-Blot eingesetzt. Als Sonde diente MMP-14-cDNA, welche auch zur Herstellung der Konstrukt-DNA verwendet wurde. In der oberen Hälfte jedes Teilbildes ist jeweils das Northern-Signal in Höhe von ca. 1,9 kB und in der unteren Hälfte als Ladekontrolle ein Foto des Agarosegels abgebildet. Dieses zeigt die 18 S und 28 S ribosomale RNA-Bande. In den Spuren 1, 2 und 3 wurde jeweils die RNA einfach MMP-14 transgener und in den Spuren 4, 5 und 6 jeweils die RNA doppelt MMP-14/Nestin-Cre transgener Tiere der Linien E, G, J und L aufgetragen. Nur für doppelt transgene Tiere der Linie G ließ sich für alle Tiere ein Signal der richtigen Größe nachweisen.

3.2.5 MMP-14-Protein-Expression

Der Nachweis der MMP-14-Proteinexpression wurde indirekt über den spezifischen Nachweis der proteolytischen Aktivität von MMP-14 erbracht. Hierzu wurde ein MMP-14 Activity-Assay verwendet. Die Bestimmung der MMP-14 Aktivität erfolgte durch Messung

der Absorptionsänderung eines künstlichen Substrates. Dieses absorbiert nach proteolytischer Spaltung Licht mit einer Wellenlänge von 405 nm.

Lebergewebe von einfach MMP-14 bzw. Nestin-Cre transgenen, doppelt MMP-14/Nestin-Cre transgenen Tieren der Linien E, G, J und L und Wildtyptieren wurde im hierfür vorgesehenen Puffer homogenisiert. Das Experiment wurde dreimal nacheinander in getrennten Ansätzen mit jeweils drei Tieren pro Gruppe durchgeführt. Eine Spaltung des künstlichen Substrates und somit eine MMP-14 Aktivität konnte nur für doppelt transgene Tiere der Linie G nachgewiesen werden. Für alle anderen Tiere ließ sich keine MMP-14 Aktivität nachweisen. Dies galt für alle drei Experimente (Abb. 3.13).

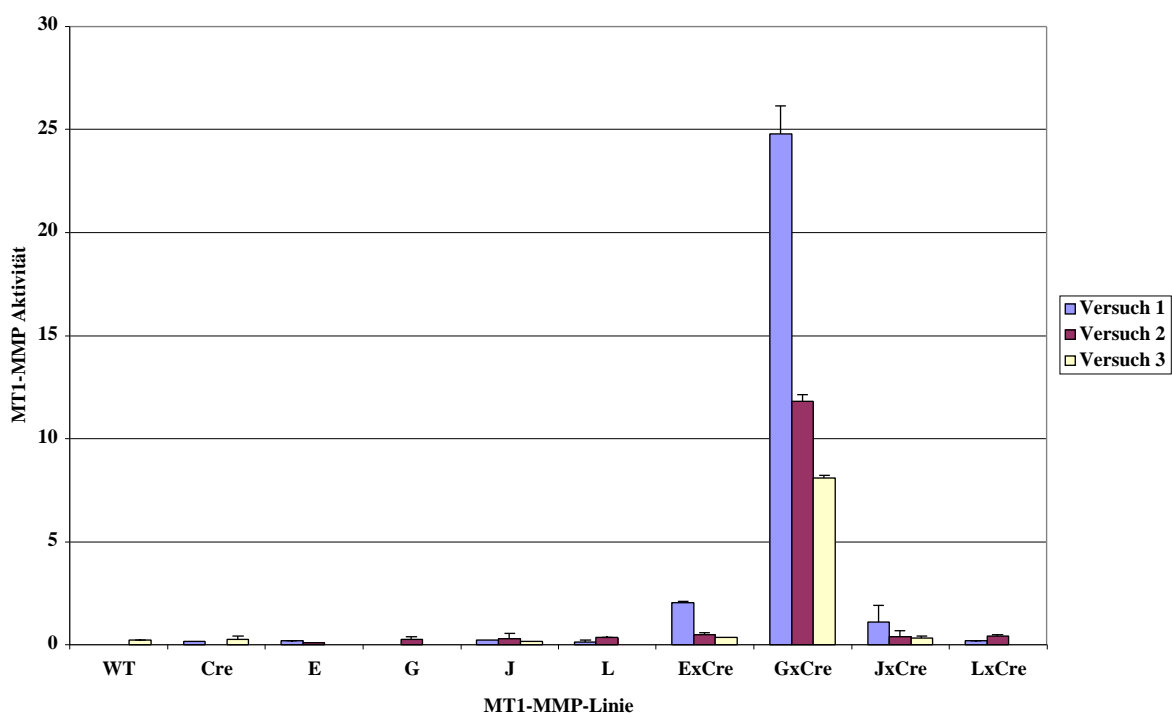
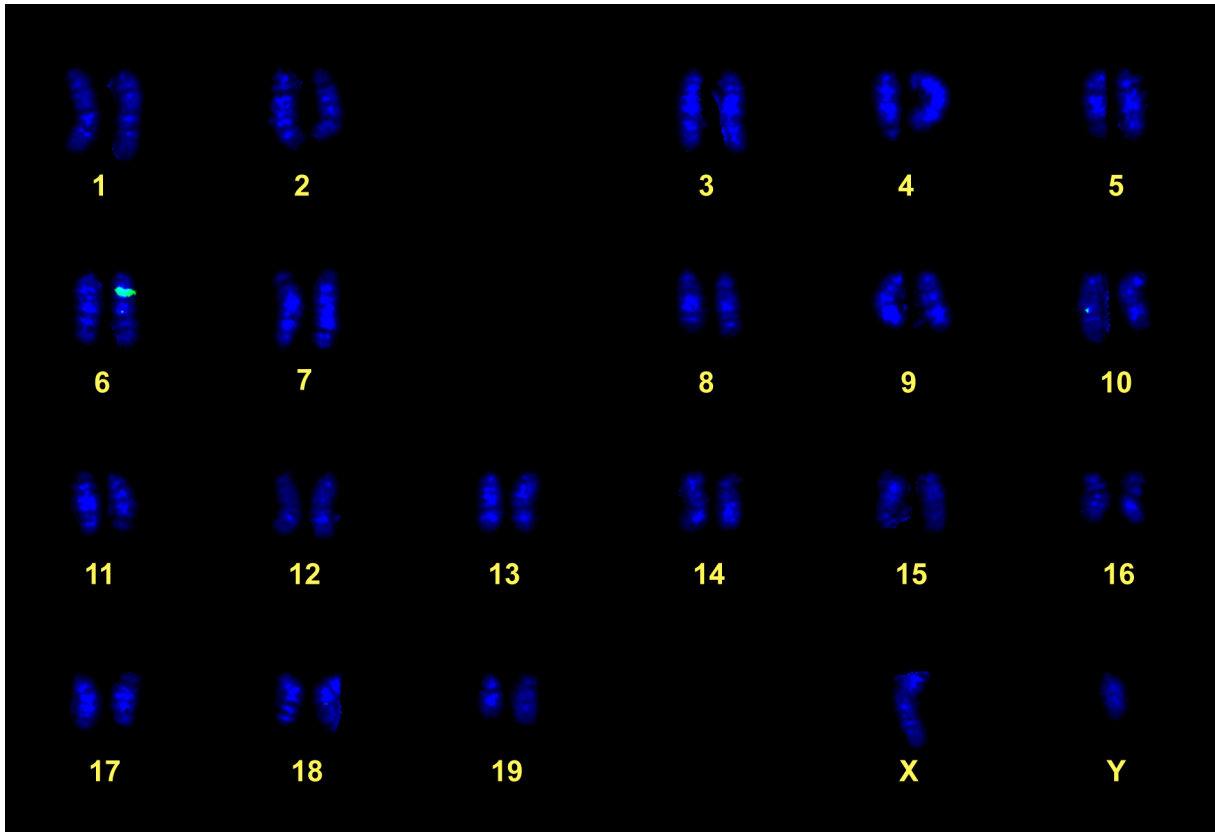


Abb. 3.13: Nachweis der MMP-14-Aktivität

Zum Nachweis der MMP-14-Aktivität wurde ein MMP-14-activity-assay verwendet. Untersucht wurden Wildtyptiere, Nestin-Cre bzw. MMP-14 transgene Tiere und doppelt MMP-14/Nestin-Cre transgene Tiere der Linien E, G, J und L. Es wurden drei unterschiedliche Experimente, mit jeweils neuen Leberproben von drei Tieren je Gruppe durchgeführt. Die Proteine wurden mit MMP-14-Extraktionspuffer aus den Leberproben isoliert und in den Assay eingesetzt. Die Nachweisgrenze des Assays lag bei einer Aktivität von drei, nach Umrechnung der Absorption in imaginäre Einheiten. In allen drei Experimenten ließ sich eine deutliche MMP-14-Aktivität für die doppelt transgenen Tiere der Linie G nachweisen. Für alle anderen Gruppen ließ sich in keinem Experiment eine MMP-14-Aktivität nachweisen.

3.2.6 Integrationsort

Wenn es mehrere Integrationsorte auf einem oder mehreren Chromosomen gibt kann es durch die Cre-rekombination zu Crossing-over-Ereignissen oder Chromosomenaberrationen

**Abb. 3.14: Bestimmung des Integrationsortes durch FISH**

Metaphasechromosomen aus Milzzellen eines einfach transgenen Tieres der Linie MMP-14 G wurden mit einer transgenspezifischen, fluoreszenzmarkierten Sonde hybridisiert und mit DAPI gegengefärbt. Die Sonde wurde aus dem IAL-Vektor ausgeschnitten und enthielt lediglich den Bakteriellen *LacZ*-Anteil des Vektors. Es ist nur ein Integrationsort nachweisbar. Dieser liegt auf Chromosom 6. (Die Abbildung wurde freundlicherweise von Dr. B Großmann und Dr. U. Zechner zur Verfügung gestellt)

kommen. Hierdurch kann ein Phänotyp vorgetäuscht werden, der völlig unabhängig von der Überexpression von MMP-14 ist. Da die Linie MMP-14 G die einzige war, für die nach Cre-vermittelter Rekombination eine MMP-14-Aktivität nachgewiesen werden konnte, wurde für diese der Integrationsort des Transgens bestimmt. Hierzu wurde freundlicherweise von Dr. B. Großmann und Dr. U. Zechner am Institut für Humangenetik der Uniklinik Mainz, eine Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) durchgeführt. Milzzellen eines einfach MMP-14 transgenen Tieres der Linie G wurden kultiviert, mit Colchicin behandelt und ausgespreizt. Als Sonde diente ein transgenspezifisches 3255 Basenpaare langes Sma I/Hind III-Fragment, aus dem IAL-Vektor, welches die *LacZ*-Kassette umfasste. Die Integration des Transgens konnte so auf dem Chromosom 6 in der Nähe des Centromers festgelegt werden. Außerdem konnte eine Mehrfachintegration an unterschiedlichen Stellen eines Chromosoms oder auf unterschiedlichen Chromosomen nahezu ausgeschlossen werden (Abb. 3.14).

3.2.7 Biologische Aktivität überexprimierter MMP-14

Bisher wurde die proteolytische Aktivität der überexprimierten MMP-14 nur über den Umsatz eines künstlichen Substrates nachgewiesen. Dies lässt aber noch keine zwingenden Rückschlüsse über die eigentliche biologische Aktivität der transgenen MMP-14 zu. Von MMP-2 und MMP-13 ist bekannt, dass sie Substrate von MMP-14 sind und *in vitro* von dieser aktiviert werden können. Von MMP-2 ist außerdem bekannt, dass sie auch *in vivo* von MMP-14 aktiviert wird. MMP-2 kann somit zum Nachweis der biologischen Funktionalität der transgenen MMP-14 dienen. Außerdem können so die *in vitro* Befunde für MMP-13 *in vivo* bestätigt werden.

3.2.7.1 Induktion der MMP-2 Aktivität

Der Nachweis der MMP-2 Aktivität erfolgte, analog zum Nachweis von MMP-14 in einem Activity-Assay. Auch hier wurde der Umsatz eines künstlichen Substrates gemessen. Dieser ist in diesem Fall MMP-2 spezifisch. Das künstliche Substrat absorbiert nach proteolytischer Spaltung Licht bei 405 nm. Die Bestimmung der MMP-2 Aktivität erfolgte durch Messen der Absorptionsänderung bei 405 nm.

Lebergewebe von einfach MMP-14 bzw. Nestin-Cre, doppelt MMP-14/Nestin-Cre transgenen Tieren der Linien E, G, J und L und Wildtyptieren wurde in MMP-2-Assaypuffer homogenisiert und das Homogenat nach Angaben des Herstellers in den Assay eingesetzt. Für doppelt transgene Tiere der Linie G konnte eine deutliche Aktivierung von MMP-2 nachgewiesen werden. Bei doppelt transgenen Tieren der Linie J sieht man zwar eine leichte Erhöhung der MMP-2 Aktivität, diese liegt aber an der Nachweisgrenze des Assays. Weder für Cre-transgene Tiere noch für einfach MMP-14 transgene Tiere der Linie G oder doppelt transgene Tiere der Linien E und L ließ sich eine MMP-2 Aktivität nachweisen (Abb. 3.15).

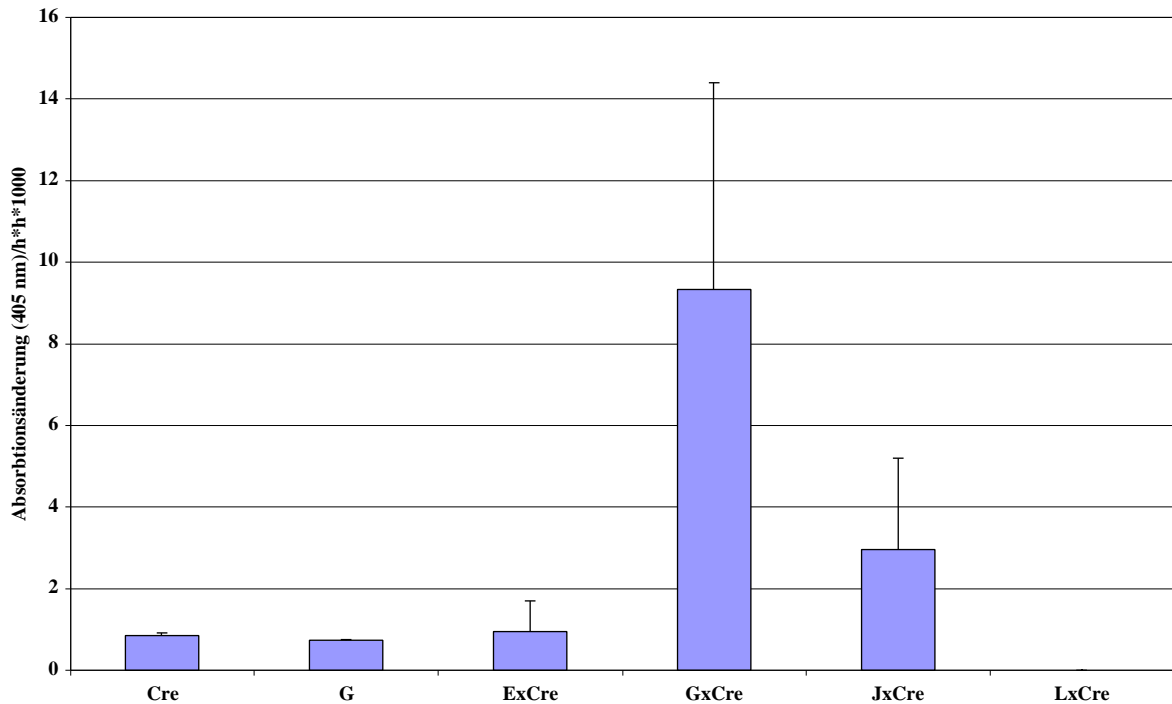


Abb. 3.15: Induktion der MMP-2-Aktivität

Mit Gewebeproben von Lebergewebe einfach Nestin-Cre oder MMP-14 transgener und doppelt MMP-14/Nestin-Cre transgener Tiere der Linien E, G, J und L wurde ein MMP-2-activity-assay durchgeführt. Für doppelt transgene Tiere der Linie G ließ sich eine deutliche Zunahme der MMP-2-Aktivität zeigen.

3.2.7.2 Induktion der MMP-13 Aktivität

Der Nachweis der MMP-13 Aktivierung geschieht auch in diesem Fall durch einen Activity-Assay. Dieser funktioniert nach dem selben Prinzip wie die Activity-Assays für MMP-14 und MMP-2 und ist für MMP-13 spezifisch. Es wurde Lebergewebe von einfach MMP-14 bzw. Nestin-Cre transgenen und doppelt MMP-14/Nestin-Cre transgenen Tieren der Linien E, G, J und L in MMP-13 Assaypuffer homogenisiert. Eine Zunahme der MMP-13 Aktivität konnte nur für doppelt transgene Tiere der Linie G nachgewiesen werden. Bei einfach transgenen ließ sich keine MMP-13 Aktivität zeigen. Auch bei doppelt transgenen Tieren der Linien E, J und L war keine MMP-13 Aktivität detektierbar (Abb. 3.16).

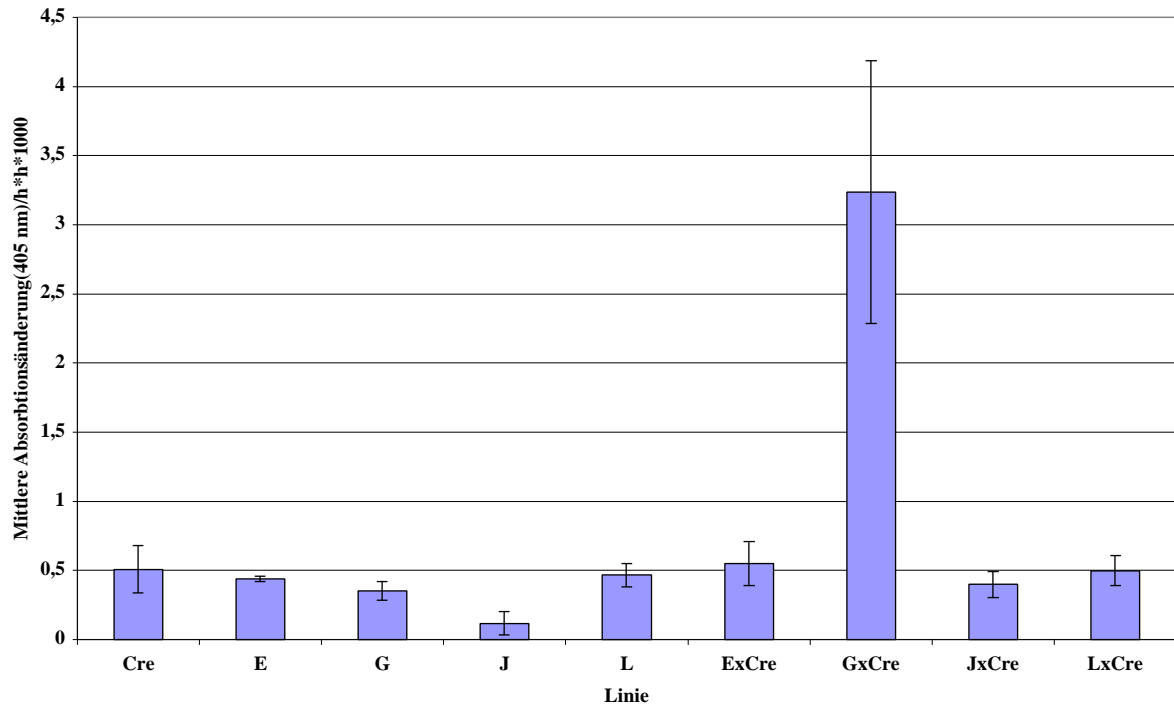


Abb. 3.16: Induktion der MMP-13-Aktivität

Mit Gewebeproben von Lebergewebe einfach Nestin-Cre oder MMP-14 transgener und doppelt MMP-14/Nestin-Cre transgener Tiere der Linien E, G, J und L wurde ein MMP-13-activity-assay durchgeführt. Für doppelt transgene Tiere der Linie G ließ sich eine deutliche Zunahme der MMP-13-Aktivität zeigen.

3.2.8 Lebergewicht

Um zu untersuchen, ob eine Überexpression von MMP-14 einen Einfluss auf die Lebergewebshomöostase hat, wurden jeweils 5 einfach MMP-14 und 5 doppelt MMP-14/Nestin-Cre transgene Tiere der Linien E, G, J und L zunächst gewogen und dann geopfert. Nach Entnahme der Leber wurde diese ebenfalls gewogen. Hieraus wurde ein Quotient des Lebergewichtes im Verhältnis zum Gesamtgewicht des Tieres in Prozent gebildet. Die Leber wog ungefähr 4,5 % des Gesamtkörpergewichts der Maus. Es zeigten sich bei keiner Linie signifikante Unterschiede zwischen einfach und doppelt transgenen Tieren. Auch zwischen den Linien bestanden keine Unterschiede im Verhältnis des Lebergewichts zum Körpergewicht (Abb. 3.17).

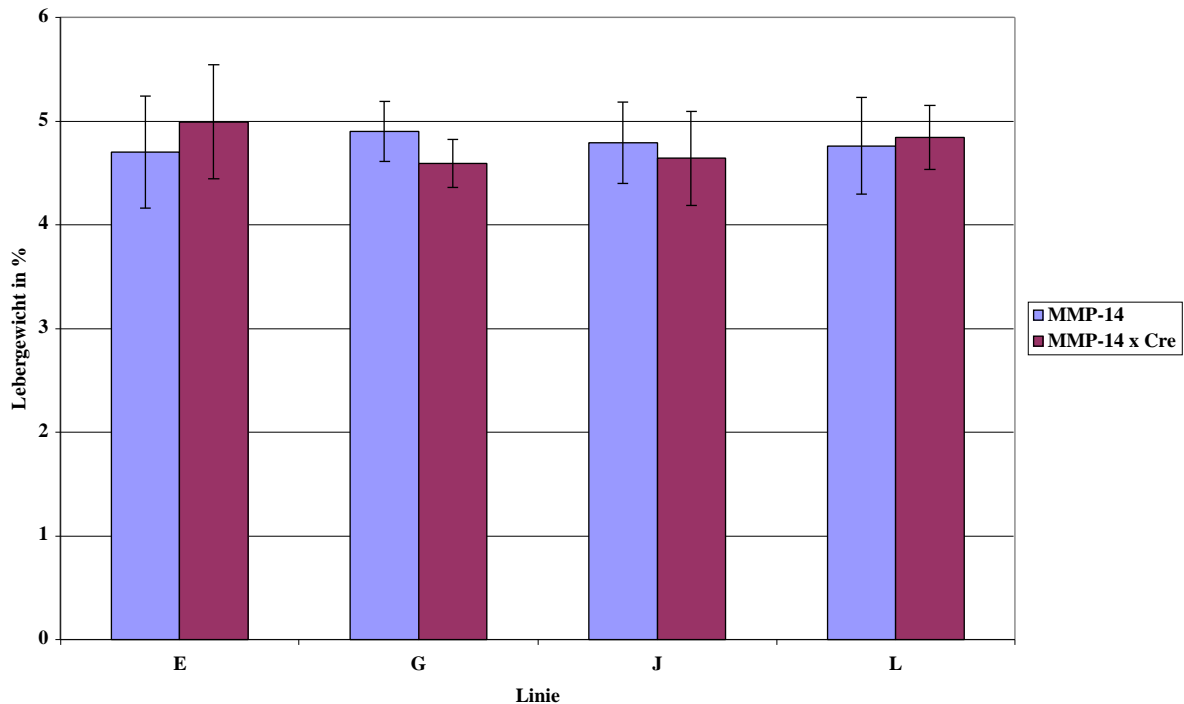


Abb. 3.17: Lebergewicht MMP-14 überexprimierender Tiere

Pro Gruppe wurden jeweils fünf Tiere gewogen und dann das Gewicht der anschließend entnommenen Leber bestimmt. Aus Leber- und Gesamtkörpergewicht wurde der Quotient in Prozent gebildet. Das Lebergewicht betrug etwa 4,5 % des Gesamtkörpergewichts der jeweiligen Maus. Es bestanden keinerlei signifikanten Unterschiede zwischen einfach MMP-14 transgenen und doppelt MMP-14/Nestin-Cre transgenen Tieren der Linien E, G, J und L. Auch zwischen den einzelnen Linien bestanden keine Unterschiede beim Lebergewicht.

3.2.9 Histologie der Leber

Zur Untersuchung der Leberhistologie wurden Paraffinschnitte von jeweils drei, 12 Wochen alten, einfach MMP-14 transgenen und zum Vergleich doppelt MMP-14/Nestin-Cre transgenen Tieren der Linien E, G, J und L angefertigt und Hämalaun-Eosin (HE) gefärbt. Es konnten keine Leberpathologica in Bezug auf Architektur, Proliferation, Apoptose und Nekrosen bei den doppelt transgenen Tieren gefunden werden. Auch im Vergleich zu einfach transgenen Tieren zeigten sich keine Unterschiede in der Histologie der Leber (Abb. 3.18).

Außerdem wurden Leberproben dieser Tiere zur Untersuchung an Herrn Prof. Dr. Schirmacher am Institut für Pathologie in Köln geschickt. Neben einer allgemeinen Untersuchung anhand von HE-Färbungen auf Apoptose, Proliferation, Nekrosen und Architekturveränderungen wurden die Proben nach Gomori gefärbt um speziell auf Kollagenfaserablagerungen untersucht zu werden. Auch in Bezug auf Kollagenfaserablagerungen war keine der Proben auffällig. Weder die Lebern der einfach

MMP-14 transgenen noch die Lebern der doppelt transgenen Tiere der Linien E, G, J und L waren fibrotisch.

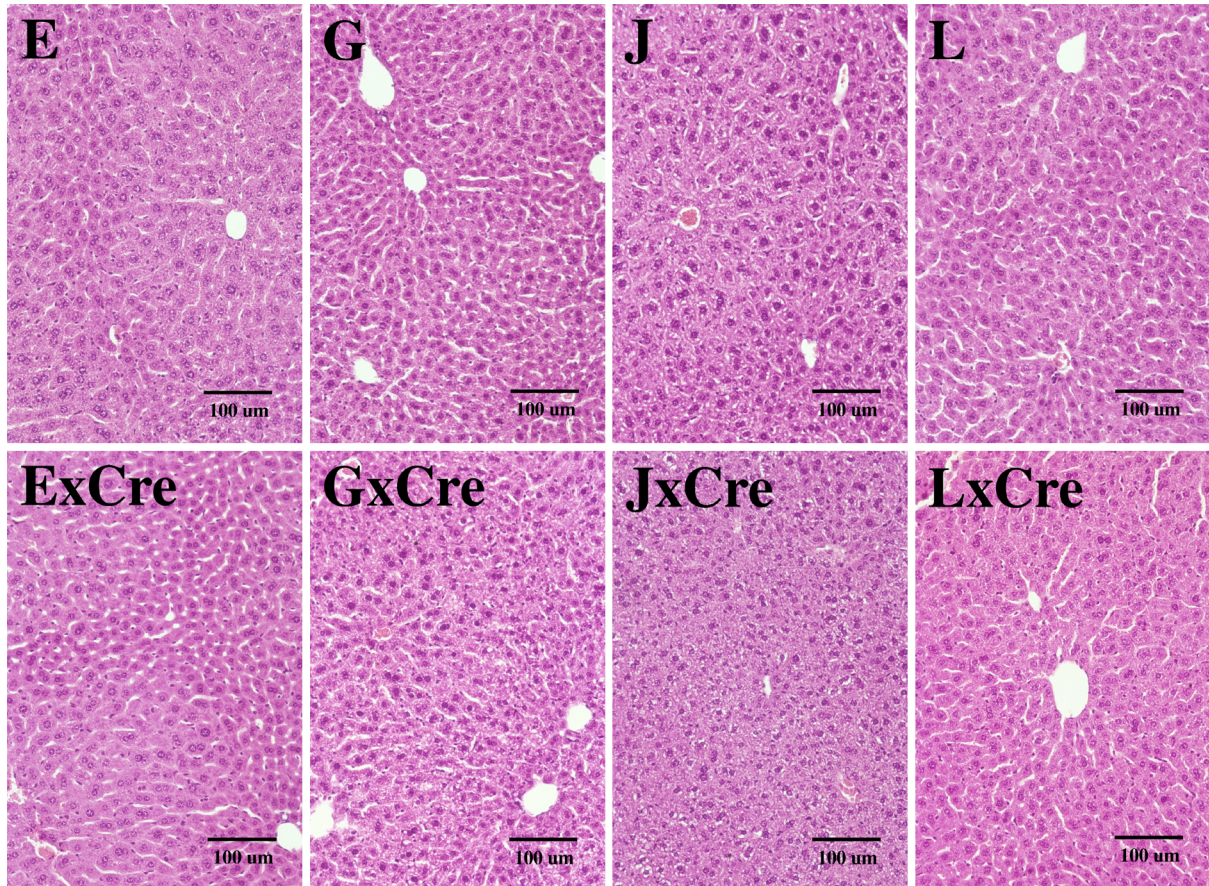


Abb. 3.18: Histologische Untersuchung MMP-14 überexprimierender Tiere

Leberschnitte von einfach MMP-14 und doppelt MMP-14/Nestin-Cre transgenen Tieren der Linien E, G, J und L wurden HE-gefärbt und histologisch untersucht. Hier ließen sich in keiner Gruppe Auffälligkeiten finden.

3.3. Charakterisierung MMP-2 transgener Mäuse

3.3.1 Founder

Durch Mikroinjektion der MMP-2-Vektor-DNA konnten acht transgene Foundertiere (MMP-2 A, B, ..., H) generiert werden, mit denen sich vier transgene Linien (MMP-2 B, F, G und H) züchten ließen. Die Genotypisierung der Tiere erfolgte durch PCR, wobei der sense Primer (MMP-2) im 3'-Bereich der MMP-2-cDNA liegt und der antisense Primer (pA-revII) im Polyadenylierungssignal des humanen Wachstumshormons (Primer siehe: 2.1.5.11). Transgene Tiere konnten durch eine Bande von 822 Basenpaaren identifiziert werden (Abb. 3.19).

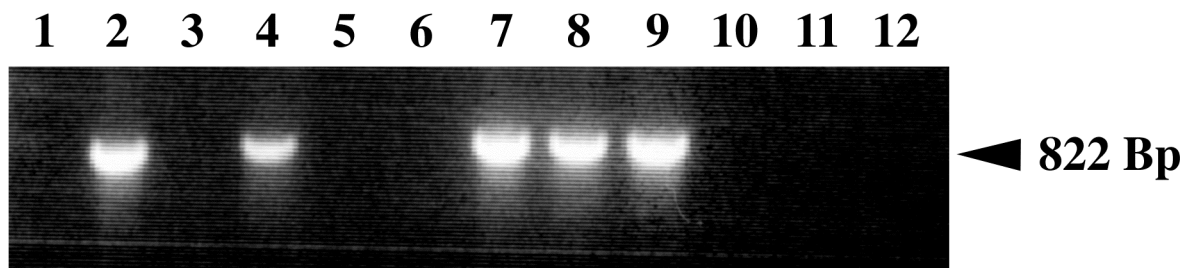


Abb. 3.19: PCR zur Bestimmung MMP-2 transgener Tiere

Zur Identifizierung MMP-2-transgener Nachkommen wurden Ohrbiopsien vier Wochen alter Tiere mit Proteinase K verdaut und als Template für eine transgenspezifische PCR eingesetzt. Bei Verwendung der Primer, MMP-14 und pA-revII, konnten transgene Tiere durch eine Bande von 822 Basenpaaren identifiziert werden. Die Abbildung zeigt die Analyse eines typischen, einfach MMP-2 transgenen Wurfs. Die Tiere 2, 4, 7, 8 und 9 waren transgen.

3.3.2 Rekombination

3.3.2.1 Rückkreuzungen mit Wildtyp- und Actin-Cre Tieren

Im Gegensatz zu den MMP-14 Tieren wurden die MMP-2 Tiere für die Cre-vermittelte Rekombination nicht mit Nestin-Cre sondern mit Actin-Cre Mäusen verpaart. Auch hierbei handelte es sich um einen Cre-Deleterstamm, der aber den Vorteil hatte, dass die Tiere den gleichen genetischen Hintergrund (FVB/NHSD) wie die MMP-2 Tiere hatten. Heterozygote Tiere der Linien MMP-2 B, F, G und H wurden entweder mit Wildtyptieren oder mit homozygoten Actin-Cre Effektormäusen verpaart. Die Genotypisierung erfolgte durch die gleiche PCR, welche auch zur Bestimmung der Foundertiere diente. Da das PCR-Produkt außerhalb der LoxP-Sequenzen amplifiziert wird, wurde auch im Falle einer Cre-vermittelten Rekombination bei MMP-2 transgenen Tieren ein Signal von 822 Basenpaaren erwartet. Cre-transgene Tiere wurden mittels PCR mit dem Primerpaar Cre Ia/Cre Iib (Primer siehe:

2.1.5.16) durch ein PCR-Produkt von 308 Basenpaaren identifiziert (Abb. 3.20). Für MMP-2/Actin-Cre doppelt transgene Tiere wurde bei beiden Reaktionen ein entsprechendes Produkt erwartet.

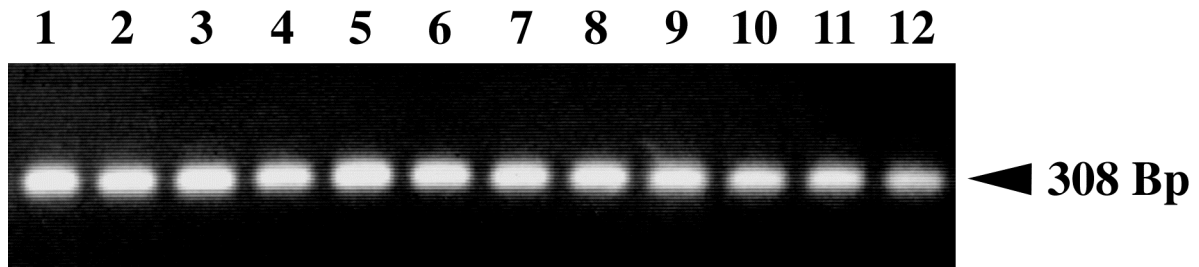


Abb. 3.20: PCR zur Bestimmung Actin-Cre transgener Tiere

Zur Identifizierung Aktin-Cre transgener Nachkommen wurden den Tieren zunächst Ohrbiopsien entnommen. Diese wurden mit Proteinase K verdaut und als Template für eine PCR angesetzt. Durch Verwendung der Cre-spezifischen Primer, Cre Ia und Cre IIb, konnten transgene Tiere durch eine Bande von 308 Basenpaaren identifiziert werden. Die Abbildung zeigt das Gel einer typischen PCR von Nachkommen nach Kreuzung der homozygoten Actin-Cre transgenen Tiere mit MMP-2 transgenen Tieren. Alle Nachkommen waren transgen für Actin-Cre.

Die Größe der Würfe wurde immer am Tag der Geburt gezählt. Bei Kreuzung mit Wildtyptieren waren die Würfe etwa 8-10 Tiere stark. Nach Kreuzung von MMP-2 transgenen Tieren der Linien B, F, G und H mit homozygoten Actin-Cre Mäusen war die Wurfgröße lediglich 4-5 Tiere. Dies lässt vermuten, dass die Cre-vermittelte Rekombination zu einem embryonal letalen Phänotyp führt. Bei den Wildtyprückkreuzungen waren erwartungsgemäß etwa 50 % aller Nachkommen in allen vier Linien MMP-2 transgen. Nach der Kreuzung von MMP-2 transgenen Tieren (Linien B, F, G und H) mit homozygoten Actin-Cre Mäusen waren alle Nachkommen transgen für Actin-Cre. Von den Nachkommen der Kreuzung der Linie MMP-2 F mit Actin-Cre Mäusen waren lediglich 3 von 98 Tieren doppelt transgen für MMP-2 und Actin-Cre, während von den Linien MMP-2 B, G und H keine doppelt transgenen Tiere geboren wurden. Die doppelt transgenen Tiere der Linie F waren äußerlich normal. Es wurden also für die Linien B, G und H keine und für die Linie F nur etwa 3% statt 50 % doppelt MMP-2/Actin-Cre transgene Nachkommen geboren.

3.3.2.2 Zeitpunkt der embryonalen Letalität

Zur Bestimmung des Zeitpunktes der embryonalen Letalität der Expression des MMP-2 Transgens nach Cre-vermittelter Rekombination wurden heterozygot MMP-2 transgene Tiere

(Linien B, F, G und H) erneut mit homozygoten Actin-Cre transgenen Tieren verpaart. Schwangere Weibchen wurden 6,5, 7,5, 8,5, 9,5, 10,5, 11,5 und 12,5 Tage post coitum (pc) geopfert und die Uteri entnommen. Es wurde die Anzahl der Dezidua und die Anzahl der Embryonen ermittelt. Bei den Dezidua handelt es sich um die Einnistungsorte der Blastozysten, sie enthalten also normalerweise jeweils einen Embryo. Ein leeres Dezidua ist also ein Anzeichen dafür, dass ein schon eingenisteter Embryo gestorben ist und resorbiert wurde. Das Dezidua wird erst verzögert resorbiert. Außerdem wurde für alle Embryonen eine MMP-2 spezifische PCR, mit dem oben beschriebenen Primerpaar MMP-2/pA-revII durchgeführt. Eine Cre-spezifische PCR wurde nicht durchgeführt, da die Muttertiere homozygot für Actin-Cre waren und somit alle Nachkommen heterozygot für Actin-Cre sein werden.

Die doppelt transgenen Embryonen der Linien B und H sterben zwischen Tag 6,5 pc und 7,5 pc und die Dezidua der gestorbenen Embryonen werden ab Tag 10,5 pc bei Linie B bzw. Tag 11,5 pc bei Linie H resorbiert. Ein Teil der doppelt transgenen Embryonen bei Linie F stirbt ebenfalls zwischen Tag 6,5 pc und Tag 7,5 pc, während einige bis Tag 12,5 pc überleben. Die doppelt transgenen Tiere der Linie G sind bis Tag 10,5 pc nicht letal. Es wird daher angenommen, dass die Bildung der leeren Dezidua (Dezidua entstammen maternalem Gewebe) bei der Einnistung von doppelt transgenen Embryonen induziert wurde, die kurz darauf verstorben sind (Abb. 3.21).

	d pc ⇒	6,5	7,5	8,5	9,5	10,5	11,5	12,5
B	Dezidua	10	12	13		10	8	2
	Embryonen	9 (4)	5 (0)	7 (0)		4 (0)	5 (0)	2 (0)
F	Dezidua	11	10	9	9	13	12	11
	Embryonen	10 (5)	7 (3)	9 (4)	6 (2)	11 (3)	9 (3)	8 (2)
G	Dezidua	11	11		13	13	11	
	Embryonen	11 (4)	9 (4)		12 (6)	12 (5)	10 (4)	
H	Dezidua	10	10	9	13	6		
	Embryonen	9 (4)	5 (0)	4 (0)	6 (0)	4 (0)		

Abb. 3.21 Zeitpunkt der embryonalen Letalität

Zur Bestimmung des Zeitpunktes der MMP-2-verursachten embryonalen Letalität wurden heterozygote MMP-2 transgene Mäuse mit homozygoten Actin-Cre transgenen Mäusen verpaart, und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Befruchtung (d pc) die Anzahl der Dezidua und der Embryonen bestimmt. Alle Embryonen waren wegen der homozygoten Actin-Cre Muttertiere transgen für Cre. In Klammern ist die Anzahl der MMP-2 transgenen Embryonen angegeben.

Die doppelt transgenen Embryonen der Linien B und H sind also zwischen Tag 4,5 pc (Zeitpunkt der Einnistung) und Tag 7,5 der Embryonalentwicklung letal, während die meisten doppelt transgenen Embryonen der Linie F erst nach 11,5 Tagen der Entwicklung sterben. Bei den doppelt transgenen Tieren der Linie G liegt der Zeitpunkt der Letalität nach Tag 12,5 der Embryonalentwicklung

3.3.2.3 Bestimmung der Cre-vermittelten Rekombination bei doppelt transgenen Embryonen

Der Versuch wurde mit den oben entnommenen 6,5 Tage alten Embryonen durchgeführt. Zur Bestimmung der Cre-vermittelten Rekombination wurde eine rekombinationspezifische PCR mit genomischer DNA ganzer Embryonen durchgeführt. Die Primer wurden so gewählt, dass nach Cre-vermittelter Rekombination das PCR-Produkt 389 Basenpaare lang war (Primer siehe: 2.1.5.12) (Abb. 3.22).

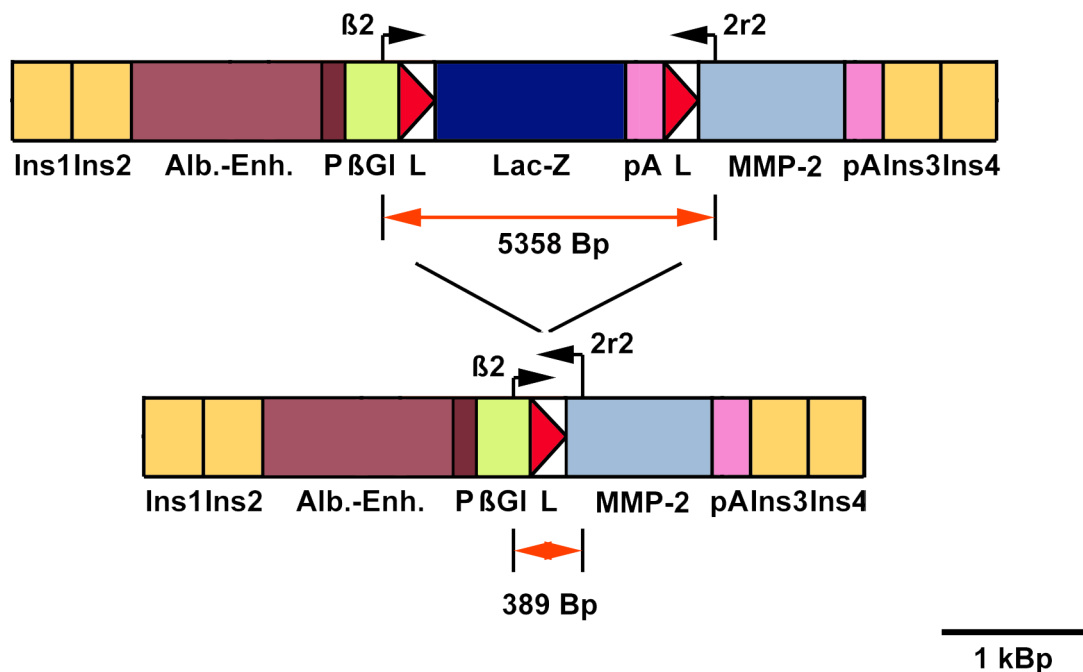


Abb. 3.22: Schema des PCR-Nachweises der Cre-vermittelten Rekombination

Unter Verwendung des Primerpaares $\beta 2/2r2$ würde sich für nicht rekombinierte DNA theoretisch ein Produkt von 5358 Basenpaaren. Nach Cre-vermittelter Rekombination wäre dieses nur noch 389 Basenpaare lang.

Ohne Rekombination wäre das PCR-Produkt über 5kbp groß und führte deshalb bei den hier gewählten PCR-Bedingungen zu keinem Produkt. Es konnte für alle doppelt transgenen Tiere

der vier MMP-2 transgenen Linien am Tag 6,5 pc eine Cre-vermittelte Rekombination nachgewiesen werden. (Abb. 3.23).

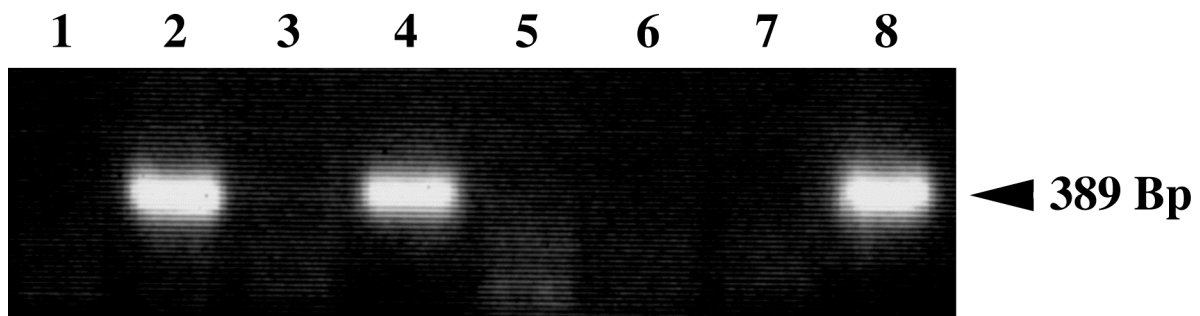


Abb. 3.23: PCR zum Nachweis der Cre-vermittelten Rekombination bei MMP-2 und Cre doppelt transgenen Tieren

Heterozygote MMP-2 transgene Tiere wurden mit homozygoten Actin-Cre transgenen Tieren verpaart und am Tag 6,5 pc der Embryonalentwicklung die Embryonen entnommen. Die Embryonen wurden mit Proteinase K verdaut und als Template für eine PCR mit dem rekombinationsspezifischen Primerpaar $\beta 2/2r2$ eingesetzt. Es wurde bei erfolgter Cre-vermittelter Rekombination ein PCR-Produkt mit einer Größe von 389 Basenpaaren erwartet. Für doppelt transgene Embryonen aller Linien konnte so eine Cre-vermittelte Rekombination nachgewiesen werden. Hier die doppelt transgenen Embryonen eines Cre transgenen Muttertieres, dass von einem MMP-2 transgenen Männchen der Linie F befruchtet war. Die Tiere 2, 3 und 8 waren MMP-2 transgen und bei ihnen hat eine Cre-vermittelte Rekombination der Konstrukt-DNA stattgefunden.

3.3.4 Nachweis der MMP-2-mRNA Expression durch RT-PCR

Zum Nachweis der Überexpression transgener MMP-2-mRNA nach Rekombination wurde eines der unter 3.3.2.1 beschriebenen doppelt transgenen Tiere der Linie MMP-2 F geopfert und RNA aus der Leber extrahiert.. Hiermit wurde unter Verwendung von oligo-dT Primern eine reverse Transkription durchgeführt. Mit dem so erhaltenen Produkt als Template wurde eine transgenspezifische PCR zum Nachweis von MMP-2-mRNA durchgeführt (Primer siehe: 2.1.5.13). Die amplifizierte Sequenz umfasste das humane β -Globin-Intron-2 des Konstruktes. Für eine korrekt gespleißte transgene MMP-2-mRNA wurde ein Produkt in der Größe von 419 Basenpaaren erwartet. Die transgenspezifische Expression von MMP-2-mRNA konnte so für ein adultes, MMP-2/Actin-Cre doppelt transgenes Tier der Linie F nachgewiesen werden (Abb. 3.24).

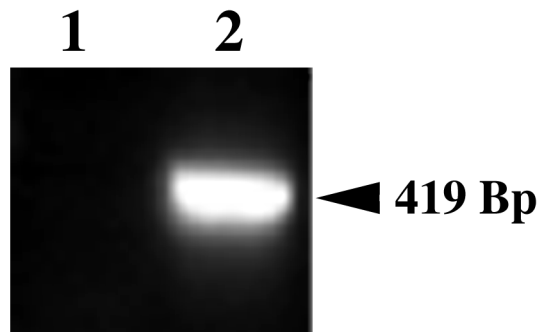


Abb. 3.24: RT-PCR zum Nachweis von MMP-2 mRNA

RNA wurde aus der Leber eines einfach MMP-2 transgenen und eines doppelt MMP-2/Actin-Cre transgenen Tieres der Linie MMP-2 F extrahiert. Hiervon wurde mit oligo dT Primern cDNA abgeschrieben. Zum Nachweis der transgenspezifischen MMP-2 mRNA Expression wurde anschließend eine PCR-Analyse durchgeführt. Die verwendeten Primer lagen im Exon 1 des humanen β -Globulintrons und in der cDNA von MMP-2 des Konstruktes. Nach korrektem „splicing“ wurde ein Produkt von 419 Basenpaaren erwartet. In Spur 1 war das PCR Produkt des einfach transgenen und in Spur 2 das PCR-Produkt des doppelt transgenen Tieres aufgetragen. Bei dem doppelt transgenen Tier sieht man eine Bande in der erwarteten Größe. Bei dem einfach transgenen Tier sieht man keine Bande.

3.3.5 Phänotyp von Embryonen mit rekombiniertem Transgen

3.3.5.1 Äußerliche Auffälligkeiten MMP-2 überexprimierender Embryonen

Untersucht wurde der Phänotyp doppelt MMP-2/Actin-Cre transgener Embryonen zwischen Tag 6,5 und 11,5 pc. Hierzu wurden homozygot Actin-Cre transgene Tiere mit heterozygoten MMP-2 transgenen Tieren der Linien B, F, G und H verpaart. Um bei der folgenden PCR zum Nachweis des MMP-2 Transgens falsch positive Signale durch maternale Verunreinigungen auszuschließen waren die Väter MMP-2 und die Mütter Cre transgen. Die Embryonen der Tage 6,5, 7,5 und 8,5 pc entsprachen den für den Rekombinationsnachweis verwendeten Embryonen. Alle Embryonen waren am Tag 6,5 unauffällig. Ab Tag 7,5 pc waren die doppelt transgenen Embryonen der Linien B und H resorbiert. Die doppelt transgenen Embryonen der Linien F und G waren bis zum Tag 10,5 pc äußerlich normal. Am Tag 11,5 post coitum fielen an den doppelt transgenen Embryonen der Linie F starke Deformationen im Kopfbereich auf. Die Regionen, die die telencephalischen Vesikel und das Dach des vierten Ventrikel überlagern waren stark abgeflacht. Außerdem traten paarige Auswüchse aus der das Telencephalon überlagernden Region hervor. Laterale und frontale nasale Primordien waren deformiert. Die anderen Bereiche der doppelt transgenen Embryonen waren äußerlich unauffällig (Abb. 3.25).

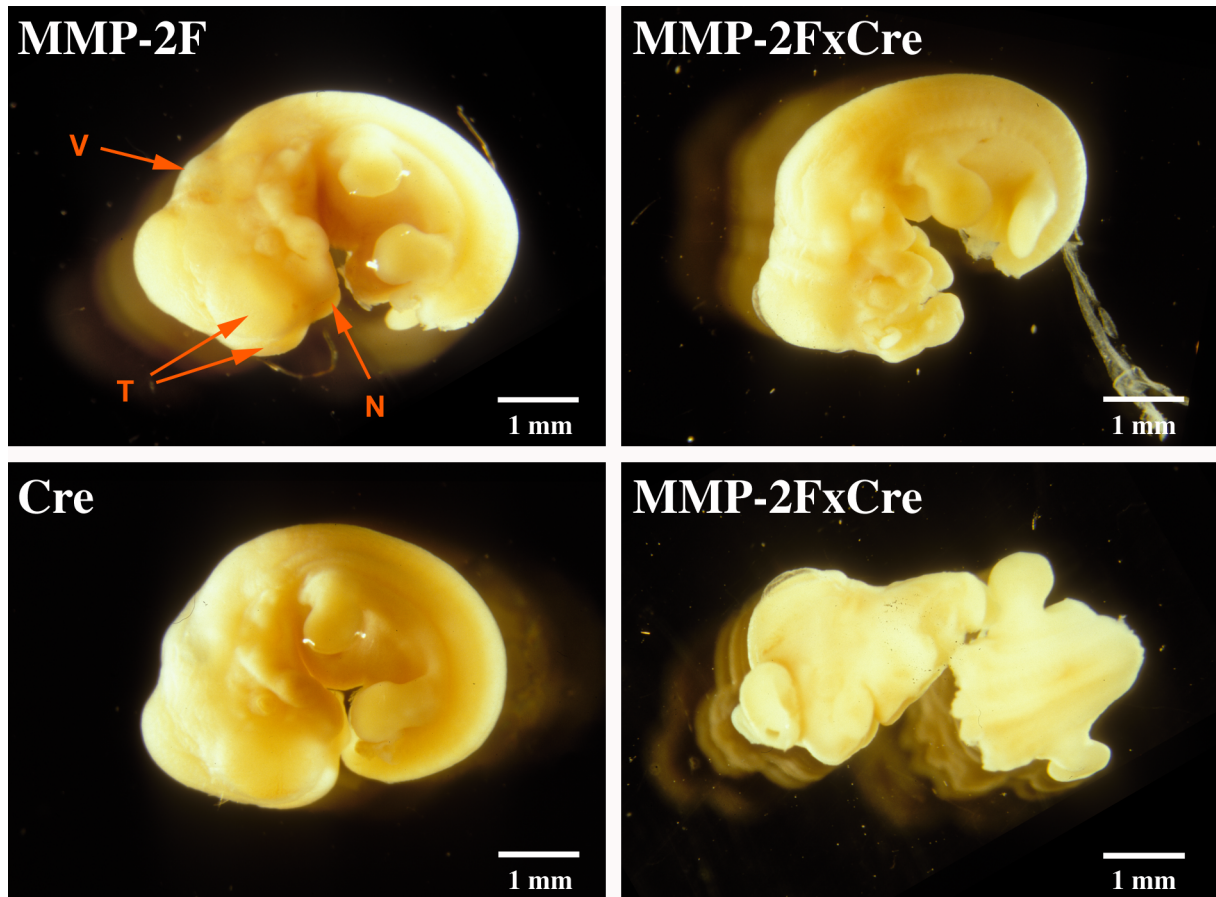


Abb. 3.25: MMP-2 Embryonen 11,5 Tage post coitum

Einfach Actin-Cre bzw. MMP-2 transgene und doppelt MMP-2/Actin-Cre transgene Embryonen wurde am Tag 11,5 der Embryonalentwicklung entnommen, von ihren extraembryonalen Hüllen befreit und fotografiert. Die einfach transgenen Embryonen waren normal. Doppelt transgene Embryonen hatten erhebliche Auffälligkeiten im Kopfbereich. Die Region, die den vierten Ventrikel überlagert (V) und die Regionen, die die telencephalischen Vesikel (T) überlagern waren stark abgeflacht. Laterale und frontale nasale Primordien waren deformiert (N). Außerdem hatten die Embryonen Auswüchse über den telencephalischen Vesikeln.

3.3.5.2 Histologische Veränderungen Cre-rekombinierter MMP-2 transgener Embryonen

Es wurden sagitale Paraffinschnitte eines einfach MMP-2 und eines doppelt MMP-2/Actin-Cre transgenen, 11,5 Tage alten Embryos der Linie MMP-2 F angefertigt. Diese wurden Hämalaun/Eosin gefärbt. Die Auswüchse vorne am Kopf eines der oben beschriebenen Cre-rekombinierten Tiere enthielten große Mengen neuralen Gewebes und waren in ihrem Innern hohl. Der Hohlraum eines Auswuchses stand jeweils mit dem Lumen des darunterliegenden telencephalischen Vesikels in Verbindung. Das Lumen des Mesencephalon war reduziert. Das Neuralgewebe kleidete bei doppelt transgenen Embryonen die innere Oberfläche der Vesikel

von Telencephalon und Mesencephalon nicht komplett aus. Hier wies das Neuralgewebe dorsal und ventral eine Lücke auf, die im posterioren Neuralrohr nicht mehr zu beobachten war (Abb.: 3.26).

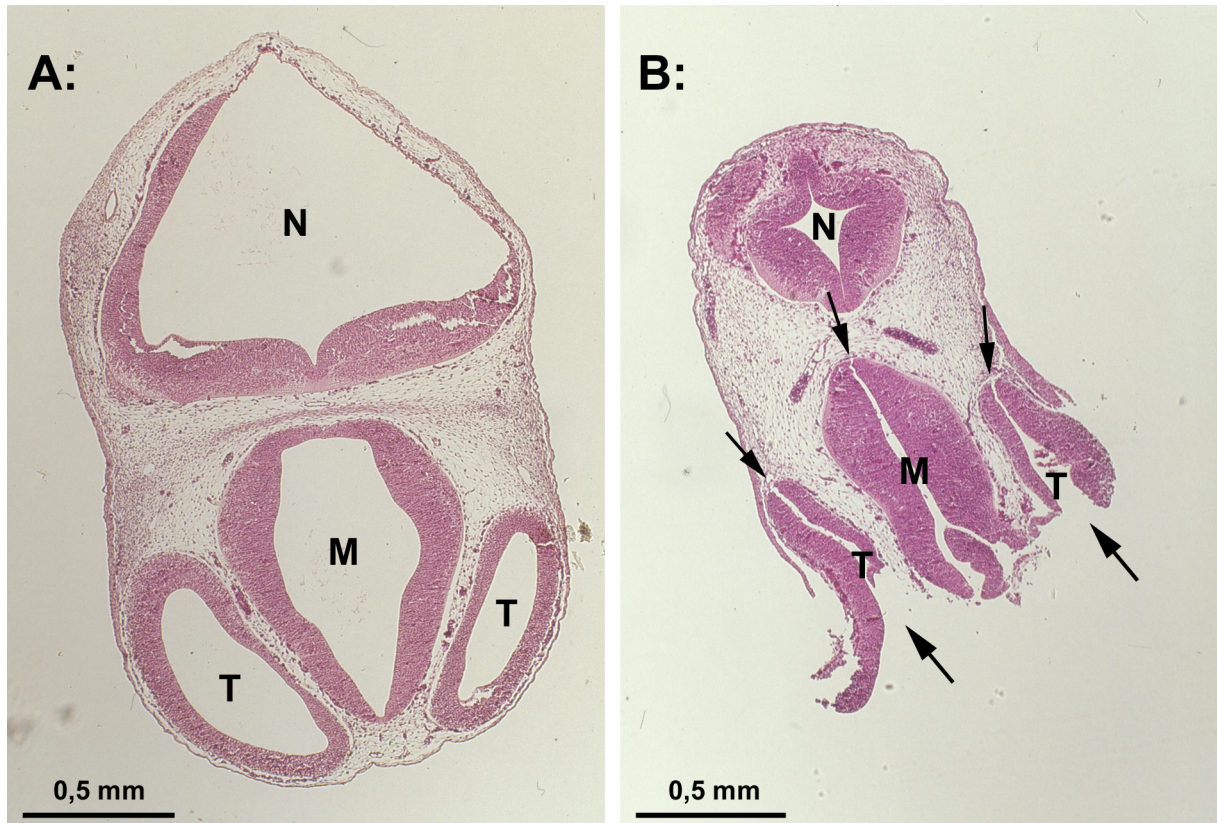


Abb. 3.26: Veränderungen im Kopfbereich MMP-2 überexprimierender Tiere der Linie F

Die Abbildungen zeigen Hämalaun/Eosin gefärbte Schnitte durch den Kopf von 11,5 Tage alten Embryonen der Linie MMP-2 F. A: zeigt ein einfach MMP-2 transgenes, B: ein doppelt MMP-2/Actin-Cre transgenes Tier. Die Lumina und das Neuralgewebe von Telencephalon (T) und Mesencephalon (M) sind in A: deutlich zu erkennen. B: zeigt, dass die Auswüchse der doppelt transgenen Embryonen hauptsächlich von Neuralgewebe gebildet wurden und mit den telencephalischen Vesikeln in Verbindung standen. Das Lumen des Mesencephalon scheint verringert. Die Pfeile zeigen Regionen in denen die Auskleidung der telencephalischen und mesencephalischen Vesikel mit Neuralgewebe unterbrochen war. Die telencephalischen Vesikel schienen dorsal offen zu sein.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von Matrix Metalloproteinasen auf die Entwicklung und die Gewebshomöostase der Leber studiert werden. Speziell sollte hier der Einfluss auf die Entstehung von Leberfibrose untersucht werden. Hierzu wurde ein Vektorsystem entwickelt, das die konditionelle Expression eines Transgens in Hepatozyten ermöglicht. Verwendet wurde der Albuminpromotor der Maus zusammen mit dem zugehörigen Albuminhancer sowie ein *LacZ*-Gen mit Lokalisierungssignal für den Nukleus als Reporter-gen, das später durch Cre-vermittelte Rekombination deletiert wird. Die Leberfibrose als Vorstufe von Leberzirrhose und hepatozellulären Karzinomen ist besonders in den afrikanischen und asiatischen Ländern von großem klinischem Interesse in denen jedes Jahr 100/100000 Menschen an einem hepatozelluläres Karzinom erkranken. Hierbei ist die Dunkelziffer hoch. In Europa sterben Jährlich über 2,5/100000 Menschen an einem hepatozellulären Karzinom (El-Serag and Mason 1999). Um den Einfluss von Matrix Metalloproteinasen auf das Wechselspiel zwischen Matrixablagerung und Matrixabbau zu untersuchen, wird die Entwicklung und Charakterisierung induzierbarer Systeme für die Expression von Transgenen in der Leber nützlich sein (Copp 1995; Kuhn, Schwenk et al. 1995).

Anhand dieses Systems sollte zum Einen die Rolle von MMP-2 untersucht werden, welches vor allem unter nicht pathologischen Bedingungen in der Leber vorkommende Matrixmoleküle abbaut. Zum Anderen sollte die Rolle von MMP-14 untersucht werden, welches MMP-2 und MMP-13 aktivieren kann als auch unter anderen die unter pathologischen Bedingungen in der Leber abgelagerten Kollagene I, II und III abbauen kann (Arthur 2000).

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind also einerseits in Hinsicht auf die Anwendbarkeit des entwickelten Vektorsystems an sich als auch im Hinblick auf die Effekte der Überexpression von MMP-2 und MMP-14 auf die Entwicklung und Gewebshomöostase der Leber zu betrachten.

4.1 Generierung transgener Mauslinien

Durch Mikroinjektion der IAL-MMP-2 Vektor-DNA konnten acht transgene Founder generiert werden aus denen vier transgene Linien gezüchtet werden konnten. Durch Mikroinjektion der IAL-MMP-14 Vektor-DNA konnten 13 transgene Foundertiere generiert werden aus denen neun transgene Linien gezüchtet werden konnten. Die transgenen Tiere zeigten zunächst keine sichtbaren Auffälligkeiten. Diese Tatsache erlaubt bereits einige

Aussagen über die Funktion des verwendeten Vektorsystems: Die Expression bakterieller *Lac-Z*-Sequenzen unter der Kontrolle des hier verwendeten Albuminpromotors wurde bisher nicht beschrieben. Außerdem enthielt das hier verwendete *LacZ*-Gen noch eine Peptidsequenz, die eine Lokalisierung der β -Galaktosidase im Nukleus bewirkt (nuclear localizing signal, NLS) (Fire, Harrison et al. 1990). In unserem Labor lagen bisher nur Daten über die Verwendung eines solchen NLS-*Lac-Z*-Gens in Keratinozyten der Basalschicht der Haut vor (Klopčič B, 2002). Da die vom *Lac-Z*-Gen kodierte β -Galaktosidase offensichtlich funktionstüchtig ist und im Nukleus angereichert wird, ist davon auszugehen, dass von ihr keinerlei feststellbare schädliche Wirkung ausgeht. Obwohl β -Globin 5'HS4-Insulatoren des Huhns und auch 3'HS1-Insulatoren des Menschen als Bestandteile von Vektoren für die Herstellung transgener Mäuse beschrieben sind (Potts, Tucker et al. 2000) (Klopčič B, 2002) lagen noch keine Erkenntnisse über die Verwendung humaner 3'HS1-Insulatoren zusammen mit dem murinen Albumin-Promotor vor. Die Tatsache, dass die transgenen Tiere phänotypisch zunächst unauffällig waren, deutet darauf hin, dass die verwendeten Insulatoren als Elemente von Expressionsvektoren nicht schädlich sind. Die Überexpression von MMP-2 bei doppelt MMP-2/Actin-Cre transgenen Tieren hat, wie im Ergebnisteil beschrieben, dramatische Effekte. Wenn man diese Effekte, die mit einer Deletion der 4 kBp großen *Lac-Z*-Kassette einhergehen, berücksichtigt, ist festzustellen, dass die räumliche Entfernung und die Anwesenheit einer Polyadenylierungssequenz hinter dem *Lac-Z*-Gen die MMP-2-cDNA im nicht rekombinierten Zustand weitgehend von der Transkription ausschließt. Bei X-Gal Färbungen von Leberschnitten MMP-14 transgener Linien wurde gezeigt, dass die transgenen Linien bezüglich der Expressionsstärke und Anzahl exprimierender Zellen beträchtlich variieren. Derartige Variationen in adulten Geweben sind auch bei Verwendung eines 5,2 kBp großen bovinen Keratin5-Promotorelements mit *Lac-Z* als Reportergen beschrieben (Ramirez, Bravo et al. 1994; Ramirez, Milot et al. 2001). Außerdem ist die Expression nicht auf die Leber beschränkt, sondern findet auch im Harnleiter und in Geweben der Blase statt (Schonrich, Kalinke et al. 1991).

Von neun hier beschriebenen MMP-14 transgenen Linien zeigten nur vier eine Expression des *Lac-Z*-Reportergens in den Nuklei von über 50% der Hepatozyten. Diese war gleichmäßig über die gesamte Leber verteilt. Potts und Kollegen beschrieben bei Verwendung der Insulatorensequenz des Huhns eine Verminderung in der Variation der Transgen-Expression zwischen den Linien (Potts, Tucker et al. 2000). Ob dies auch für die humanen Insulatorsequenzen gilt, kann hier nicht beurteilt werden, da keine transgenen Linien ohne diese Sequenzen zum Vergleich hergestellt wurden. Als Ursache für die verbleibende

beträchtliche Variation kommt ein von Ramirez und Kollegen diskutierter negativer Effekt der Lac-Z-Sequenz in Frage, dessen Einfluss durch die Insulatorsequenzen nicht kompensiert wird (Ramirez, Milot et al. 2001). Eine weitere beschriebene Eigenschaft des 5'HS4-Insulators des Huhns ist der Schutz vor ektopischer Expression durch Positionseffekte bei *Drosophila melanogaster* (Chung, Whiteley et al. 1993; Walters, Fiering et al. 1999). Hierzu ist festzustellen, dass bei der untersuchten Linie MMP-14 G eine erhebliche ektopische Expression des Reportergens im Harnleiter und in der Blase aufgetreten ist. Der humane 3'HS1-Insulator scheint nicht komplett vor Positionseffekten zu schützen.

Es gibt Berichte, dass der Integrationsort für die Stärke und Muster der Transgen-Expression wichtiger ist als die Anzahl der integrierten Kopien (Festenstein, Tolaini et al. 1996; Zhuma, Tyrrell et al. 1999; Ramirez, Milot et al. 2001). Für die Southernanalysen wurden die vier Linien mit der stärksten β -Galaktosidaseexpression ausgewählt. Die Intensität und Verteilung der X-Gal Färbung war bei diesen Linien ähnlich. Die durchgeführten Southernanalysen zeigen bei Cre-vermittelter Rekombination bei drei der vier untersuchten MMP-14 Linien eine deutliche Reduktion der Kopienzahl des Transgens. Diese Reduktion ist wohl auf die Deletion ganzer Gruppen tandemorientierter Vektorkopien zurückzuführen (Ramirez, Milot et al. 2001). Bei der vierten MMP-14 Linie war das Southernsignal auch ohne Cre-vermittelte Rekombination schwach. Dies lässt auf die Integration weniger oder gar nur einer Kopie der Vektor-DNA schließen, deren Anzahl dann durch Cre-vermittelte Rekombination nicht mehr stark verringert werden kann. Die Cre-vermittelte Rekombination findet offensichtlich auch über die Insulatoren hinweg statt. Die verwendeten Insulatorensequenzen verhindern also nicht die Cre-vermittelte Rekombination. Dies bedeutet, dass bei dem verwendeten Vektorsystem innerhalb einer Linie nach der Rekombination deutlich weniger Kopien des Vektorsystems zur Expression des eigentlichen Transgens (hier MMP-2 oder MMP-14) vorliegen können als vorher zur Lac-Z-Expression. Alle vier mit dem IAL-MMP-2 Expressionsvektor hergestellten transgenen Linien waren nach erfolgter Cre-Rekombination embryonal letal. Dies deutet darauf hin, dass auch nach Reduktion der Kopienzahl noch eine starke Transgenexpression erreicht werden kann. MMP-2 mRNA war mit einer transgenspezifischen RT-PCR nachweisbar. Von den erzeugten neun MMP-14 Linien wurden zunächst vier nach der Stärke ihrer β -Galaktosidaseexpression ausgewählt, aber nur bei einer dieser vier ließ sich nach Cre-vermittelter Rekombination eine Expression (Northern-Blot Analyse und MMP-14 Activity Assay) von MMP-14 nachweisen. Diese Befunde zeigen, dass der Integrationsort einen starken Einfluss auf die Transgenexpression hat. Außerdem zeigen

die Befunde, dass eine starke Expression des Lac-Z-Reportergens noch kein Hinweis auf eine zu erwartende starke Transgenexpression nach erfolgter Cre-vermittelter Rekombination ist. Obwohl Nestin-Cre transgene Mäuse zunächst als Balancerstamm beschrieben wurden, bei denen in allen Geweben ein Mosaik von rekombinierten und nicht rekombinierten Loci vorliegt (Betz, Vosshenrich et al. 1996; Kuhn and Schwenk 1997) überwiegen offensichtlich rekombinierte Loci: bei den Southern-Analysen zum Nachweis der Rekombination bei doppelt transgenen MMP-14 Tieren, konnte wie auch in den Arbeiten von Klopčič B (Klopčič B, 2002) keine nicht rekombinierte Vektor-DNA mehr detektiert werden. Bei doppelt transgenen Tieren der untersuchten Linie MMP-14 G lässt sich weder in der Leber noch in der Blase oder dem Harnleiter (welche eine ektopische β -Galaktosidaseaktivität zeigten) eine β -Galaktosidaseaktivität zeigen. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Cre-vermittelte Rekombination zumindest in der Leber, dem Harnleiter und der Blase weitgehend vollständig ist. Variationen im Phänotyp doppelt transgener Tiere sind daher nicht das Resultat unvollständiger Rekombinationsereignisse.

Es ist also gelungen, ein neues Vektorsystem für die Expression von Transgenen unter der Kontrolle des murinen Albumin-Promotors zu entwickeln. Mit dem Vektorsystem können zunächst *Lac-Z* als Reportergen exprimierende Linien gewonnen werden. Die Stärke der β -Galaktosidaseexpression lässt aber nur bedingt Rückschlüsse auf die nach Cre-vermittelter Rekombination zu erwartende Stärke der Expression des Transgens zu. Die transgenen Linien werden mit entsprechenden Cre-Effektorstämmen gekreuzt. Dies bietet bei potentiell letalen Transgenen einerseits die Möglichkeit, die Letalität der Transgenexpression anhand definierter Linien zunächst zu beweisen und im nächsten Schritt embryonal zu studieren. Des Weiteren können einzelne Aspekte z.B. der Embryonalentwicklung oder der Entwicklung bis zur Geschlechtsreife von transgenen Linien, die sonst nicht die Etablierung stabiler Linien zulassen, untersucht werden. Dies ist bei herkömmlich transgenen Tieren schlecht möglich, da man immer wieder auf einzeln pronukleusinjizierte Tiere bzw. Embryonen angewiesen ist, die sich zudem noch aufgrund des immer wieder neuen Integrationsortes erheblich in ihrer Transgenexpression unterscheiden können.

Auch bietet sich die Möglichkeit, durch die Wahl der entsprechenden Effektormäuse die Aktivierung des Transgens zeitlich oder räumlich einzugrenzen. Eine zeitliche Eingrenzung ist zum Beispiel durch Verwendung von induzierbaren Cre-Mäusen möglich (Kuhn and Schwenk 1997; Porter 1998). Zum Studieren von embryonal letalen Transgenen könnte man auch das Tet on/Tet off -System verwenden (Gossen and Bujard 1992; Diamond, Owolabi et al. 2000), bei dem durch Gabe oder Entzug von Tetracyclin die Transgenexpression gesteuert

werden kann. Leider werden aber gerade die MMPs durch Tetracycline in ihrer Aktivität gehemmt (Duivenvoorden WCM et al., 1998). Deshalb werden wir für weitere Studien mit unseren MMP-transgenen Mäusen die in unserer Arbeitsgruppe zu Verfügung stehenden tamoxifeninduzierbaren leberspezifischen Cre-Effektormäuse zur Kreuzung verwenden (Feil, Brocard et al. 1996). Es ist davon auszugehen, dass in Zukunft immer mehr Cre-Effektorstämme für die Induktion der Expression des Transgens zur Verfügung stehen werden, so dass auch ohne Gabe von induzierenden Stoffen einzelne Zeitfenster in der Entwicklung untersucht werden können (Kuhn and Schwenk 1997).

4.2 Phänotyp MMP-14 transgener Mäuse

Nach erfolgter Cre-vermittelter Rekombination ließ sich nur für einige Tiere der Linien MMP-14 E, J und L die Expression von MMP-14 mRNA nachweisen. Bei den wenigen Tieren war die Expression zudem schwach. Für alle untersuchten doppelt MMP-14/Nestin-Cre transgenen Tiere der Linie MMP-14 G ließ sich eine starke Expression der MMP-14 mRNA nachweisen. Wie schon erwähnt lässt sich also die Intensität der β -Galaktosidaseaktivität nur bedingt als Hinweis auf die zu erwartende Expression des Transgens nach Cre-vermittelter Rekombination heranziehen. Dies kann daran liegen, dass nicht nur die Anzahl der Kopien, sondern auch der Integrationsort für die Stärke der Expression der MMP-14 mRNA verantwortlich ist. Vor der Rekombination gibt es in jeder Linie eine andere Anzahl tandemorientierter Vektorkopien. Nach der Rekombination bleibt hiervon jeweils nur noch eine Kopie übrig. So wird die Expressionsstärke der β -Galaktosidase über den Integrationsort und die Anzahl der Vektorkopien im Genom bestimmt, während die spätere MMP-14 Expression ausschließlich über den Integrationsort beeinflusst wird. Analog zu den Befunden der mRNA-Expression war eine MMP-14 Aktivität nur für doppelt MMP-14/Nestin-Cre transgene Tiere der Linie G messbar.

Bei der Pronukleusinjektion kann es zu mehreren Integrationsereignissen an unterschiedlichen Stellen im Genom kommen. Bei mehreren unterschiedlichen Integrationsorten kann es durch Rekombination von einer *LoxP*-Site eines Integrationsortes mit der *LoxP*-Site eines anderen Integrationsortes zur unerwünschten Deletion von Teilen des Genoms kommen, die Steuerelemente, Exone, ganze Gene oder gar ganze Gencluster enthalten. Auch Chromosomenaberrationen oder Translokationen sind denkbar (Yu, Zhang et al. 2001). Da nur die Linie MMP-14 G in nachweisbaren Mengen MMP-14 exprimiert, sollte für diese gezeigt werden, dass es hier nur zu einem Integrationsereignis gekommen ist. Hierfür wurde eine Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) durchgeführt. Als transgenspezifische Sonde

diente die *LacZ* cDNA mit „nuclear localising signal“. So konnte vermieden werden, dass eventuell endogene Bereiche, die homolog zu Bereichen der Vektor DNA sind, ein falsches Signal liefern. Die FISH wurde freundlicherweise von Dr. U. Zechner und Dr. B. Großmann am Institut für Humangenetik an den Unikliniken in Mainz durchgeführt. Es konnte innerhalb der Auflösungsgrenze von 0,9 Megabasenpaaren nur ein Integrationsort gefunden werden (McFadyen, Addison et al. 1999). Dieser liegt auf Chromosom sechs. Bei etwa 30 % der Pronukleusinjektionen kommt es zur Integration fremder DNA in das Genom (Hogan B et al., 1994). Unter Berücksichtigung der Größe des Genoms ist es extrem unwahrscheinlich, dass zwei Integrationsereignisse in so unmittelbarer Nachbarschaft zueinander stattfinden, dass sie nicht mehr voneinander unterschieden werden können. Mit der Methode der FISH kann man natürlich nicht ausschließen, dass durch die Integration der Fremd-DNA am Integrationsort Teile des Genoms zerstört wurden und so einen durch das Transgen verursachten Phänotyp vortäuschen. Dies wird normalerweise dadurch umgangen, dass man mindestens zwei unterschiedliche Linien mit unterschiedlichem Integrationsort miteinander vergleicht und nur in allen Linien gleiche Auffälligkeiten dem Transgen zuschreibt. Kann man das Vorhandensein unterschiedlicher Integrationsorte ausschließen, unterscheiden sich bei Verwendung des Cre-*LoxP*-Systems einfach MMP-14 und doppelt MMP-14/Nestin-Cre transgene Tiere einer Linie lediglich in der deletierten DNA-Region zwischen den beiden *LoxP*-Sites. Es ist also davon auszugehen, dass beobachtete Unterschiede im Phänotyp zwischen einfach MMP-14 und doppelt MMP-14/Nestin-Cre transgenen Tieren auf diese Deletion zurückgehen.

ProMMP-2 wird auf der Zelloberfläche mit MMP-14 und TIMP-2 colokalisiert und dort aktiviert. (Nagase 1997; Butler, Butler et al. 1998; Murphy, Stanton et al. 1999). Auch konnte gezeigt werden, dass transgene Tiere, die MMP-14 im Epithel der Brustdrüse überexprimieren eine verstärkte MMP-2 Aktivität aufweisen (Ha, Moon et al. 2001). Außerdem können MMP-14 Knockout Mäuse MMP-2 nicht aktivieren (Zhou, Apte et al. 2000). Die Aktivierung von MMP-2 ist also ein physiologischer Marker für die Aktivität von MMP-14. doppelt MMP-14/Nestin-Cre transgene Tiere der Linie MMP-14 G hatten als einzige eine messbare MMP-14 Aktivität. Sie waren auch die einzigen, für die sich eine MMP-2 Aktivierung nachweisen ließ. Bei Wildtyptieren, Cre Tieren, einfach MMP-14 und doppelt MMP-14/Nestin-Cre transgenen Tieren der Linien E, J und L ließ sich keine MMP-2 Aktivität nachweisen. Die von den doppelt transgenen Tieren der Linie G überexprimierte MMP-14 ist also auch *in vivo* aktiv.

Bei *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass MMP-13 durch MMP-14 aktiviert werden kann. Diese Aktivierung wird in Gegenwart von MMP-2 noch verstärkt (Strongin, Collier et al. 1995; Knauper, Murphy et al. 1996; Knauper, Will et al. 1996; Murphy, Stanton et al. 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass MMP-13 nicht nur *in vitro* sondern auch *in vivo* durch MMP-14 aktiviert werden kann.

4.3 Einfluss der MMP-14 Überexpression auf die Leber von Mäusen

Eine gesteigerte MMP-14 Aktivität auf Hepatozyten aktiviert sowohl MMP-2 als auch MMP-13 in der Leber. Diese MMPs sind zusammen in der Lage sowohl natürlich vorkommende Bestandteile der Extrazellulären Matrix (ECM) als auch unter pathologischen Bedingungen abgelagerte Matrixmoleküle abzubauen. Von Matrix Metalloproteinasen ist zudem bekannt, dass sie an die ECM adhäriertes TGF- β 1, 2 und 3 freisetzen und aktivieren können (Yu and Stamenkovic 2000). TGF- β induziert die Expression von Tissue Inhibitors of MMPs (TIMP) welche dann die MMPs selbst inhibieren. Außerdem induziert TGF- β Apoptose und hemmt die Proliferation von Hepatozyten (Roberts, Sporn et al. 1986; Roberts, Birkenmeier et al. 1988; Overall, Wrana et al. 1989; Roberts, Heine et al. 1990; Takiya, Tagaya et al. 1995).

Um einen ersten Einblick zu gewinnen, ob eine Überexpression von MMP-14 in Hepatozyten einen Einfluß auf die Homöostase der Leber hat, wurde jeweils der Quotient aus Lebergewicht zu Gesamtkörpergewicht in Prozent gebildet. Untersucht wurden einfach MMP-14 und doppelt MMP-14/Nestin-Cre transgene Tiere der Linien E, G, J und L. Das Lebergewicht betrug in allen Fällen ca. 4,7 % des Gesamtkörpergewichts. Die Anwesenheit von MMP-14 in Hepatozyten hatte keinen Einfluss auf die Lebermasse. Eine Störung der Gewebshomöostase muss sich aber nicht auf das Lebergewicht auswirken und kann trotzdem folgen haben. So wird eine übersteigerte Zellproliferation unter Umständen durch eine erhöhte Apoptoserate kompensiert. Bei jeder Zellteilung kann es zu Mutationen im Genom der Zellen kommen. Wenn die Proliferationsrate zunimmt erhöht sich auch die Zahl von Mutationen. Dies steigert das Risiko der Tumorinitiation und fördert eventuell die Promotion bereits initiiert Tumoren (Cunningham and Matthews 1995; Dominguez-Malagon and Gaytan-Graham 2001). Hierbei müsste es zunächst nicht zu einer Veränderung des Lebergewichts kommen. Leberproben, einfach MMP-14 und doppelt MMP-14/Nestin-Cre transgener Tiere der Linien E, G, J und L, wurden deshalb im Alter von drei Monate an Prof. Dr. Schirmacher am Institut für Pathologie in Köln zur histologischen Untersuchung weitergegeben. Sein besonderer Fokus lag hierbei auf Proliferation, Apoptose, Nekrosen, Kollagenfaserablagerungen und der Ausbildung von Architekturveränderungen. In keiner der Gruppen konnten bei der

Untersuchung Auffälligkeiten in Bezug auf die untersuchten Kriterien feststellen. Dies bedeutet für die einfach MMP-14 transgenen Tiere, dass weder die Anwesenheit der Transgen-DNA noch die Expression des Reportergens β -Galaktosidase einen Einfluss auf die Lebergewebshomöostase haben. Auch die Cre-vermittelte Rekombination und die erhöhte MMP-14 Aktivität in doppelt MMP-14/Nestin-Cre transgenen Tieren stören alleine nicht die Lebergewebshomöostase. Dies schließt nicht aus, dass MMP-14 in einer bereits geschädigten Leber einen prokanzerogenen Charakter haben kann.

Im Gegensatz hierzu führte eine Überexpression von MMP-14 in den Milchdrüsen von Mäusen zu lymphatischen Infiltraten, Fibrose, Hyperplasie, Dysplasien und Adenokarzinomen. Allerdings traten diese Befunde nur nach mehreren Schwangerschaften bei älteren transgenen Mäusen auf. Dies steht im Zusammenhang mit dem hier verwendeten MMTV-LTR (mouse mammary tumor virus - long terminal repeat) Promotor, der vor allem während der Stillzeit eine starke Erhöhung der MMP-14 Expression in Milchdrüsen induziert (Ha, Moon et al. 2001). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten doppelt MMP-14/Nestin-Cre transgenen Tiere der Linie G exprimierten MMP-14 schon stark während ihrer Entwicklung. Dies kann zu Kompensationseffekten geführt haben. Eine spätere Induktion der MMP-14 Expression durch Verwendung induzierbarer Cre-Effektormäuse könnte diesen Effekt umgehen. Außerdem waren die hier untersuchten Mäuse mit drei Monaten noch verhältnismäßig Jung. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass es in höherem Alter noch zu ähnlichen MMP-14 vermittelten Schädigungen der Leber kommt, wie sie bei MMTV-LTR-MMP-14 transgenen Mäusen in den Milchdrüsen beobachtet wurden.

4.4 Phänotyp MMP-2 transgener Mäuse

Die einfach MMP-2 transgenen Tiere der Linien B, F, G und H waren, wie oben schon diskutiert, äußerlich normal und auch bei der Zucht unauffällig. Um nun die MMP-2 Expression zu induzieren, mussten die Tiere der MMP-2 Linien mit Actin-Cre Tieren gepaart werden. Hierdurch sollten die *LoxP*-Sites rekombiniert und die MMP-2 cDNA unter die Kontrolle der Albuminpromotor/-Enhancer Kasette gebracht werden. Nach der Verpaarung von heterozygoten MMP-2 Mäusen der Linien B, F, G und H mit homozygoten Actin-Cre Mäusen waren alle Nachkommen transgen für Cre aber zunächst war keiner der Nachkommen transgen für MMP-2. Auch die Größe der Würfe war halb so groß wie bei diesem Mausstamm in unserem Tierstall üblich. Später wurden vereinzelt Cre/MMP-2 transgene Tiere der Linie F geboren. Doppelt transgene Tiere sterben also *in utero*. Weder das Cre-Konstrukt noch das IAL-MMP-2 Konstrukt waren alleine letal, also wurde die Letalität wahrscheinlich durch die

Cre-vermittelte Rekombination der *LoxP*-Sites verursacht. Die Cre-Rekombinase wird in Actin-Cre Mäusen schon im Morulastadium in allen Zellen des Embryo exprimiert (Sakai and Miyazaki 1997). Es kann also schon vor der Einnistung der Blastozyste in den Uterus zur Cre-vermittelten Rekombination in doppelt transgenen Mäusen kommen. Hierdurch würde dann der Albuminpromotor in die räumliche Nähe der MMP-2 cDNA kommen und das Polyadenylierungssignal zwischen beiden wegfallen. Serumalbumin mRNA ist bei Mäusen zum ersten Mal durch *in situ* Hybridisierung im 6 Tage alten Embryo nachweisbar (Trojan, Naval et al. 1995). Also könnte auch MMP-2 unter der Kontrolle des Albuminpromotors ab dem Tag 6 post coitum (pc) exprimiert werden. Deshalb werden die doppelt transgenen Embryonen, wenn die Letalität nicht auf Chromosomenaberrationen oder Translokationen beruht, wahrscheinlich nicht vor Tag 6 der Schwangerschaft absterben. Zur Bestimmung des Zeitpunktes der embryonalen Letalität wurden homozygot Actin-Cre und heterozygot MMP-2 transgene Tiere der Linien B, F, G und H miteinander verpaart und den schwangeren Tieren die Embryonen zwischen Tag 6,5 und Tag 12,5 pc entnommen. Es wurden die Dezidua und Embryonen gezählt und eine MMP-2 spezifische Transgenbestimmung der Embryonen durchgeführt. Die doppelt transgenen Embryonen der Linien B und H starben zwischen Tag 6,5 und 7,5 pc, während bei der Linie F nur die Hälfte der doppelt transgenen Embryonen zu diesem Zeitpunkt absterben. Von Linie G starb kein Embryo vor Tag 10,5 pc. Da die einfach MMP-2 transgenen Tiere unterschiedlicher Linien, bei denen keine Cre-vermittelte Rekombination stattgefunden hat, normal züchten und nicht *in utero* sterben, können Integrationseffekte als Ursache für die embryonale Letalität ausgeschlossen werden. Die Letalität muss also auf Cre-vermittelten Rekombinationsereignissen beruhen.

Am Tag 6,5 pc wurden noch bei allen Linien doppelt transgene Embryonen gefunden. Mit Hilfe einer rekombinationsspezifischen PCR-Analyse konnte gezeigt werden, dass in allen Linien bei doppelt transgenen Embryonen eine Cre-vermittelte Rekombination der *LoxP*-Sites stattgefunden hat. Die Embryonen können also theoretisch MMP-2 unter der Kontrolle des Albuminpromotors überexprimieren. Da ein transgenspezifischer mRNA-Nachweis bei 6 Tage alten Embryonen sehr schwierig ist wurde eine RT-PCR-Analyse an einem der wenigen adulten doppelt transgenen Tiere der Linie MMP-2 F durchgeführt. Es konnte so ein deutlicher Nachweis der transgenspezifischen Expression von MMP-2 mRNA in der adulten Leber erbracht werden.

Die Cre-vermittelte Rekombination findet also schon vor Tag 6,5 der Embryonalentwicklung statt, und doppelt MMP-2/Actin-Cre transgene Tiere können MMP-2 mRNA überexprimieren. Außerdem wurde gezeigt, dass Serumalbumin schon ab dem sechsten Tag

der Embryonalentwicklung im Neuroektoderm exprimiert wird (Trojan, Naval et al. 1995). Der Zeitpunkt des Absterbens aller doppelt MMP-2/Actin-Cre transgenen Embryonen der Linien B und H und etwa der Hälfte der doppelt transgenen Embryonen der Linie F korreliert mit dem Zeitpunkt der ersten Expression von Serumalbumin. Positionseffekte können den Zeitpunkt und Ort der durch den Albuminpromotor induzierten MMP-2 Expression beeinflussen (Festenstein, Tolaini et al. 1996; Zhuma, Tyrrell et al. 1999). Dies kann die Unterschiede bei den Zeitpunkten der embryonalen Letalität zwischen einzelnen Linien erklären. Das Sterben der Embryonen zu verschiedenen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung kann ganz unterschiedliche MMP-2 vermittelte Ursachen haben.

Doppelt MMP-2/Actin-Cre transgene Embryonen der Linie G, die in Ihrer Entwicklung über Tag 7,5 pc hinaus kamen, blieben auch bis Tag 12,5 pc äußerlich unauffällig. Einige doppelt MMP-2/Actin-Cre transgene Embryonen der Linie F hatten am Tag 11,5 pc längliche Auswüchse über den telencephalischen Vesikeln. Außerdem waren die Regionen, die das telencephalische Vesikel und das Dach des vierten Ventrikel überlagern stark abgeflacht und die nasalen Primordien deformiert. Zudem hatte sich das Neuralrohr anterior nicht geschlossen.

Die Morphogenese des Embryos wird durch das Migrationsverhalten embryonaler Zellen innerhalb des Organismus bestimmt (Nardi 1983)(Steinberg MS et al., 1964; Crowford K et al., 1988). Zellen können hierbei während der Embryonalentwicklung entlang chemischer Gradienten innerhalb der ECM wandern (Poole and Steinberg 1982). Außerdem kann die ECM eine Barrierefunktion für migrierende Zellen haben. Die ECM spielt auch eine wichtige Rolle bei der Steuerung von Zellproliferation und -Differenzierung (Bernfield 1984; Bernfield 1984; Bernfield, Banerjee et al. 1984; Mizuno, Saito et al. 1994; Mizuno and Saito 1996). Die Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie TGF- β aus der ECM kann das Wachstumsverhalten embryonaler Zellen beeinflussen (Hardman and Neil-Dwyer 1994; Hardman, Pfeiffer et al. 1994). Wird nun die chemische Zusammensetzung der ECM durch MMPs verändert könnte dies auch das Migrations- und Wachstumsverhalten embryonaler Zellen bei der Morphogenese beeinflussen. Das Verhältnis von adhäsionsfördernden Matrixbestandteilen (Fibronectin, Laminin und die Kollagene I, III und IV) zu adhäsionshemmenden Matrixbestandteilen (Aggrecan und Versican) ist essentiell für die richtige Wanderung und Differenzierung von Neuralleistenzellen, die unter anderem bei der Bildung von craniofacialen Geweben beteiligt sind (Greenberg, Seppa et al. 1981; Duband, Dufour et al. 1987; Perris, Krotoski et al. 1991; Duband, Belkin et al. 1992; Johnston and Bronsky 1995; Perris, Perissinotto et al. 1996). Kollagen III spielt auch bei der Bildung der Kiemenbögen

eine wichtige Rolle (Nakanishi, Sugiura et al. 1986; Nakanishi, Sugiura et al. 1986). Die Kollagene I und IV, Fibronektin, Aggrecan und Versican sind Substrate von MMP-2 (Thier, Roeb et al. 2000). Die Deformationen können also Folge einer durch MMP-2 Überexpression veränderten Architektur der ECM sein. Auch führte die Überexpression der *Xenopus* MMPs Stromelysin-3 und Kollagenase-4 in *Xenopus laevis* unter der Kontrolle eines ubiquitären Promotors zu ähnlichen Missbildungen des Gehirns wie sie in dieser Arbeit bei Überexpression von MMP-2 auftraten (Damjanovski, Amano et al. 2001).

Die Korrekte Schließung des anterioren Neuralrohrs ist essentiell für die Entwicklung des Gehirns. So führt eine unvollständige Schließung des anterioren Neuralrohrs zur Anencephalie, bei der das Großhirn stark unterentwickelt ist. Das Telencephalon bleibt in Kontakt mit der Amnionflüssigkeit und degeneriert schließlich (Ford, Rupps et al. 2001). Hierbei spielt die ECM und besonders die Präsenz unterschiedlicher Zelladhäsionsmoleküle wie N-Cadherin und E-Cadherin eine wichtige Rolle (Detrick, Dickey et al. 1990; Fujimori, Miyatani et al. 1990).

Die Veränderungen des Kopfes müssen aber nicht Ursache der embryonalen Letalität nach Tag 11,5 pc sein. So werden z.B. Kinder mit einer Anencephalie lebend geboren und sterben erst kurz nach der Geburt (Warkany 1971).

Bei den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Tieren ist die Überexpression von MMP-2 oder MMP-14 im adulten Tier induzierbar. So können Entwicklungsdefekte als auch eine embryonale Letalität umgangen werden. Im adulten, korrekt aufgebauten Organismus lässt sich nun der Einfluss von MMP-2 auf die Aufrechterhaltung der Lebergewebshomöostase untersuchen. Außerdem kann nun der Einfluss von MMP-2 und MMP-14 auf die Leberfibrogenese und die Leberkarzinogenese untersucht werden. Die Methoden der leberspezifischen Fibrogeneseinduktion und Tumorinduktion sind in unserem Labor bereits etabliert (Kanzler, Lohse et al. 1999; Kanzler, Baumann et al. 2001; Kanzler, Meyer et al. 2001).

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der Matrix Metalloproteinasen (MMPs) -2 und -14 bei der Embryonalentwicklung und deren Einfluss auf die Gewebshomöostase der Leber untersucht. Von MMP-2 und MMP-14 ist bekannt, dass sie Bestandteile der extrazellulären Matrix abbauen, Zytokine spalten und Zelloberflächenmoleküle abspalten können. Außerdem können sie Wachstumsfaktoren freisetzen und aktivieren.

Mit Hilfe von Vektorsystemen zur konditionellen Expression von MMP-2 und -14 unter der Kontrolle des murinen Albuminpromotors wurden transgene Mäuse hergestellt. In dem Expressionsvektor sind Promotor und MMP-cDNA durch ein mit *LoxP*-Sequenzen flankiertes *LacZ*-Reportergen mit eigener polyA-Site räumlich und funktionell voneinander getrennt.

Für MMP-2 konnten 4 transgene Linien gezüchtet werden. Für MMP-14 wurden 4 transgene Linien weiter untersucht. Alle ausgewählten Linien wurden mit Cre-transgenen Deletermäusen gekreuzt, bei denen die Cre-Rekombinase schon frühembryonal exprimiert wird. Das *LacZ*-Gen wird durch Cre-vermittelte Rekombination deletiert und das MMP-Transgen unter die Kontrolle des Albumin-Promotors gebracht.

Nur für eine MMP-14 transgene Linien konnte nach Cre-vermittelter Rekombination eine Expression des aktiven MMP-14 Proteins gezeigt werden. Hier konnte MMP-14 sowohl MMP-2 als auch MMP-13 aktivieren. Keine der Lebern der MMP-14 Tiere war nach Cre-vermittelter Rekombination im Alter von 3 Monaten auffällig in Bezug auf Matrixgehalt, Proliferation, Apoptose oder Tumorinduktion. Auch die Masse der Lebern war normal.

Bei MMP-2 transgenen Tieren wurde die Cre-vermittelte Rekombination nach Kreuzung mit Cre-Deletermäusen am Tag 6,5 post coitum (pc) gezeigt. Bei zwei der doppelt transgenen Linien (B, H) starben alle doppelt transgenen Embryonen zwischen Tag 6,5 und 7,5 (pc). Bei Linie G geschah dies erst nach Tag 11,5 (pc). Von Linie F wurden sogar vereinzelt doppelt transgene Tiere geboren. Diese waren äußerlich unauffällig obwohl sie das Transgen in der Leber exprimierten. Einige doppelt transgene Embryonen der Linie F hatten am Tag 11,5 (pc) starke Deformationen im Kopfbereich, die das Telencephalon und das Mesencephalon betrafen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die frühembryonale Fehlregulation von MMP-2 letal ist aber eine Überexpression von MMP-14 weder auf die Embryonalentwicklung noch auf die Homöostase der gesunden adulten Leber einen Einfluss hat.

Die Induzierbarkeit des entwickelten Expressionssystems ermöglicht für die Zukunft Experimente zum Einfluss von MMP-2 und MMP-14 auf Fibrogenese, Regeneration und Tumorgenese in der Leber von Mäusen.

Abstract:

MMP-2 and MMP-14 process extracellular matrix proteins, cytokines, growth factors and adhesion molecules to generate fragments with enhanced or reduced biological activity.

In this study, a vectorsystem was developed for the conditional expression of MMP-2 and MMP-14 in the liver of transgenic mice. For this vectorsystem the murine albumin promotor was chosen together with the cre/lox system to achieve an inducible MMP-expression in the liver.

Only one of the MMP-14 transgenic lines expressed high amounts of active MMP-14 protein after recombination of the lox-P sites. In these mice MMP-14 was able to activate MMP-2 and MMP-13 *in vivo*. However, none of the livers of MMP-14 overexpressing mice showed no differences in liverweight, amount of extracellular matrixproteins and rate of proliferation, apoptosis and tumor-induction when compared to the liver of wildtype mice.

On the other hand overexpression of MMP-2 was embryonic lethal in all MMP-2 transgenic lines. After crossing the MMP-2 transgenic mice with cre deleter mice, a cre mediated recombination could be shown at day 6.5 post coitum (pc). Some of the double transgenic embryos of one of the transgenic lines had severe deformations of the head, especially of the telencephalon and the mesencephalon.

It could be shown in this study that disregulation of MMP-2 in early embryonic development is lethal but an overexpression of MMP-14 has no influence on the embryonic development or the homeostasis of the adult liver.

With this conditional vectorsystem it is to possible study the influnce of MMP-2 and MMP-14 on fibrogenesis, regeneration and tumorigenesis in the liver of mice.

6. Literatur

- Anand-Apte, B., M. S. Pepper, et al. (1997). "Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase-3." Invest Ophthalmol Vis Sci **38**(5): 817-23.
- Aoudjit, F., E. F. Potworowski, et al. (1998). "Bi-directional induction of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 during T lymphoma/endothelial cell contact: implication of ICAM-1." J Immunol **160**(6): 2967-73.
- Arthur, M. J. (2000). "Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **279**(2): G245-9.
- Arthur, M. J., S. L. Friedman, et al. (1989). "Lipocytes from normal rat liver release a neutral metalloproteinase that degrades basement membrane (type IV) collagen." J Clin Invest **84**(4): 1076-85.
- Basset, P., J. P. Bellocq, et al. (1997). "Stromelysin-3: a paradigm for stroma-derived factors implicated in carcinoma progression." Crit Rev Oncol Hematol **26**(1): 43-53.
- Basset, P., A. Okada, et al. (1997). "Matrix metalloproteinases as stromal effectors of human carcinoma progression: therapeutic implications." Matrix Biol **15**(8-9): 535-41.
- Benbow, U. and C. E. Brinckerhoff (1997). "The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about?" Rev Prat **47**(5): 482-6.
- Benyon, R. C., J. P. Iredale, et al. (1996). "Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 is increased in fibrotic human liver." Gastroenterology **110**(3): 821-31.
- Bernfield, M. (1984). "Basement membranes and cell movement. Introduction." Ciba Found Symp **108**: 1-5.
- Bernfield, M. (1984). "Matrix regulation of cell proliferation: implications for growth of the embryo." Semin Perinatol **8**(2): 117-22.
- Bernfield, M., S. D. Banerjee, et al. (1984). "Remodelling of the basement membrane: morphogenesis and maturation." Ciba Found Symp **108**: 179-96.
- Betz, R. (1995). "Generics battle brand names over mortality of drug patents." J Healthc Resour Manag **13**(7): 35-7.
- Betz, U. A., C. A. Voshenrich, et al. (1996). "Bypass of lethality with mosaic mice generated by Cre-loxP-mediated recombination." Curr Biol **6**(10): 1307-16.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-23.
- Blavier, L., P. Henriet, et al. (1999). "Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in cancer." Ann N Y Acad Sci **878**: 108-19.

- Blessing, M., L. B. Nannay, et al. (1993). "Transgenic mice as a model to study the role of TGF-beta-related molecules in hair follicles." Genes Dev **7**(2): 204-15.
- Bode, W., C. Fernandez-Catalan, et al. (1999). "Insights into MMP-TIMP interactions." Ann N Y Acad Sci **878**: 73-91.
- Bode, W., C. Fernandez-Catalan, et al. (1999). "Endoproteinase-protein inhibitor interactions." Apmis **107**(1): 3-10.
- Bronner-Fraser, M. (1982). "Analysis of neural crest migration and differentiation using a microinjection technique." Int J Neurol **16-17**: 73-94.
- Brooks, P. C., S. Stromblad, et al. (1996). "Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3." Cell **85**(5): 683-93.
- Brown, P. D., A. T. Levy, et al. (1990). "Independent expression and cellular processing of Mr 72,000 type IV collagenase and interstitial collagenase in human tumorigenic cell lines." Cancer Res **50**(19): 6184-91.
- Butler, G. S., M. J. Butler, et al. (1998). "The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase "receptor" regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study." J Biol Chem **273**(2): 871-80.
- Chambers, A. F. and L. M. Matrisian (1997). "Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis." J Natl Cancer Inst **89**(17): 1260-70.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-9.
- Chung, J. H., M. Whiteley, et al. (1993). "A 5' element of the chicken beta-globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in Drosophila." Cell **74**(3): 505-14.
- Copp, A. J. (1995). "Death before birth: clues from gene knockouts and mutations." Trends Genet **11**(3): 87-93.
- Couly, G., P. Coltey, et al. (1995). "The angiogenic potentials of the cephalic mesoderm and the origin of brain and head blood vessels." Mech Dev **53**(1): 97-112.
- Cunningham, M. L. and H. B. Matthews (1995). "Cell proliferation as a determining factor for the carcinogenicity of chemicals: studies with mutagenic carcinogens and mutagenic noncarcinogens." Toxicol Lett **82-83**: 9-14.
- Curran, S. and G. I. Murray (1999). "Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis." J Pathol **189**(3): 300-8.
- Damjanovski, S., T. Amano, et al. (2001). "Overexpression of matrix metalloproteinases leads to lethality in transgenic *Xenopus laevis*: implications for tissue-dependent functions

- of matrix metalloproteinases during late embryonic development." Dev Dyn **221**(1): 37-47.
- Delannet, M., F. Martin, et al. (1994). "Specific roles of the alpha V beta 1, alpha V beta 3 and alpha V beta 5 integrins in avian neural crest cell adhesion and migration on vitronectin." Development **120**(9): 2687-702.
- Detrick, R. J., D. Dickey, et al. (1990). "The effects of N-cadherin misexpression on morphogenesis in *Xenopus* embryos." Neuron **4**(4): 493-506.
- Diamond, I., T. Owolabi, et al. (2000). "Conditional gene expression in the epidermis of transgenic mice using the tetracycline-regulated transactivators tTA and rTA linked to the keratin 5 promoter." J Invest Dermatol **115**(5): 788-94.
- Dominguez-Malagon, H. and S. Gaytan-Graham (2001). "Hepatocellular carcinoma: an update." Ultrastruct Pathol **25**(6): 497-516.
- Duband, J. L., A. M. Belkin, et al. (1992). "Expression of alpha 1 integrin, a laminin-collagen receptor, during myogenesis and neurogenesis in the avian embryo." Development **116**(3): 585-600.
- Duband, J. L., S. Dufour, et al. (1987). "Adhesion molecules during somitogenesis in the avian embryo." J Cell Biol **104**(5): 1361-74.
- Duffy, M. J., T. M. Maguire, et al. (2000). "Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis." Breast Cancer Res **2**(4): 252-7.
- Edwards, D. R., K. J. Leco, et al. (1996). "Differential effects of transforming growth factor-beta 1 on the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in young and old human fibroblasts." Nutr Cancer **25**(2): 137-49.
- El-Serag, H. B. and A. C. Mason (1999). "Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States." N Engl J Med **340**(10): 745-50.
- Feil, R., J. Brocard, et al. (1996). "Ligand-activated site-specific recombination in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(20): 10887-90.
- Feinberg, A. P. and B. Vogelstein (1983). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity." Anal Biochem **132**(1): 6-13.
- Festenstein, R., M. Tolaini, et al. (1996). "Locus control region function and heterochromatin-induced position effect variegation." Science **271**(5252): 1123-5.
- Fini, M. E., J. R. Cook, et al. (1998). "Proteolytic mechanisms in corneal ulceration and repair." Arch Dermatol Res **290** Suppl: S12-23.
- Fire, A., S. W. Harrison, et al. (1990). "A modular set of lacZ fusion vectors for studying gene expression in *Caenorhabditis elegans*." Gene **93**(2): 189-98.

- Fleenor, D. E., K. H. Hickman, et al. (1992). "Avian cardiac tropomyosin gene produces tissue-specific isoforms through alternative RNA splicing." J Muscle Res Cell Motil **13**(1): 55-63.
- Ford, B., R. Rupps, et al. (2001). "Renal-coloboma syndrome: prenatal detection and clinical spectrum in a large family." Am J Med Genet **99**(2): 137-41.
- Francis-West, P., R. Ladher, et al. (1998). "Signalling interactions during facial development." Mech Dev **75**(1-2): 3-28.
- Friedman, S. L. (1993). "The cellular basis of hepatic fibrosis." N. Engl. J. Med. **328**: 1828-1835.
- Fujimori, T., S. Miyatani, et al. (1990). "Ectopic expression of N-cadherin perturbs histogenesis in *Xenopus* embryos." Development **110**(1): 97-104.
- Geyer, P. K. (1997). "The role of insulator elements in defining domains of gene expression." Curr Opin Genet Dev **7**(2): 242-8.
- Gomez, D. E., D. F. Alonso, et al. (1997). "Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions." Eur J Cell Biol **74**(2): 111-22.
- Gorski, K., M. Carneiro, et al. (1986). "Tissue-specific in vitro transcription from the mouse albumin promoter." Cell **47**(5): 767-76.
- Gossen, M. and H. Bujard (1992). "Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-response promoters." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**: 5547-5551.
- Greenberg, J. H., S. Seppa, et al. (1981). "Role of collagen and fibronectin in neural crest cell adhesion and migration." Dev Biol **87**(2): 259-66.
- Gu, H., J. D. Marth, et al. (1994). "Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting [see comments]." Science **265**(5168): 103-6.
- Gu, H., Y. R. Zou, et al. (1993). "Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting." Cell **73**(6): 1155-64.
- Ha, H. Y., H. B. Moon, et al. (2001). "Overexpression of membrane-type matrix metalloproteinase-1 gene induces mammary gland abnormalities and adenocarcinoma in transgenic mice." Cancer Res **61**(3): 984-90.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." J Mol Biol **166**(4): 557-80.
- Hardman, J. and G. Neil-Dwyer (1994). "Spinal cord compression secondary to a thoracic meningeal cyst after subarachnoid haemorrhage: a case report." J Neurol Neurosurg Psychiatry **57**(9): 1145-6.

- Hardman, S. M., K. P. Pfeiffer, et al. (1994). "Analysis of left ventricular contractile behaviour during atrial fibrillation." Basic Res Cardiol **89**(5): 438-55.
- Henriet, P., L. Blavier, et al. (1999). "Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) in invasion and proliferation." Apmis **107**(1): 111-9.
- Hironaka, K., I. Sakaida, et al. (2000). "Enhanced interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-13) production of Kupffer cell by gadolinium chloride prevents pig serum-induced rat liver fibrosis." Biochem Biophys Res Commun **267**(1): 290-5.
- Iredale, J. P., R. C. Benyon, et al. (1996). "Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 messenger RNA expression is enhanced relative to interstitial collagenase messenger RNA in experimental liver injury and fibrosis." Hepatology **24**(1): 176-84.
- Iredale, J. P., S. Goddard, et al. (1995). "Tissue inhibitor of metalloproteinase-I and interstitial collagenase expression in autoimmune chronic active hepatitis and activated human hepatic lipocytes." Clin Sci (Colch) **89**(1): 75-81.
- Janowska-Wieczorek, A., L. A. Marquez, et al. (1999). "Growth factors and cytokines upregulate gelatinase expression in bone marrow CD34(+) cells and their transmigration through reconstituted basement membrane." Blood **93**(10): 3379-90.
- Johnsen, M., L. R. Lund, et al. (1998). "Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation." Curr Opin Cell Biol **10**(5): 667-71.
- Johnston, M. C. (1966). "A radioautographic study of the migration and fate of cranial neural crest cells in the chick embryo." Anat Rec **156**(2): 143-55.
- Johnston, M. C. and P. T. Bronsky (1995). "Prenatal craniofacial development: new insights on normal and abnormal mechanisms." Crit Rev Oral Biol Med **6**(4): 368-422.
- Kahari, V. M. and U. Saarialho-Kere (1997). "Matrix metalloproteinases in skin." Exp Dermatol **6**(5): 199-213.
- Kahari, V. M. and U. Saarialho-Kere (1999). "Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion." Ann Med **31**(1): 34-45.
- Kanzler, S., M. Baumann, et al. (2001). "Prediction of progressive liver fibrosis in hepatitis C infection by serum and tissue levels of transforming growth factor-beta." J Viral Hepat **8**(6): 430-7.
- Kanzler, S., A. W. Lohse, et al. (1999). "TGF-beta1 in liver fibrosis: an inducible transgenic mouse model to study liver fibrogenesis." Am J Physiol **276**(4 Pt 1): G1059-68.
- Kanzler, S., E. Meyer, et al. (2001). "Hepatocellular expression of a dominant-negative mutant TGF-beta type II receptor accelerates chemically induced hepatocarcinogenesis." Oncogene **20**(36): 5015-24.
- Kerkvliet, E. H., A. J. Docherty, et al. (1999). "Collagen breakdown in soft connective tissue explants is associated with the level of active gelatinase A (MMP-2) but not with collagenase." Matrix Biol **18**(4): 373-80.

- Kil, S. H. and M. Bronner-Fraser (1996). "Expression of the avian alpha 7-integrin in developing nervous system and myotome." Int J Dev Neurosci **14**(3): 181-90.
- Kil, S. H., T. Lallier, et al. (1996). "Inhibition of cranial neural crest adhesion in vitro and migration in vivo using integrin antisense oligonucleotides." Dev Biol **179**(1): 91-101.
- Kleiner, D. E. and W. G. Stetler-Stevenson (1999). "Matrix metalloproteinases and metastasis." Cancer Chemother Pharmacol **43 Suppl**: S42-51.
- Knauper, V., G. Murphy, et al. (1996). "Activation of human neutrophil procollagenase by stromelysin 2." Eur J Biochem **235**(1-2): 187-91.
- Knauper, V., H. Will, et al. (1996). "Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme." J Biol Chem **271**(29): 17124-31.
- Kossakowska, A. E., D. R. Edwards, et al. (1998). "Altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in experimental biliary fibrosis." Am J Pathol **153**(6): 1895-902.
- Kuhn, R. and F. Schwenk (1997). "Advances in gene targeting methods." Curr Opin Immunol **9**(2): 183-8.
- Kuhn, R., F. Schwenk, et al. (1995). "Inducible gene targeting in mice." Science **269**(5229): 1427-9.
- Lakso, M., B. Sauer, et al. (1992). "Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(14): 6232-6.
- Lallier, T., R. Deutzmann, et al. (1994). "Neural crest cell interactions with laminin: structural requirements and localization of the binding site for alpha 1 beta 1 integrin." Dev Biol **162**(2): 451-64.
- Landolt, R. M., L. Vaughan, et al. (1995). "Versican is selectively expressed in embryonic tissues that act as barriers to neural crest cell migration and axon outgrowth." Development **121**(8): 2303-12.
- Le Lievre, C. S. (1978). "Participation of neural crest-derived cells in the genesis of the skull in birds." J Embryol Exp Morphol **47**: 17-37.
- Lesley, J., R. Hyman, et al. (1993). "CD44 and its interaction with extracellular matrix." Adv Immunol **54**: 271-335.
- Li, Q. and G. Stamatoyannopoulos (1994). "Hypersensitive site 5 of the human beta locus control region functions as a chromatin insulator." Blood **84**(5): 1399-401.
- Lukashev, M. E. and Z. Werb (1998). "ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour." Trends Cell Biol **8**(11): 437-41.

- McCawley, L. J. and L. M. Matrisian (2000). "Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression." Mol Med Today **6**(4): 149-56.
- McFadyen, D. A., W. Addison, et al. (1999). "Genomic organization of the rat alpha 2u-globulin gene cluster." Mamm Genome **10**(5): 463-70.
- Mizuno, T. and M. Saito (1996). "[Induction of prostatic buds in the urogenital sinus in Tfm mouse embryos without androgen receptors]." C R Seances Soc Biol Fil **190**(4): 497-501.
- Mizuno, T., M. Saito, et al. (1994). "[Induction of prostatic buds in the absence of androgens]." C R Seances Soc Biol Fil **188**(5-6): 601-3.
- Murphy, G. and V. Knauper (1997). "Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain?" Matrix Biol **15**(8-9): 511-8.
- Murphy, G., H. Stanton, et al. (1999). "Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation." Apmis **107**(1): 38-44.
- Nagase, H. (1997). "Activation mechanisms of matrix metalloproteinases." Biol Chem **378**(3-4): 151-60.
- Nagase, H., Q. Meng, et al. (1999). "Engineering of selective TIMPs." Ann N Y Acad Sci **878**: 1-11.
- Nakanishi, Y., F. Sugiura, et al. (1986). "Collagenase inhibitor stimulates cleft formation during early morphogenesis of mouse salivary gland." Dev Biol **113**(1): 201-6.
- Nakanishi, Y., F. Sugiura, et al. (1986). "Scanning electron microscopic observation of mouse embryonic submandibular glands during initial branching: preferential localization of fibrillar structures at the mesenchymal ridges participating in cleft formation." J Embryol Exp Morphol **96**: 65-77.
- Naor, D., S. Nedvetzki, et al. (2002). "CD44 in cancer." Crit Rev Clin Lab Sci **39**(6): 527-79.
- Nardi, J. B. (1983). "Neuronal pathfinding in developing wings of the moth *Manduca sexta*." Dev Biol **95**(1): 163-74.
- Nemeth, J. A., A. Rafe, et al. (1996). "TIMP-2 growth-stimulatory activity: a concentration- and cell type-specific response in the presence of insulin." Exp Cell Res **224**(1): 110-5.
- Newgreen, D. F., I. Jahnke, et al. (1980). "Differentiation of sympathetic and enteric neurons of the fowl embryo in grafts to the chorio-allantoic membrane." Cell Tissue Res **208**(1): 1-19.
- Nishioka, Y. (1995). "The origin of common laboratory mice." Genome **38**(1): 1-7.
- Noden, D. M. (1978). "The control of avian cephalic neural crest cytodifferentiation. I. Skeletal and connective tissues." Dev Biol **67**(2): 296-312.

- Noden, D. M. (1983). "The role of the neural crest in patterning of avian cranial skeletal, connective, and muscle tissues." Dev Biol **96**(1): 144-65.
- Noden, D. M. (1988). "Interactions and fates of avian craniofacial mesenchyme." Development **103 Suppl**: 121-40.
- Ohuchi, E., K. Imai, et al. (1997). "Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules." J Biol Chem **272**(4): 2446-51.
- Orban, P. C., D. Chui, et al. (1992). "Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(15): 6861-5.
- Osumi-Yamashita, N., Y. Ninomiya, et al. (1994). "The contribution of both forebrain and midbrain crest cells to the mesenchyme in the frontonasal mass of mouse embryos." Dev Biol **164**(2): 409-19.
- Overall, C. M., J. L. Wrana, et al. (1989). "Independent regulation of collagenase, 72-kDa progelatinase, and metalloendoproteinase inhibitor expression in human fibroblasts by transforming growth factor-beta." J Biol Chem **264**(3): 1860-9.
- Perris, R., D. Krotoski, et al. (1991). "Collagens in avian neural crest development: distribution in vivo and migration-promoting ability in vitro." Development **113**(3): 969-84.
- Perris, R., D. Perissinotto, et al. (1996). "Inhibitory effects of PG-H/aggrecan and PG-M/versican on avian neural crest cell migration." Faseb J **10**(2): 293-301.
- Pettway, Z., M. Domowicz, et al. (1996). "Age-dependent inhibition of neural crest migration by the notochord correlates with alterations in the S103L chondroitin sulfate proteoglycan." Exp Cell Res **225**(1): 195-206.
- Poole, T. J. and M. S. Steinberg (1982). "Evidence for the guidance of pronephric duct migration by a craniocaudally traveling adhesion gradient." Dev Biol **92**(1): 144-58.
- Porter, A. (1998). "Controlling your losses: conditional gene silencing in mammals." Trends Genet **14**(2): 73-9.
- Potts, W., D. Tucker, et al. (2000). "Chicken beta-globin 5'HS4 insulators function to reduce variability in transgenic founder mice." Biochem Biophys Res Commun **273**(3): 1015-8.
- Ramirez, A., A. Bravo, et al. (1994). "Sequences 5' of the bovine keratin 5 gene direct tissue- and cell-type-specific expression of a lacZ gene in the adult and during development." Differentiation **58**(1): 53-64.
- Ramirez, A., E. Milot, et al. (2001). "Sequence and chromosomal context effects on variegated expression of keratin 5/lacZ constructs in stratified epithelia of transgenic mice." Genetics **158**(1): 341-50.

- Ray, J. M. and W. G. Stetler-Stevenson (1995). "Gelatinase A activity directly modulates melanoma cell adhesion and spreading." *Embo J* **14**(5): 908-17.
- Reddy, K. B., V. G. Keshamouni, et al. (1999). "The level of tyrosine kinase activity regulates the expression of p21/WAF1 in cancer cells." *Int J Oncol* **15**(2): 301-6.
- Reddy, K. B., J. S. Krueger, et al. (1999). "Mitogen-activated protein kinase (MAPK) regulates the expression of progelatinase B (MMP-9) in breast epithelial cells." *Int J Cancer* **82**(2): 268-73.
- Roberts, A. B., U. I. Heine, et al. (1990). "Transforming growth factor-beta. Major role in regulation of extracellular matrix." *Ann N Y Acad Sci* **580**: 225-32.
- Roberts, A. B., M. B. Sporn, et al. (1986). "Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(12): 4167-71.
- Roberts, C. J., T. M. Birkenmeier, et al. (1988). "Transforming growth factor beta stimulates the expression of fibronectin and of both subunits of the human fibronectin receptor by cultured human lung fibroblasts." *J Biol Chem* **263**(10): 4586-92.
- Roeb, E., C. G. Dietrich, et al. (2001). "Activity and cellular origin of gelatinases in patients with colon and rectal carcinoma differential activity of matrix metalloproteinase-9." *Cancer* **92**(10): 2680-91.
- Roeb, E. and S. Matern (2001). "[Matrix metalloproteinases: Promoters of tumor invasion and metastasis - A review with focus on gastrointestinal tumors]." *Z Gastroenterol* **39**(9): 807-13.
- Saiki, R. K., S. Scharf, et al. (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." *Science* **230**(4732): 1350-4.
- Sakai, K. and J. Miyazaki (1997). "A transgenic mouse line that retains Cre recombinase activity in mature oocytes irrespective of the cre transgene transmission." *Biochem Biophys Res Commun* **237**(2): 318-24.
- Sato, H., T. Takino, et al. (1994). "A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells." *Nature* **370**(6484): 61-5.
- Sato, H., M. Tanaka, et al. (1997). "Assignment of the human genes for membrane-type-1, -2, and -3 matrix metalloproteinases (MMP14, MMP15, and MMP16) to 14q12.2, 16q12.2-q21, and 8q21, respectively, by in situ hybridization." *Genomics* **39**(3): 412-3.
- Sato, M., H. Kawamata, et al. (1997). "Induction of cyclin-dependent kinase inhibitor, p21WAF1, by treatment with 3,4-dihydro-6-[4-(3,4)-dimethoxybenzoyl]-1-piperazinyl]-2(1H)-quinoline (vesnarinone) in a human salivary cancer cell line with mutant p53 gene." *Cancer Lett* **112**(2): 181-9.

- Sauer, B. and N. Henderson (1988). "The cyclization of linear DNA in *Escherichia coli* by site-specific recombination." Gene **70**(2): 331-41.
- Sauer, B. and N. Henderson (1988). "Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(14): 5166-70.
- Scherson, T., G. Serbedzija, et al. (1993). "Regulative capacity of the cranial neural tube to form neural crest." Development **118**(4): 1049-62.
- Schonrich, G., U. Kalinke, et al. (1991). "Down-regulation of T cell receptors on self-reactive T cells as a novel mechanism for extrathymic tolerance induction." Cell **65**(2): 293-304.
- Schwarzbauer, J. (1999). "Basement membranes: Putting up the barriers." Curr Biol **9**(7): R242-4.
- Schwarzbauer, J. E. and J. L. Sechler (1999). "Fibronectin fibrillogenesis: a paradigm for extracellular matrix assembly." Curr Opin Cell Biol **11**(5): 622-7.
- Schwenk, F., U. Baron, et al. (1995). "A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells." Nucleic Acids Res **23**(24): 5080-1.
- Seiki, M. (1999). "Membrane-type matrix metalloproteinases." Apmis **107**(1): 137-43.
- Shapiro, S. D. (1998). "Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences." Curr Opin Cell Biol **10**(5): 602-8.
- Stemple, D. L. and D. J. Anderson (1992). "Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest." Cell **71**(6): 973-85.
- Stepp, M. A., L. A. Urry, et al. (1994). "Expression of alpha 4 integrin mRNA and protein and fibronectin in the early chicken embryo." Cell Adhes Commun **2**(4): 359-75.
- Sternberg, J. and S. J. Kimber (1986). "The relationship between emerging neural crest cells and basement membranes in the trunk of the mouse embryo: a TEM and immunocytochemical study." J Embryol Exp Morphol **98**: 251-68.
- Sternberg, J. L. (1986). "Sublingual pyramidal lobe. Complications of subtotal thyroidectomy for Graves' disease." Clin Nucl Med **11**(11): 766-8.
- Sternberg, N., D. Hamilton, et al. (1981). "Site-specific recombination and its role in the life cycle of bacteriophage P1." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **45 Pt 1**: 297-309.
- Stetler-Stevenson, W. G. (1996). "Dynamics of matrix turnover during pathologic remodeling of the extracellular matrix." Am J Pathol **148**(5): 1345-50.
- Stetler-Stevenson, W. G., R. Hewitt, et al. (1996). "Matrix metalloproteinases and tumor invasion: from correlation and causality to the clinic." Semin Cancer Biol **7**(3): 147-54.

- Strongin, A. Y., I. Collier, et al. (1995). "Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease." J Biol Chem **270**(10): 5331-8.
- Takahara, T., K. Furui, et al. (1995). "Increased expression of matrix metalloproteinase-II in experimental liver fibrosis in rats." Hepatology **21**(3): 787-95.
- Takahara, T., K. Furui, et al. (1997). "Dual expression of matrix metalloproteinase-2 and membrane-type 1-matrix metalloproteinase in fibrotic human livers." Hepatology **26**(6): 1521-9.
- Takahara, T., S. Sollberg, et al. (1995). "Type VI collagen gene expression in experimental liver fibrosis: quantitation and spatial distribution of mRNAs, and immunodetection of the protein." Liver **15**(2): 78-86.
- Taketo, M., A. C. Schroeder, et al. (1991). "FVB/N: an inbred mouse strain preferable for transgenic analyses." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(6): 2065-9.
- Takiya, S., T. Tagaya, et al. (1995). "Role of transforming growth factor beta 1 on hepatic regeneration and apoptosis in liver diseases." J Clin Pathol **48**(12): 1093-7.
- Tan, S. L., G. Scammell, et al. (1987). "The midcycle cervical microbial flora as studied by the weighed-swab method, and its possible correlation with results of sperm cervical mucus penetration tests." Fertil Steril **47**(6): 941-6.
- Thier, M., E. Roeb, et al. (2000). "Expression of matrix metalloproteinase-2 in glial and neuronal tumor cell lines: inverse correlation with proliferation rate." Cancer Lett **149**(1-2): 163-70.
- Trojan, J., X. Naval, et al. (1995). "Expression of serum albumin and of alphafetoprotein in murine normal and neoplastic primitive embryonic structures." Mol Reprod Dev **42**(4): 369-78.
- Walters, M. C., S. Fiering, et al. (1999). "The chicken beta-globin 5'HS4 boundary element blocks enhancer-mediated suppression of silencing." Mol Cell Biol **19**(5): 3714-26.
- Warkany, J. (1971). "Syndromes." Am J Dis Child **121**(5): 365-70.
- Westermarck, J. and V. M. Kahari (1999). "Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion." Faseb J **13**(8): 781-92.
- Weston, J. A. (1970). "The migration and differentiation of neural crest cells." Adv Morphog **8**: 41-114.
- Will, H., S. J. Atkinson, et al. (1996). "The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autoproteolytic activation. Regulation by TIMP-2 and TIMP-3." J Biol Chem **271**(29): 17119-23.

- Winwood, P. J., D. Schuppan, et al. (1995). "Kupffer cell-derived 95-kd type IV collagenase/gelatinase B: characterization and expression in cultured cells." *Hepatology* 22(1): 304-15.
- Woessner, J. F., Jr. (1998). "Role of matrix proteases in processing enamel proteins." *Connect Tissue Res* 39(1-3): 69-73; discussion 141-9.
- Yoshiji, H., T. B. Buck, et al. (1998). "Stimulatory effect of endogenous tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) overexpression on type IV collagen and laminin gene expression in rat mammary carcinoma cells." *Biochem Biophys Res Commun* 247(3): 605-9.
- Yu, Q. and I. Stamenkovic (2000). "Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis." *Genes Dev* 14(2): 163-76.
- Yu, Q. M., Z. J. Cheng, et al. (1999). "The amino terminus with a conserved glutamic acid of G protein-coupled receptor kinases is indispensable for their ability to phosphorylate photoactivated rhodopsin." *J Neurochem* 73(3): 1222-7.
- Yu, Y., C. Zhang, et al. (2001). "Gene expression profiling in human fetal liver and identification of tissue- and developmental-stage-specific genes through compiled expression profiles and efficient cloning of full-length cDNAs." *Genome Res* 11(8): 1392-403.
- Zhou, Z., S. S. Apte, et al. (2000). "Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase I." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(8): 4052-7.
- Zhuma, T., R. Tyrrell, et al. (1999). "Human HMG box transcription factor HBP1: a role in hCD2 LCR function." *Embo J* 18(22): 6396-406.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaare
BrdU	Bromodeoxyuridin
BSA	Bovine Serum Albumine
CDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ci	Curie
cm	Zentimeter
d	Tag
dATP	Desoxyadenosyl-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotid
dpc	days post coitum
E. coli	Escherichia Coli
EDTA	Ethylendiamin-,N,N,N',N'-tetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EtOH	Ethanol
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
g	Gramm, Erdbeschleunigung
°C	Grad Celsius
h	Stunde, human
hCG	humanes Chorion Gonadotropin
HE	Hämatoxylin/Eosin
Ins	Insulator
i.p.	intraperitoneal
kb	Kilobasen
kDA	Kilodalton

kg	Kilogramm
kj	Kilojoule
	Lambda, Wellenlänge
l	Liter
LB-Medium	Luria Bertani Medium
Lsg.	Lösung
M	Molar
m	murin
mA	Milliampere
mcs	Multiple cloning site
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mMol	Millimol
MMP	Matrix Metalloproteinase
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	„messenger“-Ribonukleinsäure
MT-MMP	Membrantyp-Matrixmetalloproteinase
nls	nuclear localising signal
TIMP	Tissue Inhibitor of Matrixmetalloproteinases
µCi	Mikrocurie
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikromolar
neo	Neomycin-Resistenzgen
ng	Nanogramm
NLS	Nuclear Localizing Signal
nm	Nanometer
pA	siehe polyA
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	„phosphate buffered saline“
p.c.	post coitum
PCR	Polymerasekettenreaktion

pH	pH-Wert
PMS	pregnant mare serum
PolyA	Polyadenylierungssignal
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Standard-Saline-Citrat-Puffer
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tg	transgene Linie
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated nick end labeling
U	Enzymeinheiten (Units)
U/min	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierter Bereich
Vol.	Volumen
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenprozent
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtsprozent

Lebenslauf:

Name: Erik Meyer
Geburtsdatum: 18. Juni 1968
Geburtsort: Mainz
Adresse: Silvaner Straße 37
55129 Mainz
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schule:

1974-1978 Grund- und Hauptschule Mombach West, Mainz
1978-1986 Staatliches Gymnasium am Kurfürstlichen Schloss zu Mainz
1986-1990 Technisches Gymnasium, Mainz
1990 Abitur

Ersatzdienst:

1990-1992 Antoniushaus, Hochheim

Studium:

1992-1997 Studium der Biologie an der Universität Mainz
1997-1999 Anfertigung der Diplomarbeit in der Forschergruppe der Boehringer Ingelheim-Stiftung „Experimentelle Modelle menschlicher Erkrankungen“, 1. Medizinische Klinik und Poliklinik der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
Titel: Untersuchungen zur Funktion des TGF- β Typ-II Rezeptors bei der Leberregeneration und der Leberkarzinogenese in einem transgenen Mausmodell

seit 1999 Wissenschaftlicher Angestellter an der 1. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz, Mildred Scheel Stiftung „Apoptose“

