

---

**Forschungszentrum Karlsruhe**  
Technik und Umwelt

---

**Wissenschaftliche Berichte**  
FZKA 5551B

# **Klonierung von Matrix- metalloproteinasen und deren Expressions- muster in der Maus**

**AP-1 (Fos/Jun)- abhängige  
Expression von Kollagenase I  
im Knochen**

**S. Gack**

Institut für Genetik

Februar 1995

---



**Forschungszentrum Karlsruhe**  
Technik und Umwelt

**Wissenschaftliche Berichte**  
FZKA 5551 B

**Klonierung von Matrixmetalloproteinasen und deren  
Expressionsmuster in der Maus**

**AP-1 (Fos/Jun)- abhängige Expression von Kollagenase I  
im Knochen**

**Sabine Gack**  
Institut für Genetik

Dissertation, genehmigt von  
der naturwissenschaftlich-mathematischen Gesamtfakultät  
der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe  
1995

Als Manuskript gedruckt  
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH  
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe

ISSN 0947-8620

## ZUSAMMENFASSUNG

Die Extrazelluläre Matrix (ECM) übernimmt im Organismus die Funktion der strukturellen und mechanischen Unterstützung und dient zusätzlich als Barriere zwischen verschiedenen Zellen bzw. Organen. Aufgrund dessen ist für ihre Aufrechterhaltung ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau der Matrixkomponenten erforderlich.

Matrixmetalloproteinasen (MMPs) sind für den spezifischen Abbau der einzelnen Komponenten der ECM verantwortlich. Aus diesem Grund sind diese Enzyme in weitem Umfang am ECM-Umbau im Organismus beteiligt. Besonders während embryonalen Prozessen, wo ein intensiver Gewebeumbau stattfindet, wird auch eine hohe MMP-Expression erwartet.

In der Zellkultur konnten die Substratspezifitäten und die Expression in verschiedenen Zelltypen, auch als Antwort auf extrazelluläre Stimuli, für MMPs der Spezies Mensch, Ratte und Kaninchen gezeigt werden. Ob diese "in vitro" identifizierten Eigenschaften dieser Enzyme auf die Situation des Gesamtorganismus zu übertragen sind, konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit ist die Klonierung der mausspezifischen MMPs Stromelysin 1, Stromelysin 2, Kollagenase I und 72 kD Kollagenase IV gelungen. Mit Hilfe dieser cDNA Proben konnte die gewebespezifische Expression der vier Metalloproteinasen im Embryo und im adulten Organismus nachgewiesen werden. Im embryonalen Gewebe wird Kollagenase I und Kollagenase IV (72 kD), nicht aber Stromelysin 1 und Stromelysin 2 exprimiert. Während Kollagenase IV (72 kD) Transkripte in vielen Geweben mesenchymalen Ursprungs gefunden wurden, ist Kollagenase I ganz spezifisch im sich entwickelnden Knochengewebe exprimiert. Im Gegensatz zum embryonalen Gewebe ist im adulten Organismus eine Expression von Stromelysin 1 und Stromelysin 2 nachweisbar. Dabei werden Stromelysin 1 und Kollagenase IV in Herz und Lunge koordiniert exprimiert. Eine basale Stromelysin 2 Expression ist in jedem der untersuchten Gewebe, außer im Hoden nachweisbar, und ist vor allem im Herz und in der Niere deutlich. Hohe Transkriptmengen an Kollagenase I findet man im Muskel, der Niere und im Knochen; geringere Mengen sind im Herz, der Milz und der Lunge zu beobachten. Dieses Expressionsmuster unterscheidet sich deutlich von dem der anderen drei MMPs.

Obwohl Kollagenase I, Stromelysin 1 und Stromelysin 2 im Zellkultursystem durch extrazelluläre Substanzen sehr ähnlich reguliert werden, geben diese Unterschiede in der Expression im Gesamtorganismus einen deutlichen Hinweis auf eine spezifische Funktion der

einzelnen MMPs beim Abbau verschiedener Komponenten der ECM. Die AP-1 (cJun/cFos)-abhängige Expression konnte in Zellkultur für die MMPs Stromelysin 1, Stromelysin 2 und Kollagenase I der Maus bestätigt werden. Die Existenz von transgenen Mäusen, bei denen die Expression einer Komponente des Transkriptionsfaktors AP-1, das *c-fos* Gen, verändert war, bot die Möglichkeit, die AP-1 (*c-fos*)-abhängige Expression der MMPs in Bezug auf den Gesamtorganismus zu untersuchen. Unter "in vivo" Bedingungen zeigte sich Kollagenase I als einzige der klonierten MMPs als AP-1-abhängige Metalloproteinase. In Mäusen, die einen induzierbaren *c-fos* Expressionsvektor als Transgen tragen, findet man sechs Stunden nach Induktion eine erhöhte Kollagenase I Expression in der Milz, dem Thymus, der Leber und im Knochen. Interessanterweise korrelierten die Gewebe mit einer erhöhten Kollagenase Expression mit den Geweben, die infolge einer langfristig erhöhten *c-fos* Expression in transgenen Mäusen phänotypische Veränderungen aufweisen. Für das veränderte Knochengewebe in *c-fos* transgenen Mäusen konnte gezeigt werden, daß im Vergleich zum normalen Knochengewebe von Wildtyp Mäusen auch hier die Kollagenase I Expression um mehr als 100-fach erhöht ist. Auch *c-fos*-defiziente Mäuse zeigen erhebliche Störungen in ihrer Knochenentwicklung. Im Gewebe dieser Tiere gehen die phänotypischen Veränderungen mit einer veränderten, in diesem Falle reduzierten, Kollagenase I Expression einher.

Ob Kollagenase I für die Entstehung bzw. die Aufrechterhaltung des veränderten Phänotyps, ausgelöst durch das *c-fos* Transgen oder die *c-fos* Null-Mutation, verantwortlich ist, bleibt zu zeigen. Kollagenase I könnte jedoch als Markergen für pathologische Veränderungen, vor allem der Knochenhomöostase, dienen.

## ABSTRACT

### **Cloning of matrix metalloproteinases and their expression pattern in the mouse.**

#### **AP-1 (Fos/Jun)- dependent expression of collagenase I in the bone**

The extracellular matrix (ECM) functions as structural and mechanical support in the organism and additionally serves as a barrier between different cell types and organs. The maintenance of a dynamic equilibrium between synthesis and degradation of matrix components is therefore necessary. Matrix metalloproteinases (MMPs) are responsible for the specific degradation of the respective components of the ECM. These enzymes are thus involved in ECM remodelling. During embryonic processes, where an especially intense tissue remodelling occurs, a high expression of MMPs is expected. In cell culture, substrate specificities and expression of MMPs in different cell types and in response to extracellular stimuli, has been shown in human, rat and rabbit. Whether the *in vitro* properties of these enzymes are transferable to the *in vivo* situation has not been shown so far.

In the work presented here, the cloning of the mouse specific MMPs stromelysin 1, stromelysin 2, collagenase I and the 72 kD collagenase IV was achieved. With these cDNA probes, the tissue specific expression of the four metalloproteinases could be demonstrated in the embryo as well as in the adult organism. In the embryonic tissue, collagenase I and collagenase IV (72 kD) were expressed, while stromelysin 1 and stromelysin 2 were not found. Whereas collagenase IV (72 kD) transcripts were expressed in many tissues of mesenchymal origin, collagenase I was specifically expressed in the developing bone tissue. Unlike in embryonic tissue, in the adult organism the expression of stromelysin 1 and stromelysin 2 could be shown. Stromelysin 1 and collagenase IV were coordinately expressed in heart and in lung. Basal expression of stromelysin 2 could be found in all of the examined tissues, except in testis; higher expression of this gene was seen in heart and kidney. High amounts of collagenase I could be found in muscle, kidney and bone; smaller amounts were observed in heart, spleen and in lung. This expression pattern clearly differs from the one seen for the other three MMPs.

Although in cell culture collagenase I, stromelysin 1 and stromelysin 2 are regulated in very similar ways, the different expression pattern in the organism point to their respective function in the degradation of the various components of the ECM. An AP-1 (cFos/cJun)- dependent expression in cell culture was demonstrated for the mouse MMPs stromelysin 1, stromelysin 2 and collagenase I. The existence of transgenic mice, where the expression of one component of

the transcription factor AP-1, the *c-fos* gene, is altered offers the possibility to study the AP-1 (*c-fos*)- dependent expression of the MMPs *in vivo*.

In the *c-fos* transgenic mouse, collagenase I was shown as the only one of the cloned MMPs to be an AP-1- dependent metalloproteinase. In mice carrying an inducible *c-fos* expression vector as a transgene, an increased collagenase I expression was found in spleen, thymus, liver and in bone six hours after induction. Interestingly, tissues with elevated collagenase I expression correlated with the tissues that show phenotypic alterations as a result of constitutively elevated *c-fos* expression in the transgenic mice. In the altered bone tissue in *c-fos* transgenic mice it could be demonstrated that the expression of collagenase I is elevated more than 100 times compared with normal bone tissue in wild type mice. In addition, *c-fos* deficient mice also show considerable impairments in their bone development. In the tissues of these mice the phenotypic alterations correlate with an altered, in this case reduced, collagenase I expression. Whether collagenase I is responsible for the formation or maintenance of the altered phenotype triggered by the *c-fos* transgene or the *c-fos* null-mutation, respectively, remains to be shown. Collagenase I, however, could serve as a marker gene for pathological alterations, especially in bone homeostasis.

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>IV</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1 Funktion und Zusammensetzung der Extrazellulären Matrix (ECM)	1
1.2 Matrixmetalloproteinasen: ECM abbauende Proteasen	2
1.3 Struktur und Substratspezifität von Metalloproteinasen	3
1.4 Regulation der Synthese und Aktivität der Metalloproteinasen	6
1.5 Kontrolle von MMPs durch Wachstumsfaktoren bei embryonalen Prozessen	9
1.6 Die transgene Fos-Maus: ein System zur Untersuchung der Regulation der MMP Expression "in vivo"	11
1.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	11
<b>2. MATERIALIEN</b>	<b>13</b>
2.1 Bezugsquellen	13
2.2 Radiochemikalien	15
2.3 Bakterien und eukaryontische Zelllinien	15
2.4 Mausstämme	15
2.5 Kulturmedien	16
2.6 Plasmide	17
2.7 Verwendete Primer	17
<b>3. METHODEN</b>	<b>18</b>
3.1 Behandlung von Nukleinsäuren	18
3.1.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	18
3.1.2 Phenol/Chloroform-Extraktion	18
3.1.3 Präzipitation von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen	18
3.2 Transformation von Bakterien	18
3.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien	18
3.2.2 Transformation von kompetenten Zellen	19
3.2.3 Herstellung von Selektiv-Agarplatten	19
3.3 DNA Präparation	19
3.3.1 Mini-Plasmid DNA Präparation	19

3.3.2	Plasmid DNA Präparation	20
3.4	Klonierungstechniken	20
3.4.1	Fragmentierung von DNA-Molekülen durch Restriktionsendonukleasen	20
3.4.2	Dephosphorylierung von DNA	21
3.4.3	Phosphorylierung von Oligonukleotiden und Linkern	21
3.4.4	Auffüllen von 5'-Überhängen	21
3.4.5	Ligation von DNA-Fragmenten	21
3.4.6	cDNA-Synthese (Erststrangsynthese)	22
3.4.7	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	22
3.4.8	Sequenzierung von DNA	22
3.5	DNA-Gelelektrophorese	23
3.5.1	Agarose-Gelelektrophorese	23
3.5.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	23
3.5.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	23
3.5.4	Denaturierende Polyacrylamid-Harnstoff-Gele	24
3.6	Zellkultur	25
3.6.1	Trypsinieren von Zellen	25
3.6.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	25
3.6.3	Behandlung von Zellen mit Induktoren	25
3.7	Poly A <sup>+</sup> -RNA-Präparation	25
3.8	Radioaktive Markierung von DNA und RNA	26
3.8.1	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	26
3.8.2	Radioaktive Markierung von RNA durch "in vitro" Transkription	26
3.9	RNA-Transfer auf eine Nylonmembran ("Northern Blot") und Hybridisierung	27
3.9.1	RNA-Transfer auf eine Nylonmembran	27
3.9.2	Hybridisierung radioaktiv markierter DNA-Fragmente an die filtergebundene RNA	28
3.10	"In situ" Hybridisierung	28
3.10.1	Behandlung von Objektträgern, Deckgläsern, Glaskästen und Glasfärbegestellen	28
3.10.2	Fixierung, Einbettung von Geweben und Anfertigung von Schnitten	29
3.10.3	Vorhybridisierung der Schnitte	29
3.10.4	Hybridisierung der Schnitte	30
3.10.5	Waschen der Schnitte	30
3.10.6	Beschichten der Objektträger mit einer Photoemulsion	31
3.10.7	Entwickeln, Färben und Mikroskopieren der Schnitte	31

<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>33</b>
4.1	Klonierung mausspezifischer MMP cDNAs und ihre Homologie zu den entsprechenden Sequenzen in Mensch und Ratte	33
4.2	Transkriptionelle Regulation der Maus-MMPs in Zellkultur	38
4.2.1	Induktion der MMP-Expression durch TPA und cAMP	38
4.2.2	Induktion der MMP-Expression durch UV-Bestrahlung	40
4.3	Gewebespezifische Expression der Maus Metalloproteinasen	41
4.3.1	Expression der MMPs während der Embryonalentwicklung der Maus	41
4.3.2	Expression der MMPs in Geweben des adulten Organismus	55
4.4	Expression der Kollagenase I in Geweben von <i>c-fos</i> transgenen Mäusen	60
4.4.1	Induzierte Expression von Kollagenase I in Mäusen mit induzierter <i>c-fos</i> Expression	60
4.4.2	Kollagenase I Expression in konstitutiv <i>c-fos</i> exprimierenden transgenen Mäusen	62
4.5	Expression der Kollagenase I in Geweben von <i>c-fos</i> -negativen Mäusen	64
4.5.1	Expression der Kollagenase I in Embryonen von <i>c-fos</i> -negativen Mäusen	64
4.5.2	Kollagenase I Expression zum Zeitpunkt des Auftreten phänotypischer Veränderungen (2 Wochen alte Tiere)	67
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>71</b>
5.1	Die Matrix-abbauenden Enzyme der Maus lassen sich in die Familie der Metalloproteinasen einordnen	72
5.2	Fos/Jun als die limitierenden Kontrollfaktoren der MMPs in Kulturzellen	74
5.3	Die Expression der MMPs während der Embryogenese ist gewebespezifisch und nicht überlappend	76
5.4	Unterschiede in der MMP Expression im Embryo und im adulten Organismus	81
5.5	Expression von Kollagenase I in <i>c-fos</i> transgenen und <i>c-fos</i> "Null" Mäusen: Ist Kollagenase I ein Markergen für cFos abhängige pathologische Veränderungen im Knochenmetabolismus	83
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>88</b>

## ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
AMV	Avian Myoblastosis Virus
AP-1	Aktivatorprotein 1
bFGF	basischer Fibroblasten Wachstumsfaktor
bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serumalbumin
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
cFOS	zelluläres Fos-Protein
<i>c-fos</i>	zelluläres Fos-Gen
cJun	zelluläres Jun-Protein
<i>c-jun</i>	zelluläres Jun-Gen
Ci	Curie
CIP	Intestinale alkalische Phosphatase vom Kalb
cpm	counts per minute
CTAB	Cetyl-trimethyl-ammoniumbromid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
ECM	Extrazelluläre Matrix
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EPIF	Extrazellulärer Proteinsynthese-induzierender Faktor
f.c.	Endkonzentration (final concentration)
FCS	Fötale Kälberserum
FBJ Osteosarkomavirus	Finkel-Biskis-Jinkis Maus Osteosarkomavirus
g	Gramm

g	Erdbeschleunigung
h	Stunden
IL-1	Interleukin 1
J	Joule
kD	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
LTR	Long terminal repeat
M	Molarität
MBq	Megabequerel
MCS	Multiple Cloning site (Polylinker)
min	Minuten
MMP	Matrixmetalloproteinase
MOPS	3-N-(Morpholino)-Propan-Sulfonsäure
mRNA	messenger RNA
NGF	Nervenwachstumsfaktor
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	aus Blutplättchen stammender Wachstumsfaktor
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNasin	RNase-Inhibitor
rNTP	Ribonukleosidtriphosphat
rpm	Umdrehungen per Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV40	Simian Virus 40
TEMED	N, N, N', N'-tetramethyl-ethylendiamin
TGF	transformierender Wachstumsfaktor
TNF	Tumornekrosefaktor
TPA	12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat
TRE	TPA responsive element
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan
tRNA	transfer RNA
U	units (Enzymeinheiten)
UV	Ultraviolette Strahlung
UTP	Uridintriphosphat

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Funktion und Zusammensetzung der Extrazellulären Matrix (ECM)

Die Entwicklung und das Wachstum vielzelliger Organismen erfordern eine perfekte Koordination von Einzelprozessen, wie z. B. Proliferation, Differenzierung und Wanderung von Zellen. Die Koordination dieser Prozesse beinhaltet, daß Gene zum richtigen Zeitpunkt in einer Zelle exprimiert werden ("differentielle Genexpression"), aber auch daß diese Zellen an ihren späteren Wirkungsort, das entsprechende Organ, gelangen (Positionsinformation). Für diese Positionseinnahme ist die Wechselwirkung der Zellen untereinander, aber auch die Wechselwirkung mit ihrer Umgebung erforderlich. Eine wichtige Rolle bei diesen embryonalen Prozessen spielt die **Extrazelluläre Matrix (ECM)**, die in diesem Zusammenhang als Substrat für Zelladhäsion und Zellbewegung dient (als Übersichtsartikel: Matrisian und Hogan, 1990; Matrisian, 1992).

Im adulten Organismus übernimmt die ECM die Funktion der strukturellen und mechanischen Unterstützung, z. B. in Form von Knorpel, Knochen und Sehnen (Goldberg und Rabinovitch; 1989) und dient als Barriere zwischen verschiedenen Zelltypen bzw. Organen (Woolley, 1984). Auch die Weiterleitung von Signalen aus dem extrazellulären Raum ins Zellinnere kann durch die Extrazelluläre Matrix beeinflusst werden. Zum Beispiel werden durch Wechselwirkung der Zellen mit Komponenten der ECM, mittels der Integrin-Rezeptorfamilie, sowohl Veränderungen des Zytoskeletts als auch biochemische Signale ausgelöst, die sich in der Aktivierung von Tyrosinkinase als Teil einer Kaskade zytoplasmatischer Proteinkinase äußern, und somit die Genexpression reguliert (Juliano und Haskill, 1993).

Die ECM setzt sich aus einem Geflecht von spezifischen Glykoproteinen (Kollagen, Fibronectin, Laminin) und Proteoglykanen zusammen, das von einer Reihe verschiedener Zellen sezerniert wird (als Übersichtsartikel siehe Goldberg und Rabinovitch, 1989; Matrisian und Hogan, 1990; Matrisian, 1990; Gilbert, 1991).

Die Familie der Kollagene repräsentiert dabei mit mehr als zehn verschiedenen Kollagentypen den Hauptanteil aller Strukturproteine; sie machen fast die Hälfte des gesamten Körperproteins aus. Das Hauptmerkmal aller Kollagenmoleküle ist dabei ihre starre, dreistrangige Struktur. Drei Kollagen Polypeptidketten,  $\alpha$ -Ketten, sind in Form einer regelmäßigen Helix umeinander gewunden, um ein faserartiges Kollagenmolekül (Tripel-Helix) von ungefähr 300 nm Länge und 15 nm Durchmesser zu bilden (Goldberg und Rabinovitch, 1989). Typ I Kollagen, das als Bestandteil der Extrazellulären Matrix vieler Gewebe (Haut, Sehnen, Knochen, Dentin) zu finden ist, ist die am häufigsten vorkommende Komponente (90% des gesamten Kollagens).

Andere Kollagene, Kollagen Typ IV und V, sind vor allem Bestandteile der Basalmembranen (Woolley, 1984; Goldberg und Rabinovitch, 1989; Gilbert, 1991).

Für die Aufrechterhaltung der ECM ist ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau der Matrixkomponenten erforderlich (als Übersichtsartikel: Matrisian und Hogan, 1990). Defekte in der Synthese, dem Abbau und der Zusammensetzung der Matrixkomponenten können daher tiefgreifende Auswirkungen auf die normale Entwicklung eines Organismus haben. Als Beispiel einer gestörten Synthese von Matrixkomponenten gilt die Insertion eines Retrovirus (Mov13) in das erste Intron des  $\alpha_1$  Typ I Kollagen Gens. Diese Mutation führt zu einem Verlust der Typ I Kollagensynthese in homozygoten Embryonen. Aufgrund der fehlenden Typ I Kollagen Expression sterben diese Embryonen am Tag 13.5 der Entwicklung, infolge zu dünner Blutgefäßwände (Schnieke et al., 1983; Löhler et al., 1984; Kratochwil et al., 1986).

Im Folgenden soll jedoch auf die Mechanismen des physiologischen und pathologischen Abbaus der ECM eingegangen werden.

## **1.2 Matrixmetalloproteinasen: ECM abbauende Proteasen**

Am Ab- und Umbau der ECM sind eine Reihe von proteolytischen Enzymen, z. B. Serin-, Cystein- und Aspartatproteinasen beteiligt. Die bedeutendste Rolle kommt hier jedoch der Familie der Matrixmetalloproteinasen (MMPs) zu, da ihre Mitglieder aufgrund ihrer Substratspezifität für den spezifischen Abbau der einzelnen ECM-Komponenten verantwortlich sind. Diese Enzyme sind alleinig für die anfängliche Spaltung der Matrixkomponenten verantwortlich und machen diese damit für den weiteren Verdau durch andere Proteasen zugänglich. Um die Dynamik der ECM aufrecht zu erhalten, muß ein regulierbarer Mechanismus von Synthese und Abbau vorhanden sein. Den kontrollierten Abbau der ECM-Komponenten besorgen dabei die Mitglieder der Familie der MMPs.

Wird das fein ausbalancierte Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau der ECM durch eine unkontrollierte MMP-Expression gestört, kann dies zu pathologischen Veränderungen, wie chronischen Entzündungsreaktionen (z. B. Rheumatische Arthritis) oder einer Ausbreitung von Tumorzellen führen: Eine erhöhte MMP-Aktivität wurde in den Gelenkflüssigkeiten von Rheumapatienten und auch in Kulturmedien von Synovialfibroblasten von Rheumapatienten beobachtet und konnte auch in den entsprechenden Bereichen der Gewebeerstörung nachgewiesen werden (Okada et al., 1990; Birkedal-Hansen et al., 1993 und Referenzen darin). In invasiven und metastasierenden Tumoren konnte im Vergleich zu normalem Gewebe oder gutartigen Tumoren eine erhöhte Expression verschiedener MMPs gefunden werden (Salo et al., 1983; Matrisian et al., 1986a; Garbisa et al., 1987; Krieg et al., 1988; Ostrowski et al., 1988). Diese erhöhten MMP-Aktivitäten könnten die Tumorzellen in die Lage versetzen, die Bindegewebsbarrieren zu durchqueren.

### 1.3 Struktur und Substratspezifität von Metalloproteinasen

Matrixmetalloproteinasen sind metallabhängige Endopeptidasen, die in den extrazellulären Raum sezerniert werden. Ihre maximale Aktivität besitzen sie bei einem neutralen pH-Wert. Aufgrund einer charakteristischen Domänenstruktur und aufgrund ihrer Substratspezifität, werden die einzelnen Enzyme in folgende Klassen eingeteilt (Abb.1; nach Matrisian, 1992; Birkedal-Hansen et al., 1993):

1. Kollagenasen vom Typ I (interstitielle und neutrophile)
2. Stromelysine (Stromelysin 1 und 2)
3. Gelatinasen: -Gelatinase A (72 kD Typ IV Kollagenase)  
-Gelatinase B (92 kD Typ IV Kollagenase)
4. Andere MMPs (Stromelysin 3, "putative" Metalloproteinase PUMP, Makrophagen-Elastase)

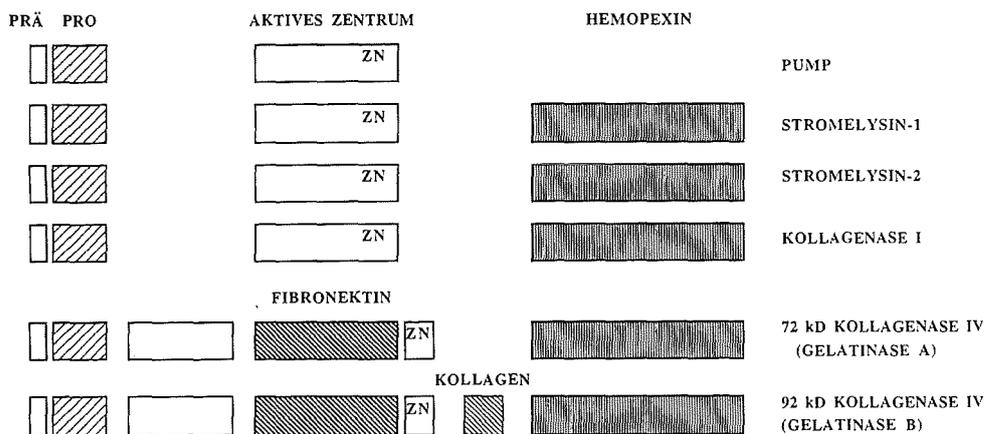


Abb.1: Domänenstruktur der MMPs (Matrisian 1990). PRÄ: Die Prädomäne kodiert für das Signalpeptid, das für die Ausschleusung des Proteins aus der Zelle verantwortlich ist. PRO: Die Prodomäne ist verantwortlich für die Latenz des Enzyms. Durch ihre Abspaltung wird das Enzym in die aktive Form umgewandelt. ZN: Die Zink-bindende Domäne beinhaltet das aktive Zentrum des Moleküls. HEMOPEXIN: Domäne, die für die Substratbindung verantwortlich sein könnte. FIBRONEKTIN: Die Fibronektindomäne zeigt Ähnlichkeiten zur kollagenbindenden Domäne des Fibronektins. Sie ist typisch für Kollagenasen vom Typ IV. KOLLAGEN: Die Kollagendomäne zeigt Ähnlichkeit zur  $\alpha_2$ -Kette des Typ V Kollagens. Sie ist typisch für die 92 kD Typ IV Kollagenase.

Kollagenase vom Typ I, die sowohl von Fibroblasten (FIB-CL) als auch von polymorphkernigen Leukozyten (PMN-CL) sezerniert wird, ist als einziges Enzym der MMP-Familie in der Lage Kollagen vom Typ I, II und III spalten (Tab.1). Die Spaltung erfolgt spezifisch zwischen den

Aminosäureresten GLY<sub>775</sub> und ILE<sub>776</sub> in den  $\alpha$ -Ketten der Tripel-Helix. Durch die Spaltung entstehen Fragmente mit einer Länge von  $3/4$  und  $1/4$  des Kollagenmoleküls. Dies führt zur Entwindung der helikalen Struktur und die Abbauprodukte sind für die weitere proteolytische Spaltung durch andere Proteinasen zugänglich (Goldberg et al., 1986; Wilhelm et al., 1986; Whitham et al., 1986).

Das Kollagenasemolekül läßt sich aufgrund von spezifischen Sequenzhomologien in folgende Domänen unterteilen (Abb.1):

Die "**Prä**"-Domäne beinhaltet das Signalpeptid, das für die Ausschleusung des Enzyms aus der Zelle verantwortlich ist. Es wird während dieses Prozesses durch proteolytische Spaltung entfernt. Die "**Pro**"-Domäne (Aminosäuren 18-99) ist für die Inaktivität des sezernierten Enzyms verantwortlich. Sie enthält ein Cystein-Rest an Position 73, der als vierte Koordinationsstelle für die Komplexbildung mit drei Aminosäuren (Histidine) der "**Zink**"-bindenden Domäne dient. Durch die Abspaltung der "Pro"-Domäne wird die vierte Koordinationsstelle durch ein Wassermolekül ersetzt und dadurch die inaktive Form in die aktive Form überführt (Grant et al., 1987; Springman et al., 1990). Die Funktion der "**Hemopexin**"-Domäne (C-Terminus), die mit Ausnahme der Metalloproteinase PUMP ("putative" Metalloproteinase) in allen anderen Mitgliedern der Familie zu finden ist, ist noch nicht eindeutig bekannt. Sie könnte jedoch bei Substratspezifität, Inhibitorbindung (s. folgendes Kapitel 1.4) oder Bindung an ECM-Komponenten involviert sein (Muller et al., 1988; Matrisian, 1992). Die Entfernung der C-terminalen Domäne der Kollagenase I führt zum Verlust der Spezifität für tripelhelikales Kollagen, während die Aktivität gegenüber Gelatin kaum verändert ist (Murphy et al., 1992).

Die Stromelysine, die eine vergleichbare Domänenstruktur besitzen wie Kollagenase (Abb.1; Sanchez-Lopez et al., 1988), zeigen eine sehr viel breitere Substratspezifität (Tab.1). Sie können Proteoglykane, Laminin, Fibronectin, Elastin und denaturiertes Kollagen abbauen. Begrenzte enzymatische Aktivität besitzen sie auch gegenüber Typ IV und Typ V Kollagen, keine Aktivität dagegen gegenüber nativem Typ I Kollagen (Whitham et al., 1986; Wilhelm et al., 1987; Breathnach et al., 1987).

Gelatinase A (72 kD Typ IV Kollagenase) enthält ein zusätzliches Sequenzmotiv, das Ähnlichkeiten zur kollagenbindenden Domäne des Fibronectin hat. Diese Domäne könnte ebenfalls bei der Bestimmung der Substratspezifität oder an der Bindung und Lokalisierung des Enzyms an der Extrazellulären Matrix mitwirken (Alexander und Werb, 1989). Das Enzym erkennt Gelatine, Typ IV, V und VII Kollagen sowie Fibronectin als Substrat (Tab.1), während natives Typ I Kollagen nicht abgebaut wird (Salo et al., 1983; Collier et al., 1988; Reponen et

al., 1992). Die B-Form der Gelatinasen (92 kD Typ IV Kollagenase) unterscheidet sich durch den Besitz einer weiteren Domäne, die Homologie zur  $\alpha_2$ -Kette des Typ V Kollagen zeigt. Ihre Substratspezifität ist vergleichbar mit der der A-Form (Wilhelm et al., 1989; Huhtala et al., 1991).

Enzym	ECM-Substrat
<b>Kollagenasen</b>	
interstitielle (FIB-CL)	Kollagen I, II, III (III > I), VII, VIII, X, Gelatine
neutrophile (PMN-CL)	wie interstitielle Kollagenase, (I > III)
<b>Stromelysine</b>	
Stromelysin 1	Fibronectin, Laminin, Kollagen IV, V, IX, X, Elastin, Gelatine, Proteoglykane
Stromelysin 2	wie Stromelysin 1
<b>Gelatinasen</b>	
72 kD Typ IV Kollagenase (Gelatinase A)	Gelatine, Kollagen IV, V, VII, X, XI, Elastin, Fibronectin
92 kD Typ IV Kollagenase (Gelatinase B)	wie 72 kD Typ IV Kollagenase
<b>Andere MMPs</b>	
PUMP	Fibronectin, Laminin, Kollagen IV, Gelatine, Elastin, Proteoglykane
Stromelysin 3	nicht bestimmt
Makrophagen-Elastase	Elastin, Fibronectin

Tab.1: Substratspezifität der Mitglieder der Familie der Metalloproteinasen (Matrisian, 1992; Birkedal-Hansen et al., 1993). Die MMPs werden aufgrund ihrer Substratspezifität in die Subklassen Kollagenasen, Stromelysine, Gelatinasen und andere MMPs eingeteilt.

Betrachtet man sich die Anzahl der existierenden Enzyme gegenüber der beschriebenen Menge von Kollagenen (> 10 Typen, s. a. Abschnitt 1.1) ist klar, daß es nicht für jeden einzelnen Typ von Kollagen ein Enzym mit spezifischer Aktivität gibt. Welche Enzyme für den Abbau all dieser Kollagentypen verantwortlich sind, ist noch nicht geklärt. Zum einen besitzen die Enzyme überlappende Substratspezifitäten und vielleicht sind die bisher "in vitro" bestimmten Substratspezifitäten unter physiologischen Bedingungen noch sehr viel weiter gestreut. Weiterhin

könnten zusätzliche Mitglieder der MMP-Familie existieren, die bisher noch nicht identifiziert werden konnten.

Aufgrund der signifikanten Homologie im aktiven Zentrum der hier beschriebenen Metalloproteinasen und Zink-Endopeptidasen von niedrigen Organismen, wie Bakterien (z. B. Thermolysin) oder dem Flußkrebs *Astacus astacus* L. (*Astacus* Proteinase=*Astacin*) könnte eine strukturelle Verwandtschaft zwischen diesen Zinkendopeptidasen und den hier aufgeführten MMPs höherer Organismen bestehen (Murphy et al., 1991). Die Tatsache, daß bestimmte Aminosäuren (Histidine) aus dem Bereich des aktiven Zentrums während der Evolution erhalten geblieben sind, während die benachbarten Sequenzen eine sehr viel geringere Homologie aufweisen, verdeutlicht die essentielle Funktion dieser Aminosäuren. Aufgrund der Selektion dieser Aminosäuren dürfte die katalytische Maschinerie der Säuger-MMPs weitgehend der den bakteriellen Endopeptidasen entsprechen (Springman et al., 1990).

#### **1.4 Regulation der Synthese und Aktivität der Metalloproteinasen**

Metalloproteinasen werden, wie viele andere sezernierte Enzyme, streng kontrolliert. Dies mag in Zusammenhang stehen mit der vermuteten Bedeutung dosierter Aktivität bei vielen Prozessen des Wachstums, der Morphogenese und der Wanderung von Zellen. Eine ungehemmte Aktivität dieser Enzyme kann deshalb, wie bereits erwähnt (s. 1.2), zu massiven Gewebeschäden führen und deshalb erhebliche Auswirkungen auf den betroffenen Organismus haben. Tatsache ist, daß mehrere Ebenen der Kontrolle entdeckt wurden: die Regulation auf der Ebene der Transkription und die Kontrolle der Aktivität des sezernierten Enzyms.

Die Regulation der Transkription von Kollagenase I und Stromelysin 1 wird durch eine Reihe von extrazellulären Stimuli, z. B. Wachstumsfaktoren oder Cytokine, aber auch durch verschiedene Umwelttoxene (Strahlung, chemische Karzinogene) reguliert.

So wird beispielsweise eine erhöhte Expression der Wachstumsfaktoren PDGF-A, TGF- $\alpha$  und TGF- $\beta$  während des Blastozysten Stadiums zum gleichen Zeitpunkt gefunden, zu dem die Menge an MMP-Transkripten erhöht ist (Rappolee et al., 1988). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß "in vitro" kultivierte, kapillare Rinderendothelzellen bei der Invasion durch eine menschliche Basalmembran des Amnions erhöhte Mengen an Proteasen, darunter auch MMPs, synthetisieren als Antwort auf den angiogenen, basischen Fibroblasten Wachstumsfaktor (bFGF) (Gross et al., 1983; Moscatelli et al., 1986; Presta et al., 1986; Mignatti et al., 1989).

In Zellkultur ist der Einfluß von Wachstumsfaktoren auf die Expression von MMPs gut untersucht. So führt die Behandlung von Zellen mit dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) oder dem, aus Blutplättchen stammenden Wachstumsfaktor (PDGF) zu einer erhöhten

Expression an MMPs (Kerr et al., 1988; Matrisian et al., 1986b). Auch Faktoren, wie das Interleukin-1 (IL-1) und der Tumornekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), die im Organismus als Antwort auf Entzündungsreaktionen von Makrophagen sezerniert werden (Frisch und Ruley, 1987; Brenner et al., 1989b), zeigen diesen Effekt. Weiterhin haben auch Faktoren, die in Folge von UV-Bestrahlung von Zellen freigesetzt werden, darunter IL-1 $\alpha$  und bFGF, eine ähnliche Wirkung auf die Expression von Metalloproteinasen (Schorpp et al., 1984; Krämer et al., 1993). Die meisten dieser extrazellulären Substanzen imitieren ihre Wirkung auf die Expression spezifischer Gene durch Bindung an den entsprechenden Oberflächenrezeptor an der Zellmembran. Dadurch wird ein Signal ausgelöst, welches dann über eine Signaltransduktionskaskade im Cytoplasma in den Zellkern weitergeleitet wird. Bestandteile dieser Signaltransduktionskaskade sind Proteinkinasen (darunter Proteinkinase C) und Phosphatasen, die durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung andere Proteine aktivieren oder reprimieren (Juliano und Haskill, 1993; Derijard et al., 1994). Der Phorbol-ester TPA (12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat) imitiert die Wirkung von Wachstumsfaktoren auf die Zelle (Angel et al., 1987a,b; Angel und Karin, 1991), und wird deshalb zur Erforschung von Signaltransduktion und Genexpression in Zellkultursystemen eingesetzt. TPA wirkt dabei, indem es direkt mit der Proteinkinase C interagiert und diese aktiviert (Nishizuka, 1984; 1986). Am Ende dieser Signalkette steht unter anderem die Aktivierung der Mitglieder der nukleären Protoonkogen-Familien *jun* und *fos*. Die Proteine dieser Protoonkogen-Familien bilden entweder Homodimer- (Jun/Jun), oder Heterodimer-Komplexe (Jun/Fos). Diese als AP-1 (Aktivatorprotein 1) bezeichneten Komplexe binden an ein 8 bp konserviertes Element, die AP-1 Bindungsstelle oder TRE-Sequenz ("TPA-responsive element"), die sowohl im Promoter des Kollagenase- als auch des Stromelysin 1-Gens vorkommt und für die Expression dieser Gene notwendig ist. "In vivo" und "in vitro" DNA/Protein Bindungsstudien (Footprinting) zeigten, daß eine verstärkte Bindung an die AP-1-Stelle im Kollagenase Promoter nach TPA-Behandlung erfolgt (Angel et al., 1987b; König et al., 1992).

Die AP-1 Bindungsstelle der Kollagenase I ist notwendig und ausreichend für eine Transkriptionsaktivierung durch TPA, wenngleich auch weitere Bindungsstellen für DNA bindende Proteine, z. B. "PEA3", stromaufwärts von der AP-1-Stelle im Kollagenase-, aber auch im Stromelysin-Promoter, identifiziert werden konnten, die für die volle Aktivität notwendig sind (Gutman und Wasylyk, 1990; 1992; H.-P. Auer, persönliche Mitteilung).

Um im Organismus die Expression der MMPs wieder gezielt auf den Basalwert zurückzubringen, müssen auch Mechanismen existieren, die die AP-1 Aktivität reprimieren. Die zwei am besten untersuchten Beispiele von zellulären, bzw. viralen Komponenten, die die AP-1 Aktivität, und davon abhängig, auch die Expression von MMPs (Kollagenase I und

Stromelysin 1) hemmen, sind Steroidhormonrezeptoren (darunter das Stresshormon Cortisol, Parillo und Bauci, 1979; Frisch und Ruley, 1987; Jonat et al., 1990; Schüle et al., 1991; Ponta et al., 1992) und das E1A Genprodukt von Adenoviren (Offringa et al., 1990). Die reprimierende Wirkung dieser Proteine auf die MMP-Expression findet auf Transkriptionsebene durch Hemmung der DNA Bindung (durch E1A; Hagmeyer et al., 1993) oder durch Hemmung der Transaktivierungseigenschaften von Fos/Jun (durch Steroidhormonrezeptoren; Schüle et al., 1991; Schüle und Evans, 1991; König et al., 1992) statt.

Der therapeutische Effekt künstlicher Steroide (z. B. Dexamethason) ist wahrscheinlich auf diese Repression von Fos/Jun und damit der Hemmung der MMP Expression zurückzuführen, und könnte somit für die klinische Therapie Bedeutung haben (Allison, 1988).

In Zellkultur wird eine Wachstumsfaktor-induzierte (z. B. durch EGF oder bFGF) Expression von Metalloproteinasen durch Wachstumsfaktoren der TGF- $\beta$ -Familie inhibiert (Edwards et al., 1987; als Übersichtsartikel: Matrisian und Hogan, 1990). Diese Repression erfolgt nicht über das TRE, sondern über eine weitere konservierte Sequenz TIE ("TGF- $\beta$ 1 inhibitory element") im Promoter des Stromelysin 1-Gens, und auch der Kollagenase- und Metalloelastase-Gene. Ein Protein des multimeren Komplexes, der an die "TIE" Konsensussequenz bindet, konnte als Produkt des *c-fos* Gens identifiziert werden. Seine Induktion durch TGF- $\beta$ 1 ist für die vermittelte Hemmung des Stromelysin 1 Gens notwendig (Kerr et al., 1990).

Die Regulation der MMP-mRNA Halbwertszeit könnte, wenn auch nur in weit geringerem Ausmaß als die transkriptionelle Regulation, eine weitere Möglichkeit der Kontrolle darstellen. So wurde eine Erhöhung der Halbwertszeit der Kollagenase I mRNA nach TPA-Behandlung (Brinckerhoff et al., 1986) und eine Verlängerung der Halbwertszeit der 72 kD Kollagenase IV mRNA nach einer TGF- $\beta$  Stimulierung beobachtet (Overall et al., 1991).

Neben der Regulation auf der Ebene der Transkription wird die Aktivität der MMPs auch auf posttranslationaler Ebene kontrolliert.

Kollagenase I und Stromelysin 1, als auch die Gelatinasen A und B, werden in zwei Formen mit unterschiedlichem Molekulargewicht von Zellen sezerniert. Das höhere Molekulargewicht der seltener vorkommenden Form ist auf eine partielle N-Glykosylierung zurückzuführen (Goldberg et al., 1986; Wilhelm et al., 1986; 1987; Wilhelm et al., 1989; Reponen et al., 1992). Die Funktion dieser Modifikationen ist nicht bekannt. Sie könnten jedoch für die Ausschleusung der unterschiedlichen MMP-Formen in verschiedene Kompartimente der ECM verantwortlich sein.

Die Sekretion dieser Enzyme erfolgt als inaktives Pro-Enzym. Unter physiologischen Bedingungen wird die Aktivierung durch die Abspaltung der Prodomäne (Abb.1) durch bisher unbekannte Proteasen bewerkstelligt. Bei diesem Prozeß könnten jedoch Serinproteinasen

(Plasmin) als Komponenten einer Enzymkaskade wirken, die in der Aktivierung der Prokollagenase und des Prostromelysins endet (Reich et al., 1988; He et al., 1989; Matrisian, 1992). In vitro Daten sprechen auch für eine direkte Beteiligung von Stromelysin, welches an der "in vivo" Aktivierung der Kollagenase involviert sein könnte (Fini et al., 1987b; Murphy et al., 1987; Ito und Nagase, 1988).

Um pathologischen Veränderungen vorzubeugen, ist es notwendig das Ausmaß des ECM-Abbaus und somit die Aktivität der MMPs zu kontrollieren. Dies setzt voraus, daß neben der Abschaltung der Transkription der MMP Gene, die aktiven Metalloproteinasen selbst auch rasch wieder inaktiviert werden können. Dies wird spezifisch durch die Mitglieder einer Familie von Gewebehemmern ("tissue inhibitor of metalloproteinases" = TIMP) bewerkstelligt. Diese Glykoproteine, die in einer Reihe von menschlichen Geweben und Gewebeflüssigkeiten gefunden werden, bilden einen irreversiblen Komplex mit der aktiven Form der MMPs in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 (Welgus und Stricklin, 1983; Docherty et al., 1985; Stetler-Stevenson et al., 1989). Eine "Netto"-Enzymaktivität resultiert nur dann, wenn die transkriptionelle Aktivierung des Metalloprotease-Gens die Expression des Inhibitors übersteigt. Wird das normale Gleichgewicht zwischen MMP und Inhibitor extrem gestört, treten pathologische Veränderungen auf. So erwerben nichtmetastasierende NIH3T3 Zellen, nach Reduktion der TIMP mRNA Menge durch die Transfektion von antisense TIMP-Konstrukten, tumorigene und metastatische Eigenschaften (Khokha et al., 1989). Es konnte auch gezeigt werden, daß eine erhöhte Kollagenase-Aktivität in metastasierenden Zellen, gegenüber nichtmetastasierenden, auf eine reduzierte TIMP-Genexpression zurückzuführen ist (Ponton et al., 1991).

### **1.5 Kontrolle von MMPs durch Wachstumsfaktoren bei embryonalen Prozessen**

Über die Wirkung von einzelnen Wachstumsfaktoren auf die Expression von Metalloproteinasen im Zellkultursystem existieren eine Vielzahl von Daten. Dagegen ist über die Wirkung dieser Faktoren in Bezug auf den Gesamtorganismus, wo viele verschiedene Prozesse gleichzeitig ablaufen, sehr viel weniger bekannt.

Während im adulten Organismus viele Vorgänge, die einen Gewebeumbau erfordern, nur noch in einem reduzierten Ausmaß stattfinden, laufen solche Prozesse, wie Organogenese, Angiogenese, Neurogenese und Knochenentwicklung während der Embryonalentwicklung in großem Umfang in eng begrenzten Zeiträumen ab. Hierbei findet ein hoher ECM-Umbau statt und deshalb wird auch eine hohe Aktivität der Enzyme zu diesem Zeitpunkt erwartet. Für einige wenige Prozesse konnte dies bisher nachgewiesen werden. So werden während der Trophoblasten Invasion eine Reihe von MMPs produziert, deren Expression zu späteren Stadien

der Entwicklung stark reduziert ist. Die Invasion des menschlichen Trophoblasten kann dabei durch spezifische Antikörper gegen die 92 kD Typ IV Kollagenase vollständig gehemmt werden (Librach et al., 1991). Eine Erhöhung der MMP-Transkriptmenge und MMP-Aktivitäten wird auch während des Blastozysten-Stadiums des Mausembryos beobachtet (Brenner et al., 1989a). In diesem Zusammenhang wird auch die Expression von Kollagenase I postuliert. Die vermutete Kollagenase I mRNA (2.0 kb) stimmt aufgrund ihrer Länge jedoch nicht mit der vor kurzem isolierten Kollagenase I cDNA (2.9 kb) der Maus überein (Henriett et al., 1992; Gack et al., 1994) und kodiert wahrscheinlich für eine andere MMP. Weiterhin konnten Stromelysin 3 RNA-Transkripte in mehreren Regionen eines achtwöchigen menschlichen Embryos durch "in situ" Hybridisierung gefunden werden. Eine Expression war z. B. in den zwischen den Fingern liegenden Regionen der Armanlagen zu beobachten (Basset et al., 1990).

Auf die mögliche Beteiligung von MMPs während des Prozesses der Knochenentwicklung soll hier, in Bezug auf die vorliegende Arbeit, im Besonderen eingegangen werden.

Zu Beginn der Organogenese des Mausembryos, zwischen dem achten und neunten Tag der Entwicklung, wird ein knorpeliges Skelettmodell, das hauptsächlich aus Typ II-Kollagen besteht, aus aggregierten Mesenchymzellen aufgebaut. Beginnend am Tag 14 wird dieses Knorpelmodell dann nach und nach durch eine verknöcherte Form, die vor allem aus Typ I-Kollagen besteht, ersetzt. Dieser Vorgang wird als "endochondrale Ossifizierung" bezeichnet (Rugh, 1968; Jee, 1989; Kaufman, 1992). Hierbei könnte Kollagenase I eine wichtige Rolle spielen, da sie die einzige Metalloproteinase ist, die eine spezifische Substratspezifität gegenüber nativem Kollagen vom Typ I, II und III zeigt.

Bei diesen Prozessen üben Wachstumsfaktoren und Hormone eine wesentliche Funktion aus. Das Parathormon (PTH) und Vitamin D<sub>3</sub> stimulieren die Knochenresorption sowohl in Zellkultur, als auch "in vivo" und induzieren darüberhinaus auch die Expression von Kollagenase I in kultivierten, knochenspezifischen Zellen (Heath et al., 1984; Delaisse et al., 1988; Matrisian und Hogan, 1990). Weiterhin könnten auch die Mitglieder der TGF- $\beta$ -Familie an der Regulation und Koordination von Knochenmatrixsynthese und -resorption sowohl während der Embryonalentwicklung, als auch im adulten Organismus beteiligt sein. Die Knochenentwicklung liefert daher ein fast einmaliges System, in welchem die Regulation der Synthese von ECM-Komponenten und die Regulation der Matrix abbauenden Enzyme durch Wachstumsfaktoren und Hormone eine Schlüsselrolle spielen könnte (als Übersichtsartikel: Matrisian und Hogan, 1990).

## **1.6 Die transgene Fos-Maus: ein System zur Untersuchung der Regulation der MMP Expression "in vivo"**

Um die Regulation und die genaue Funktion von Metalloproteinasen in Geweben des Embryos, als auch des adulten Organismus untersuchen zu können, war es notwendig ein dafür geeignetes System auszuwählen. Die Maus ist der am besten untersuchte Säugerorganismus und inzwischen sind gezielte Eingriffe in die Keimbahn möglich. Durch solche Eingriffe in die Keimbahn konnten mittlerweile Mausstämme etabliert werden, bei denen das *c-fos* Gen, eine Hauptkomponente des für die Regulation der Kollagenase I notwendigen Transkriptionsfaktors AP-1, konstitutiv exprimiert ist ("Transgene") oder durch homologe Rekombination inaktiviert wurde ("Knock out") (Rüther et al., 1987; 1988; 1989; Johnson et al., 1992; Wang et al., 1992). Diese Tiere zeigen mehrere phänotypische Veränderungen, hauptsächlich des Knochengewebes:

Transgene Mäuse, die das *c-fos* Gen konstitutiv exprimieren, entwickeln mit hoher Inzidenz Schwellungen (lokale Hyperosteosen) in den Röhrenknochen, aus denen sich mit einer Rate von 18 Prozent invasive Tumore bilden (Rüther et al., 1989). Darüberhinaus besitzen sie eine vergrößerte Milz und ihre T-Zell Entwicklung im Thymus ist gestört (Rüther et al., 1988). Auch die Knochenentwicklung der "*fos*-negativen" Mäuse ist erheblich beeinträchtigt. Die Tiere zeigen ein verzögertes Wachstum, ihre Röhrenknochen sind verkürzt, die Zahnbildung ist gestört und sie neigen zu Osteopetrose. Auch die Blutzellentwicklung ist beeinflusst (Johnson et al., 1992; Wang et al., 1992).

## **1.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit**

Diese beobachteten pathologischen Veränderungen spezifischer Gewebe, vor allem im Knochen einerseits, und die Spezifität von Kollagenase I für die Kollagentypen I und II andererseits, die vorwiegend im Knochen- und Knorpelgewebe zu finden sind, könnten auf eine Beteiligung dieser MMP im Knochenmetabolismus hinweisen. Daher bieten die *c-fos* transgenen und die *c-fos* defizienten Tiere ein ideales System um eine AP-1-abhängige Expression von Metalloproteinasen, im Besonderen der Kollagenase I, bzw. deren postulierte Funktion im Gesamtorganismus zu untersuchen.

Der erste Schritt zur Untersuchung, ob Kollagenase I tatsächlich während der Knochenentwicklung exprimiert wird, ob Veränderungen ihrer Expression in den Maus-Mutanten auftreten, und ob sich die Expression von Kollagenase I von anderen MMPs unterscheidet, war die Klonierung von mausspezifischen MMP cDNAs. Bislang wurde nur für die Gelatinase A eine gewebespezifische Expression sowohl in adulten, als auch in embryonalen Geweben der Maus gezeigt (Reponen et al., 1992).

Die Klonierung von cDNA Fragmenten der vier Maus Metalloproteinasen Stromelysin 1, Stromelysin 2, Kollagenase I und Kollagenase IV (72 kD) war im Verlauf dieser Arbeit möglich. Mit Hilfe dieser cDNA Proben sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Wie werden die MMPs der Maus in Zellkultur als Antwort auf verschiedene extrazelluläre Stimuli reguliert? Ist dieser Regulationsmechanismus mit demjenigen im Organismus vergleichbar?
2. Gibt es Unterschiede in der Expression der MMPs zwischen embryonalen und adulten Geweben?
3. Wird die MMP-Expression durch die veränderte Expression der AP-1 Komponente cFos in *c-fos* transgenen und *c-fos* defizienten Mäusen beeinflusst? Spielt Kollagenase I eine Rolle bei der Entstehung der beobachteten Gewebeveränderungen in diesen Tieren?

## 2. MATERIALIEN

### 2.1 Bezugsquellen:

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose Typ II, Typ VII	Sigma, München
Alkalische Phosphatase	Boehringer, Mannheim
3-Aminopropyltriethoxy-Silan (TESPA)	Sigma, München
Ammoniumperoxodisulfat	Bio Rad Laboratories, München
Ampicillin	Sigma, München
AMV-Reverse Transkriptase	Stratagene, Heidelberg
Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung (Giemsa)	Merck, Darmstadt
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit
Bacto-Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit
Bacto-Trypton	Difco Laboratories, Detroit
8-Bromoadenosin-3';5'-zyklisches Monophosphat	Sigma, München
BSA	Serva, Heidelberg
Cäsiumchlorid	Biomol, Ilvesheim
CTAB	Sigma, München
Desoxy-Nukleosidtriphosphate	Boehringer, Mannheim
Didesoxy-Nukleosidtriphosphate	Boehringer, Mannheim
Dimethyldichlorsilan	Fluka, Buchs
Dithiothreitol	BRL Inc., Neu-Isenburg
DMEM	Gibco, Eggenstein
DMSO	Fluka, Buchs
DNA-Polymerase I (Klenow)	Bio Labs, Schwalbach
Einbettkassetten	Leica Vertrieb GmbH, Bensheim
Elutip-Säulen	Schleicher und Schuell, Dassel
Emulsifier Safe	Packard Instrument Company, Illinois
Entellan (Schnelleindeckmittel für die Mikroskopie)	Merck, Darmstadt
Essigsäureanhydrid	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, München
Ficoll	Sigma, München
Formamid	Sigma, München
Fötale Kälberserum	Gibco, Eggenstein
Glycerin	BRL Inc., Neu-Isenburg
Harnstoff	Bio Rad Laboratories, München

Heringssperma-DNA Typ III	Sigma, München
Histowax	Leica Vertrieb GmbH, Bensheim
Hybond N <sup>+</sup>	Amersham, Braunschweig
Hyperfilm <sup>TM</sup> -MP	Amersham, Braunschweig
LM-1 Emulsion für die Autoradiographie	Amersham, Braunschweig
Lysozym	Boehringer, Mannheim
β-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
N,N'-Methylenbisacrylamid	Bio Rad Laboratories, München
Objektträger	Bender und Hobein, Karlsruhe
Oligo-d(T)-Cellulose	Pharmacia, Freiburg
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Eggenstein
Polyoxymethylen Färbegestelle	Bender und Hobein, Karlsruhe
Polyoxymethylen Färbetröge	Bender und Hobein, Karlsruhe
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	Sigma, München
Proteinase K	Sigma, München
Restriktionsendonukleasen	USB, Cleveland
	Boehringer, Mannheim
	Pharmacia, Freiburg
	Promega Biotec, Heidelberg
	Boehringer, Mannheim
	Wacker Chemie, München
	Serva, Heidelberg
	Sigma, München
	Amersham, Braunschweig
	Promega Biotec, Heidelberg
	USB, Cleveland
	USB, Cleveland
	Bio Rad Laboratories, München
	Sigma, München
	Sigma, München
	Vetter, Wiesloch
	Bender u. Hobein, Karlsruhe
	Greiner, Nürtingen
RNase A	
Silan GF31	
Silikon-Lösung	
Sodiumthiosulfat	
Taq-Polymerase	
T4-DNA-Ligase	
T4-Polynukleotid-Kinase	
T7-Sequenase-Kit	
TEMED	
TPA	
Triethanolamin	
UV-Lampe (254 nm)	
Whatman 3MM-Papier	
Zellkulturschalen	

## 2.2 Radiochemikalien

$\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP (370 MBq/ml)

$\alpha$ -<sup>35</sup>S-dATP (296 MBq/ml)

$\alpha$ -<sup>35</sup>S-UTP (370 MBq/ml)

Alle Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham, Braunschweig bezogen.

## 2.3 Bakterien und eukaryontische Zelllinien

**E. coli XL1 blue:** (F':Tn10proA+B+lacI<sup>q</sup> d(lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96 (Nal<sup>r</sup>) thi hsdR17 (r<sub>k</sub>-m<sub>k</sub>+ ) supE44 relA1 lac.

**E. coli K12/CMK 603:** (thr<sup>-</sup>, leu<sup>-</sup>, supE, recBC, lacY<sup>-</sup>).

**F9 tk<sup>-</sup>:** embryonale Maus-Teratokarzinom-Zellen. Erhalten von Dr. Peter Angel, Institut für Genetik, Kernforschungszentrum Karlsruhe.

**NIH3T3:** embryonale Maus-Fibroblasten. Entsprechen der NIH 3T3-Zelle der American Type Culture Collection.

**LuSVX:** SV40 transformierte Maus Lungen-Fibroblasten. Erhalten von Dr. Hans Weiher, Institut für Genetik, Kernforschungszentrum Karlsruhe.

**rat2pEJ:** mit dem T24-ras-Onkogen transformierte rat2-Fibroblasten aus Fisher-Ratten. Poly A<sup>+</sup> RNA aus diesen Zellen erhalten von Dr. Martin Hofmann, Institut für Genetik, Kernforschungszentrum Karlsruhe.

## 2.4 Mausstämme:

CFW x Balb/c Hybridmäuse, infiziert mit einem rekombinanten Retrovirus (Mpv17 Mäuse, heterozygot). Die heterozygoten Tiere zeigen keinen veränderten Phänotyp. Embryonen dieser Mäuse wurden von Dr. Hans Weiher, Institut für Genetik, Kernforschungszentrum Karlsruhe zur Verfügung gestellt.

Mäuse (genetischer Hintergrund C57BL/6 x SJL), homozygot transgen mit dem H2-*c-fos*LTR Genkonstrukt (LTR des Moloney Sarkomavirus). RNA aus den Geweben dieser Mäuse wurde von Dr. Ulrich Rütter, Institut für Molekularbiologie, Medizinische Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt.

Mäuse (genetischer Hintergrund C57BL/6 x SJL) transgen mit dem Mx-*c-fos*D Genkonstrukt. RNA aus den Geweben dieser Mäuse wurde von Dr. Ulrich Rüther, Institut für Molekularbiologie, Medizinische Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt.

Mäuse (genet. Hintergrund C57BL/6), bei denen das endogene *c-fos* Gen durch homologe Rekombination inaktiviert wurde (homozygot). Paraffinschnitte von Geweben dieser Mäuse wurden von Dr. Agamemnon Grigoriadis, Forschungsinstitut für Molekulare Pathologie, Wien zur Verfügung gestellt.

## **2.5 Kulturmedien**

### **L-Broth:**

0.5% Bacto-Hefeextrakt, 1.0% NaCl, 1.0% Bacto-Trypton

### **PSI-Medium:**

2% Bacto-Trypton, 0.5% Bacto-Hefeextrakt, 0.4% MgSO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, pH 7.7

### **SOB:**

0.5% Bacto-Hefeextrakt, 2% Bacto-Trypton, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>

### **SOC:**

SOB mit 20 mM Glucose

### **Bakterienselektionsmedium:**

L-Broth mit 100 µg/ml Ampicillin

### **Einfriermedium:**

90% L-Broth, 10% DMSO

### **Kulturmedium für LuSVX- und NIH3T3-Zellen:**

DMEM mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

### **Kulturmedium für F9-Zellen:**

DMEM-F12 (1:1) mit 2 mM Glutamin, 10<sup>-3</sup> M β-Mercaptoethanol, 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

### **Einfriermedium (Zellkultur):**

DMEM mit 10% FCS, 10% DMSO

## **2.6 Plasmide:**

**pAZ:** Minimal-Klonierungsvektor mit bakteriellem Origin,  $\beta$ -Lactamasegen und Polylinker (MCS). (pSP65-Derivat; U. Günthert, pers. Mitteilung)

## **2.7 Verwendete Primer:**

**coll-7:** 5'-ATGAGAAAACCAAGATGTGGAGTGCCTGATGT-3' (entspricht Nukleotid 258-289 der Ratten Kollagenase I, Quinn et al., 1990)

**coll-8:** 5'-TTGGCGGGGACGCCATTTTGATGATGATGA-3' (entspricht Nukleotid 570-601 der Ratten Kollagenase I, Quinn et al., 1990)

**coll-12:** 5'-AGACAGCATCTACTTTGTCGCCAATTCCAGG-3' (entspricht Nukleotid 1259-1290 der Ratten Kollagenase I, Quinn et al., 1990))

**coll-13:** 5'-TCCTTGAGTGGTCCAGACCGAGGGAGTGGCCAAGCTCATGGGCAGCAAC-3' (entspricht Nukleotid 641-691 der Ratten Kollagenase I, Quinn et al., 1990))

**coll-15:** 5'-GGATATCTAGATGCGAAAGCCACGGTGCGGCA/GT/ACCCAGA-3' (entspricht Nukleotid 202-230 der menschlichen 72 kD Typ IV Kollagenase, Collier et al., 1988)

**coll-16:** 5'-CCAGATCTCGAGTGGCCGAACTCATGGGCCC/TGCCACGC/AG-3' (entspricht Nukleotid 1108-1137 der menschlichen 72 kD Typ IV Kollagenase, Collier et al., 1988)

### **3. METHODEN**

#### **3.1 Behandlung von Nukleinsäuren**

##### **3.1.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Extinktion der wässrigen Nukleinsäurelösung bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch bestimmt. Eine Extinktion von 1 entspricht 50  $\mu\text{g/ml}$  (doppelsträngiger) DNA, 40  $\mu\text{g/ml}$  Ribonukleinsäure (RNA) oder 20  $\mu\text{g/ml}$  Oligonukleotid DNA.

##### **3.1.2 Phenol/Chloroform Extraktion**

Zur Reinigung der Nukleinsäure-Lösung von Proteinen wurde die Probe mit Wasser auf mindestens 100  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Nach Zugabe des gleichen Volumens Phenol (mit 1x TNE gesättigt; 1x TNE: 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA pH 8) wurde gut geschüttelt und nach Zugabe eines weiteren Volumens Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) nochmals gut gemischt. Die Phasen wurden durch 3 min Zentrifugieren wieder getrennt. Die Oberphase wurde abgenommen und noch zweimal mit dem gleichen Volumen Chloroform auf die gleiche Weise extrahiert.

##### **3.1.3 Präzipitation von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen**

Die Nukleinsäure-Lösung wurde mit Natriumacetat (pH 4.8) bis zu einer Endkonzentration von 0.25-0.3 M versetzt. Nach Zugabe des 2.5-fachen Volumens Ethanol wurde 30 min bei  $-80^{\circ}\text{C}$  oder über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gefällt und anschließend 10 bis 30 min bei 13000xg zentrifugiert. Zur Entfernung von Salz wurde das Präzipitat nochmal mit 80% Ethanol gewaschen und anschließend im Vakuum-Konzentrator ("speed vac") getrocknet.

#### **3.2 Transformation von Bakterien**

##### **3.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien**

Der Bakterienstamm XL1 blue oder K12/CMK 603 wurde auf einer Agarplatte mit LB-Medium ausgestrichen und bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 16 h inkubiert. Von dieser Platte wurde eine Einzelkolonie gepickt und damit eine 6 ml Kultur mit PSI-Medium angeimpft. Diese Kultur wurde unter Schütteln bei  $37^{\circ}\text{C}$  bis zu einer OD von 0,28 (bei 600 nm) inkubiert. Mit diesem Ansatz wurde eine 100 ml Kultur mit PSI-Medium angeimpft und unter Schütteln bei  $37^{\circ}\text{C}$  bis zu einer OD von 0,48 (bei 600 nm) wachsen gelassen. Danach wurden die Bakterien sofort auf Eis gestellt.

Nach Sedimentation der Bakterien bei 1500xg für 10 min bei 4°C, wurden diese in 10 ml vorgekühltem (4°C) TFBI-Puffer (100 mM RbCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 30 mM KAC, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.2 mit 0.2 M Essigsäure eingestellt, sterilfiltriert) für 3 h auf Eis gestellt. Nach dieser Zeit wurden die Bakterien bei 1500xg für 5 min bei 4°C sedimentiert, in 10 ml vorgekühltem TFBI-Puffer (10 mM MOPS pH 7, 10 mM RbCl<sub>2</sub>, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % Glycerin) resuspendiert und in 100 µl Aliquots abgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

### **3.2.2 Transformation von kompetenten Zellen**

Ein 100 µl Aliquot mit kompetenten Bakterien (s. 3.2.1) wurde auf Eis aufgetaut, 5 µl des Ligationsansatzes zugemischt, und eine Stunde auf Eis gestellt. Nach 90 Sekunden Hitzeschock bei 42°C und 2 min auf Eis wurden 3 ml SOC-Medium (0.5% Bacto-Hefeextrakt, 2% Bacto-Trypton, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Glukose) zugegeben und 60 min bei 37°C geschüttelt. 200 µl der Bakteriensuspension wurden danach auf eine Selektiv-Agarplatte ausgestrichen.

### **3.2.3 Herstellung von Selektiv-Agarplatten**

In einem 2 l Kolben wurden 5 g Hefeextrakt, 10 g Bacto-Trypton, 10 g NaCl und 15 g Bacto-Agar auf 1 Liter mit Wasser aufgefüllt. Diese Mischung wurde autoklaviert. Nach Abkühlen auf etwa 45°C wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben. Damit konnten etwa 30 Agarplatten (9 cm Durchmesser) gegossen werden. Luftblasen wurden durch Überstreichen mit einer Bunsenbrennerflamme entfernt. Nach Erstarren des Agars wurden die Platten bei 4°C gelagert.

## **3.3 DNA Präparation**

### **3.3.1 Mini-Plasmid DNA Präparation**

Die Bakterien wurden in 2 ml Nährmedium mit dem Antibiotikum Ampicillin (100 µg/ml) über Nacht bei 37°C geschüttelt. 1.5 ml der Kultur wurden 5 min bei 4000xg zentrifugiert. Das Sediment wurde in 200 µl STET-Puffer (8% Saccharose, 0.1% Triton X-100, 50 mM EDTA pH 8.0, 50 mM Tris pH 8.0) und 20 µl Lysozym (10 mg/ml) resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Nach 1-minütigem Kochen wurde die Lösung 10 min bei 13000xg zentrifugiert. Das Sediment wurde mit einem Zahnstocher entfernt, zum Überstand wurden 8 µl CTAB-Ionenaustauscher (5% CTAB in 500 mM NaCl) zugegeben. Nach 10 min Zentrifugation bei 13000xg wurde der Überstand verworfen, das Sediment in 300 µl 1.2 M NaCl aufgenommen und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 750 µl Ethanol 10 min bei -70°C gefällt. Die

ausgefallene Plasmid-DNA wurde dann 10 min bei 13000xg pelletiert und nochmals mit 70% Ethanol gewaschen.

### **3.3.2 Plasmid DNA Präparation**

Die Bakterien wurden in 2 ml Nährmedium (L-Broth) mit dem Antibiotikum Ampicillin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) etwa 4 Stunden bei 37°C geschüttelt. 500  $\mu\text{l}$  dieser Vorkultur dienten zum Animpfen von 250 ml Selektionsmedium. Die Bakterien wurden dann über Nacht bei 37°C im Erlenmeyer-Kolben geschüttelt.

Die über Nacht inkubierte Bakterien-Suspension wurde 10 min bei 3600xg und 4°C abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 5 ml einer Tris-Saccharose-Lösung (50 mM Tris pH 8.0, 25% Saccharose) resuspendiert und in Beckmann SW40 Zentrifugenröhrchen gefüllt. Dann wurden 5 ml einer Lysozym-Lösung (2 mg/ml Lysozym, 100 mM EDTA pH 8.0, 0.1% Triton X-100) zugegeben. Das Gemisch wurde bei RT 10 min geschüttelt und anschließend 10 min bei 70°C inkubiert. Die Lösung wurde dann 1 Stunde in einer Beckman Ultrazentrifuge bei 30000xg (4°C) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand in ein Zentrifugenglas gefüllt und 10 ml einer PEG-Lösung (20% PEG 6000, 1 M NaCl, 10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) dazugegeben. Nach 1 Stunde Inkubation bei RT wurde das Gemisch bei 2400xg zentrifugiert. Das Sediment wurde in TE-Puffer (pH 8.0) 1 Stunde bei 37°C gelöst. Nach Zugabe von 4.2 g CsCl und 150  $\mu\text{l}$  Ethidiumbromid (10 mg/ml) wurde die Lösung in Beckman VTi65 Ultrazentrifugenröhrchen verteilt und 16 Stunden bei 55000 rpm und 20°C in einer Beckman Ultrazentrifuge (Rotortyp: VTi65-Vertikalrotor) zentrifugiert. Die Plasmidbanden wurden anschließend mit Hilfe einer Spritze abgezogen und nochmals für weitere 6 Stunden unter den selben Bedingungen zentrifugiert. Nach Abziehen der Plasmidbanden wurden zwei Teile Wasser zu der Lösung gegeben und das Ethidiumbromid mit wassergesättigtem 1-Butanol extrahiert. Die DNA wurde aus der wässrigen Phase mit Ethanol präzipitiert.

## **3.4 Klonierungstechniken**

### **3.4.1 Fragmentierung von DNA-Molekülen durch Restriktionsendonukleasen**

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

### 3.4.2 Dephosphorylierung von DNA

Die DNA wurde mit 1  $\mu\text{l}$  Alkalischer Phosphatase (2U/ $\mu\text{l}$ ) in einem Endvolumen von 50  $\mu\text{l}$  1x CIP-Puffer (50 mM Tris pH 9, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1 mM  $\text{ZnCl}_2$ , 1 mM Spermidin) versetzt. Die Abspaltung der Phosphatgruppe erfolgte bei 5'-überhängenden Enden durch 30 min Reaktion bei 37°C. Danach wurde erneut 1  $\mu\text{l}$  Enzym zugesetzt und für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Bei 3'-überhängenden und glatten Enden wurde 15 min bei 37°C und 15 min bei 56°C dephosphoryliert, dann 1  $\mu\text{l}$  Enzym zugefügt und nochmals je 15 min bei 37°C und 56°C dephosphoryliert. In beiden Fällen wurden 42.5  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ , 10  $\mu\text{l}$  TNE (1x: 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 1mM EDTA pH 8) und 2.5  $\mu\text{l}$  20% SDS zugegeben und 15 min bei 68°C inkubiert. Danach erfolgt eine Phenol/Chloroform-Extraktion und die Präzipitation der DNA.

### 3.4.3 Phosphorylierung von Oligonukleotiden und Linkern

Etwa 2  $\mu\text{g}$  Oligonukleotid oder Linker-DNA wurden mit 1  $\mu\text{l}$  10 mM ATP und 1  $\mu\text{l}$  T4-Polynukleotid-Kinase (10 U/ $\mu\text{l}$ ) in einem Endvolumen von 10  $\mu\text{l}$  mit Linker-Kinase-Puffer (66 mM Tris pH 7.6, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 15 mM DTT, 1 mM Spermidin, 1 mM ATP, 0.2 mg/ml BSA) versetzt. Die Reaktion wurde nach einer Stunde Inkubation bei 37°C durch Einfrieren bei -20°C abgestoppt.

### 3.4.4 Auffüllen von 5'-Überhängen

Die DNA wurde mit 2  $\mu\text{l}$  10 mM DTT, 1  $\mu\text{l}$  10 mM dNTP-Mix (10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP, 10 mM Tris pH 7.5) und 1  $\mu\text{l}$  E. coli DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment, 5 U/ $\mu\text{l}$ ) in einem Endvolumen von 20  $\mu\text{l}$  1x Polymerase-Puffer (7 mM Tris pH 7.5, 7 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM NaCl) versetzt. Nach 30 min Reaktion bei RT erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion. 3'-Überhänge werden bei dieser Prozedur abgebaut.

### 3.4.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden mit 2  $\mu\text{l}$  10 mM ATP und 1  $\mu\text{l}$  T4 DNA-Ligase (2 U/ $\mu\text{l}$ ) versetzt und in einem Endvolumen von 20  $\mu\text{l}$  in 50 mM Tris pH 7.4, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM DTT, 1 mM Spermidin, 1 mM ATP für 16 h bei 15°C inkubiert. Wenn sich die zu ligierenden DNA-Fragmente in "low-melting" Agarose befanden, wurde diese 10 min bei 68°C geschmolzen und nach dem Abkühlen auf 42°C sofort mit obigen Lösungen versetzt. Für Linker-Ligationen wurden 2  $\mu\text{l}$  des phosphorylierten Linkers benutzt.

### 3.4.6 cDNA-Synthese (Erststrangsynthese)

5  $\mu\text{g}$  poly A<sup>+</sup>-RNA wurden mit 1,25  $\mu\text{l}$  Oligo d(T)<sub>18</sub> (200 ng/ $\mu\text{l}$ ) in einem Endvolumen von 30  $\mu\text{l}$  10 min bei 90°C erhitzt und in Eiswasser abgekühlt. Nach Zugabe von 5  $\mu\text{l}$  10x RTC-Puffer (500 mM Tris pH 8.15 [bei 41°C], 60 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 mM KCl, 10 mM DTT), 2,5  $\mu\text{l}$  10x dNTPs (25 mM), 1,5  $\mu\text{l}$  RNasin (40 U/ $\mu\text{l}$ ) und 1  $\mu\text{l}$  AMV-Reverser Transkriptase (20-30 U/ $\mu\text{l}$ ) wurde der Ansatz in einem Volumen von 50  $\mu\text{l}$  eine Stunde bei 41°C inkubiert.

Für PCR-Amplifikationen wurde der Ansatz nach thermischer Inaktivierung der Reversen Transkriptase (30 min bei 52°C) mit TE auf 500  $\mu\text{l}$  aufgefüllt.

### 3.4.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

5  $\mu\text{l}$  einer Erststrangreaktion (siehe cDNA-Synthese) wurden mit je 250 ng Amplifikationsprimern, die für das 3'- und 5'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes spezifisch waren, in 1x PCR-Puffer (10 mM Tris pH 8.9 (bei 25°C), 40 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% Gelatine), 250  $\mu\text{M}$  dNTPs und 5 U Taq-Polymerase in einer 100  $\mu\text{l}$  Reaktion amplifiziert. Dabei wurden meist 35 Zyklen mit den folgenden Grenzwerten durchgeführt:

Denaturierung: 1 min bei 94°C

Annealing: 2 min bei 45°C

Extension: 2 min bei 72°C

Nach Beendigung der programmierten Zyklen wurden 10  $\mu\text{l}$  aus der Reaktion auf einem Polyacrylamidgel analysiert.

### 3.4.8 Sequenzierung von DNA

Cäsiumchlorid-gereinigte Plasmid-DNA wurde nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977) mit dem "T7-Sequenase-Kit" der Firma USB, Cleveland Ohio sequenziert. Die Durchführung der Reaktion erfolgte nach den Angaben des Herstellers. 5  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA wurden mit 0.2 mM EDTA, 0.2 M NaOH denaturiert. Die denaturierte DNA wurde mit 2.5 ng bzw. 40 ng der entsprechenden Sequenzier-Primer oder den für die Polymerase-Kettenreaktion verwendeten Oligonukleotide gemischt, auf 65°C erhitzt und langsam auf RT abgekühlt. Nach einer kurzen Strangverlängerung mit  $\alpha$ -<sup>35</sup>S-dATP erfolgt die eigentliche Kettenabbruch-Reaktion mit den vier Didesoxy-Nukleosidtriphosphaten. Nach Abstoppen der Reaktion mit Formamid-Probenpuffer (20 mM EDTA pH 7.8, 99% Formamid, 0.03% Xylencyanol, 0.03% Bromphenolblau) und 3 min Kochen wurden die Proben auf einem denaturierenden 6% Polyacrylamid/8.3 M Harnstoff Gel aufgetragen.

### **3.5 DNA-Gelelektrophorese**

#### **3.5.1 Agarose-Gelelektrophorese**

Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden 0.8% bis 1.5% Agarose-Gele benutzt. Es handelt sich hierbei um Mini-Gele: Gelvolumen 50 ml, Puffervolumen 100 ml, Taschenvolumen 25  $\mu$ l. Das Gel ist völlig von Puffer bedeckt. Die entsprechende Menge Agarose Typ II wurde in 50 ml 1x TBE (90 mM Tris pH 8.3, 90 mM krist. Borsäure, 2.5 mM EDTA pH 8) gegeben und 5 min im Mikrowellenherd aufgeköcht. Für "low melting" Gele wurde Agarose Typ VII verwendet. Nach Zugabe von 3  $\mu$ l Ethidiumbromid (10 mg/ml) wurde das Gel gegossen und ca. 30 min abkühlen gelassen. Nach Eingießen des Laufpuffers (1x TBE) wurde der Kamm entfernt und die Proben in Glycerin-Probenpuffer (10 mM EDTA, 10% Glycerin, 0.1% SDS, 0,02% Bromphenolblau) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei etwa 100 V. Die DNA-Banden werden unter UV (256 nm) sichtbar gemacht.

#### **3.5.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden 6% bis 10% Polyacrylamid-Gele verwendet. Das Gel wurde zwischen zwei 14 x 15 cm große Glasplatten mit 1 mm dicken Abstandhaltern gegossen. Für ein 6% Gel benötigt man 6 ml einer deionisierten Acrylamid:Bisacrylamid (30:0.8) Stammlösung, die mit 3 ml TBE (1x: 90 mM Tris pH 8.3, 90 mM krist. Borsäure, 2.5 mM EDTA pH 8.0) und 21 ml Wasser versetzt wird. Nach Zufügen und Mischen von 25  $\mu$ l TEMED und 150  $\mu$ l 10% Ammoniumperoxidsulfat-Lösung wurde das Gel gegossen und ein geeigneter Kamm eingesetzt. Nach Auspolymerisieren des Gels wurde der Kamm entfernt und die Taschen mit Wasser ausgespült. Die Gelplatten wurden senkrecht in eine Elektrophorese-Apparatur eingespannt und als Anoden- und Kathodenpuffer je etwa 400 ml 1x TBE eingefüllt. Nach Auftragen der Proben in Glycerin-Probenpuffer (10 mM EDTA pH 8.0, 10% Glycerin, 0.1% SDS, 0.02% Bromphenolblau) erfolgte die Auftrennung bis zum Einwandern der Proben ins Gel bei 100 V und danach bei 240 V. Nach Ende der Elektrophorese wurde das Gel von den Glasplatten entfernt und 15 min unter leichtem Schütteln in 200 ml 1x Wasser mit 1  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid gefärbt. Unter UV (256 nm) werden die DNA-Banden sichtbar.

#### **3.5.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die Präparation von DNA-Fragmenten nach vorhergehender Auftrennung in Agarosegelen wurde mit Hilfe von "Elutip"-Ionenaustauschersäulen durchgeführt. Die DNA wurde zuvor in "low-melting"-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt und die gewünschte Bande ausgeschnitten.

Nach Schmelzen der Agarose in einem 10 ml Röhrchen bei 65°C wurden 5 ml Niedrigsalz-Puffer (100 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7.6, 1 mM EDTA) zugegeben und weitere 30 min bei 65°C inkubiert. Eine Elutip-Säule wurde zwischenzeitlich mit 1 ml Hochsalz-Puffer (1 M NaCl, 20 mM Tris pH 7.6, 1 mM EDTA) hydriert und mit 5 ml Niedrigsalz-Puffer äquilibriert. Die geschmolzene Agarose in Niedrigsalz-Puffer wurde dann über die Säule gegeben und die adsorbierte DNA mit 3 ml Niedrigsalz-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die DNA mit 400 µl Hochsalz-Puffer eluiert und mit Ethanol präzipitiert.

#### 3.5.4 Denaturierende Polyacrylamid-Harnstoff-Gele

Diese Gele dienen zur Auftrennung von DNA unter denaturierenden Bedingungen, hervorgerufen durch die 8.3 M Harnstoff-Konzentration und die hohe Temperatur während der Auftrennung. Es wurden 20x39 cm große Glasplatten und 0.1 mm dicke Abstandshaltern benutzt. Um diese dünnen Gele an die Glasplatte zu polymerisieren, wurden die beiden Glasplatten vorbehandelt. Auf der Glasplatte mit dem Ausschnitt wurden 1.5 ml 5%-iges Dimethyldichlor-Silan (gelöst in Tetrachlorkohlenstoff), auf der ungeschnittenen Glasplatte eine Mischung von 3.3 ml Haftsilan und 100 µl 100% Essigsäure verteilt und trocknen gelassen. Danach wurden die Glasplatten gut poliert und mit den 0.1 mm dicken Abstandshaltern zusammengebaut. Für ein 6% Gel werden 30 ml einer 6% Acrylamid-Lösung mit 8.3 M Harnstoff benötigt [100 ml einer deionisierten Acrylamid:Bisacrylamid (30:0.8) Stammlösung werden mit 50 ml 10x TBE (1x: 90 mM Tris pH 8.3, 90 mM krist. Borsäure, 2.5 mM EDTA pH 8.0) versetzt und darin 250 g Harnstoff gelöst. Die mit Wasser auf 500 ml aufgefüllte Lösung wird noch steril filtriert und bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt]. Nach Zufügen von 30 µl TEMED und 300 µl 10% Ammoniumperoxidsulfat-Lösung wurde das Gel gegossen und der Kamm eingesetzt. Nach etwa 30 min ist das Gel polymerisiert.

Die Gelplatte wurde dann senkrecht in eine Elektrophorese-Apparatur eingespannt und zur gleichmäßigen Wärmeverteilung mit einer Aluminiumplatte bedeckt. Als Anoden- und Kathodenpuffer dienten je etwa 375 ml 1x TBE. Der Kamm wurde entfernt und die Taschen mit einer Spritze ausgespült. Zur Erwärmung des Gels diente ein Vorlauf von 30 min bei 25 bis 30 Watt. Die in 3 µl Formamid-Probenpuffer (20 mM EDTA pH 7.8, 99% Formamid, 0.03% Xylencyanol, 0.03% Bromphenolblau) gelösten Proben wurden 3 min auf 95°C erhitzt und dann auf Eis gestellt. Nachdem die Taschen nochmals ausgespült wurden, wurden die Proben aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 25 bis 30 Watt bis zur gewünschten Laufstrecke. Mit einem dünnen Spatel wurde dann die Dimethyldichlor-Silan beschichtete Glasplatte abgehoben. Durch sofortiges Einlegen in 10% Essigsäure für 10 min wurde der Harnstoff herausgelöst. Das Gel wurde dann, nach Spülen mit Wasser, für etwa zwei Stunden bei 80°C auf der Glasplatte getrocknet und anschließend bei -80°C autoradiographiert.

## **3.6 Zellkultur**

### **3.6.1 Trypsinieren von Zellen**

Die Zellen wurden nach Absaugen des Mediums und einmal Waschen mit PBS mit 0.05% Trypsin gespült und mit 0.05% Trypsin (1ml pro 10 cm Kulturschale) bis zu ihrem Ablösen bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in 5 ml Kulturmedium aufgenommen. Vor dem Ausplattieren von Zellen wurden diese aus dem trypsinhaltigen Medium abzentrifugiert (3 min, 300-400xg) und in neuem Kulturmedium aufgenommen.

### **3.6.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Logarithmisch wachsende Zellen wurden abtrypsiniert, abzentrifugiert und in kaltem Einfriermedium aufgenommen. Die Zellen wurden zunächst 30 min auf Eis inkubiert, dann in einem Styrorpor-Behälter auf -80°C abgekühlt (über Nacht) und schließlich in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Das Auftauen von eingefrorenen Zellen erfolgte im Wasserbad bei 37°C. Danach wurden die Zellen in 10 ml Kulturmedium aufgenommen, abzentrifugiert und zur Kultivierung erneut in Medium aufgenommen und auf Zellkulturschalen verteilt.

### **3.6.3 Behandlung von Zellen mit Induktoren**

Die Induktion von Zellen mit dem Phorbolster TPA (Endkonzentration: 60 ng/ml) oder dem cAMP-Analogon 8-Bromoadenosin-3';5'-zyklisches Monophosphat (Endkonzentration: 1 mM) erfolgte durch direkte Zugabe der Substanzen ins Medium.

Bei UV-Bestrahlung wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS ohne Puffer oder Medium in der Petrischale mit offenem Deckel mit 30 J/m<sup>2</sup> bestrahlt. Das ursprüngliche Medium wurde zurück auf die Zellen gegeben. Die Kontrollzellen wurden, mit Ausnahme der Bestrahlung, in gleicher Weise behandelt.

## **3.7 Poly A<sup>+</sup>-RNA-Präparation**

Jede Petrischale wurde zweimal mit 10 ml kaltem PBS (123 mM NaCl, 17 mM NA<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.3) gewaschen. Die Zellen eines Probenpunktes wurden in insgesamt 10 ml kaltem STE (100 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7.4, 10 mM EDTA pH 7.8), 300 µg/ml Proteinase K und 0.5% SDS mit einem Gummischaber abgeschabt und in ein 50 ml Zentrifugen-Röhrchen überführt. Dann wurde das Lysat 30 Sekunden mit einem Ultra-Turrax-Homogenisator homogenisiert. Danach erfolgte eine Inkubation für 60 min bei 37°C. Der Lösung wurde NaCl bis zu einer Endkonzentration von 0.5 M zugesetzt und etwa 100 mg Oligo-dT-VII-Cellulose (in

HSB [0.3 M NaCl, 10 mM Tris pH 7.5, 5 mM EDTA, pH 8.0, 0.1% SDS] resuspendiert) zugegeben. Durch Mischen über Nacht auf einer Rotationsapparatur wurde die poly A<sup>+</sup>-RNA an die Oligo-dT-VII-Cellulose adsorbiert. Die Oligo-dT-VII-Cellulose wurde 2 min bei 2000xg zentrifugiert und dreimal mit 10 ml HSB gewaschen. Die E<sub>260</sub> des HSB nach dem dritten Waschgang sollte < 0.05 sein, wenn die rRNA zum größten Teil abgetrennt wurde. Die RNA wurde dann mit sterilem Wasser von der Oligo-dT-VII-Cellulose eluiert. Dazu wurde die Oligo-dT-VII-Cellulose dreimal mit je 1 ml Wasser und einmal mit 1.5 ml Wasser gewaschen. Der erste Milliliter wurde verworfen und die restlichen 3.5 ml RNA-Lösung vereinigt und anschließend nochmals zentrifugiert, um die Oligo-dT-VII-Cellulose vollständig abzutrennen. 300 µl davon wurden zur Konzentrationsbestimmung abgenommen. Zu den restlichen 3.2 ml wurden in einem 15 ml Zentrifugen-Röhrchen 10 µg tRNA gegeben und die RNA mit Ethanol ausgefällt. Die Oligo-dT-VII-Cellulose wurde durch zweimaliges Waschen mit 10 ml 0.1 M NaOH, 5 mM EDTA pH 8.0, fünfmaliges Waschen mit Wasser und zweimaliges Waschen mit HSB regeneriert.

### **3.8 Radioaktive Markierung von DNA und RNA**

#### **3.8.1 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten**

50 bis 100 ng eines gereinigten DNA-Fragments wurden mit 5 µl α-<sup>32</sup>P-dCTP mit Hilfe des Prime it<sup>TM</sup>-Kits (Stratagene) gemäß dem Herstellerprotokoll radioaktiv markiert. Um nicht eingebaute radioaktive Nukleotide abzutrennen, wurde die DNA dreimal mit Ethanol gefällt, mit 200 µl Ethanol (80%) gewaschen und die getrocknete DNA in 200 µl Wasser gelöst. Der Gesamteinbau betrug im Durchschnitt 5x 10<sup>5</sup> cpm/ng DNA.

#### **3.8.2 Radioaktive Markierung von RNA durch "in vitro" Transkription.**

Für die "in vitro" Transkription wurde der Vektor pGEM-4 (Promega) mit Promotersequenzen für SP6- und T7-Bakteriophagen-RNA-Polymerase ausgewählt, in den die MMP-cDNA Fragmente inkloniert wurden. Um die Transkription von Plasmid DNA zu vermeiden wurden die Konstrukte durch Restriktionsverdau linearisiert. Dies geschieht durch Schneiden mit Restriktionsenzymen, deren Erkennungsstelle in der MCS liegt, die sich distal zur RNA-Polymerase Initiationsstelle befindet. Da der pGEM-Vektor beidseitig der MCS eine Phagenpromotersequenz besitzt, können durch unterschiedliche Restriktionsverdau eines jeweiligen Konstrukts sowohl antisense, als auch sense RNA-Transkripte hergestellt werden. Nach dem Verdau wurden die linearisierten Plasmide mit Phenol/Chloroform extrahiert und präzipitiert. Nach dem Waschen und Trocknen der DNA wurde sie in sterilem Wasser gelöst und die Konzentration auf 1 µg/µl eingestellt.

Zur radioaktiven Markierung des Transkripts wurde  $\alpha$ -<sup>35</sup>S-UTP als Nukleotid verwendet. In einem 20  $\mu$ l Transkriptionsansatz wurden 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l DNA in 1x TSC-Puffer (40 mM Tris pH 8, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM DTT, 10 mM NaCl, 4 mM Spermidin, 50  $\mu$ g/ml BSA) mit 20 mM DTT, 2 U RNasin, 625  $\mu$ M rNTPs (ohne UTP), 50  $\mu$ Ci  $\alpha$ -<sup>35</sup>S-UTP und 30 U Phagenpolymerase (T7 oder SP6) inkubiert.

Danach wurde die Plasmid DNA 15 min bei 37°C unter Zugabe von 7.5  $\mu$ g tRNA und 3 U RQ1 DNase verdaut. Danach wurden die Proteine durch eine Phenol/Chlorform-Extraktion extrahiert. Das RNA-Transkript wurde zur Entfernung nicht eingebauter Nukleotide zweimal mit 2 M NH<sub>4</sub>Ac und 2.5 Volumen Ethanol gefällt. Nach der letzten Zentrifugation (10 min bei 13000 rpm) wurde das Pellet getrocknet und in 50  $\mu$ l 100 mM DTT aufgenommen. 1  $\mu$ l davon wurde in 3 ml Szintillationslösung gemessen, 2  $\mu$ l wurden auf einem denaturierenden Acrylamid-Harnstoffgel aufgetrennt. Die restliche Probe wurde wieder in 2 M NH<sub>4</sub>Ac und 2.5 Volumen Ethanol aufgenommen und bis zum Gebrauch bei -80°C aufbewahrt.

### **3.9 RNA-Transfer auf eine Nylonmembran ("Northern-Blot") und Hybridisierung.**

#### **3.9.1 RNA-Transfer auf eine Nylonmembran (nach McMaster und Carmichael 1977, sowie Thomas 1980).**

Entsprechende Mengen Poly A<sup>+</sup> RNA wurden in der Vakuumzentrifuge getrocknet, in 5  $\mu$ l sterilem Wasser gelöst und in 15  $\mu$ l Denaturierungspuffer (10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 6.85, 50% DMSO, 30% deionisiertes Glyoxal) aufgenommen und 3 min bei 50°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt und 2  $\mu$ l Ladepuffer (50% Glycerin, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 6.85, 0.1% Bromphenolblau) zugegeben. Die RNA wurde in einem 1% Agarosegel aufgetrennt, das zwischen zwei Glasplatten mit 5 mm dicken Abstandhaltern gegossen war. Am unteren Ende war das Gel mit einem Acrylamidkissen abgedichtet. Die Elektrophorese erfolgte mit 1x PB (10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 6.85) als Laufpuffer bei 100 V für ca. 3 h. Danach wurde das Gel zur Anfärbung der RNA 15 min bei RT in 300  $\mu$ g/ml Acridinorange in 1x PB gefärbt, dreimal je 15 min mit 1x PB entfärbt und anschließend die angefärbte RNA unter UV (256 nm) sichtbar gemacht.

Für den Transfer wurde folgender Aufbau verwendet: In eine Plastikwanne mit 500 ml 20x SSC (3 M NaCl, 0.3 M Na-Citrat pH 6.5) als Laufmittel wurde eine Glasplatte auf einen Plastikständer gelegt. Auf die Glasplatte wurden drei mit 20x SSC getränkte 3MM Whatman-Filter gelegt, die seitlich in das Laufmittel hängen. Auf die Filter kam das gefärbte Agarosegel und darauf eine Nylonmembran (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham), die zuvor mit 20x SSC getränkt war. Auf die Nylonmembran wurde nochmals ein 3MM Whatman-Filter gelegt. Zwischen den Schichten darf es keine Luftblasen geben. Schließlich wurde ein Pack Papierhandtücher und eine Glasplatte zum Beschweren aufgelegt. Durch das nach oben in die Papierhandtücher gesaugte

Laufmittel wird die RNA auf die Nylonmembran transferiert. Nach 12-16 h ist der Transfer abgeschlossen. Die Nylonmembran wurde dann 10 min in 20x SSC gewaschen und mit 0.5 M NaOH die RNA auf der Membran fixiert.

### **3.9.2 Hybridisierung radioaktiv markierter DNA-Fragmente an die filtergebundene RNA.**

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran (in Folie eingeschweißt) in 50 ml Hybridisierungslösung (4x SSC, 0.02% BSA, 0.02% Ficoll, 0.02% PVP, 3.3% PIPPI [0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5% Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>], 0.1% SDS) für 1 h bei 65°C inkubiert und nach Zugabe von 20 µg/ml Heringsspermien-DNA nochmals für 3 h bei 65°C inkubiert. Das Volumen der Hybridisierungslösung errechnet sich aus der Fläche der Membran multipliziert mit dem Faktor 13 und Addition von 30% dieses Wertes. Die Hybridisierungslösung bestand aus: 50 bis 100 ng/ml radioaktiv markierte DNA, 20 µg/ml denaturierte Heringsspermien-DNA, 4x SSC, 10 mM EDTA, 0.1% SDS. Die markierte DNA und Heringsspermien-DNA wurden durch Kochen für 15 min denaturiert und im Eisbad abgeschreckt, bevor die übrigen Lösungen des Hybridisierungspuffers zugegeben wurde. Die Hybridisierungslösung wurde zu der Membran in eine Plastikhülle gegeben, zugeschweißt und schließlich über Nacht in feuchter Atmosphäre bei 65°C inkubiert.

Das Waschen erfolgte für jeweils 30 min bei 65°C in 200 ml:

- 2x SSC, 3.3% PIPPI, 0.1% SDS
- 1x SSC, 3.3% PIPPI, 0.1% SDS
- 1x SSC, 3.3% PIPPI, 0.1% SDS
- 0,5x SSC, 3.3% PIPPI, 0.1% SDS

Danach wurde der Filter erneut eingeschweißt und autoradiographiert.

### **3.10 "In situ" Hybridisierung (nach Wilkinson und Green, 1990)**

#### **3.10.1 Behandlung von Objektträgern, Deckgläsern, Glaskästen und Glasfärbegestellen.**

Die Objektträger wurden durch aufeinanderfolgendes Eintauchen in 10% HCl/70% Ethanol, Wasser und 96% Ethanol gespült und im Ofen 5 min bei 150°C getrocknet. Die Beschichtung erfolgte dann durch 10 sekündiges Eintauchen der Objektträger in eine 2% TESPA/Aceton-Lösung. Nach zweimaligem Waschen in 100% Aceton und einmal Waschen in Wasser wurden die Objektträger 15 min bei 42°C im Ofen getrocknet.

Die Deckgläschen wurden in eine Silikon-Lösung getaucht und bei RT getrocknet. Dann wurden sie in 100% Ethanol durch kurzes Eintauchen gewaschen und ebenfalls bei RT trocknen gelassen. Die Deckgläschen wurden dann in einem Becherglas gesammelt und im Ofen bei 160°C gebacken.

Zur Beseitigung von Spuren von RNase wurden die Glaskästen und Glasfärbegestelle im Ofen bei 250°C für zwei Stunden gebacken.

### **3.10.2 Fixierung, Einbettung und Schnitte der Embryonen und Gewebe.**

Die aus Mäusen isolierten Embryonen und Gewebe werden über Nacht in einer 4%-igen Paraformaldehydlösung (4% Paraformaldehyd in 1x PBS) bei 4°C fixiert. Dann wurde jedes Gewebe mit einer Pinzette in eine Einbettkassette transferiert und in einem 1 Liter Becherglas 4 bis 5 h in 600 ml PBS und anschließend für die gleiche Dauer und im gleichen Volumen in einer 0.83%-igen NaCl-Lösung gewässert. Danach wurden sie in einem Becherglas für 5 h unter ständigem Rühren in 50%-igem Ethanol gehalten. Die weitere Entwässerung und die darauffolgende Einbettung erfolgte in einem 2 Liter Gewebeeinbettautomaten (Shandon, Frankfurt) mit folgenden Schritten:

- 70% Ethanol: 1x 1 h
- 100% Ethanol: 3x 1 h
- Aceton: 2x 1 h
- Xylol: 1x 2 h
- Xylol/Histowax (1:1): 1x 3 h bei 59°C
- Histowax: 1x 3 h bei 59°C

Nach Ablauf dieser Prozedur wurden die Gewebe aus den Kassetten herausgenommen und in vorgewärmte Einbettformen (59°C; Reichert und Jung, Nußloch) gelegt. Die Einbettformen wurden dann mit flüssigem Wachs (Histowax; 59°C) aufgefüllt und eine Einbettkassette daraufgedrückt. Nach Erkalten des Wachses wurden die Wachsböcke aus den Einbettformen genommen.

Zur Herstellung von Gewebeschnitten wurden die Wachsböcke in die Halterung eines Mikrotoms (Rotationsmikrotom 2035, Reichert und Jung, Nußloch) eingespannt und parallel zum Messer ausgerichtet. Es wurden dann Schnitte von 6 bis 8  $\mu\text{m}$  angefertigt. Diese wurden in einem Wasserbad bei 42°C geglättet und auf die beschichteten Objektträger aufgezogen.

### **3.10.3 Vorhybridisierung der Schnitte**

Je 19 Objektträger mit Gewebeschnitten, die zur Hybridisierung vorgesehen waren, wurden in ein Glasfärbegestell transferiert. Die Vorhybridisierung der Schnitte erfolgte durch Eintauchen der Gestelle in die mit 250 ml der folgenden Lösungen vorbereiteten Glaskästen:

Um die Schnitte zu entwachsen wurden die Färbegestelle je 2x 10 min in Xylol inkubiert. Durch die folgende absteigende Alkoholreihe wurden die Schnitte gewässert (100% , 95%, 90%, 80%, 70%, 30% Ethanol, je 2 min). Nach zwei Waschschrinen in 1x PBS und 0.83% NaCl (je 5 min) wurden die Schnitte 20 min in 4%-igem Paraformaldehyd/1x PBS fixiert. Nach zweimal

Waschen in 1x PBS (je 5 min) erfolgte ein RNase Verdau im Gewebe mit Proteinase K (Endkonzentration: 500  $\mu$ l/250 ml) in 20 mM Tris pH 7.4, 1 mM EDTA für 10 min. Nach nochmaligem 5 min Waschen in 1x PBS erfolgte eine weitere Fixierung in 4% Paraformaldehyd/1x PBS für 5 min und nochmaliges Waschen in 1x PBS (5 min). Die darauffolgende 10 minütige Inkubation in einer Triethanolamin/Essigsäureanhydridlösung (3,125 ml:0,625 ml/250ml Wasser) diente zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen. Nach jeweils 5 min Waschen in 1x PBS und 0.83% NaCl wurden die Gewebeschnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (s. o.) entwässert und danach bei RT getrocknet.

### 3.10.4 Hybridisierung der Schnitte

Die in Ethanol aufbewahrte radioaktiv markierte RNA Probe (s. 3.8.2) wurde 10 min bei 13000xg abzentrifugiert und einmal mit 70%-igem Ethanol gewaschen und nochmals zentrifugiert. Das Präzipitat wurde getrocknet und in 100 mM DTT (1/10 des Hybridisierungsvolumens) aufgenommen. Für 19 Objektträger wurden 900 ml Hybridisierungspuffer (1x Hyb-Salz [10x Hyb-salt: 0.2% PVP, 0.2% Ficoll, 0.38%  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 6.8, 50 mM EDTA, 3 M NaCl, 0.1 M Tris pH 8], 50% Formamid, 10% Dextransulfat, 10 mM DTT, 1  $\mu$ l tRNA [10 mg/ml]) angesetzt. Vor Zugabe der Probe zum Hybridisierungspuffer wurde diese 5 min bei 80°C denaturiert. Dann wurden 40  $\mu$ l Hybridisierungslösung mit einer Probenkonzentration von 1 bis 2x 10<sup>5</sup> cpm/ $\mu$ l auf dem Objektträger mit den vorhybridisierten Schnitten gleichmäßig verteilt und mit einem silikonisierten Deckgläschen abgedeckt. Zur Inkubation der Objektträger wurde eine Glasschale mit drei Lagen 3MM Whatman-Filter und einer Lage Aluminiumfolie ausgelegt. Das Filterpapier wurde mit 2x SSC, 50% Formamid getränkt. Die Objektträger wurden in die Schale gelegt, diese mit einem Deckel abgedichtet und über Nacht bei 50°C im Wasserbad inkubiert.

### 3.10.5 Waschen der Schnitte

Nach der Inkubation wurden die Objektträger aus der feuchten Kammer genommen und wieder in die Glasfärbegestelle gestellt. Das Waschen der Schnitte erfolgt unter stringenten Bedingungen durch Eintauchen der Gestelle in die mit 250 ml der folgenden Lösungen vorbereiteten Glaskästen:

- 2x SSC, 50% Formamid, 20 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol: 15 min bei 37°C
- 2x SSC, 50% Formamid, 20 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol: 30 min bei 65°C
- 2x SSC, 50% Formamid, 20 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol: 2 h bei 37°C
- NTE (0,5 M NaCl, 10 mM Tris pH 8.0, 5 mM EDTA): 15 min bei 37°C
- NTE mit RNase (Endkonz.: 20  $\mu$ g/ml): 15 min bei 37°C
- NTE: 15 min bei 37°C

-2x SSC, 50 % Formamid, 20 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol: 30 min bei 37°C

-2x SSC: 15 min bei RT

-0.1x SSC: 15 min bei RT

Eine Entwässerung der Schnitte erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe für je 2 min:

-30 % Ethanol, 0.25 M  $\text{NH}_4\text{OAc}$

-50 % Ethanol, 0.25 M  $\text{NH}_4\text{OAc}$

-70 % Ethanol, 0.25 M  $\text{NH}_4\text{OAc}$

-80 % Ethanol

-90 % Ethanol

-95 % Ethanol

-100 % Ethanol

Anschließend wurden die Objektträger bei RT getrocknet, mit einem Klebeband in einer Expositionskassette befestigt, und über Nacht ein Röntgenfilm (Hyper<sup>TM</sup>-MP) aufgelegt.

### **3.10.6 Beschichten der Objektträger mit einer Photoemulsion**

Die LM-1 Photoemulsion wurde in der Dunkelkammer in einem Wasserbad bei 42°C geschmolzen und 5 ml davon mit Wasser 1:1 verdünnt. Das Gemisch wurde dann möglichst blasenfrei in ein Gefäß eingefüllt, das speziell zur Beschichtung der Objektträger angefertigt wurde. Diese Vorrichtung wurde dann in das Wasserbad (42°C) gestellt, um die Photoemulsion flüssig zu halten. Die Blasen wurden aus der Photoemulsion entfernt, dann wurden die Objektträger nacheinander, durch Eintauchen, mit der Photoemulsion beschichtet. Dabei sollte die Photoemulsion so gleichmäßig wie möglich auf den Objektträgern verteilt sein. Die beschichteten Objektträger wurden im Dunkeln 2 h getrocknet. Danach wurden sie in Polyoxymethylen Färbegestelle gestellt, in die entsprechenden Färbetröge eingepackt und mit Aluminiumfolie umwickelt. Die Objektträger wurden so 10 bis 14 Tage bei 4°C exponiert.

### **3.10.7 Entwickeln, Färben und Mikroskopieren der Schnitte**

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

-16 % Kodak D-19 Entwickler: 3 min

-2,5 % Eisessig: 1 min

-30 % Natriumthiosulfat: 3 min

-Wasser: 2x 10 min und 1x 30 min

Die Schnitte wurden getrocknet und mit einer Giemsa-Lösung (4 % Giemsa, 4 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 6.0) gefärbt. Nach Trocknen der Objektträger wurden sie mit dem Eindeckmittel Entellan eingedeckelt. Die so hergestellten Präparate wurden anschließend im Zeiss Axioskop-Mikroskop im Hell- und Dunkelfeld analysiert und fotografiert. Zur

Betrachtung im Dunkelfeld mit Objektiven von kleiner Vergrößerung (1,25x, 2.5x, 5x) wurde ein Dunkelfeldilluminator der Firma Zeiss verwendet, der ins Mikroskop anstelle des Kondensors eingesetzt wurde. Zur Photographie wurden Farbdiafilme (Kodak Extrachrome 320T für Kunstlicht) oder Schwarzweißfilme (Ilford HP5 400) verwendet.

## 4. ERGEBNISSE

Eine Reihe von physiologischen Prozessen benötigt einen regelmäßigen und kontrollierten Matrixauf- und abbau, damit die Gewebemorphologie und -funktion aufrecht erhalten wird. Matrixmetalloproteinasen sind in weitem Umfang am spezifischen Abbau der ECM Komponenten beteiligt. Eine besonders hohe MMP-Aktivität wird während embryonaler Prozessen erwartet, bei denen ein schneller Matrixumbau notwendig ist (Matrisian, 1992). Aber auch unter pathologischen Bedingungen (z. B. bei chronischen Entzündungskrankheiten) sind hohe, unkontrollierte MMP-Aktivitäten die Regel (Alexander und Werb, 1989).

"In vitro", d. h. im Zellkultursystem, ist die Substratspezifität der verschiedenen Enzyme, als auch ihre Regulation der Aktivität, sowohl auf RNA-Ebene als auch auf Proteinebene gut untersucht. Ob diese "in vitro" Daten auf die Situation des Gesamtorganismus übertragbar sind, konnte bislang noch nicht gezeigt werden.

Mit der Maus als Modellsystem und der schnellen Entwicklung der molekularbiologischen Methoden besteht nun die Möglichkeit Gene im Mausorganismus konstitutiv zu exprimieren ("Transgene") oder durch homologe Rekombination zu eliminieren ("Knock out"). Somit kann die Funktion eines Enzyms per se, entweder durch Funktionsverlust, oder mittels einer konstitutiv erhöhten Aktivität untersucht werden. Letzteres könnte ein Modellsystem für verschiedene pathologische Prozesse darstellen. Unbedingte Voraussetzung für die Untersuchung der Expression, der Regulation, und der Funktion von Metalloproteinasen im Maussystem war die Klonierung von mausspezifischen MMP-Proben.

### 4.1 Klonierung mausspezifischer MMP cDNAs und ihre Homologie zu den entsprechenden Sequenzen in Mensch und Ratte

Um mausspezifische MMP cDNA-Sequenzen zu isolieren, wurden die beiden Mauszelllinien NIH3T3 und LuSVX jeweils 8 und 10 Stunden mit dem Tumorpromoter TPA (12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat) behandelt. Eine Stimulation der Zellen mit TPA wurde deshalb gewählt, da diese Substanz die Expression verschiedener Metalloproteinasen induziert, z. B. die Expression der menschlichen MMPs Kollagenase I und Stromelysin 1 (Angel et al., 1987a,b), wie auch die Expression von Stromelysin 1 und Stromelysin 2 der Ratte (Breathnach et al., 1987). Tatsächlich konnte eine verstärkte MMP-Aktivität im Medium beider Zelllinien, gemessen mit der Hilfe des Zymogramm-Assays, nach TPA-Behandlung beobachtet werden (Rüdiger Vallon, persönliche Mitteilung). Aus den TPA behandelten Zellen wurde die poly A<sup>+</sup> RNA isoliert und mittels reverser Transkription einzelsträngige cDNA hergestellt. Diese cDNAs wurden für eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) eingesetzt, in der mit spezifischen Oligonukleotiden definierte cDNA-Bereiche amplifiziert werden sollten.

Die Auswahl der Oligonukleotide erfolgte anhand eines Sequenzvergleiches zwischen den schon bekannten Kollagenase I Nukleotidsequenzen von Mensch (Goldberg et al., 1986) und Ratte (Quinn et al., 1990). Unter der Annahme, daß diese Regionen auch in den Maus MMPs konserviert sind, wurden Bereiche mit sehr hoher Homologie (>90%) zwischen den beiden Sequenzen zur Synthese spezifischer Oligonukleotide ausgewählt. Diese wurden dann in folgenden Kombinationen für die PCR eingesetzt:

- coll-7/coll-13 (Sequenzen sind identisch zu den Bereichen zwischen Nukleotid 258-289 und Nukleotid 641-691 der Ratten Kollagenase I, Quinn et al., 1990; s. Abb.2e)
- coll-8/coll-12 (Sequenzen sind identisch zu den Bereichen zwischen Nukleotid 570-601 und Nukleotid 1259-1290 der Ratten Kollagenase I, Quinn et al., 1990; s. Abb.2e).

Aufgrund der hohen Homologie der verschiedenen Metalloproteinasen untereinander sollten die ausgewählten Oligonukleotidsequenzen auch mit den entsprechenden Sequenzbereichen der Stromelysine hybridisieren. Um die Sequenz der 72 kD Typ IV Kollagenase der Maus zu isolieren, wurden Sequenzen aus den Bereichen der Pro-Domäne (coll-15: entspricht der Sequenz im Bereich zwischen Nukleotid 202-230; s. Abb.2e) und der der Zink-bindenden Domäne (coll-16: entspricht der Sequenz im Bereich zwischen Nukleotid 1108-1137; s. Abb.2e) der menschlichen 72 kD Typ IV Kollagenase zur Synthese spezifischer Oligonukleotide ausgewählt (Collier et al., 1988).

Durch die PCR-Amplifikation wurde pro Oligonukleotidkombination ein cDNA-Fragment mit einer spezifischen Länge erhalten. Die Fragmente wurden durch Gelelektrophorese aufgereinigt und in den Vektor **pAZ** (ein Derivat von pSP65; U. Günthert, persönliche Mitteilung) kloniert und anschließend sequenziert. Eine schematische Darstellung der Proteinbereiche, für die die klonierten cDNAs kodieren, und ihre Lokalisation im gesamten MMP-Molekül zeigt Abb.2e. Die Positionen der einzelnen Oligonukleotide ist in Form von Pfeilen markiert. Die erhaltenen Nukleotidsequenzen wurden in der Sequenzdatenbank mit schon bekannten MMP-Sequenzen anderer Spezies verglichen.

Aus der NIH3T3-Zelllinie konnte mit der Oligonukleotid-Kombination coll-8/coll-12 ein 730 bp Fragment isoliert werden. Der Sequenzvergleich ergab, daß die Sequenz eine 91%-ige Homologie zum Stromelysin 2 (MMP-10) der Ratte besaß (Breathnach et al., 1987), während gegenüber dem Stromelysin 1 der Ratte (Matrisian et al., 1985) oder dem bereits klonierten Stromelysin 1 der Maus (Ostrowski et al., 1988) nur eine 75%-ige bzw. 76%-ige Homologie zu verzeichnen war. Dies läßt darauf schließen, daß es sich bei diesem Klon um die Sequenz des Stromelysin 2 der Maus handelt. Die Homologie zur entsprechenden menschlichen Sequenz (Muller et al., 1988) betrug nur 77% (Abb.2a). Aus der LuSVX-Zelllinie konnten, je nach Oligonukleotidkombination, Fragmente mit unterschiedlichen Längen isoliert werden. Die Amplifikation mit der Oligonukleotid-Kombination coll-7/coll-13 ergab ein 430 bp Fragment,

dessen abgeleitete Aminosäuresequenz identisch zum Stromelysin 1 (MMP-3) war, das aus einem Plattenepithelzellkarzinom der Maus isoliert wurde (Ostrowski et al., 1988). Ein Vergleich mit den entsprechenden Sequenzen aus der Ratte (Matrisian et al., 1985) und vom Menschen (Whitham et al., 1986) zeigte eine 93%-ige bzw. eine 83%-ige Homologie (Abb.2b). Die Isolierung eines 935 bp Fragments war mit der Kombination coll-15/coll-16 aus der LuSVX-Zelllinie möglich. Der Sequenzvergleich ergab, daß es mit der vor kurzem isolierten 72 kD Typ IV Kollagenase aus NIH3T3 Zellen identisch ist (nicht dargestellt, Reponen et al., 1992). Wie erwartet, enthält der klonierte cDNA-Bereich die Sequenz, die Ähnlichkeit zur kollagenbindenden Domäne des Fibronektin besitzt, und die typisch für Kollagenasen vom Typ IV ist. Ein weiteres Fragment mit einer Länge von 730 bp (coll-8/coll-12) zeigte eine fast 100%-ige Homologie zur kürzlich aus dem Knochengewebe des Schädeldaches isolierten Kollagenase I cDNA Sequenz der Maus (Henriet et al., 1992). Die beiden Sequenzen unterschieden sich in nur einem Basenpaar (G/A) an Position 1239 bezüglich der von Henriet (1992) klonierten Sequenz. Dies führt zu einem Aminosäureaustausch von Asparagin (Asn, N; Henriet) nach Serin (Ser, S; hier klonierte Sequenz). Da die von Henriet et al. (1992) klonierte Sequenz an dieser Position mit der Sequenz der Ratte übereinstimmt, wo an der entsprechenden Position auch ein Asparagin zu finden ist (Quinn et al., 1990), dürfte der Unterschied im vorliegenden Fall auf einen Fehler bei der PCR-Amplifikation zurückzuführen sein. Die Homologie der Kollagenase I Sequenz zur entsprechenden Ratten- bzw. Menschsequenz betrug 93% und 53% (Abb.2c). In Abb.2d ist ein Sequenzvergleich der abgeleiteten Proteinsequenzen der vier klonierten Maus MMP cDNAs dargestellt, der 14 Aminosäuren vor dem aktiven Zentrum beginnt und im C-terminalen Bereich endet. Die durch die Umrahmung markierte Sequenz kennzeichnet den Bereich des  $Zn^{2+}$ -bindenden aktiven Zentrums, der einen sehr hohen Grad an Homologie zwischen den verschiedenen Maus Metalloproteinasen aufweist.

Abb.2: Sequenzvergleichsanalyse der klonierten mausspezifischen MMP-cDNA-Sequenzen mit den entsprechenden Sequenzen aus Mensch und Ratte. a. Nukleotidsequenzvergleich des Stromelysin 2 Gens der Maus (730 bp) mit den entsprechenden Sequenzbereichen von Mensch (Nukleotid 645-1303, Muller et al.,1988) und Ratte (Nukleotid 660-1315, Breathnach et al., 1987). b. Nukleotidsequenzvergleich des Stromelysin 1 Gens der Maus (430 bp) mit den entsprechenden Sequenzbereichen von Mensch (Nukleotid 334-685, Whitham et al., 1986) und Ratte (Nukleotid 341-692, Matrisian et al., 1985). c. Nukleotidsequenzvergleich des Kollagenase I Gens der Maus (730 bp) mit den entsprechenden Sequenzbereichen von Mensch (Nukleotid 672-1325, Goldberg et al., 1986) und Ratte (602-1258 bp, Quinn et al., 1990). d. Proteinsequenzvergleich der vier Maus Metalloproteinasen Kollagenase IV (72 kD), Kollagenase I, Stromelysin 2 und Stromelysin 1. Die durch die Umrahmung markierte Sequenz zeigt den Bereich des aktiven Zentrums, das einen hohen Grad an Homologie aufweist. e. Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Matrixmetalloproteinasen. Die einzelnen Domänen des gesamten MMP-Moleküls sind in Abb.1 beschrieben. Die Kästchen unterhalb des Gesamt-moleküls repräsentieren die klonierten Bereiche der vier verschiedenen Maus MMP-cDNAs und ihre Lage im Vergleich zum Gesamt-molekül. Die klonierte Kollagenase IV Sequenz beinhaltet zusätzlich einen Bereich, der Ähnlichkeit zur kollagenbindenden Domäne des Fibronektins zeigt. Die Pfeile markieren die Bindungsstellen der verwendeten Oligonukleotide.



**b**

```

humanstrom1  TGGTCACTTCAGAACCTTTCTGGCATCCCGAAGTGGAGGAAAACCCACCTTACATACAG
mousestrom1  TGGTGGCTTCAGTACCTTCCCAGGTTCCGCAAAATGGAGGAAATCCCACATCACCTACAG
ratstrom1    CGGTGGCTTCAGTACCTTTCCAGGTTACCCAAATGGAGGAAAACCCACATCTCCTACAG

humanstrom1  GATTGTGAATTATACACCAGATTGCCCCAAAGATGCTGTGATTCTGCTGTTGAGAAAGC
mousestrom1  GATTGTGAATTATACACCGGATTGCCCCAAGACAGAGTGTGGATTCTGCCATTGAAAAGC
ratstrom1    GATTGTGAATTATACACTGGATTACCAAGAGAGAGTGTGGATTCTGCCATTGAGAGAGC

humanstrom1  TCTGAAAGTCTGGGAAGAGGTGACTCCACTCACATTCTCCAGGCTGTATGAAGGAGAGGC
mousestrom1  TTTGAAGGTCTGGGAGGAGGTGACCCACTCACATTTCTCCAGGATCTCTGAAGGAGAGGC
ratstrom1    TTTGAAGGTCTGGGAGGAGGTGACCCACTCACATTCTCCAGGATCTCTGAAGGAGAGGC

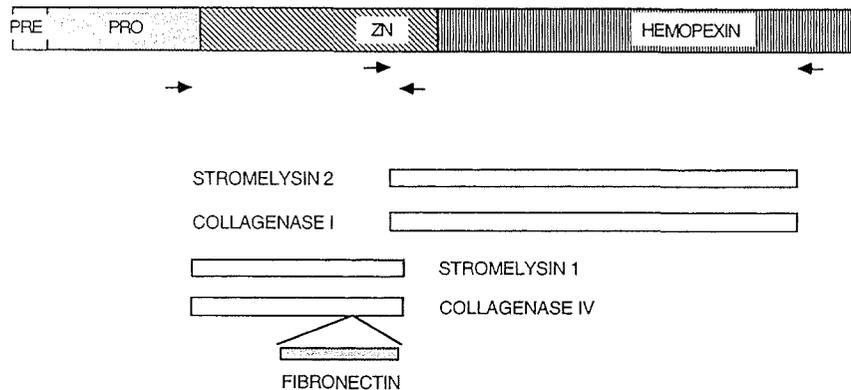
humanstrom1  TGATATAATGATCTCTTTTGCAGTTAGAGAACATGGAGACTTTTACCCTTTTGATGGACC
mousestrom1  TGACATAATGATCTCCTTTGCAGTTGAGAGAACATGGGGACTTTGTCCTTTTGATGGGCC
ratstrom1    TGACATAATGATCTCCTTTGCAGTTGAAGAACATGGAGACTTTATCCCTTTTGATGGGCC

humanstrom1  TGGAAATGTTTTGGCCATGCCCTATGCCCTGGGCCAGGGATTAATGGAGATGCCCACTT
mousestrom1  TGGAACAGTCTTGCTCATGCCTATGCACCTGGACCAGGGATTAATGGAGATGCTCACTT
ratstrom1    TGGAAATGGTCTTGCTCATGCCTATGCCCTGGACCAGGGACCAATGGAGATGCTCACTT

humanstrom1  TGATGATGATGAACAATGGACAAAGGATACAACAGGACCAATTTATTTCTC
mousestrom1  TGACGATGATGAACGATGGACAGAGGATGTCACCTGGTACCAACCTATTCCCTG
ratstrom1    TGATGATGATGAACGATGGACAGATGATGTCACAGGTACCAACCTATTCCCTG

```

37

**e****d**

```

mousecol IV  KWGFCPDQGYSLFL VAAHEFGHAMGLEHS QDPGALMAPIYTYTK---NFR
mousecol I   TWTSSSK-GYNLFI VAAHELGHSLGLDHS KDPGALMFPFIYT-CTGKSHFM
mousestrom2  -WTLAPS-GTNLFL VAAHELGHSLGLFHS DKKESLMYPVYRFSTSPANFH
mousestrom1  RTEDVT-GTNLFL VAAHELGHSLGLYHS AKAEALMYPVYKSSTDLSRFH

mousecol IV  LSHDDIKGIQELYGSPDADTDGTGTP--TLGPVTPEICKQDIVFDGI
mousecol I   LPDDDVQGIQFLYGPDEDPN-----PKHPKTPEKCDPALSLDAI
mousestrom2  LSQDDIEGIQSLYAGPSSDA--TVVPVLSVSPRPETTDKCDPALSFDSV
mousestrom1  LSQDDVDGIQSLYGTPTASPDVLVLPVTKNSLEPETSPMCSSTLFFDAV

mousecol IV  AQIRGEIFFFKDRFIWRTVTPRDKPTGPLLVATFWPELPEKIDAVYEAPQ
mousecol I   TSLRGETMIFKDRFFWRL-HPQQVEAELFLTKSFWPELPHNVDAAYEHPS
mousestrom2  NTLRGEVLFFKDRYFWRR-SHWNPEPEFHLSAFWPTLPSDLDAAYEAHN
mousestrom1  STL RGEVLFFKDRQFWRK-SLRTPEHEFYLISSFWSLP SNMDAAYEVTN

mousecol IV  EEKAVFFAGNEYWVYSASTLERGYPKPLTSLGLPPDVQVDAAFNWSKNK
mousecol I   RDLIFIFRGRKFWALNGYDILEGYPRKISDLGFFKEVKRLRAAVHFENTG
mousestrom2  TDSVLIFKGSQFWAVRGNEVQAGYPKGIHTLGFPPVTKKIDAAVFEKEKK
mousestrom1  RDTVEIFKGNQFWAIRGHEELAGYPKSIHTLGLPATVKKIDAASNKEKR

mousecol IV  KTYIFAGDKFWRYNEVKKMDPGFPKLIADSW
mousecol I   KTLFFSENVWSYDDVSQTMKDYPRLIEEEF
mousestrom2  KTYFFVGDKYWRFDETRHVMKGFPRQITD-I
mousestrom1  KTYFFVEDKYWRFDEKKQSMEPGFPKIAE-F

```

## 4.2 Transkriptionelle Regulation der Maus MMPs in Zellkultur

### 4.2.1 Induktion der MMP-Expression durch TPA und cAMP

Die isolierten cDNAs wurden benutzt um zu untersuchen, ob die MMP Expression in Mauszelllinien in ähnlicher Weise reguliert wird wie in Ratten oder menschlichen Zellen. In menschlichen Zelllinien, als auch in Rattenzelllinien wird die Expression der Kollagenase I und auch die Expression von Stromelysin 1 und Stromelysin 2 durch extrazelluläre Substanzen induziert, die über eine Aktivierung der Proteinkinase C wirken (z. B. PDGF, TNF- $\alpha$ ; Kerr et al., 1988; Brenner et al., 1989b). Die Regulation der 72 kD Kollagenase IV Expression verläuft dagegen über einen anderen Mechanismus.

Der Phorbolester TPA imitiert die natürliche Induktion der Zelle durch Wachstumsfaktoren oder Hormone, da er aufgrund seiner Fettlöslichkeit in die Zellmembran eindringen und dort an die Proteinkinase C binden und somit aktivieren kann (Nishizuka, 1984; 1986). Im Gegensatz dazu wird die MMP Expression durch Substanzen, die durch eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels die Proteinkinase A aktivieren, nicht beeinflusst oder sogar gehemmt (Angel und Karin, 1992).

Zur Untersuchung der MMP Expression im Maussystem wurden LuSVX-Zellen 8 Stunden mit dem Phorbolester TPA oder dem cAMP-Analogen 8-Bromoadenosin-3';5'-zyklisches Monophosphat behandelt. Danach wurde die poly A<sup>+</sup> RNA aus behandelten und unbehandelten Zellen isoliert und diese in einer Northern Blot Analyse auf MMP-Transkripte hin untersucht. Wie erwartet zeigten F9-Zellen, die aufgrund einer fehlenden AP-1 Aktivität (Kryszke et al., 1987; Chiu et al., 1988; 1989) und einer fehlenden Gelatine-abbauenden Aktivität (Rüdiger Vallon, pers. Mitteilung), als negative Kontrolle verwendet wurden, keine Expression der vier verschiedenen Matrixmetalloproteinasen (Abb.3). Auch die als Positivkontrollen verwendeten H-ras transformierten Rattenzellen (rat2) verhalten sich erwartungsgemäß: Sie zeigen, wie auch andere ras-transformierte Zellen (Garbisa et al., 1987; Collier et al., 1988), eine hohe Expression der MMPs (Abb.3).

Abb.3 zeigt, daß die Expression der Maus MMPs durch Substanzen induziert wird, die über eine Aktivierung der Proteinkinase C wirken. Durch TPA, nicht aber durch cAMP, wird die Expression von Stromelysin 1, Stromelysin 2 und Kollagenase I um ein Vielfaches des Basalwertes induziert. Während Stromelysin 1 eine hohe basale Expression in den LuSVX-Zellen besitzt (Abb.3, Kontrolle), ist die basale Expression von Stromelysin 2 sehr niedrig. In den nicht behandelten Zellen können für Kollagenase I keine Transkripte nachgewiesen werden (Abb.3, Kontrolle).

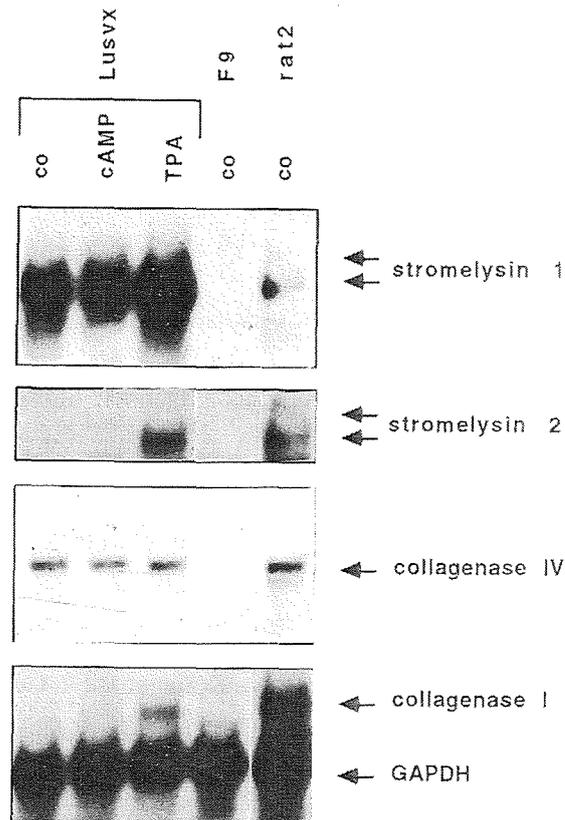


Abb.3: Expression der MMPs in TPA- und cAMP-behandelten Zellen. LuSVX-Zellen wurden nicht (co: Kontrolle) oder 8 Stunden mit TPA (60 ng/ml) oder cAMP (1 mM f.c.) behandelt. Danach wurde die poly A<sup>+</sup> RNA aus den Zellen isoliert, je 10 µg RNA auf einem Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Membran wurde nacheinander mit den <sup>32</sup>P-markierten MMP cDNA Proben und einer <sup>32</sup>P-markierten GAPDH cDNA Probe hybridisiert (rechte Seite der Abbildung). RNA aus unbehandelten F9-Zellen und H-ras transformierten rat2-Zellen dienten als Kontrollen (co).

Weder die TPA-, noch die cAMP-Behandlung haben einen Einfluß auf die Expression der 72 kD Kollagenase IV. Ihre Transkriptmenge ist in Kontrollzellen und behandelten Zellen annähernd gleich (Abb.3). Dies entspricht den Expressionsdaten, die für die menschliche Kollagenase IV gefunden werden (Collier et al., 1988).

Da die MMP-Sequenzen zwischen Maus und Ratte (s. Abb.2) einen hohen Grad an Homologie aufweisen, ist eine Kreuzhybridisierung der Maus MMP-cDNA Proben mit MMP-Transkripten der Ratte zu erwarten. Die gefundenen Transkripte in den Rattenzellen besitzen eine vergleichbare Größe wie ihre homologen Partner in den Maus Zellen (die genaue Transkriptgröße ist in Abb.15 angegeben). In den H-ras transformierten Zellen werden mit den Stromelysin-1 und -2 Proben jeweils noch eine zusätzliche, größere Bande beobachtet. Dies ist wahrscheinlich auf eine Kreuzhybridisierung mit einer MMP eines höheren Molekulargewichts (evt. 92 kD Typ IV Kollagenase) zurückzuführen. In Übereinstimmung mit den weit geringeren Homologien zu den entsprechenden menschlichen Sequenzen von Stromelysin 1, Stromelysin 2

und Kollagenase I (s. 3.1), konnte eine Kreuzhybridisierung mit menschlicher RNA unter sehr stringenten Bedingungen nur für die 72 kD Kollagenase IV der Maus gefunden werden (nicht gezeigt). Wie oben beschrieben zeigt sie eine 97%-ige Homologie zur entsprechenden menschlichen Kollagenase IV (Reponen et al., 1992).

#### **4.2.2 Induktion der MMP-Expression durch UV-Bestrahlung**

Die Antwort der Zelle auf eine Reihe von DNA schädigenden Substanzen (z. B. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UV-Strahlung,  $\gamma$ -Strahlung) kann als allgemeine "Stress-Antwort" angesehen werden (Herrlich et al., 1992). Um zu untersuchen, welchen Einfluß diese Agenzien auf die Expression der Metalloproteinasen der Maus haben, wurde UV-Strahlung als ein Vertreter solcher Substanzen ausgewählt.

Ebenso wie die Behandlung mit dem Phorbolster TPA führt die Behandlung von Zellen mit UV-Strahlung zu einer Induktion des menschlichen Kollagenase I Gens. Im Gegensatz zu der relativ frühen maximalen Induktion der Kollagenase I Expression nach TPA-Behandlung (nach 6-8 Stunden), ist eine maximale Kollagenase I Expression nach UV-Bestrahlung in den Zellen jedoch erst nach 36 bis 48 Stunden zu beobachten. Der Grund dafür könnte sein, daß die Signalkette von der Auslösung des Signals bis zur Induktion der Kollagenase I Expression über eine extrazelluläre Schleife verläuft, bei der die Sekretion der Faktoren IL-1 $\alpha$  und bFGF (zusammenfassend als EPIF=extrazellulärer Proteinsynthese induzierender Faktor bezeichnet) notwendig ist (Schorpp et al., 1984; Krämer et al., 1993).

Da die Expression der Maus Metalloproteinasen durch TPA in gleicher Weise induziert wird wie die Expression von MMPs anderer Spezies, könnte man auch eine ähnliche Induktionskinetik der Maus Kollagenase I nach Behandlung von Zellen mit UV-Strahlung erwarten. Um dies zu überprüfen wurden LuSVX-Zellen 0, 24, 36 und 48 Stunden nach UV-Behandlung geerntet und die poly A<sup>+</sup> RNA isoliert. Diese wurde dann in einer Northern Blot Analyse sowohl auf Kollagenase I Expression, als auch auf die Expression der anderen MMPs untersucht.

Eine maximale Expression von Kollagenase I konnte 48 Stunden nach UV-Behandlung beobachtet werden, während Stromelysin 2 eine maximale Expression zwischen 36 und 48 Stunden nach Bestrahlung zeigt (Abb.4). Eine induzierte Expression von Stromelysin 1 und Kollagenase IV konnte durch die UV-Behandlung nicht beobachtet werden (nicht gezeigt).

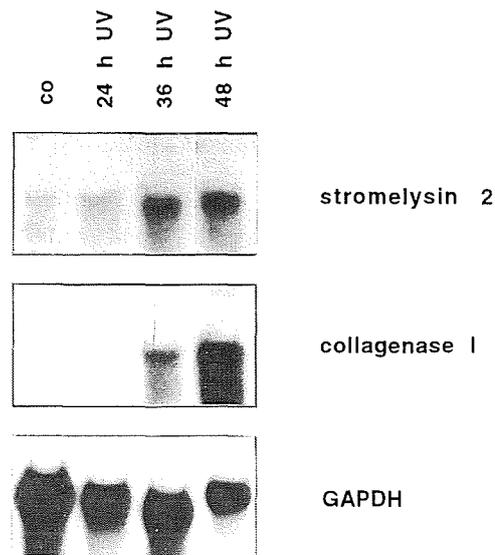


Abb.4: Expression der MMPs in UV bestrahlten LuSVX-Zellen. LuSVX-Zellen wurden nicht behandelt oder UV bestrahlt (256 nm Wellenlänge, 30 J/m<sup>2</sup>). Zu den angegebenen Zeiten wurde aus unbehandelten Zellen (co) oder Zellen nach UV-Behandlung (24, 36, 48 Stunden) die poly A<sup>+</sup> RNA isoliert und je 10 µg der RNA für die Northern Blot Analyse eingesetzt. Der Filter wurde nacheinander mit den <sup>32</sup>P-markierten MMP-cDNA Proben und einer <sup>32</sup>P-markierten GAPDH-cDNA Probe (rechte Seite) hybridisiert.

### 4.3 Gewebespezifische Expression der Maus Metalloproteinasen

Die in Kapitel 4.2 beschriebenen Zellkulturexperimente suggerieren, daß die drei MMPs Stromelysin 1, Stromelysin 2 und Kollagenase I durch Substanzen, die über die Proteinkinase C wirken, koordiniert exprimiert werden. Die in Zellkultur durchgeführten Experimente haben jedoch den Nachteil, daß die MMP-Gene als Gene der Proliferation auf jeden Fall im offenen Chromatin vorliegen und der Differenzierungszustand der Zellen nicht mit jenem im Organismus vergleichbar ist. Deshalb war es wichtig, die Expression der MMPs im Organismus direkt zu untersuchen, um zu prüfen ob die in isolierten Zelllinien gefundene hohe Expression von MMPs auch im Gesamtorganismus nachzuweisen ist, oder ob eine MMP Expression auf solche Gewebe beschränkt ist, die ECM-Komponenten enthalten, die ihrer Substratspezifität entsprechen.

#### 4.3.1 Expression der MMPs während der Embryonalentwicklung der Maus

Während der Embryonalentwicklung findet ein intensiver Gewebeumbau statt, bei dem ein schneller Auf- und Abbau von ECM-Komponenten notwendig ist, um ein Wachstum und eine Ausdehnung der Organe zu ermöglichen. Deshalb wird zu diesem Zeitpunkt eine hohe Expression von Matrix-abbauenden Enzymen erwartet. Die isolierten Maus MMP cDNA Proben

stellen ein ideales Hilfsmittel dar, um die Expression dieser MMPs während der Embryonalentwicklung zu untersuchen.

Mit einer Northern Blot Analyse sollte vorab ermittelt werden, zu welchem Zeitpunkt der Embryogenese eine Expression der verschiedenen MMPs zu erwarten ist. Die auffälligsten Veränderungen im Embryo finden ab dem Tag 9 der Entwicklung statt, wenn die Organogenese beschleunigt wird und sich gleichzeitig die generelle Architektur des Embryos verändert (Rugh, 1968). Deshalb wurde poly A<sup>+</sup> RNA aus Gesamt-Embryonen ab dem Alter von 9.5 Tage im Abstand von einem Tag isoliert (bis 15.5 Tage) und die Menge an Kollagenase I Transkripten durch eine Northern Blot Analyse bestimmt.

Eine schwache Kollagenase I Expression kann zum ersten Mal am Tag 14.5 der Entwicklung beobachtet werden. Am Tag 15.5 ist eine starke Zunahme der Kollagenase I Expression zu beobachten (Abb.5). Dem gegenüber kann eine Kollagenase IV Expression schon sehr früh, am Tag 10.5, beobachtet werden, die sich bei fortschreitender Entwicklung in ihrer Intensität kaum verändert (nicht gezeigt).

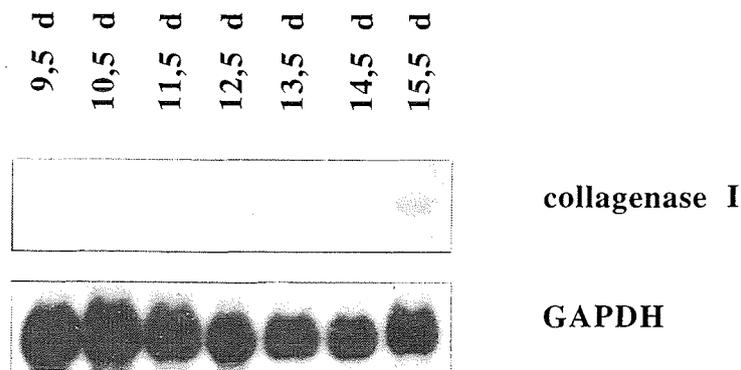


Abb.5: Expression der MMPs während der Embryogenese. Poly A<sup>+</sup> RNA wurde aus Gesamt-Embryonen im Abstand von einem Tag isoliert. Je 10  $\mu$ g RNA wurden für die Northern Blot Analyse verwendet. Der Filter wurde nacheinander mit einer <sup>32</sup>P-markierten Kollagenase I-cDNA Probe und einer <sup>32</sup>P-markierten GAPDH-cDNA Probe hybridisiert.

Um zu untersuchen, in welchen Geweben des Embryos eine Expression der verschiedenen Metalloproteinasen zu finden ist, wurde die Methode der "in situ" Hybridisierung angewendet. Damit läßt sich die Expression von Genen direkt im entsprechenden Gewebe auf Einzelzellebene nachweisen (Wilkinson und Green, 1990).

In Paraformaldehyd fixierte Embryonen wurden durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und in Paraffin eingebettet. Von den eingebetteten Embryonen wurden dann 6 bis 8  $\mu$ m dicke Schnitte angefertigt und auf beschichtete Objektträger aufgezogen. Nach der Vorhybridisierung

wurden die Gewebeschnitte mit radioaktiv markierten MMP antisense und sense RNA Proben hybridisiert die, wie im Folgenden beschrieben, hergestellt wurden:

Um ein gutes Eindringen der Probe ins Gewebe zu ermöglichen, sind für die "in situ" Hybridisierung RNA-Transkripte mit einer Länge zwischen 250 bis 350 Basenpaaren am besten geeignet. Da die ursprünglich klonierten MMP-cDNAs (s. Abb.2e) für diese Verwendung zu lang waren, wurden die MMP-cDNA Fragmente aus dem pAZ-Vektor in den pBluescript-Vektor (Stratagene) umklontiert. Durch anschließenden Restriktionsverdau wurden die ursprünglichen MMP cDNAs (Abb.2e) in kürzere DNA Fragmente gespalten. Die erhaltenen Subfragmente wurden in den pGEM-4 Vektor kloniert. Abb.6 gibt die Restriktionsverdaus der ursprünglich isolierten MMP-cDNAs (s. Abb.2e) im pBluescript und die dabei erhaltenen Fragmente an.

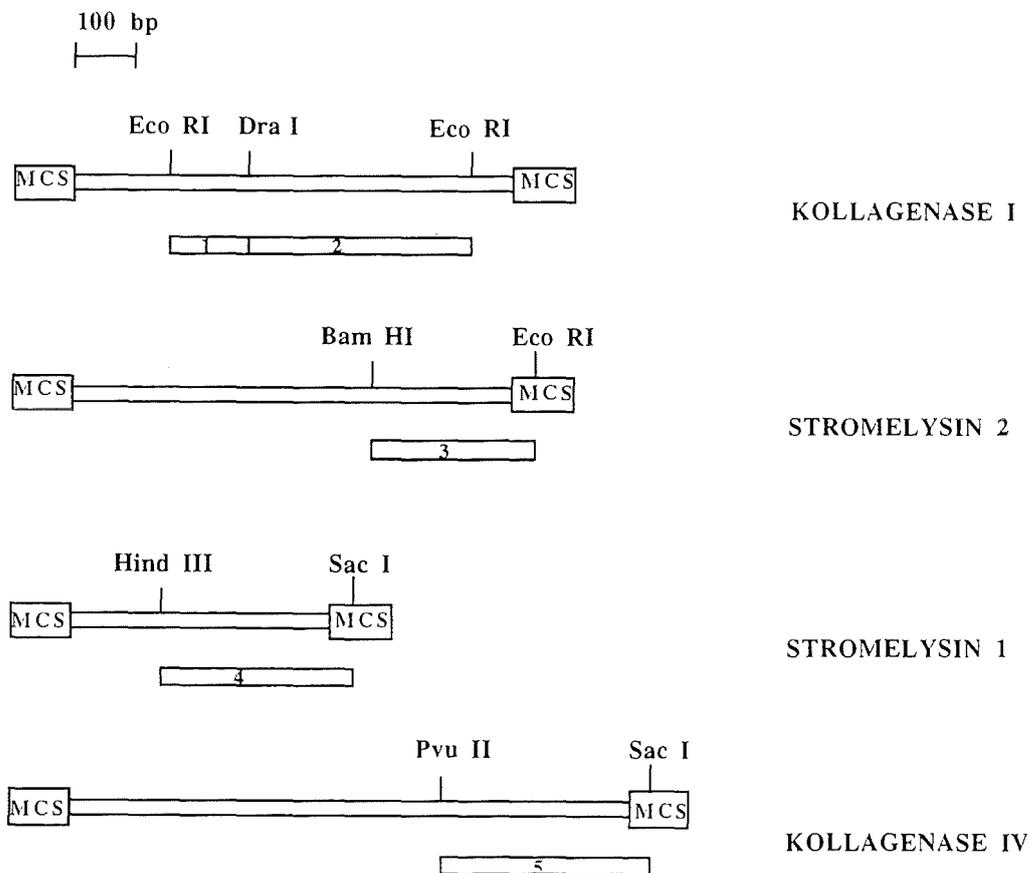


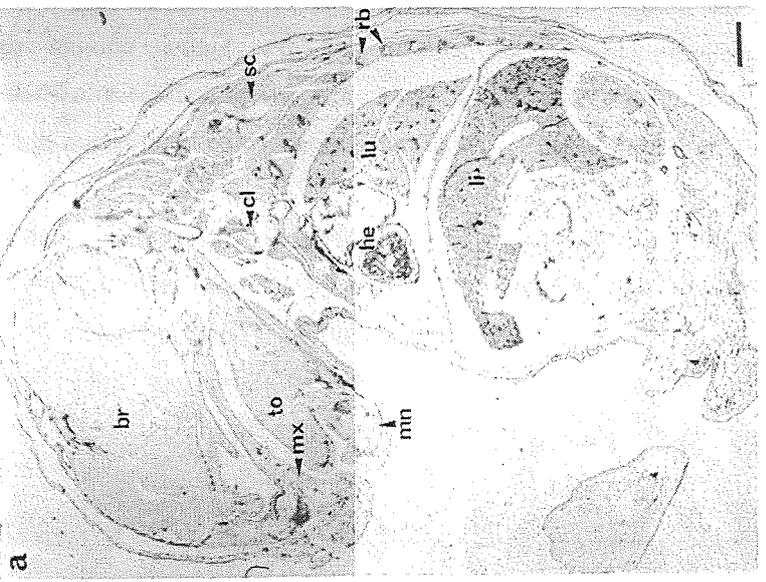
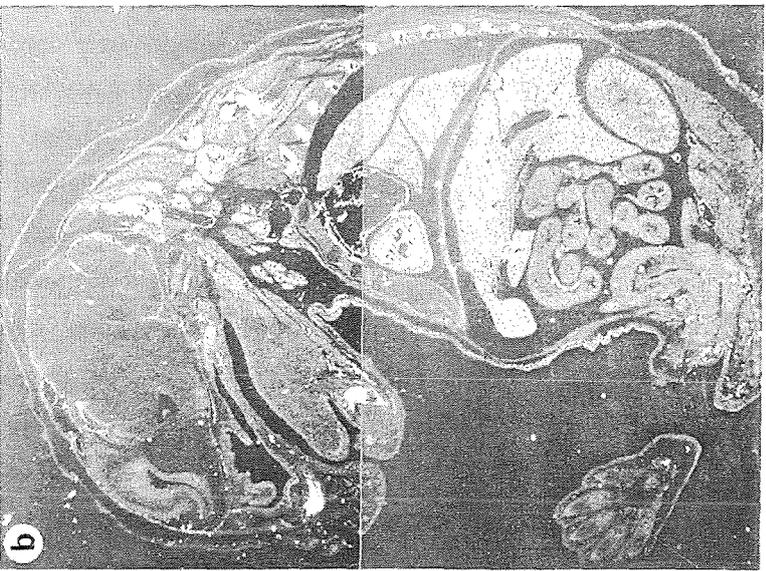
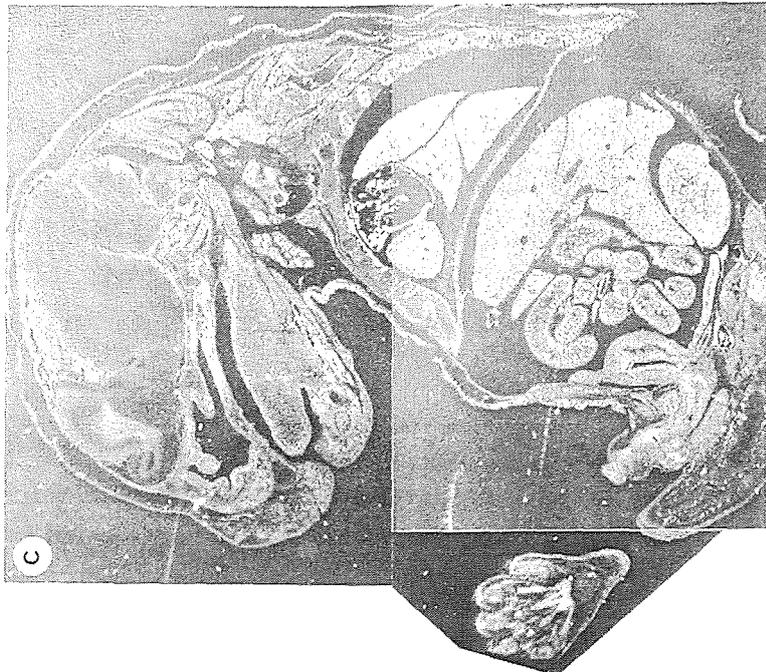
Abb.6: Schematische Darstellung der durch Restriktionsverdau erhaltenen MMP-Subfragmente. Durch Restriktionsverdau der vier ursprünglich isolierten MMP-cDNAs (s. Abb.2e) wurden folgende cDNA-Subfragmente erhalten: 1: 126 bp Kollagenase I (Eco RI/Dra I); 2: 363 bp Kollagenase I (Dra I/Eco RI); 3: 223 bp Stromelysin 2 (Bam HI/Eco RI [MCS]); 4: 302 bp Stromelysin 1 (Hind III/Sac I [MCS]); 5: 340 bp Kollagenase IV (Pvu II/Sac I [MCS]). MCS: schematische Darstellung der "Multiple Cloning Site" des pBluescript-Vektors. Der Balken über den dargestellten cDNA-Fragmenten dient als Maßstab und zeigt die Länge von 100 bp an.

Der Verdau der Kollagenase I cDNA mit den Restriktionsenzymen Eco RI und Dra I lieferte zwei Fragmente mit einer Länge von 126 bp (Fragment 1) und 363 bp (Fragment 2). Der Verdau der Stromelysin 2 cDNA mit Bam HI und Eco RI (Eco RI-Stelle in der MCS des pBluescript liegend) resultierte in einem 223 bp Fragment (Fragment 3).

Die Stromelysin 1 und Kollagenase IV cDNAs wurden mit Sac I (Sac I-Stelle in der MCS des pBluescript liegend) und entweder Hind III (Stromelysin 1) oder Pvu II (Kollagenase IV) verdaut. Für Stromelysin 1 wurde ein 302 bp Fragment (Fragment 4), für Kollagenase IV ein 340 bp Fragment (Fragment 5) erhalten. Nach Klonierung der einzelnen Subklone in den pGEM-4 Vektor wurde durch "in vitro" Transkription mit Hilfe der SP6- oder T7-Polymerase <sup>35</sup>S-UTP-markierte antisense bzw. sense RNA hergestellt. Diese wurden für die im Folgenden beschriebenen "in situ" Hybridisierungen verwendet.

Abb.7 zeigt den Längsschnitt eines 16.5 Tage alten Embryos. Die in der Hellfeldabbildung gekennzeichneten Bereiche (mn), (mx), (rb), (sc) markieren Regionen der Skelettbildung (Abb.7a). Die Signale einer Hybridisierung mit Kollagenase I (Fragment 2, Abb.6) bzw. der 72 kD Kollagenase IV (Fragment 5) sind in 7b bzw. 7c in der Dunkelfelddarstellung (weiße Bereiche) abgebildet. Eine starke Expression der Kollagenase I findet man im Bereich des Unter- und des Oberkiefers (mn, mx), im Schulterblatt, im Bereich des Hinterhauptes (exoccipital), im Schlüsselbein (cl) und in den proximalen (dorsalen) Bereichen der Rippen (rb). Dagegen wird im distalen (ventralen) Bereich der Rippen kein Signal beobachtet. Mit der kürzeren Kollagenase I Probe (Fragment 1), die ebenfalls beim Restriktionsverdau mit Dra I/Eco RI entsteht, wurde in den gleichen Bereichen ein Signal gefunden (nicht gezeigt), was für die Spezifität dieser Proben spricht. Aufgrund des etwas höheren Hintergrundes bei der Hybridisierung wurde für alle weiteren Analysen die längere Probe verwendet. Die Hybridisierung mit der Kollagenase IV Probe zeigt ein deutlich unterschiedliches Expressionsmuster. Im Vergleich zu Kollagenase I ist die Expression dieser MMP sehr viel weiter verbreitet. Auch im Bereich des Skeletts selbst unterscheidet sich deren Expression. Während Kollagenase I innerhalb des entsprechenden Skelettgewebes zu finden ist, ist das Kollagenase IV Signal in Form eines Ringes um das Gewebe sichtbar. Interessanterweise konnte im Fuß des Embryos ein Signal im Knorpelgewebe nachgewiesen werden, während für Kollagenase I zu diesem Zeitpunkt in diesem Bereich keine Expression gefunden wird.

Abb.7: Expression der Kollagenase I und 72 kD Typ IV Kollagenase in Längsschnitten eines 16.5 Tage alten Embryos. Die Schnitte wurden in der Hellfeldbeleuchtung (a) photographiert, um die Gewebemorphologie darzustellen, und in der Dunkelfeldbeleuchtung (b: Kollagenase I antisense Probe; c: Kollagenase IV antisense Probe), um das Hybridisierungssignal zu veranschaulichen. (br) Gehirn; (cl) Schlüsselbein; (he) Herz; (li) Leber; (lu) Lunge; (mn) Mandibel; (mx) Maxille; (rb) Rippen; (sc) Schulterblatt; (to) Zunge. Maßstab: 1mm.



Die für Kollagenase IV gefundenen Daten stimmen hierbei mit dem von Reponen et al. (1992) beschriebenen Expressionsmuster überein und sind dort im Detail beschrieben. Im Folgenden soll vor allem die Lokalisierung der Kollagenase I genauer untersucht werden. Mit den verschiedenen sense RNA-Transkripten (Kollagenase I, Kollagenase IV), die als Kontrolle mitgeführt wurden, konnte in keinem der durchgeführten Experimente ein Signal beobachtet werden.

Abb.8 verdeutlicht die Expression der Kollagenase I im Bereich des Unter- und Oberkiefers. In Abb.8a ist ein Längsschnitt durch den Oberkiefer eines 16.5 Tage alten Embryos zu sehen (s. auch Abb.7a,b; mx). Die kleinen Pfeile geben den Bereich der Knochenbildung an. Die Region ist in 8b,c vergrößert dargestellt. Hier weisen die großen Pfeile auf ein starkes Signal (schwarze Granula) der Kollagenase I hin, die im Bereich der Knochenneubildung exprimiert wird. In Abb.8d wird ein Längsschnitt durch den Unterkieferbereich des Embryos gezeigt (s. auch Abb.7a,b; mn). Die kleinen Pfeile markieren wiederum den Bereich der Knochenbildung, die sich in der Region des "Meckel's cartilage" (mc) vollzieht. Die Region ist in Abb.8e,f vergrößert dargestellt. In dieser Abb. ist deutlich zu erkennen, daß das Signal (schwarze Granula) in Zellen erscheint, die sich im Bereich der neuentstehenden Knochenmatrix entlang der Knochenbälkchen (große Pfeile) befinden. Die MMP könnte deshalb von Zellen exprimiert werden, die an der Knochenneubildung (Osteoblasten) beteiligt sind. Die im Hellfeld beobachteten Signale (8b,e) leuchten in der Dunkelfeldabbildung aufgrund der Lichtbrechung an den Granula weiß auf (8c,f). Auch im proximalen (dorsalen) Bereich der Rippen (Abb.7b) wurde ein deutliches Signal beobachtet. In Abb.9 wird dieser Bereich sowohl im Querschnitt, als auch im Längsschnitt dargestellt. Abb.9a zeigt die Übersicht eines Querschnittes im Bereich des Brustkorbes. Der Kreis markiert den Bereich des Rippenansatzes am Wirbel und ist in Abb.9b vergrößert dargestellt. Hier ist der proximale Bereich der Rippen (rb) sichtbar (Abb.9b). Die Pfeile deuten auf den Ansatz der Rippe am Wirbelbogen, der in Abb.9c weiter vergrößert dargestellt ist. Die in Abb.9c eingezeichneten Pfeile weisen auf das Signal entlang der neuentstehenden Knochenbälkchen hin. Wie auch der Längsschnitt durch den Gesamt-Embryo (Abb.7b) zeigt, findet man im distalen (ventralen) Bereich der Rippen keine Expression der Kollagenase I (nicht gezeigt).

Ein Längsschnitt durch die Rippenregion (rb; Abb.9d) läßt erkennen, daß Kollagenase I in der zentralen Schaftregion der Rippen (Pfeile) exprimiert wird. Abb.9e,f stellt eine Vergrößerung des markierten Bereiches im Hell- (e) und Dunkelfeld (f) dar und macht deutlich, daß das Signal spezifisch im Bereich der endochondralen Knochenbildung (s. auch Abb.11) zu finden ist, während der Bereich des hypertrophen Knorpels (hc; s. auch Abb. 12, H) negativ ist.

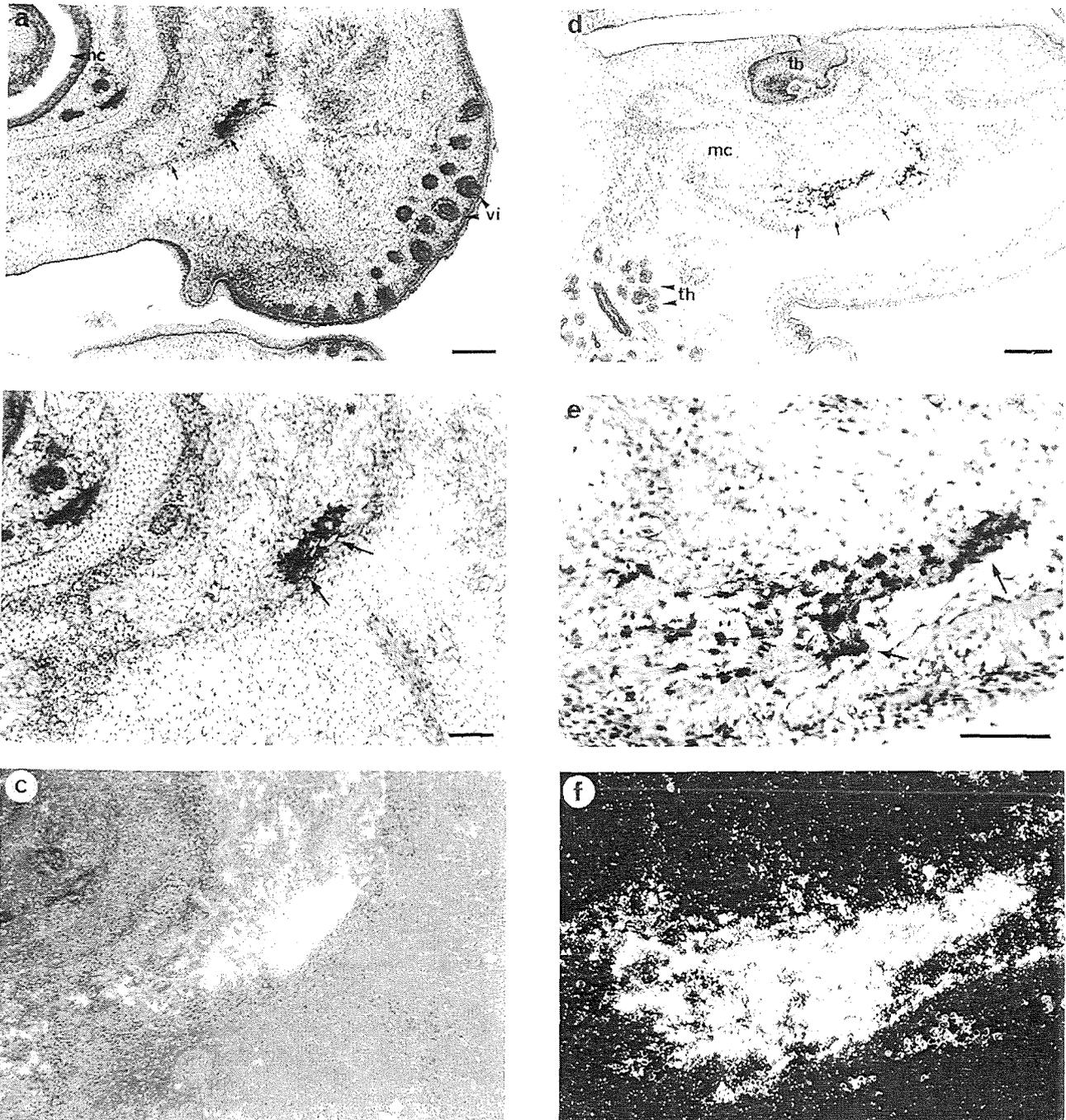


Abb.8: Expression der Kollagenase I im Ober- und Unterkiefer eines 16.5 Tage alten Embryos. (a) Oberkiefer (Maxille); (d) Unterkiefer (Mandibel). Die mit kleinen Pfeilen markierten Bereiche sind in (b) und (e) vergrößert dargestellt. Die großen Pfeile weisen auf das Signal hin. (c) und (f) Dunkelfelddarstellung von (b) bzw. (e). (mc) "Meckel's cartilage"; (nc) Nasenhöhle; (tb) Zahnanlage; (th) Thymus; (vi) Schnurrbarthaar-Follikel. Maßstab: (a,d) 200  $\mu\text{m}$ ; (b,c,e,f) 100  $\mu\text{m}$ .

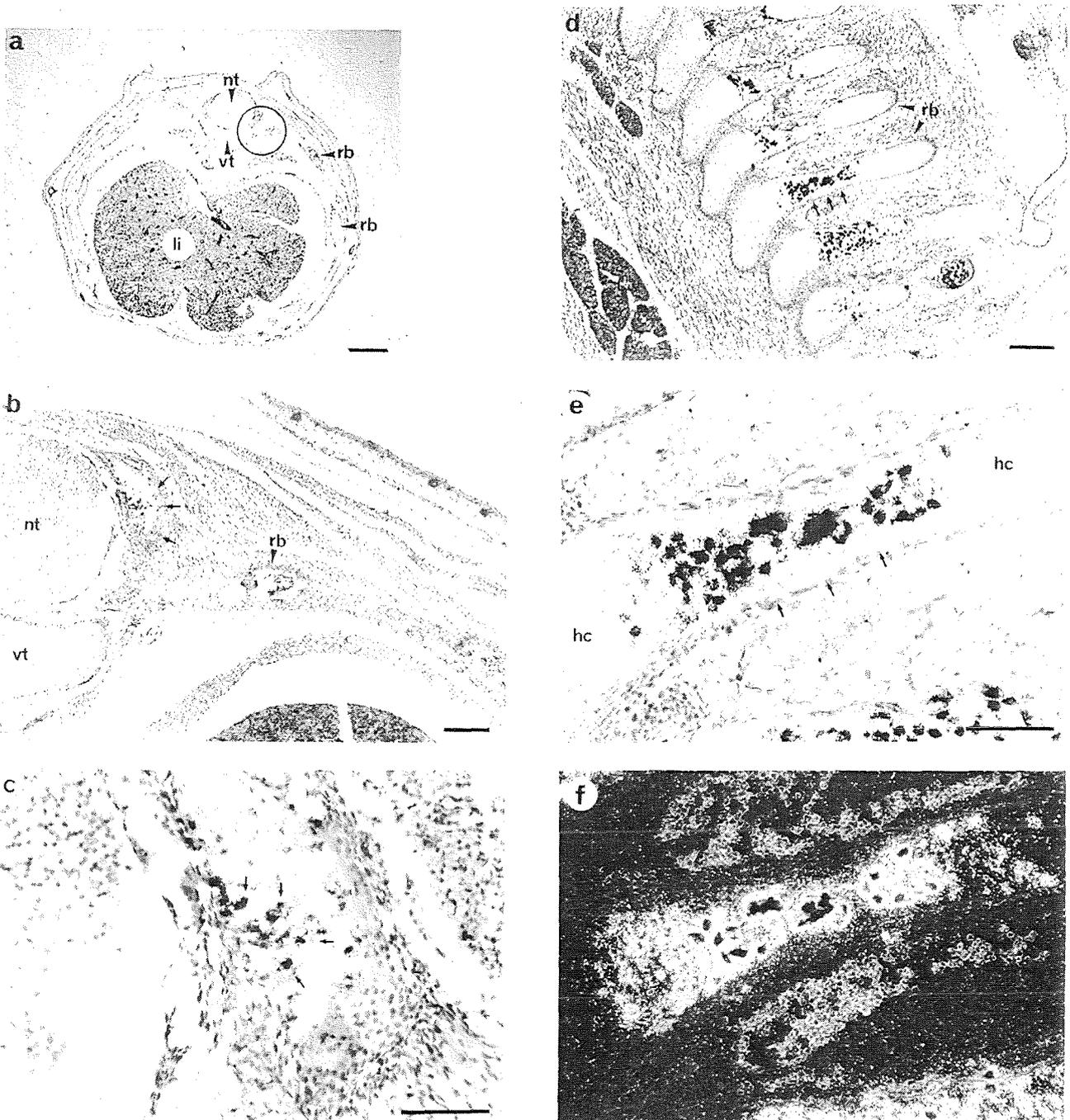


Abb.9: Expression der Kollagenase I im Bereich der Rippen im 16.5 Tage alten Embryo. (a) Querschnitt im Bereich des Brustkorbes. Der Kreis markiert die in (b) gezeigte Vergrößerung. Pfeile in (b) markieren den in (c) vergrößerten Bereich. Pfeile in (c) markieren das Signal im Bereich der Knochenneubildung. (d) Längsschnitt durch die Rippen. Pfeile markieren die in (e) dargestellte Vergrößerung. Pfeile in (e) markieren den Bereich der endochondralen Ossifizierung. (f) Dunkelfelddarstellung von (e). (hc) hypertropher Knorpel; (li) Leber; (nt) Neuralrohr; (rb) Rippen; (vt) Wirbel. Maßstab: (a) 1 mm; (b,d) 200  $\mu\text{m}$ ; (c) 50  $\mu\text{m}$ ; (e,f) 100  $\mu\text{m}$ .

Vergleicht man die Kollagenase I Expressionsdaten mit einer spezifischen Färbung für Knochen (Alizarinrot) und Knorpelgewebe (Alcianblau) eines 16.5 Tage alten Embryos (Abb.10) scheint die rote Färbung, die die Ossifizierungszentren in diesem Embryo darstellt, mit der Lokalisation der Kollagenase I Expression übereinzustimmen.

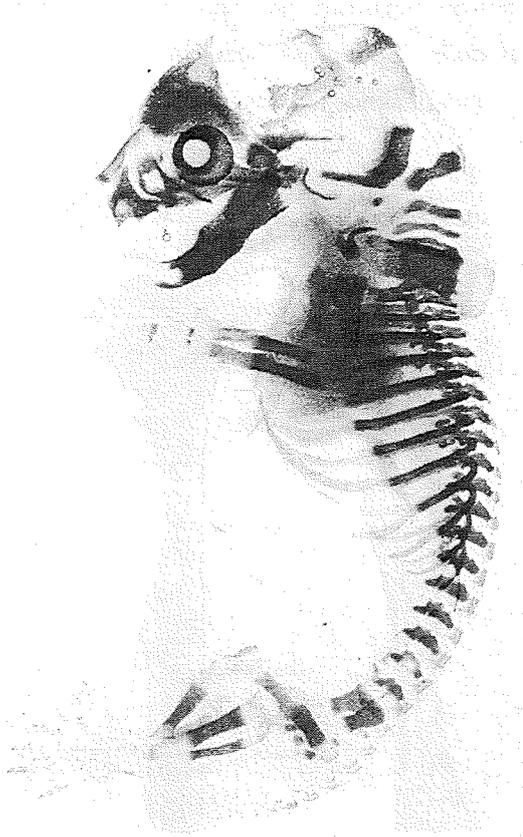


Abb.10: Alizarinrot-/Alcianblau-Färbung eines 16.5 Tage alten Embryos (nach Kaufman, 1992). Die rote Färbung zeigt spezifisch die verknöcherten Bereiche des Skeletts. Die blaue Färbung stellt die Skelettbereiche dar, die aus Knorpel bestehen.

Zusätzlich zu den hier gezeigten Daten findet man, daß Kollagenase I zu diesem Zeitpunkt auch in den Schaftregionen der Röhrenknochen von Arm und Bein, in den Wirbelkörpern (Wirbelzentrum und -bögen), und in bestimmten Bereichen der Knochen des Schädeldaches exprimiert ist. Ein schwaches Signal kann auch in den Fingerknochen beobachtet werden. Im 15.5 Tage alten Embryo ist eine Kollagenase I Expression in den gleichen Bereichen des Skeletts in ähnlicher Stärke zu beobachten (nicht gezeigt).

Zum Verständnis der möglichen Funktion von Kollagenase I während dieser Stadien der Embryonalentwicklung soll hier kurz auf den Prozeß der Knochenentwicklung eingegangen werden.

Die Knochenbildung (Osteogenesis) erfolgt auf zwei Wegen, die zur Bildung des primären Knochens (Geflechtknochen) führen. Bei der **desmalen Ossifikation** entsteht das Knochengewebe direkt im ursprünglich mesenchymalen Bindegewebe. Diese Knochenbildung führt zur Entstehung der Bindegewebsknochen. Durch desmale Ossifikation entstehen die flachen Schädelknochen, der Oberkiefer und der größte Teil des Unterkiefers, die meisten

Gesichtsschädelknochen, der Hauptteil des Schlüsselbeins und die Knochenmanschette der Röhrenknochen. Wird aus dem Mesenchym zuerst ein Knorpelmodell gebildet, das dann schrittweise durch Knochengewebe ersetzt wird, nennt man diesen Vorgang **endochondrale Ossifikation** (Knochen der Schädelbasis, der Wirbelsäule, des Becken und der Extremitäten). In beiden Fällen wird ein Geflecht von Knochenbälkchen gebildet, das durch Matrixablagerung von differenzierten Osteoblasten entsteht und als **primäre Spongiosa** bezeichnet wird. Die primäre Spongiosa wird später durch den sekundären Lamellenknochen ersetzt oder unter Bildung der Knochenmarkshöhle entfernt.

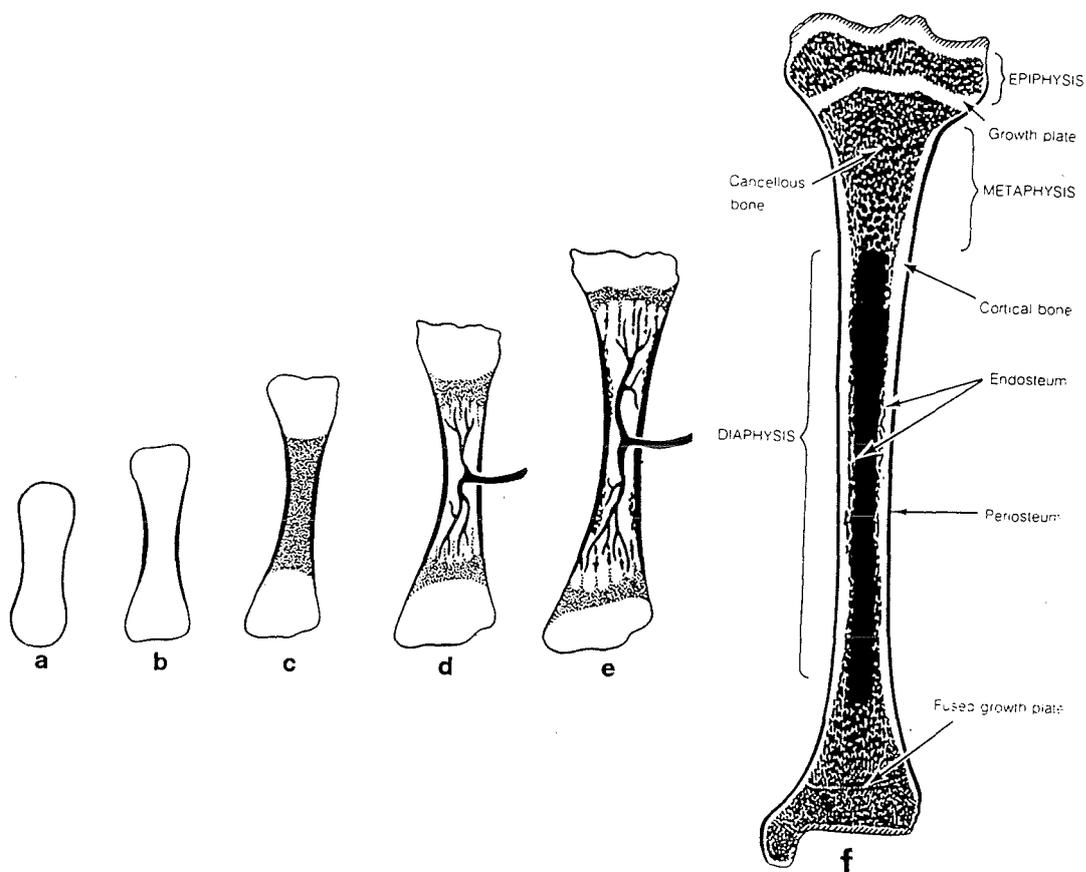
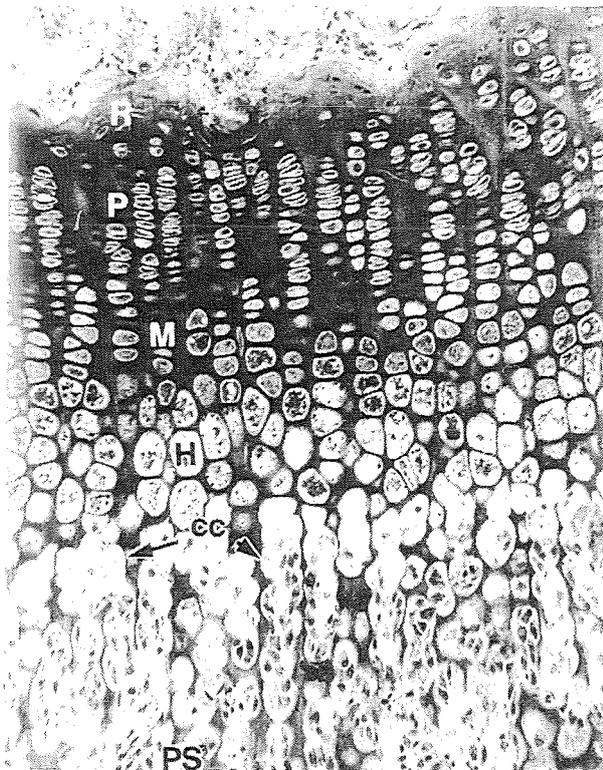


Abb.11: Schematische Darstellung der Entwicklung eines Röhrenknochens (nach Jee, 1989). a. Knorpelmodell. b. Bildung der perichondralen Knochenmanschette. c. Beginn der Knorpelverkalkung. d. Eintritt der Blutgefäße in den verkalkten Knorpel (b-d: Bildung des primären Ossifikationszentrums). e. Blutgefäße und vaskuläres Mesenchym teilen sich in zwei Zonen der Ossifizierung (Wachstumszonen). f. Röhrenknochen des adulten Tieres mit den Bereichen Epiphysis und Metaphysis, die aus Knochenbälkchen [cancellous bone] bestehen und durch den Bereich der Wachstumszone [growth plate] getrennt sind. Diaphysis, Bereich der von kompaktem Knochen [cortical bone] umgeben ist. Der Knochen wird außen von der Knochenhaut [Periosteum] überzogen; die Knochenmarkshöhle und die Zwischenräume der Knochenbälkchen werden vom Endosteum ausgekleidet. Im adulten Tier ist der hyaline Knorpel im Bereich der Wachstumszone durch Knochensubstanz ersetzt [Fused growth plate].

Der Prozeß der endochondralen Ossifikation ist in Abb.11 schematisch dargestellt. Zu Beginn entsteht ein Knorpelmodell, das sich aus einer Kondensation von mesenchymalen Zellen bildet (11a). Dann bildet sich die perichondrale Knochenmanschette aus, die aus kompakten Knochen besteht (11b). Der Knorpel beginnt im Bereich der Schaftregion zu verkalken (11c), daraufhin treten Blutgefäße in den Bereich des verkalkten Knorpels ein (11b-d; Bildung des primären Ossifikationszentrums). Die Blutgefäße und das vaskuläre Mesenchym teilen sich in zwei Zonen, wodurch zwei Wachstumszonen entstehen (11e). Später treten dann auch Blutgefäße im Bereich der Epiphysis (s. Abb.11f) ein, um die Ossifikationszentren in diesem Bereich zu bilden (sekundäres Ossifikationszentrum). Abb.11f zeigt den adulten Röhrenknochen, der in drei Bereiche unterteilt werden kann: **1.** In den Bereich der Diaphysis, der zentralen Schaftregion mit der Knochenmarkshöhle, die von kompakten Knochen (cortical bone) umgeben ist. **2.** In den Bereich der Metaphysis und **3.** in den Bereich der Epiphysis, die hauptsächlich aus Knochenbälkchen bestehen. Im noch wachsenden Tier wird die Epiphysis durch eine Wachstumszone, die aus hyalinem Knorpel besteht, von der Metaphysis getrennt. In diesem Bereich können noch Knochenbälkchen gebildet werden, was in einem Längenwachstum resultiert. Der Bereich der Knochen-Knorpel-Grenze (Wachstumszone) ist in Abb.12 dargestellt und kann in folgende Zonen untergliedert werden:



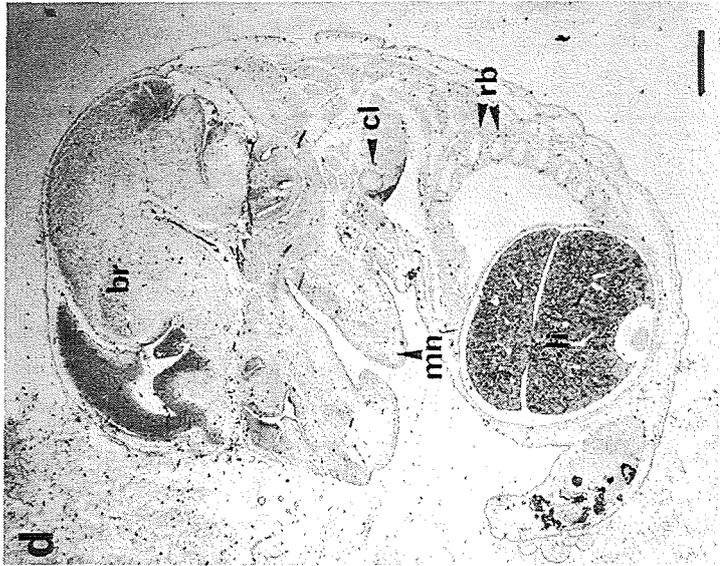
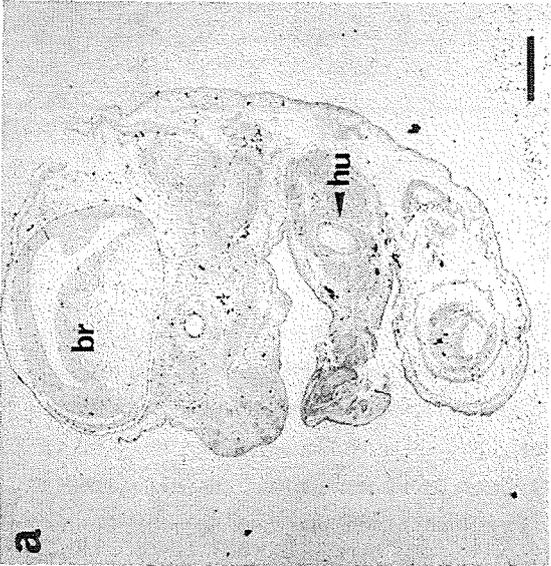
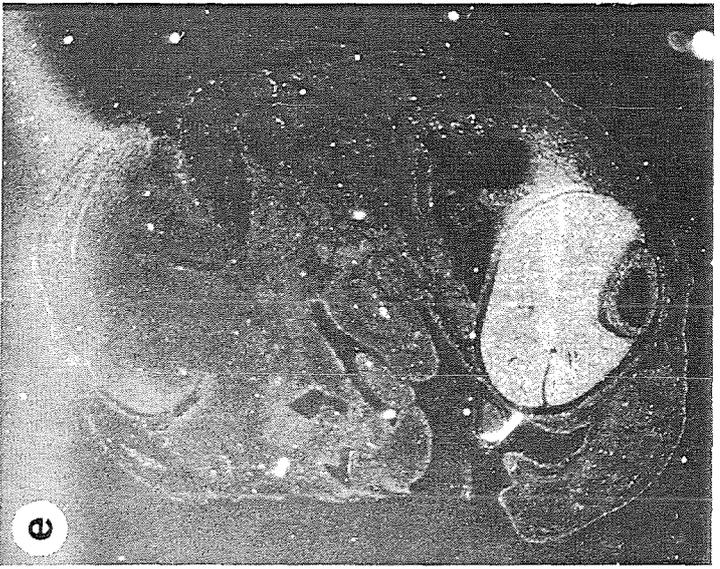
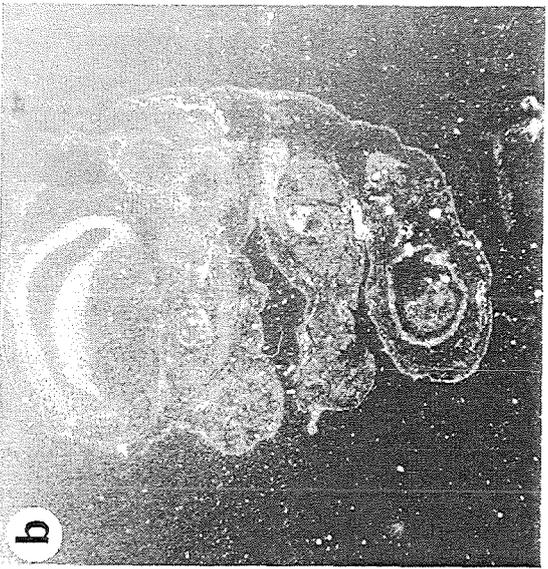
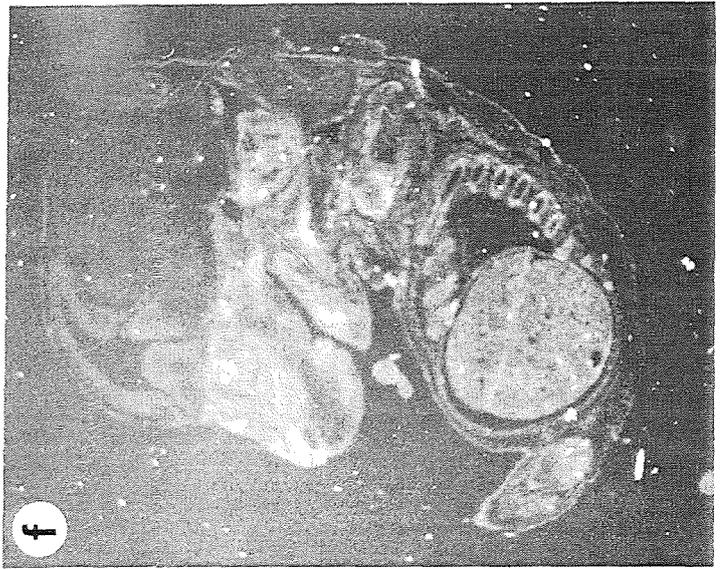
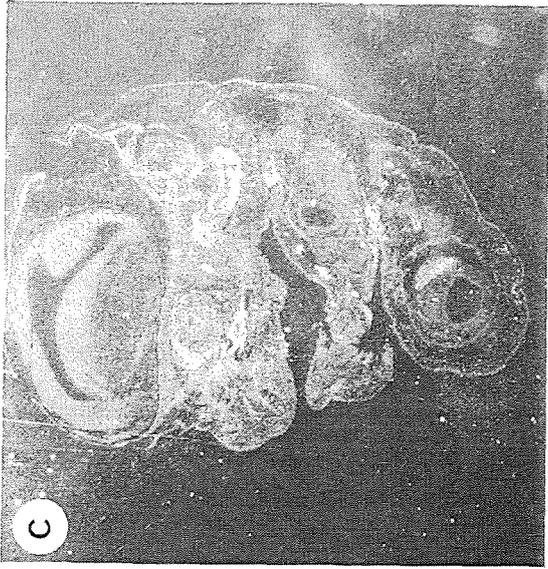
1. Zone des Reserveknorpels (R)
2. Zone der Chondrozytenproliferation ("Säulenknorpel";P)
3. Zone der Chondrozytenreifung (M)
4. Zone der Hypertrophie der Chondrozyten (H)
5. Zone der Knorpelverkalkung (cc)
6. Zone des Knorpelabbaus (Eröffnungszone) und der Knochenneubildung (primäre Spongiosa; PS)

Abb.12: Knochen-Knorpel-Grenze der endochondralen Ossifikation im Bereich der epiphysalen-metaphysalen Wachstumszone (nach Jee, 1989). Reserveknorpel (R), proliferierende (P), reifende (M), hypertrophe (H) Knorpelzone, Knorpelverkalkung (cc) und primäre Spongiosa (P). x 125.

Die in Abb.5 dargestellte Bestimmung der Kollagenase I Transkripte in Gesamt-Embryonen zeigte, daß der früheste Zeitpunkt einer schwachen Expression am Tag 14.5 auftritt. Dieser Zeitpunkt markiert auch das Auftreten der primären Ossifikationszentren (Kaufman, 1992). Die Untersuchung mittels "in situ" Hybridisierung sollte nun aufklären, ob die gefundenen Kollagenase I Transkripte tatsächlich von einer Expression in diesen Bereichen herrührt. Abb.13 stellt Längsschnitte aus verschiedenen Ebenen eines 14.5 Tage alten Embryos (a,d) dar. Es zeigt, daß Kollagenase I Transkripte nur in wenigen Geweben des 14.5 Tage alten Embryos gefunden werden können. In 13a führt die Schnittebene durch die Schaftregion des Oberarmes (hu) und den Bereich des Unterarmes. In 13d führt die Schnittebene durch die Region des Brustkorbes. Die Mandibel (mn) und Maxille, das Schlüsselbein (cl), die Rippen (rb) und die Leber (li) sind zu erkennen. Die Dunkelfeldabbildungen in Abb.13b,e zeigen die Hybridisierung mit der Kollagenase I antisense Probe (Fragment 3), in Abb.13c,f ist die Hybridisierung mit der 72 kD Kollagenase IV antisense Probe (Fragment 5) zu sehen.

Ein Kollagenase I spezifisches Hybridisierungssignal ist in der Schaftregion des Oberarmes (hu) zu erkennen (Abb.13b), während im Bereich der Rippen (Abb.13e) noch keine Expression nachzuweisen ist. Dagegen findet man zu diesem Zeitpunkt eine weit verbreitete Expression der Kollagenase IV. Ein deutliches Signal findet man im mesenchymalen Gewebe im Kopfbereich (Abb.13c) und, wie auch im 16.5 Tage alten Embryo, im Bereich des Oberarmes (hu), des Schlüsselbeines (cl) und der proximalen Rippen (rb), in Form eines Ringes um das entstehende Skelettgewebe (Abb.13c,f). Im Bereich der distalen Rippen erscheint das Signal innerhalb des Knorpelgewebes. Abb.14 verdeutlicht die Kollagenase I Expression in den Geweben des 14.5 Tage alten Embryos. Der Längsschnitt führt durch die Ebene der Wirbelsäule (vc; Abb.14a). Die im Bereich der Maxille (mx) und des Gaumendaches (bo) mit Kreisen markierten Regionen sind in 14b,c (Maxille) und 14d,e (Gaumendach) mit je 2 verschiedenen Vergrößerungen dargestellt. Abb.14c gibt den in 14b markierten Bereich der Knochenbildung der Maxille (mb) vergrößert wider. Einzelne Bereiche, in denen das Signal (schwarze Granula) zu sehen ist, sind mit Pfeilen markiert.

Abb.13: Expression der Kollagenase I in Längsschnitten eines 14.5 Tage alten Embryos. Die Schnitte wurden in der Hellfeldbeleuchtung (a,d) photographiert, um die Gewebemorphologie darzustellen und im Dunkelfeld (b,e: Kollagenase I antisense Probe; c,f: Kollagenase IV antisense Probe), um das Hybridisierungssignal zu veranschaulichen. (a) zeigt einen Längsschnitt im Bereich des Oberarmes; (d) einen Längsschnitt im Bereich der Rippen. (br) Gehirn; (cl) Schlüsselbein; (hu) Oberarm; (mn) Mandibel; (rb) Rippen. Maßstab: 1mm.



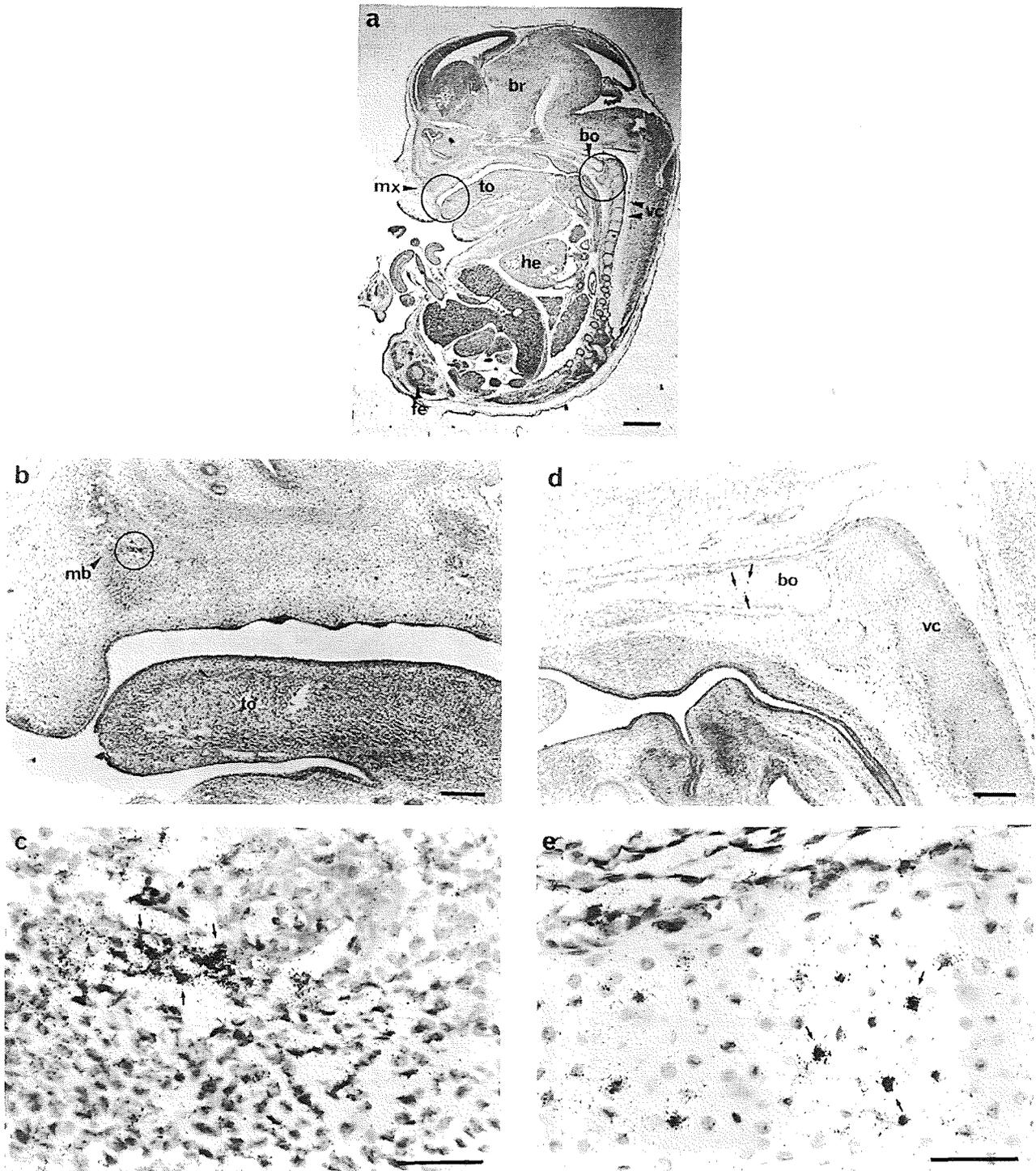


Abb.14: Expression der Kollagenase I im Bereich der Maxille und des Gaumendaches im 14.5 Tage alten Embryo. (a) Übersicht eines Längsschnittes. Kreise markieren die in (b) und (d) vergrößerten Bereiche. (b) Vergrößerung im Bereich der Maxille. Der Kreis markiert den in (c) gezeigten Ausschnitt im Bereich des Maxillenknochens. Pfeile markieren das Signal im Bereich der Knochenbildung. (d) Vergrößerung im Bereich des Gaumendaches. Pfeile zeigen den in (e) vergrößerten Ausschnitt. (e) Pfeile markieren einzelne Zellen in diesem Bereich, die Kollagenase I exprimieren. (bo) Gaumendach; (br) Gehirn; (fe) Oberschenkel; (he) Herz; (mb) Maxillenknochen; (mx) Maxille; (to) Zunge; (vc) Wirbelsäule. Maßstab: (a) 1mm; (b,d) 200  $\mu$ m; (c,e) 50  $\mu$ m.

Im Knorpelgewebe des Gaumendaches (bo) werden ebenfalls einzelne Zellen gefunden, die Kollagenase I exprimieren (Pfeile, 14d). Die in 14e mit Pfeilen markierten Zellen entsprechen den in der kleineren Vergrößerung markierten Zellen. Zu diesem Zeitpunkt wird außer in den in Abb.13 und Abb.14 lokalisierten Geweben eine schwache Kollagenase I Expression auch im Oberschenkel (fe) und in der Mandibel beobachtet. In den Rippen und auch in allen weiteren Teilen des Skeletts konnte keine Expression nachgewiesen werden. Somit stimmte die am Tag 14.5 der Entwicklung erstmals auftretende Kollagenase I Expression in den beschriebenen Geweben mit dem beobachteten Auftreten und der Lokalisation der ersten Ossifizierungszentren überein (Kaufman, 1992). Kollagenase I könnte damit eine wichtige Funktion bei der Entstehung des verknöcherten Skeletts spielen.

Bei der Untersuchung der Kollagenase I Expression zu einem früheren Stadium der Entwicklung (Schnitte von 12.5 und 13.5 Tage alten Embryonen) konnte keine Expression der MMP nachgewiesen werden. Dies ist in Übereinstimmung mit der Northern Blot Analyse (Abb.5) mit RNA von Gesamt-Embryonen.

Zusammenfassend zeigen die in Abb.7-14 gezeigten Daten, daß Kollagenase I spezifisch im sich entwickelnden Skelettsystem zu dem Zeitpunkt und in denjenigen Bereichen exprimiert wird, in denen die neue Knochenmatrix entsteht. Kollagenase IV (72 kD) dagegen kann sehr viel früher als Kollagenase I nachgewiesen werden und wird in vielen Geweben mesenchymalen Ursprungs exprimiert. In Bereichen des entstehenden Skeletts findet man eine Kollagenase IV Expression in Form eines Ringes um das Knorpelgewebe. Zu keinem Stadium der Embryonalentwicklung konnte dagegen eine Expression von Stromelysin 1 und Stromelysin 2 beobachtet werden (nicht gezeigt).

#### **4.3.2 Expression der MMPs in Geweben des adulten Organismus**

Zum Zeitpunkt der Geburt ändert sich für viele Gene, z. B. Globine ( $\beta$ -Globin; Charnay et al., 1984; Wright et al., 1984) oder Lebergene ( $\alpha$ -Fetoprotein; Tilghman und Belayew, 1982; Krumlauf et al., 1985; Godbout et al., 1986), das Expressionsmuster signifikant. Es ist daher denkbar, daß Metalloproteinasen mit ähnlichem Substratspektrum entweder im Embryo oder im adulten Organismus ausschließlich Anwendung finden, zum Beispiel aus Gründen noch nicht bekannter Proteineigenschaften. Die überraschend exklusive Expression von Kollagenase I und IV (72 kD) in bestimmten Geweben des Embryos, und die Abwesenheit von Stromelysin 1 und 2 während der Embryogenese, sollte deshalb mit der Expression der MMPs im adulten Organismus verglichen werden.

Um die Expression der verschiedenen klonierten MMPs im adulten Organismus zu untersuchen, wurde die poly A<sup>+</sup> RNA aus verschiedenen Mausgeweben in einer Northern Blot Analyse auf MMP Expression hin überprüft (Abb.15).

Ein 3.0 kb Transkript der Kollagenase IV ist in Herz und Lunge zu finden. Die Expression stimmt dabei mit der von Reponen et al. (1992) beschriebenen Expression überein. Interessanterweise kann in denselben Geweben mit der Stromelysin 1 Probe ein 1.9 kb Transkript nachgewiesen werden. Eine schwache Expression von Stromelysin 1 kann auch im Skelettmuskel und in der Milz beobachtet werden.

Die Stromelysin 2 Expression (1.8 kb Transkript) unterscheidet sich deutlich von dem beobachteten Kollagenase IV und Stromelysin 1 Expressionsmuster. Außer im Hoden kann in jedem der untersuchten Geweben eine geringe Menge an Transkripten dieser MMP gefunden werden. Im Herz und in der Niere ist eine höhere Transkriptmenge vorhanden.

Das Kollagenase I (2.8 kb) Expressionsmuster unterscheidet sich ebenfalls von dem der anderen MMPs. Eine hohe Expression ist im Muskel und in der Niere zu beobachten, eine geringere Expression in Lunge, Herz und Milz. Keine Transkripte sind dagegen im Gehirn, der Leber und im Hoden nachweisbar. Ähnlich wie während der Embryogenese wird Kollagenase I auch im adulten Tier im Knochengewebe exprimiert (Abb.17, 18).

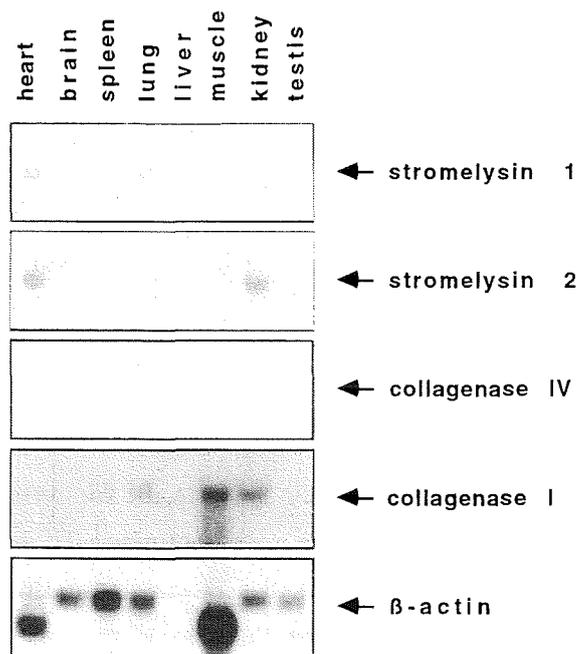
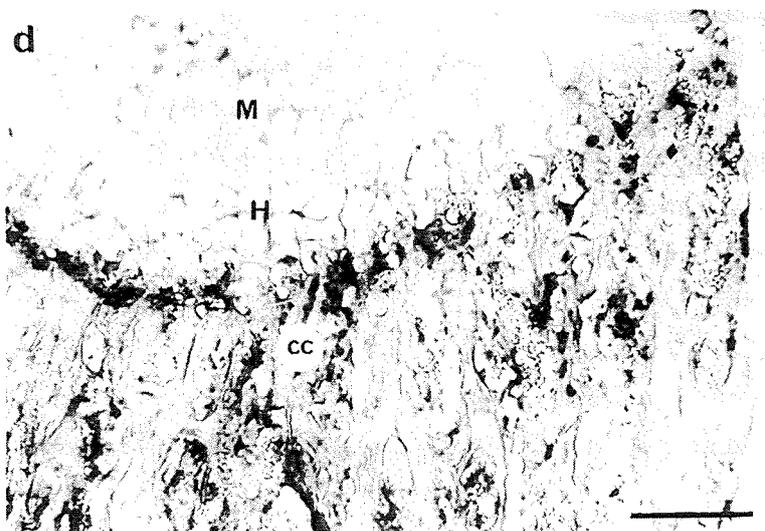
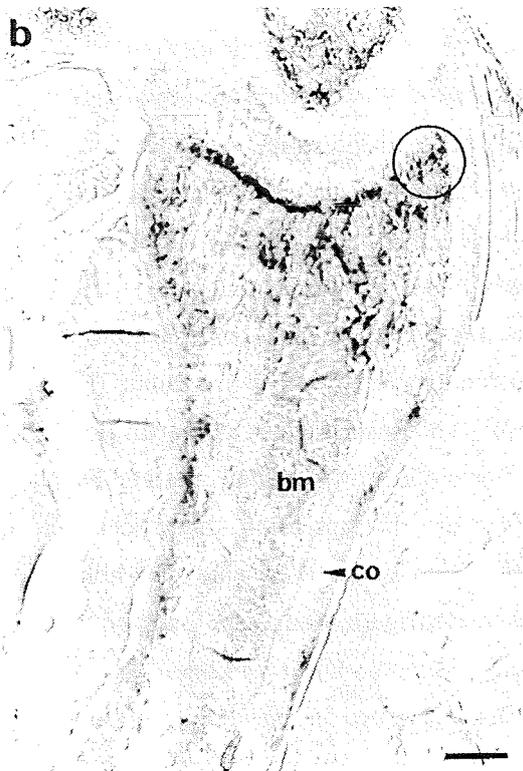
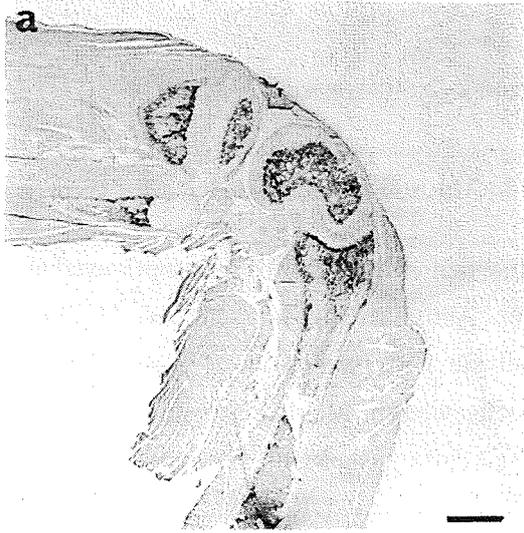


Abb.15: Expression der Maus Metalloproteinasen in Geweben von adulten Tieren. Poly A<sup>+</sup> RNA wurde aus den oben angegebenen Geweben (Herz [heart]; Gehirn [brain]; Milz [spleen]; Lunge [lung]; Leber [liver]; Skelettmuskel [muscle]; Niere [kidney]; Hoden [testis]) isoliert. Je 2 µg der hochgereinigten RNA wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Der RNA-Filter (MTN, Multiple Tissue Northern) wurde von der Firma Clontech, Heidelberg bezogen. Der Filter wurde nacheinander mit den <sup>32</sup>P-markierten MMP-cDNA Proben und einer <sup>32</sup>P-markierten β-Aktin cDNA Probe (rechte Seite) hybridisiert. Folgende Transkriptgrößen konnten für die einzelnen cDNAs gefunden werden: Stromelysin 1 (1.9 kb); Stromelysin 2 (1.8 kb); 72 kD Kollagenase IV (3.0 kb); Kollagenase I (2.8 kb). Sie wurden anhand eines RNA-Markers auf dem Filter bestimmt. Die β-Aktin Probe hybridisiert mit verschiedenen Spleißformen der β-Aktin mRNA (1.6-2.0 kb).

Da Knochen auch im adulten Organismus eines der dominierenden Gewebe der Kollagenase I Expression zu sein scheint (siehe auch Abb.17, 18), sollte mittels "in situ" Hybridisierung gezeigt werden, in welchen Bereichen und in welchem Typ von Zellen Kollagenase I im adulten Knochengewebe exprimiert wird. Dazu wurden Gewebeschnitte von eingebetteten Röhrenknochen aus zwei Wochen alten Mäusen angefertigt und einer "in situ" Hybridisierungsanalyse unterzogen. Abb.16 zeigt die Kollagenase I Expression im Oberschenkel einer zwei Wochen alten Maus. Abb.16a stellt eine Übersicht des distalen Bereichs des Oberschenkels dar. Die Epi-, die Meta- und die Diaphyse sind zu sehen (s. auch Abb.11f). Abb.16b zeigt eine Vergrößerung des Oberschenkels. Im Bereich der Diaphyse ist die Knochenmarkshöhle (bm), die vom kompakten Knochen (co) umgeben ist, zu erkennen. Abb.16c zeigt die Dunkelfelddarstellung zu 16b. Ein starkes Signal (weiße Bereiche) ist im Grenzbereich der Wachstumszone, in der Metaphyse und entlang des kompakten Knochens der Diaphyse zu beobachten. In Abb.16d ist eine Vergrößerung des in 16b mit einem Kreis markierten Bereich aus der Region der Wachstumszone dargestellt. Das Signal (schwarze Granula) ist in der Zone der Knorpelverkalkung (cc) und in Osteoblasten, die entlang der Oberfläche des Knochens liegen, der sich im Bereich der Wachstumszone bildet, zu erkennen. In diesem Bereich sind auch reife Chondrozyten und Osteoklasten zu finden. Es ist deshalb nicht auszuschließen, daß diese Zellen ebenfalls Kollagenase I exprimieren (A. Grigoriadis, pers. Mitteilung). Im Bereich des hypertrophen Knorpels (H), bzw. in der Zone der Chondrozytenreifung (M) kann dagegen keine Expression der MMP beobachtet werden (Abb.16).

Zusammenfassend zeigen diese Daten deutliche Unterschiede in der Intensität und Lokalisation der verschiedenen MMPs im Gesamtorganismus. Dies läßt darauf schließen, daß den verschiedenen MMPs unterschiedliche Funktionen zukommen. Das Expressionsmuster im adulten Organismus unterscheidet sich von dem im Embryo gefundenen Muster. Während im Embryo keine Expression von Stromelysin 1 und 2 gefunden werden kann, sind die beiden MMPs im adulten Tier in mehreren Geweben exprimiert. Auch Kollagenase I, die im Embryo ausschließlich im entstehenden Knochen gefunden wird, wird im adulten Tier auch in anderen Geweben exprimiert. Kollagenase IV, die während der Embryonalentwicklung weit verbreitet in fast allen Organen des Embryos exprimiert ist, ist im adulten Tier auf wenige Gewebe reduziert.

Abb.16: Expression der Kollagenase I im Oberschenkel einer zwei Wochen alten Wildtyp Maus. (a) Übersicht des Knochens. (b) Vergrößerung im Bereich der Meta- und der Diaphyse. Der Kreis markiert die in (d) vergrößerte Region. (c) Dunkelfelddarstellung von (b). (d) Vergrößerung im Bereich der Wachstumszone. (bm) Knochenmarkshöhle; (cc) Zone der Knorpelverkalkung; (co) kompakter Knochen im Bereich der Diaphyse; (H) hypertropher Knorpel; (M) Zone der Chondrozytenreifung. Maßstab: (a) 1 mm; (b,c) 200  $\mu\text{m}$ ; (d) 100  $\mu\text{m}$ .



## 4.4 Expression der Kollagenase I in Geweben von *c-fos* transgenen Mäusen

### 4.4.1 Induzierte Expression von Kollagenase I in Mäusen mit induzierter *c-fos* Expression

Aus den oben beschriebenen Zellkulturexperimenten wurde der Transkriptionsfaktor AP-1 (Fos/Jun) als entscheidender Regulator in der Aktivität des menschlichen Kollagenase I Promoters (Angel et al., 1987a) und dem Stromelysin 1 Promoter vom Menschen und der Ratte (Angel et al., 1987a; Breathnach et al., 1987) nachgewiesen. Möglicherweise trifft dies auch im Organismus zu. Um dies zu untersuchen wurden Mäuse ausgewählt, die eine Komponente des AP-1 Komplexes erhöht exprimieren, oder bei denen eine AP-1 Komponente inaktiviert wurde. Transgene Mäuse, bei denen die Expression des *c-fos* Gens induzierbar ist, bieten nun die Möglichkeit die Expression dieser AP-1 abhängigen Gene "in vivo" zu untersuchen. In diesen Tieren ist die Expression des *c-fos* Gens unter der Kontrolle des Interferon-induzierbaren "Mx" Promoters. Durch Behandlung der Tiere mit Poly I:C wird die endogene Interferon Produktion in den transgenen Tieren angeschaltet. Da das 3'-untranslatierte Ende für die schnelle Degradation der *c-fos* mRNA verantwortlich ist (Rahmsdorf et al., 1987), wurde dieses deletiert um die *c-fos* mRNA zu stabilisieren (Konstrukt: Mx-*c-fos*D, Bachiller und Rütter, 1990).

"In vitro" findet man nach TPA Behandlung eine schnelle *c-fos* Induktion (30 min), die für die maximale Kollagenase I Expression nach 6 Stunden notwendig zu sein scheint (König et al., 1992). Aufgrund dieser Induktionskinetik wurde die Gesamt-RNA aus Geweben der Mx-*c-fos*D transgenen Mäuse sechs Stunden nach Poly I:C Behandlung isoliert und in einer Northern Blot Analyse sowohl auf *c-fos*, als auch auf Kollagenase I Expression untersucht. Zu diesem Zeitpunkt konnte in der Milz, der Leber, der Niere und in der Haut eine sehr hohe Menge an exogenen *c-fos* Transkripten gefunden werden. Eine niedrigere Menge an Transkripten wurde im Gehirn und im Knochen beobachtet (Abb.17, rechte Spalte). Die Expression des endogenen *c-fos*, bzw. die basale Transkriptionsrate des Transgens liegt in Geweben von unbehandelten Mäusen unterhalb der Nachweisgrenze (Abb.17, linke Spalte). Trotz der starken Expression des *c-fos* Transgens in den Geweben der transgenen Tiere kann nur in drei der untersuchten Gewebe eine induzierte Kollagenase I Expression beobachtet werden. Während diese in der Milz und in der Leber sehr niedrig ist, wird im Knochen eine starke Induktion gegenüber dem Knochengewebe von nicht behandelten Mäusen gefunden (Abb.17, rechte Spalte). Weiterhin wurde in einem parallel durchgeführten Experiment auch im Thymus eine induzierte Expression der Kollagenase I beobachtet (U. Rütter, pers. Mitteilung). In der Milz und der Niere von unbehandelten Mäusen ist keine Expression von Kollagenase I nachweisbar, obwohl ein Vorhandensein von Kollagenase Transkripten in diesen Geweben in vorhergehenden Experimenten nachgewiesen werden konnte (s. 4.3.2, Abb.15). Dies ist wohl auf die Verwendung von sehr limitierten Mengen an RNA aus diesen Geweben zurückzuführen.

Während in dem hier durchgeführten Experiment die Gesamt-RNA (20  $\mu\text{g}$ ) untersucht wurde, wurde in Kapitel 4.3.2 hochgereinigte poly A<sup>+</sup> RNA (2  $\mu\text{g}$ ) verwendet.

Eine Untersuchung der Gewebe auf Kollagenase IV-Transkripte, zeigte eine Expression in der Niere, im Knochen und in der Haut. Dabei war kein Unterschied zwischen unbehandelten und behandelten Tieren festzustellen (nicht gezeigt). Für Stromelysin 1 und Stromelysin 2 konnte unter den hier verwendeten Bedingungen weder eine basale, noch eine induzierte Expression beobachtet werden.

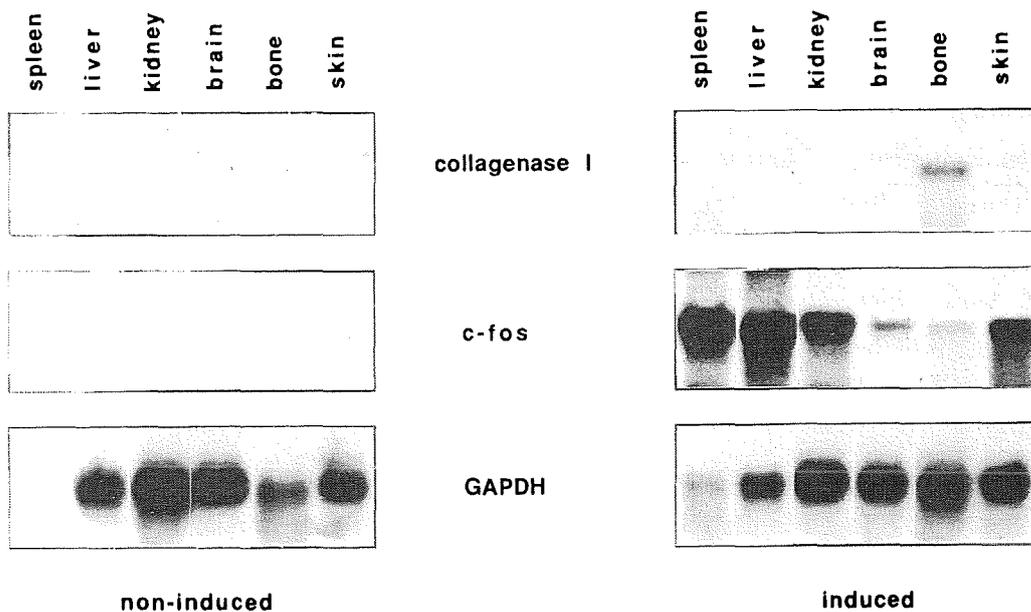


Abb.17: Induzierte Kollagenase I Expression in Geweben von transgenen Mäusen mit induzierter *c-fos* Expression. Transgene Mäuse, in denen das *c-fos* Gen unter der Kontrolle des Interferon-induzierbaren Mx-Promoters (*Mx-c-fosD*) steht, wurden nicht (non-induced) oder, zur Induktion der Interferon-Synthese, mit 800  $\mu\text{g}$  Poly I:C behandelt (induced). 6 Stunden nach Behandlung wurde die Gesamt-RNA aus den oben angegebenen Geweben isoliert (Milz [spleen]; Leber [liver]; Niere [kidney]; Gehirn [brain]; Knochen [bone]; Haut [skin]). Je 20  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA wurden für die Northern Blot Analyse eingesetzt. Der Filter wurde nacheinander mit einer <sup>32</sup>P-markierten Kollagenase I-cDNA Probe und mit einer <sup>32</sup>P-markierten GAPDH-Probe (Mitte) hybridisiert.

Die hier vorliegenden Daten zeigen zum ersten Mal eine *c-fos* abhängige Expression eines AP-1-regulierten Gens, Kollagenase I, im Gesamtorganismus. Dabei wird die Kollagenase I Expression, trotz der stark erhöhten *c-fos* Expression in allen untersuchten Geweben, nur in der Milz, der Leber (auch im Thymus, nicht gezeigt) und hauptsächlich im Knochen induziert. Die *c-fos* abhängige Expression unter physiologischen Bedingungen scheint dabei, im Hinblick auf die Mitglieder der MMP-Familie, spezifisch für Kollagenase I zu sein.

#### 4.4.2 Kollagenase I Expression in konstitutiv *c-fos* exprimierenden transgenen Mäusen.

In den *Mx-c-fosD* transgenen Mäusen führt die Induktion einer stark erhöhten *c-fos* Expression zu einem schnellen Anschalten der Kollagenase I Expression. Interessanterweise führt die langzeitige Expression von *c-fos* in *MT-c-fosLTR*, *H2-c-fos* oder *H2-c-fosLTR* transgenen Mäusen zu phänotypischen Veränderungen im Knochen, der Milz und im Thymus (Rüther et al., 1987; 1988; 1989). Vor allem in den Röhrenknochen entstehen Schwellungen (lokale Hyperosteosen), die sich nach ungefähr vier bis 9 Monaten zu Tumoren entwickeln können (Rüther et al., 1987; 1989). Da diese gewebespezifischen Veränderungen mit denjenigen Geweben übereinstimmen, in denen eine Induktion der Kollagenase I in den *Mx*-transgenen Mäusen nachweisbar war, war es offensichtlich zu untersuchen, ob die phänotypischen Veränderungen, verursacht durch die konstitutive Expression von *c-fos*, ebenfalls mit einer erhöhten Kollagenase I Expression einhergehen.

Dazu wurde die Gesamt-RNA aus Geweben von Wildtyp Mäusen und aus Geweben von *H2-c-fosLTR* transgenen Mäusen [anstelle des LTR des FBJ Osteosarkomavirus wie bei Rüther et al. (1989) wurde hier das LTR des Moloney Sarkomavirus verwendet] zum Zeitpunkt der Knochtumorbildung isoliert und mittels Northern Blot Hybridisierung auf eine Kollagenase Expression hin untersucht.

In Wildtyp Mäusen kann eine schwache Kollagenase I Expression nach einer Expositionsdauer des Filters von 7 Tagen in der Niere und im Knochen, nicht aber im Gehirn beobachtet werden (Abb.18, linke Spalte). Die hier gefundenen Expressionsdaten stimmen dabei mit den Daten aus unbehandelten *Mx-c-fosD* transgenen Mäusen (Abb.17) bzw. Wildtyp Mäusen (Abb.15) überein. Im pathologisch veränderten Knochengewebe der *H2-c-fosLTR* transgenen Mäuse dagegen ist schon nach einer Expositionsdauer von 30 Stunden eine starke Kollagenase I Expression zu finden. Eine Expression in der Niere ist in den transgenen Tieren, wie beim Wildtyp, ebenfalls erst nach 7 Tagen Expositionsdauer zu finden (Abb.18, rechte Spalte). Die *c-fos* Expression ist in den *H2-c-fosLTR* transgenen Mäusen ungefähr 3-fach höher als in den Wildtyp Mäusen. Im Knochengewebe der Wildtyp Mäuse liegt die *c-fos* Expression unterhalb der Nachweisgrenze, im pathologisch veränderten Knochengewebe der *H2-c-fosLTR* Mäuse sind *c-fos* Transkripte aber zu finden (Abb.18). Eine schwach erhöhte Kollagenase IV Expression im Tumorgewebe der *H2-c-fosLTR* transgenen Mäuse konnte ebenfalls beobachtet werden (5-10-fach), die jedoch weitaus geringer als im Falle von Kollagenase I war (nicht gezeigt). Die Expression von Kollagenase IV in den anderen Geweben entsprach der Expression in den Geweben von Wildtyp Mäusen (s. 4.3.2).

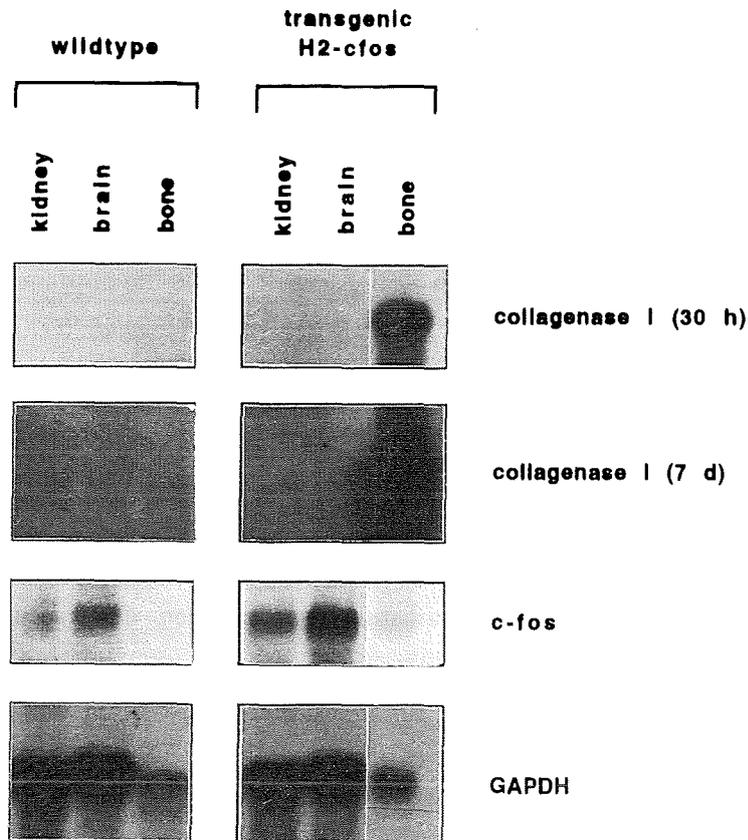


Abb.18: Kollagenase I Expression in Geweben von konstitutiv *c-fos* exprimierenden transgenen Mäusen. Gesamt-RNA wurde aus den oben angegebenen Geweben von Wildtyp Mäusen und aus den entsprechenden Geweben von H2-*c-fos*LTR transgenen Mäusen zum Zeitpunkt der Knochentumorbildung isoliert (Niere [kidney]; Gehirn [brain]; Knochen [bone]). Je 20 µg RNA wurden für die Northern Blot Analyse verwendet. Der Filter wurde nacheinander mit einer <sup>32</sup>P-markierten Kollagenase I cDNA-Probe und mit einer <sup>32</sup>P-markierten GAPDH-cDNA Probe hybridisiert.

Da die gewebespezifische Kollagenase I Expression in den Mx-*c-fos*D transgenen Mäusen mit den Orten der phänotypischen Veränderungen in den langfristig *c-fos* exprimierenden transgenen Mäusen (MT-*c-fos*LTR, H2-*c-fos*, H2-*c-fos*LTR) korreliert und eine erhöhte Menge an Kollagenase I Transkripten auch bei einer langzeitigen *c-fos* Expression im phänotypisch veränderten Gewebe nachgewiesen werden konnte, könnte Kollagenase I als ein Markergen für solche pathologische Veränderungen dienen.

Da die Expression der Kollagenase IV in den Mx-*c-fos*D transgenen Mäusen nicht durch eine erhöhte *c-fos* Expression beeinflusst wird, erscheint es unwahrscheinlich, daß die hier beobachtete Expression der MMP im Tumorgewebe durch die konstitutive *c-fos* Expression direkt verursacht werden. Sie scheint vielmehr eine sekundäre Folge der Tumorbildung zu sein.

#### 4.5 Expression der Kollagenase I in Geweben von *c-fos*-negativen Mäusen.

Die im Kapitel 4.4 beschriebenen Daten zeigen, daß eine veränderte *c-fos* Expression im Organismus (transgene Mäuse) zu einer veränderten Kollagenase I Expression in bestimmten Geweben, hauptsächlich im Knochen, führt. Auch in transgenen Tieren, in denen die langzeitige erhöhte *c-fos* Expression zu phänotypischen Gewebeveränderungen führt, ist die Kollagenase I Expression ausschließlich im pathologisch veränderten Knochengewebe stark erhöht. Dies deutet auf eine entscheidende Funktion von cFos auf die transkriptionelle Regulation von Kollagenase I hin. Für die Expression der menschlichen Kollagenase I wurde die absolute Notwendigkeit von cFos durch transiente Transfektion von *c-fos* antisense Konstrukten im Zellkultursystem gezeigt (Schönthal et al., 1988). Diese Daten führen zu der Fragestellung, welche Auswirkungen das Fehlen des *c-fos* Genprodukts auf die Expression von Kollagenase I und damit auf den davon betroffenen Organismus hat.

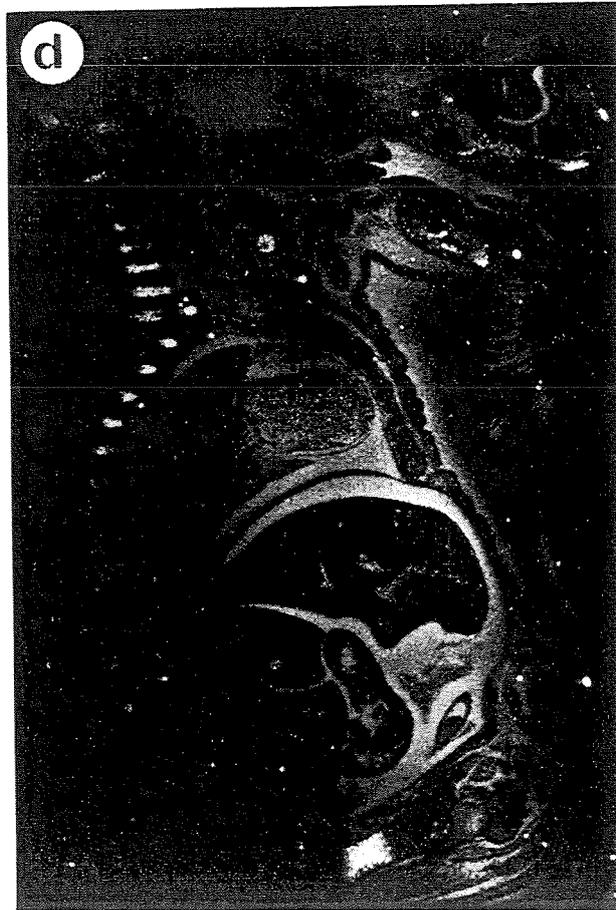
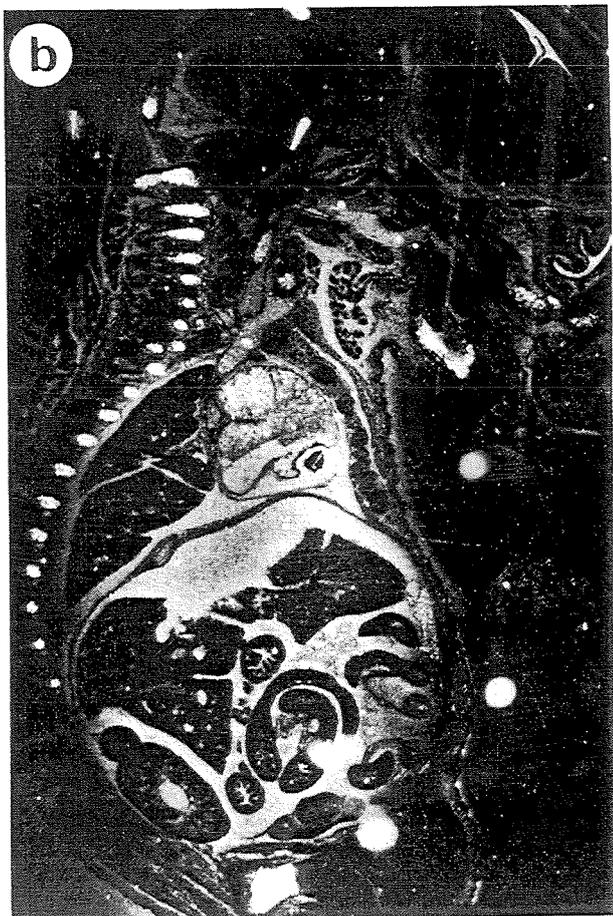
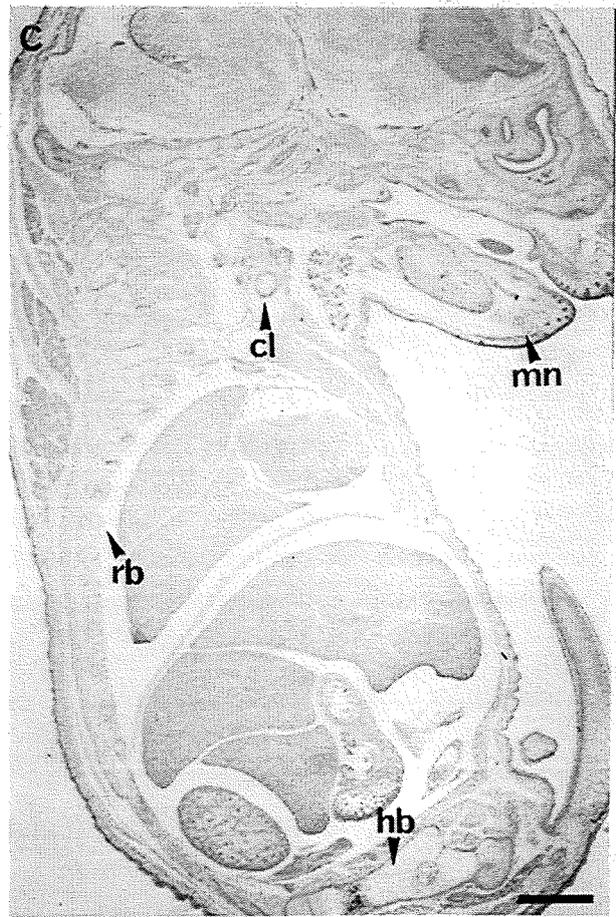
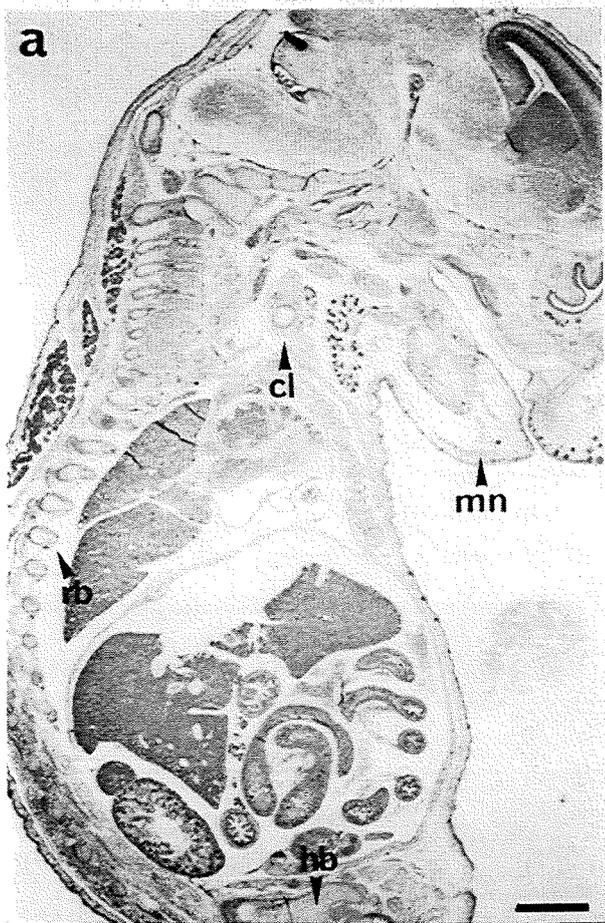
Diese Untersuchung wurde in Mäusen durchgeführt, bei denen das *c-fos* Gen durch homologe Rekombination inaktiviert wurde ("Knock out"). Diese Tiere zeigen ungefähr zehn bis vierzehn Tage nach Geburt ein verzögertes Wachstum und besitzen eine gestörte Knochen- und Blutzellentwicklung (Johnson et al., 1992; Wang et al., 1992). Ob diese phänotypischen Veränderungen mit einer veränderten Kollagenase I Expression einhergehen, sollte im Nachfolgenden untersucht werden.

##### 4.5.1 Expression der Kollagenase I in Embryonen von *c-fos*-negativen Mäusen.

Mittels "in situ" Hybridisierung wurde die Expression der Kollagenase I in embryonalen Geweben von *c-fos*-defizienten Mäusen untersucht. Zu diesem Zeitpunkt können noch keine phänotypischen Veränderungen in den Tieren beobachtet werden. Paraffin-Schnitte von 16,5 Tage alten Wildtyp- und Mutanten-Embryonen Mäusen wurden mit Kollagenase I antisense Proben hybridisiert (s. 4.2.2).

Abb.19 zeigt Längsschnitte von 16,5 Tage alten Embryonen von Wildtyp (a) und *c-fos*-negativen Mäusen (c). Folgende Bereiche des Skeletts sind zu erkennen: das Schlüsselbein (cl), die Rippen (rb), der Unterkiefer (mn) und der Hüftknochen (hb). Abb.19b zeigt die Dunkelfelddarstellung zu Abb.19a; Abb.19d die Dunkelfelddarstellung zu 19b. Eine Expression von Kollagenase I ist in den oben aufgeführten Bereichen des Skeletts sowohl im Wildtyp-Embryo, als auch im Mutanten-Embryo nachweisbar. Im Bereich der Rippen und im Unterkiefer des *c-fos*-defizienten Embryos scheint das Signal schwächer zu sein als im vergleichbaren Schnitt des Wildtyp-Embryos.

Abb.19: Expression der Kollagenase I in Längsschnitten von 16,5 Tage alten Embryonen aus Wildtyp und *c-fos*-negativen Mäusen. (a) Wildtyp-Embryo. (c) Mutanten-Embryo. (b) Dunkelfelddarstellung von (a). (d) Dunkelfelddarstellung von (c). (cl) Schlüsselbein; (hb) Hüftknochen; (mn) Unterkiefer; (rb) Rippen. Maßstab: 1 mm.



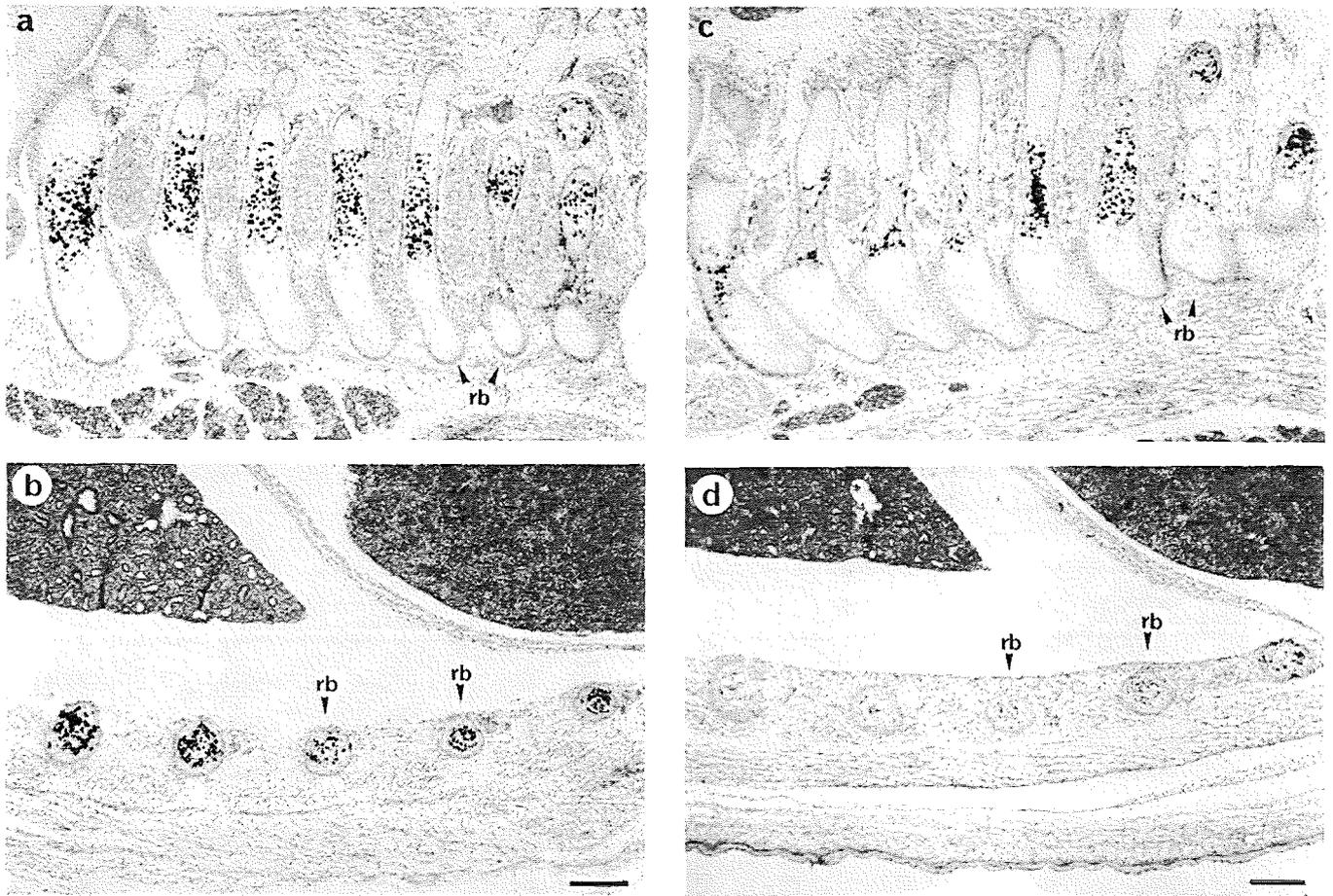


Abb.20: Expression der Kollagenase I im Bereich der Rippen von 16.5 Tage alten Embryonen aus Wildtyp und *c-fos*-negativen Mäusen. (a) Längsschnitt und (b) Querschnitt im Bereich der Rippen eines Wildtyp-Embryos. (c) Längsschnitt und (d) Querschnitt im Bereich der Rippen eines Mutanten-Embryos. (rb) Rippen. Maßstab: 200  $\mu$ m.

Betrachtet man den Bereich der Rippen in der Vergrößerung (Abb.20), kann man schwache Unterschiede in der Expressionsstärke beobachten. Abb. 20a zeigt einen Längsschnitt des proximalen Bereiches der Rippen im Wildtyp-Embryo; Abb. 20c den entsprechenden Bereich im *c-fos*-defizienten Embryo. In den Rippen des Mutanten-Embryos scheint die Kollagenase I Expression schwächer zu sein. Dies könnte jedoch auch durch die etwas unterschiedlichen Schnittebenen durch beide Embryonen hervorgerufen werden. Ein deutlicherer Unterschied in der Expressionsstärke der MMP ist beim Vergleich eines Querschnittes im Bereich der Rippen zu erkennen (Abb.20b,d). In den Rippen des Wildtyp-Embryos (20b) scheint das Signal stärker zu sein als im entsprechenden Bereich des *c-fos*-negativen Embryos (20d).

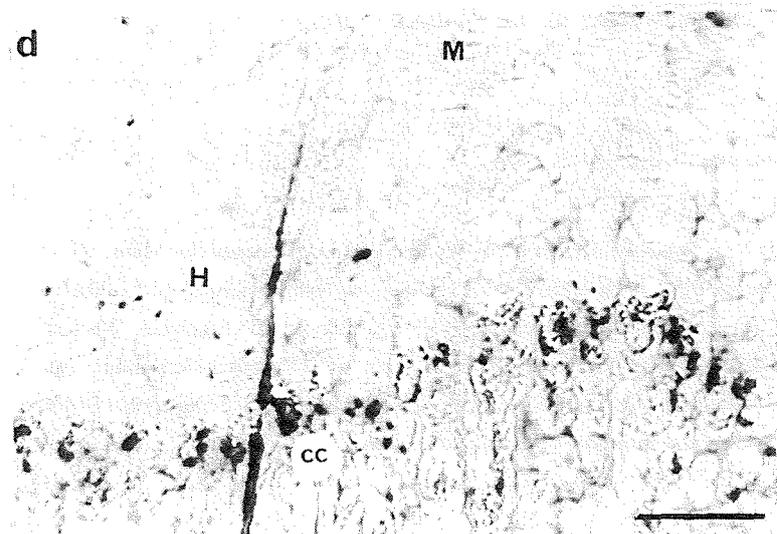
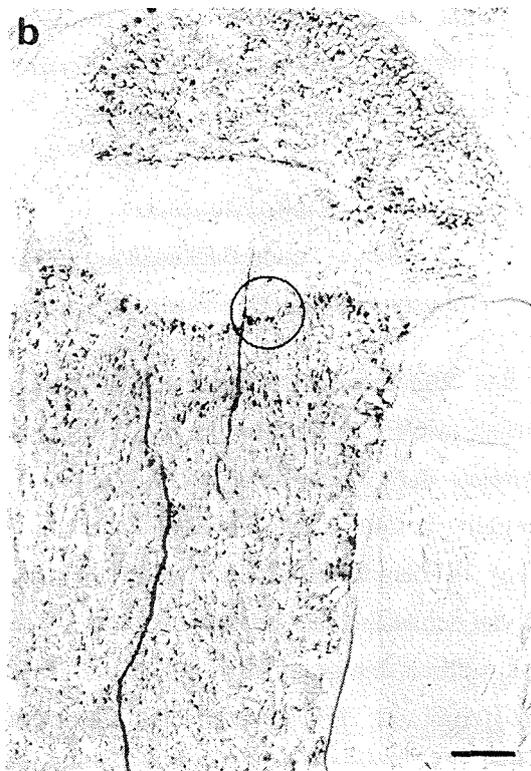
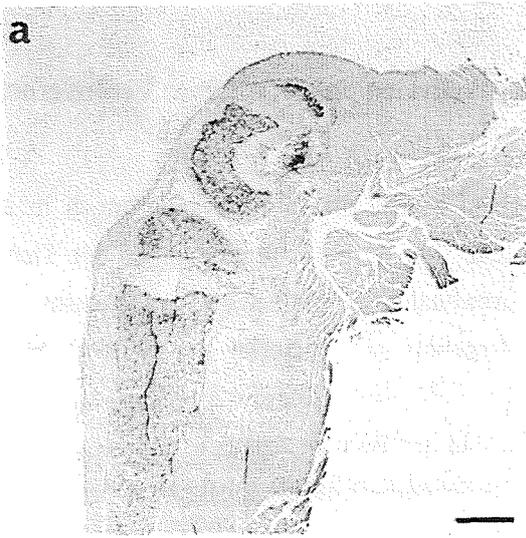
Signifikantere Unterschiede im Kollagenase I Expressionsmuster zwischen Wildtyp und Mutanten Mäusen sind in neugeborenen Tieren zu erkennen. Zu diesem Zeitpunkt scheint das Signal in den Röhrenknochen der Mutanten schwächer zu sein als im Wildtyp (nicht gezeigt).

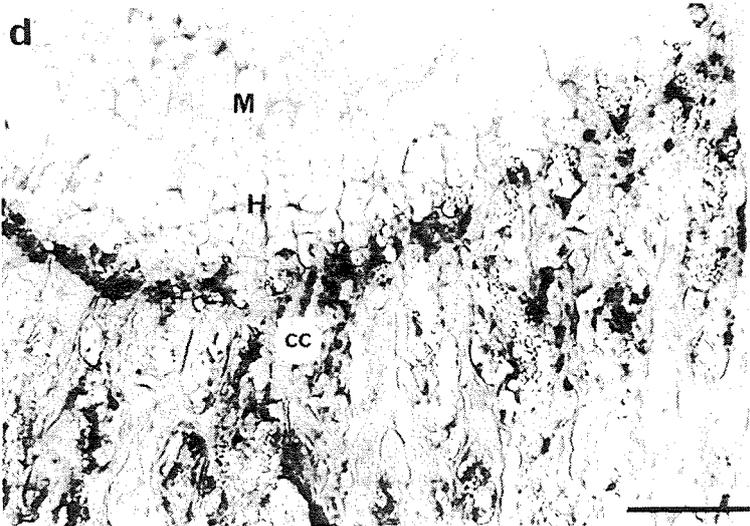
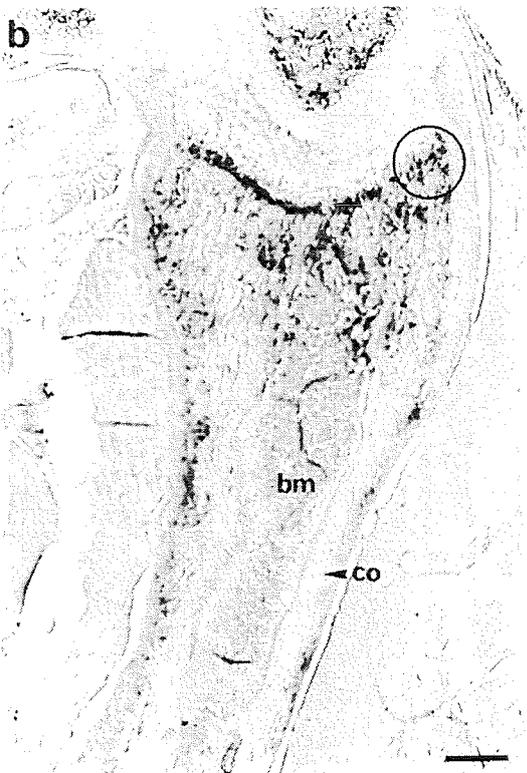
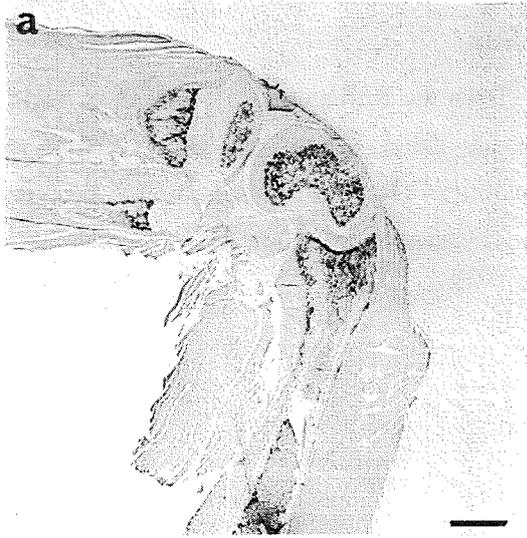
#### 4.5.2 Kollagenase I Expression zum Zeitpunkt des Auftreten phänotypischer Veränderungen (2 Wochen alte Tiere)

Zwei Wochen nach Geburt zeigen die *c-fos*-negativen Mäuse massive Veränderungen in ihrer Knochenentwicklung. Die gravierendsten Unterschiede sind in den Röhrenknochen der Tiere zu beobachten. Abb. 21a zeigt eine Übersicht des proximalen Bereiches des Schienbeins. Zum direkten Vergleich ist parallel noch einmal das Ergebnis mit Material aus Wildtyp-Mäusen gezeigt (Abb.16). Ebenso wie im Wildtyp sind die Epi-, die Meta- und die Diaphyse zu sehen (s. auch Abb.11f). Die Vergrößerung in Abb.21b zeigt, daß der Bereich der Epi- und Metaphyse im Vergleich zum Wildtyp verbreitert ist, und daß die Knochenmarkshöhle im Bereich der Diaphyse von Knochenbälkchen ausgefüllt ist. Auch der kompakte Knochen im Bereich der Diaphyse (co) ist sehr viel dünner als im Wildtyp. Osteoblasten entlang der äußeren und inneren Knochenhaut (Periosteum und Endosteum) fehlen (Johnson et al., 1992; Wang et al., 1992). Im Bereich der Wachstumszone ist der Bereich der proliferierenden Chondrozyten stark reduziert und die Längssäulen, die typisch für die Proliferationszone sind (s.Abb.12; P), erscheinen sehr unregelmäßig. Zusätzlich ist ein Anwachsen der hypertrophen Chondrozytenzone zu beobachten (Abb.21d, H). Weiterhin können die vorhandenen Schneide- und Backenzähne aufgrund abnormal hoher Knochenmengen nicht durchbrechen (Johnson et al., 1992; Wang et al., 1992).

Ein Vergleich der Kollagenase I Expression in den Röhrenknochen von zwei Wochen alten Wildtyp und Mutanten Mäusen ist in Abb.21 zu sehen (die Expression in Wildtyp Mäusen ist in Kapitel 4.3.2 genauer beschrieben). Die im Bereich der Wachstumszone mit einem Kreis markierte Region ist in Abb.21d vergrößert dargestellt. In 21c ist die Dunkelfelddarstellung zu Abb.21b zu sehen. Das Signal (weiße Bereiche) in der Grenzregion der Metaphyse zur Wachstumszone ist im Knochen der Mutante sehr viel schwächer als im Knochen des Wildtyps. Zusätzlich kann man in der Mutante eine Expression durch den gesamten Bereich der Diaphyse beobachten. Das Signal ist, wie schon erwähnt (Abb.16d, H), ebenfalls im Grenzbereich zwischen hypertrophem und kalzifiziertem Knorpel, im Bereich der Knochenneubildung zu beobachten. Es ist jedoch sehr viel schwächer als im Wildtyp.

Abb.21: Expression der Kollagenase I im Schienbein einer zwei Wochen alten *c-fos*-negativen Maus. Zum direkten Vergleich ist auf der gegenüberliegenden Seite noch einmal das Ergebnis der Hybridisierung mit Kollagenase I aus Wildtyp-Mäusen (Abb. 16) gezeigt. (a) Übersicht des Knochens. (b) Vergrößerung der Epiphyse, Wachstumszone, Meta- und Diaphyse. Der Kreis markiert den in (d) vergrößerten Bereich. (c) Dunkelfelddarstellung von (b). (d) Vergrößerung im Bereich der Wachstumszone. (cc) Zone der Knorpelverkalkung; (H) hypertropher Knorpel; (M) Zone der Chondrozytenreifung. Maßstab: (a) 1 mm; (b,c) 200 µm; (d) 100 µm.





Diese Daten zeigen, daß in den *c-fos*-defizienten Tieren die Kollagenase I Expression beeinflusst ist. Eine veränderte Expression der MMP kann dabei schon vor dem Auftreten der phänotypischen Veränderungen nachgewiesen werden. Ob die veränderte Expression der Kollagenase I für die beobachteten phänotypischen Veränderungen mitverantwortlich ist, muß jedoch noch gezeigt werden.

## 5. DISKUSSION

Eine intakte Extrazelluläre Matrix (ECM) ist sowohl für Vorgänge während der Embryonalentwicklung (z. B. Zellwanderungen, Wachstum), als auch für die Aufrechterhaltung der Gewebemorphologie und -funktion des adulten Organismus erforderlich (als Übersichtsartikel: Alexander und Werb, 1989; Matrisian und Hogan, 1990). Die ECM ist jedoch kein starres Gebilde, sondern unterliegt einem regelmäßigen Auf- und Abbau ihrer Komponenten, um die Dynamik zu erhalten, die für viele Wachstumsprozesse notwendig ist. Dies erfordert ein kontrolliertes Gleichgewicht dieser beiden gegenläufigen Prozesse.

Das Ausmaß dieser Gewebeumbauprozesse unterliegt der Kontrolle von extrazellulären Faktoren, z. B. Wachstumsfaktoren und Cytokine, die diese Vorgänge steuern. Zum einen haben diese Substanzen Einfluß auf die Synthese der Matrixkomponenten, zum anderen beeinflussen sie die Expression der Matrix-abbauenden Enzyme und deren Inhibitoren (Edwards et al., 1987; Kerr et al., 1988; Brenner et al., 1989b; Nomura et al., 1989; Matrisian und Hogan, 1990; Lee et al., 1994). Zum Beispiel konnte nachgewiesen werden, daß Wachstumsfaktoren, wie PDGF-A, TGF- $\alpha$  und TGF- $\beta$  während dem Blastozystenstadium erhöht exprimiert sind, und daß gleichzeitig die Menge an MMP- (Kollagenase, Stromelysin) und Inhibitor- (TIMP) Transkripten ansteigt (Rappolee et al., 1988). Für den Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  konnte in Zellkultur eine entgegengesetzte Wirkung auf die Synthese der ECM-Komponenten und die Expression der spezifisch die ECM-abbauenden Matrixmetalloproteinasen gezeigt werden (Frisch und Ruley, 1987). Auch die sehr weitgestreute Substratspezifität für die Komponenten der ECM und die mögliche hohe Expression von Metalloproteinasen im Zellkultursystem, im Gegensatz zu den niedrigen oder nicht nachweisbaren Kollagenumbauraten, die im normalen Organismus beobachtet werden, weisen auf eine komplexe Kontrolle der MMP-Expression und MMP-Aktivität hin (als Übersichtsartikel: Werb et al., 1989). Die Folgen einer unkontrollierten MMP-Aktivität sind Gewebeerstörung und die Ausbreitung von Tumoren (als Übersichtsartikel: Woessner et al., 1991). Unter physiologischen Bedingungen finden sich hohe MMP-Aktivitäten nur während der Embryonalentwicklung. Dies ist plausibel, da man aufgrund des schnellen Wachstums und der Gewebemorphogenese einen schnellen Umbau der Komponenten der ECM erwarten muß.

Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung der transkriptionellen Regulation der MMPs im Gesamtorganismus. Dabei sollte die transkriptionelle Regulation der Maus MMPs im Zellkultursystem mit derjenigen im Gesamtorganismus verglichen werden. Um den Regulationsmechanismus im Gesamtorganismus zu studieren, wurden solche Tiere ausgewählt, bei denen gezielt die Synthese von wichtigen Regulatorproteinen der MMP-Transkription manipuliert wurde. Weiterhin sollte überprüft werden, ob Unterschiede im Expressionsmuster

der MMPs im Embryo und im adulten Tier auftreten, und ob die Expression der MMPs im Organismus zelltypspezifisch ist. Zur Durchführung dieser Experimente war die Klonierung von mausspezifischen MMP-cDNA Proben notwendig.

Bei diesen Untersuchungen konnten folgende Ergebnisse erzielt werden: Stromelysin 1, Stromelysin 2, Kollagenase I und Kollagenase IV (72 kD) der Maus werden gewebespezifisch exprimiert, wobei deutliche Unterschiede zwischen der Expression im Embryo und im adulten Organismus auftreten. Eine AP-1 abhängige Expression von Kollagenase I, Stromelysin 1 und Stromelysin 2 konnte im Zellkultursystem nachgewiesen werden. Im Organismus trifft dies jedoch nur für Kollagenase I zu. Sie wird im Embryo, als auch im adulten Tier im Knochen höchstwahrscheinlich in Osteoblasten exprimiert. Aufgrund einer erhöhten Expression von Kollagenase I in den *c-fos* transgenen Mäusen, die spezifisch im pathologisch veränderten Knochengewebe zu beobachten war, könnte diese MMP als Markergen für die Knochentumorgenese und anderer Veränderungen in der Knochenhomöostase dienen.

Neben der Aufklärung zum Regulationsmechanismus brachte die cDNA Isolierung auch Erkenntnisse über die phylogenetische Verwandtschaft von Säuger-MMPs. Dieser Aspekt wird vorweg diskutiert.

### **5.1 Die Matrix-abbauenden Enzyme der Maus lassen sich in die Familie der Metalloproteinasen einordnen**

Anhand des Sequenzvergleiches, der in dieser Arbeit klonierten Maus MMP-cDNA Proben von Stromelysin 1, Stromelysin 2, Kollagenase I und der 72 kD Kollagenase IV mit MMPs anderer Spezies, können die Metalloproteinasen der Maus in den phylogenetischen Stammbaum der Matrixmetalloproteinasen (Murphy et al., 1991) eingeordnet werden. Die klonierte Nukleotidsequenz der 72 kD Kollagenase IV erwies sich als 100% identisch zur kürzlich isolierten cDNA aus NIH3T3 Zellen (Reponen et al., 1992), und hat 97% Homologie zur menschlichen Kollagenase IV (72 kD). Auch die Stromelysine weisen einen hohen Prozentsatz an Homologie zu den entsprechenden menschlichen Sequenzen und denen der Ratte auf. Für Stromelysin 1 der Maus konnte eine 93%-ige Sequenzhomologie zur entsprechenden Sequenz aus Ratte (Matrisian et al., 1985) gefunden werden; zur menschlichen Stromelysin 1 Sequenz zeigte es eine 83%-ige Homologie (Whitham et al., 1986). Auch Stromelysin 2 wies eine über 90%-ige Sequenzübereinstimmung (91%) zum Stromelysin 2 der Ratte auf (Breathnach et al., 1987). Für die entsprechende menschliche Sequenz konnte 77% Homologie gefunden werden (Muller et al., 1988). Eine Ausnahme bilden die Kollagenasen I der Maus und der Ratte, bei denen die Homologie zu den entsprechenden Sequenzen von Mensch und auch Kaninchen nur bei 52 bis 55% liegt. Die Unterschiede der Kollagenasen von Maus und Ratte, gegenüber denen der anderen Säuger, beruhen jedoch nicht nur in ihrer Primärsequenz, sondern es konnten auch

Differenzen im 3'-nichttranslatierten Bereich, in der Anzahl der Glykosylierungsstellen, und in ihrer Substratspezifität gefunden werden (Henriet et al., 1992). Eine Ausnahme bildet der Bereich des aktiven Zentrums, dessen Sequenz hoch konserviert ist. Die Charakterisierung des kürzlich in unserem Labor isolierten genomischen Klons der Maus Kollagenase I (Schorpp et al., 1994) zeigt ebenfalls, daß sowohl im Promoterbereich (mit Ausnahme der AP-1 und PEA3 Bindungsstellen) als auch im Bereich der Intronsequenzen (mit Ausnahme der Exon/Intron Übergänge) eine starke Abweichung zu den entsprechenden Sequenzen der interstitiellen Kollagenasen von Mensch und Kaninchen (Fini et al., 1987a) besteht.

Diese Daten machen deutlich, daß die Kollagenasen vom Typ I der Ordnung Rodentia sich in vielen Merkmalen klar von den entsprechenden Sequenzen der anderen Säugerordnungen unterscheiden und unterstützen somit die von Li et al. (1990) aufgestellte Hypothese (basierend auf einer phylogenetischen Analyse), daß sich die Ordnung Rodentia als eine Seitengruppe zu den anderen Säugetieren abzweigt. Die anderen Metalloproteinasen, z. B. Stromelysin 1 (Ostrowski et al., 1988) und Stromelysin 2 (diese Arbeit), könnten diesem Evolutionsdrift durch eine Koevolution entkommen sein (Henriet et al., 1992). Ein weiterer Hinweis auf die Abzweigung der interstitiellen Kollagenasen von Maus und Ratte könnte die vor kurzem in unserem Labor (in Zusammenarbeit mit M. G. Mattei, Marseille) durchgeführte Chromosomenlokalisierung liefern, wobei das Gen für Kollagenase I in einem Bereich auf Chromosom 9 (A1-A2 Region) der Maus lokalisiert wurde, welcher synthenisch mit dem kurzen Arm von Chromosom 19 im Menschen ist (M. G. Mattei, pers. Mitteilung; Schorpp et al., 1994). Das menschliche Gen für Kollagenase I, und auch das des Stromelysin 1, liegt jedoch nicht auf Chromosom 19, sondern auf dem langen Arm von Chromosom 11 (Birkedal-Hansen et al., 1993). Ein weiteres MMP-Gen, das auf Chromosom 9 der Maus gefunden wurde, ist das der Metalloelastase (Shapiro et al., 1992). Auch diese Metalloproteinase zeigt nur eine sehr geringe Homologie zu den anderen MMPs der Säuger (33-48%). Die unterschiedliche chromosomale Lokalisierung der Kollagenase I Gene der Ordnung Rodentia zu den entsprechenden Genen der anderen Säuger könnten daher ein weiteres Indiz für die Hypothese sein, daß sich die heutigen Kollagenasen der Nager als eine neue Enzymgruppe aus einem Gen entwickelt haben, das sich vom Vorläufergen der Kollagenase I vor der Entstehung der Ordnung Rodentia abgetrennt hat (Henriet et al., 1992). Das ursprüngliche Kollagenase I Vorläufergen muß jedoch bei diesem Prozeß verloren gegangen sein, da keine Kreuzreaktion zwischen genomischer DNA der Maus und der cDNA Probe aus Mensch oder Kaninchen festgestellt werden konnte (Angel et al., unveröffentlichte Daten).

## 5.2 Fos/Jun als die limitierenden Kontrollfaktoren der MMPs in Kulturzellen

Die Expression der MMP-Gene wird in Zellkultur durch eine Reihe von extrazellulären Stimuli, darunter Wachstumsfaktoren, Hormone, Cytokine oder Phorbolster reguliert (Angel et al., 1987; Kerr et al., 1988; Brenner et al., 1989b; Quinn et al., 1990). Die Behandlung von SV40 transformierten Lungenfibroblasten der Maus mit dem Phorbolster TPA führt zu einer Induktion der Stromelysin 1, der Stromelysin 2 und der Kollagenase I Expression. Diese Ergebnisse stimmen weitgehend mit den Expressionsdaten von Metalloproteinasen anderer Spezies überein (Angel et al., 1987a; Breathnach et al., 1987). Im menschlichen und auch im Rattensystem induziert der Phorbolster TPA und auch Wachstumsfaktoren (z. B. EGF) sowohl die Transkriptionsrate, als auch posttranslationale Modifikationen der Mitglieder der Transkriptionsfaktorfamilien Jun und Fos, die als AP-1 Komplex an die AP-1 Bindungsstelle in der Promoterregion von Stromelysin 1, Stromelysin 2 und Kollagenase I binden (als Übersichtsartikel: Angel und Karin, 1991). Der Signalweg, der zu dieser Induktion der MMP-Expression führt, verläuft über die durch TPA und Wachstumsfaktoren aktivierbare Proteinkinase C (Nishizuka, 1984; 1986) und weiterer, nachgeschalteter Proteinkinasen (z. B. Raf und Mitglieder der MAP-Kinase Familie; Radler-Pohl et al., 1993; Nishida und Gotoh, 1993; Derijard et al., 1994). Dagegen scheint die durch den sekundären Botenstoff cAMP aktivierbare Proteinkinase A in der Regulation der drei MMPs Stromelysin 1, Stromelysin 2 und Kollagenase I der Maus keine Rolle zu spielen. In einigen menschlichen Zelllinien konnte nach einer Behandlung von Zellen mit cAMP oder cAMP-imitierenden Substanzen sogar eine Hemmung der basalen MMP-Expression beobachtet werden (Brenner et al., 1989b; Angel und Karin, 1992).

UV-Strahlung, die in den Zellen DNA-Schäden erzeugt und damit zur Auslösung einer Streß-Antwort im Organismus führt, induziert ebenfalls die Expression von Kollagenase I und Stromelysin 2 der Maus. Im Gegensatz zu der nach 6 bis 8 Stunden nach TPA-Behandlung beobachteten MMP-Induktion ist eine Expression der beiden MMPs erst nach 36 bis 48 Stunden zu beobachten. Diese Kinetik stimmt mit der im menschlichen System beobachteten Kinetik der Kollagenase I Expression durch UV-Strahlung überein und ist wahrscheinlich, analog zum menschlichen System, auf die vermehrte Synthese und Sekretion von  $Il-1\alpha$  und bFGF zurückzuführen (Schorpp et al., 1984; Krämer et al., 1993). Dies muß jedoch für das Maussystem noch gezeigt werden. Obwohl die Behandlung der Lungenfibroblasten mit TPA auch zu einer Induktion der Stromelysin 1 Genexpression führt, induziert die Bestrahlung der Zellen mit UV die Expression des Stromelysin 1 Gens nicht. Der Grund hierfür könnte sein, daß trotz der gemeinsamen AP-1-Stelle, die im Promoter von Kollagenase I (Schorpp et al., 1994) und Stromelysin 1 (J. Mudgett, pers. Mitteilung) der Maus gefunden wurde, Unterschiede in anderen Sequenzen innerhalb des Promoterbereichs dieser beiden Gene existieren, die für die

beobachteten Unterschiede in Antwort auf verschiedene extrazelluläre Stimuli verantwortlich sind. So könnten Faktoren, die infolge einer UV-Behandlung sezerniert werden, über andere Promotorelemente wirken, indem sie mit Fos/Jun funktionell zusammenarbeiten. Sie könnten so für die erhöhte Expression von Stromelysin 2 und Kollagenase I verantwortlich sein, aber nicht die Induktion der Stromelysin 1 Genexpression bewirken. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie der kodierenden Regionen von Stromelysin 1 und Stromelysin 2 könnte man annehmen, daß diese beiden Gene ähnlich reguliert werden. Ein Vergleich der Sequenzen im Promoterbereich der Rattengene zeigte jedoch nur eine geringe Homologie (Breathnach et al., 1987).

Vor kurzem wurde eine weitere MMP der Maus, die 92 kD Typ IV Kollagenase, isoliert (Reponen et al., 1994). Das Gen besitzt ebenfalls eine AP-1-Stelle in der Promoter Region (C. Murnaut, I. Thesleff, persönliche Mitteilung) und man könnte deshalb erwarten, daß diese MMP ähnlich reguliert wird, wie Kollagenase I, Stromelysin 1 und Stromelysin 2. Diese Untersuchungen stehen jedoch noch aus. Demgegenüber wird die Expression der 72 kD Typ IV Kollagenase weder durch eine Behandlung der Zellen mit TPA, noch durch eine cAMP- bzw. eine UV-Behandlung beeinflusst. Die fehlende Antwort auf TPA in den Mauszellen ist in Übereinstimmung mit der fehlenden TPA-Antwort dieser MMP in menschlichen Zellen. Für die menschliche 72 kD Typ IV Kollagenase konnte gezeigt werden, daß die ausbleibende TPA-Antwort mit dem Fehlen einer AP-1-Stelle im Promoter des Gens korreliert (Collier et al., 1988; Huhtala et al., 1991). Aufgrund des hohen Grades an Homologie (97%) zwischen der menschlichen und der Maus Kollagenase IV Sequenz (Reponen et al., 1992) könnte das Ausbleiben der TPA-Antwort im Maussystem ebenfalls auf einem Fehlen der AP-1-Stelle im Promoter beruhen.

Die hohe Übereinstimmung in der Regulation der Maus MMP-Gene mit der Regulation der MMP-Gene anderer Spezies läßt vermuten, daß die für den Transkriptionsmechanismus verantwortlichen Komponenten streng konserviert sind. Die in der Zwischenzeit in unserem Labor erfolgte Isolierung des genomischen Klons der Maus Kollagenase I ermöglichte eine Charakterisierung der für die Regulation verantwortlichen Sequenzen (Schorpp et al., 1994). So zeigte die Analyse der Promoterregion nur zwei konservierte Elemente; eine AP-1- und eine PEA3-Stelle, die auch im Promoter der menschlichen oder der Kaninchen Kollagenase I zu finden sind (Angel et al., 1987a,b; Fini et al., 1987a). Die AP-1-Stelle des Maus Kollagenase Gens erwies sich dabei als perfektes Palindrom und die durchgeführten "in vitro" Bindungsstudien bestätigten, daß diese AP-1-Stelle eine hochaffine Jun/Fos-Bindungsstelle darstellt (Schorpp et al., 1994). Es ist daher anzunehmen, daß die Bindung des Transkriptionsfaktors AP-1, zusammen mit den Ets-Proteinen, für die transkriptionelle Regulation als Antwort auf Wachstumsfaktoren, Cytokine und Tumorpromotoren verantwortlich

ist. Auch in der Promoterregion des Stromelysin 1 Gens der Maus ist eine AP-1-Stelle zu finden (J. Mudgett, persönl. Mitteilung). Ob diese Bindungsstelle für die Antwort auf extrazelluläre Signale essentiell ist, bleibt noch zu zeigen. Für Stromelysin 2 der Maus müssen solche Promoterelemente und die daran bindenden Faktoren noch identifiziert werden. Eine AP-1 Bindungsstelle, die eine TPA-Antwort vermitteln könnte, konnte jedoch im Promoter des Stromelysin 2 Gens der Ratte identifiziert werden (Breathnach et al., 1987).

### **5.3 Die Expression der MMPs während der Embryogenese ist gewebespezifisch und nicht überlappend**

Die im Zellkultursystem gefundene Induzierbarkeit von Kollagenase I, Stromelysin 1 und Stromelysin 2 deutet auf eine koordinierte Regulation dieser MMPs hin. Ob dies jedoch auch für den Gesamtorganismus zutrifft, oder ob die verschiedenen Metalloproteinasen in den Geweben unterschiedlich exprimiert werden, sollte in dieser Arbeit untersucht werden. Daß Zell- bzw. Gewebekulturdaten nicht unbedingt auf die Situation des Gesamtorganismus zu übertragen sind, konnte bereits für die 92 kD Typ IV Kollagenase der Maus bestätigt werden. "In situ" Hybridisierungsdaten zeigten, daß diese MMP in Zellen der Osteoklastenlinie exprimiert wird und nicht, wie aufgrund der existierenden Zellkulturdaten angenommen, in Makrophagen und Geweben, die Makrophagen enthalten (Reponen et al., 1994). Die hier beschriebene Klonierung von mausspezifischen MMP-cDNA Proben liefert somit einen wichtigen Beitrag zur Erforschung der Regulation und Funktion dieser für den Gewebeumbau wichtigen Enzyme im Gesamtorganismus.

Zu den verschiedenen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung der Maus konnte in den Geweben des Embryos nur die Expression von Kollagenase IV und Kollagenase I nachgewiesen werden. Die für die 72 kD Typ IV Kollagenase beobachtete Expression, die in vielen Geweben mesenchymalen Ursprungs gefunden wird, stimmte mit den von Reponen et al. (1992) beschriebenen Ergebnissen überein. Die Metalloproteinasen Stromelysin 1 und Stromelysin 2 konnten in diesem Zeitraum nicht nachgewiesen werden (Tab.2). Dies ist erstaunlich, da während der Embryonalentwicklung cJun und cFos Proteine in verschiedenen Geweben exprimiert werden (Caubet, 1989; Wilkinson et al., 1989). Diese Beobachtung könnte jedoch eine Erklärung dafür sein, daß Mäuse, bei denen das Stromelysin 1 Gen durch homologe Rekombination inaktiviert wurde ("Knock out"), keinen auffälligen Phänotyp aufweisen (J. Mudgett, persönliche Mitteilung). Während eine Expression der 72 kD Kollagenase IV in vielen mesenchymalen Geweben schon sehr früh (Tag 10.5; Tab.2) beobachtet werden kann (hier gezeigte Daten; Reponen et al., 1992), findet man eine schwache Kollagenase I Expression zum ersten Mal am Tag 14.5 (Tab.2) in eng begrenzten Bereichen einiger weniger Gewebe des sich entwickelnden Skeletts (z. B. in den Schaftregionen von Oberarm und -schenkel, bestimmte

Bereiche in Ober- und Unterkiefer und des Schädels). Am Tag 15.5 der Entwicklung läßt sich dann eine drastische Zunahme der Kollagenase I Expression beobachten. Nun findet man eine Expression in den Schaftregionen fast aller Röhrenknochen, in den proximalen Bereichen der Rippen, im Zentrum des Wirbelkörpers und in den Wirbelbögen, im Schulterblatt und in Bereichen des Unter- und Oberkiefers. Am Tag 16.5 wird die Expression geringfügig gesteigert. Das Erscheinen und die Lokalisation des Signals stimmt dabei mit den beschriebenen Bereichen der Umwandlung des Knorpel-Vorläuferskeletts in den primären Knochen überein. Auch der Zeitpunkt zu dem eine Kollagenase I Expression zum ersten Mal auftritt, korreliert mit dem Auftreten der ersten Ossifizierungszentren (Kaufman, 1992). Eine spezifische Färbung (Alizarinrot-Färbung), die die Ossifikationszentren im Gesamt-Embryo lokalisiert, stimmt mit der Kollagenase I Lokalisation überein und bestätigt diese Annahme. Die genauere Untersuchung zeigt, daß die Kollagenase I wahrscheinlich von Osteoblasten exprimiert wird, denn man findet das Signal in Bereichen, in denen aktive Osteoblasten lokalisiert sind, z. B. in der Übergangszone zwischen Knorpel und sich neubildendem Knochen (Eröffnungszone), entlang der Knochenbälkchen, und entlang der Kompakta.

	Zeitpunkt der Embryonalentwicklung (in Tage)								Geburt	Adult
	10.5	11.5	12.5	13.5	14.5	15.5	16.5	18.5		
Kollagenase IV (72 kD)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kollagenase I	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Stromelysine (1 und 2)	-	-	-	-	-	-	-	n.b.	n.b.	+
c-jun	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	+	+	+	+	+	+
c-fos	-	-	-	-	n.b.	+	+	+	+	+
TIMP-1	-	-	-	+	+	+	+	+	n.b.	n.b.

Tab.2: Expression der MMPs, des Transkriptionsfaktors AP-1 (Jun/Fos) und des MMP-Inhibitors TIMP-1 während der Embryogenese und im adulten Organismus der Maus. Die Expression wurde mittels "in situ" Hybridisierung und durch Northern Blot Analysen bestimmt (+: nachgewiesene Expression; -: keine Expression; n.b.: nicht bestimmt).

Die gefundene Expression von Kollagenase I wirft natürlich die Frage nach der möglichen Funktion während dieser Prozesse auf. Bei der Umwandlung des im Embryo angelegten Knorpelmodells in die verknöcherte Form des Skeletts findet ein "Switch" von Kollagen II nach Kollagen I statt (v. d. Mark, 1980; Martin et al., 1985). Um der neugebildeten Knochenmatrix Platz zu verschaffen, ist ein Abbau der Knorpelkomponenten, d.h. von Kollagen II, notwendig. Die Funktion der Kollagenase I könnte dabei im Abbau des Kollagen vom Typ II liegen, da sie spezifisch in der Eröffnungszone vom Knorpelgewebe zum neugebildetem Knochen hin und in Zellen entlang der Knochenbälkchen lokalisiert werden kann. Dabei scheint hauptsächlich Kollagenase I während der Embryonalentwicklung für diesen Prozeß verantwortlich zu sein. Obwohl eine Kollagenase I Funktion für viele andere embryonale Prozesse (z. B. Angiogenese) postuliert wurde, konnte keine Expression dieser MMP in anderen Geweben gefunden werden. Eine andere Möglichkeit wäre allerdings auch, daß die Transkriptmenge unterhalb der Nachweisgrenze der verwendeten Methode liegt.

Die Transfektion von *c-jun* und *c-fos* spezifischen antisense Konstrukten bzw. transdominant-negativ Mutanten von Fos und Jun Proteinen in menschlichen Zelllinien und die durchgeführten "in vitro" Bindungsstudien im Maussystem zeigten, daß für die Induktion der Kollagenase I Expression der Transkriptionsfaktor AP-1 verantwortlich ist, der sich aus Jun/Fos Heterodimeren zusammensetzt (Peter Angel, pers. Mitteilung; Schönthal et al., 1988; Schorpp et al., 1994). Tatsächlich wurde eine *c-jun* Expression im sich entwickelnden Skelett gefunden (Wilkinson et al., 1989). Transkripte konnten mittels "in situ" Hybridisierung am Tag 14.5 (Tab.2) in den schnell proliferierenden Zellen des Perichondriums der sich entwickelnden Gliedmaßen und in den Rippen nachgewiesen werden. Später am Tag 17.5 findet man *c-jun* Transkripte hauptsächlich in den Wachstumszonen des Knorpels (Wilkinson et al., 1989). Das Gen scheint jedoch schon früher während anderer Prozesse der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle zu spielen, da Mäuse, bei denen das *c-jun* Gen durch homologe Rekombination inaktiviert wurde, ungefähr am Tag 12.5 der Entwicklung sterben (Hilberg et al., 1993; Johnson et al., 1993). Auch eine *c-fos* Expression konnte in den perichondralen Regionen des hyalinen Knorpels, in den wachsenden Regionen der flachen Knochen (parietaler und frontaler Knochen), in den Wirbelkörpern, und in den langen Röhrenknochen nachgewiesen werden (Dony und Gruss, 1987; Caubet und Bernaudin, 1988). Die *c-fos* exprimierenden Zellen sind dabei hauptsächlich Chondrozyten und Osteoblasten in den ossifizierenden Regionen. Eine *c-fos* Expression ist ebenfalls nicht vor Tag 13 der Entwicklung zu beobachten. "In vitro" konnte bestätigt werden, daß die *c-fos* Expression der Differenzierung der osteogenen Zellen vorausgeht (Closs et al., 1990). Diese Daten machen deutlich, daß *c-jun* und *c-fos* im sich entwickelnden Skelettsystem koexprimiert werden und somit für die Kollagenase I Expression verantwortlich sein könnten.

Die beiden Transkriptionsfaktoren sind dabei in Chondrozyten und in Zellen der osteogenen Linien kurz vor und zum Zeitpunkt der Ossifizierung nachweisbar.

Eine wichtige Frage kann bisher noch nicht beantwortet werden: Geht die Transkription in den Geweben mit dem Erscheinen von Enzymaktivität einher?

Mit kürzlich hergestellten spezifischen Antikörpern gegen Kollagenase I (Rüdiger Vallon, unveröffentlichte Daten) der Maus konnte zwar die Kollokalisierung des Proteins mit der mRNA, und auch die Koexpression mit dem cFos Protein im Skelettgewebe mittels Immunhistochemie nachgewiesen werden (Rüdiger Vallon, unveröffentlichte Daten). Die Aktivität der Enzyme wird jedoch von posttranslationalen Ereignissen bestimmt. Einerseits muß die inaktive Proform des Enzyms durch einen spezifischen Aktivator im entsprechenden Gewebe aktiviert werden. An der Aktivierung der Prokollagenase ist "in vivo" wahrscheinlich die Serinproteinase Plasmin beteiligt. Ob Plasmin, das durch die Spaltung von Plasminogen durch den Plasminogenaktivator entsteht, in den Geweben bzw. Zellen in denen Kollagenase I exprimiert ist, ebenfalls zu finden ist, wurde bisher noch nicht untersucht. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, daß das Parathormon (PTH) die Akkumulation des Plasminogen-spaltenden Plasminogenaktivators in kultivierten Osteoblasten stimuliert (als Übersichtsartikel: Matrisian und Hogan, 1990; und Referenzen darin). Die postulierte Funktion der Stromelysine bei der Aktivierung der Kollagenase ist zum Zeitpunkt der Embryonalentwicklung ausgeschlossen, da in der vorliegenden Arbeit eine Expression dieser beiden MMPs nicht nachgewiesen werden konnte.

Eine "Netto"-Enzymaktivität resultiert nur dann, wenn die Expression des MMP-Gens die Expression des gewebespezifischen Inhibitors TIMP übersteigt. Im Gegensatz zur Kollagenase I Expression kann eine TIMP Expression schon etwas früher am Tag 13.5 (Tab.2) der Entwicklung mittels "in situ" Hybridisierung nachgewiesen werden (Flenniken und Williams, 1990). Transkripte werden ebenfalls in den Geweben, die eine Osteogenese durchlaufen, z. B. in der Mandibel, den Rippen und im Schädelknochen gefunden. Das Signal wird dabei in einem Ring von Zellen und extrazellulärer Matrix beobachtet, der den Knorpelkern umgibt und ähnelt damit sehr dem Expressionsmuster der 72 kD Kollagenase IV. Zu einem späteren Zeitpunkt (Tag 15.5 und 17.5) findet man eine TIMP Expression sowohl in der Knochenmanschette, die das Knorpelgewebe umgibt, als auch in den Regionen der zentralen Markhöhle (Nomura et al., 1989; Flenniken und Williams, 1990), wo auch die Kollagenase I Expression beobachtet wird. Die Expression von TIMP in der Schaftregion scheint jedoch weitaus geringer zu sein, als die für Kollagenase beobachtete Expression, sodaß trotz Vorhandensein des Inhibitors in den knochenbildenden Regionen eine "Netto"-Enzymaktivität resultieren könnte. Obwohl TIMP-1 effektiver in der Hemmung der Kollagenase I zu sein scheint (Birkedal-Hansen et al., 1993 und Referenzen darin), deutet die korrelierende Lokalisation von TIMP-1 und der 72 kD Kollagenase IV darauf hin, daß der Inhibitor vorwiegend eine Rolle bei der Hemmung dieser MMP zu

spielen scheint. Die Expression von TIMP-2, dem effektiveren Inhibitor gegenüber Gelatinasen, wurde bisher noch nicht untersucht.

Um zum richtigen Zeitpunkt der Entwicklung einen Matrixauf- oder Abbau zu erhalten, müssen diese Vorgänge einem strengen Kontrollmechanismus unterliegen, der durch eine Reihe physiologischer Regulatoren gesteuert wird. Eine wichtige Rolle in Bezug auf die Knochenmatrixsynthese scheinen hier die Wachstumsfaktoren der TGF- $\beta$ -Familie zu spielen. Im Zellkultursystem konnte für TGF- $\beta$  eine hemmende Wirkung auf die Expression der Metalloproteinasen Stromelysin 1 und Kollagenase I nachgewiesen werden, dagegen wird die Expression von TIMP und auch die Ablagerung von ECM-Komponenten und ihre Einlagerung in die Extrazelluläre Matrix stimuliert (Matrisian et al., 1986; Edwards et al., 1987). "In situ" Hybridisierungsdaten zeigen, daß sich die räumliche Verteilung von TGF- $\beta$  und TIMP sehr ähneln. Man findet beide im Periosteum und in den Osteoblasten des sich entwickelnden Knochens (Sandberg et al., 1988; Nomura et al., 1989). TGF- $\beta$  scheint so auch unter "in vivo" Bedingungen für eine Induktion der TIMP Expression verantwortlich zu sein. Die Bestimmung der Lokalisierung anderer Wachstumsfaktoren, die die Kollagenase Expression stimulieren könnten, z. B. das Parathormon (PTH) oder Vitamin D<sub>3</sub>, muß noch durchgeführt werden, um diesen komplexen Regulationsmechanismus aufzuklären. In Zellkultur induzieren PTH und Vitamin D<sub>3</sub> in Osteoblasten die Expression von Kollagenase I (Heath et al., 1984; Delaisse et al., 1988; Quinn et al., 1990). Es konnte nachgewiesen werden, daß PTH in Osteoblasten auch die Expression der Protoonkogene *c-jun* und *c-fos* induziert (Clohisy et al., 1992). Mittels "in situ" Hybridisierung wurde gezeigt, daß PTH "in vivo" eine schnelle und transiente *c-fos* Expression in Osteoblasten entlang der Knochenbälkchen und in Chondrozyten im Bereich der Wachstumsplatte induziert. Die Expression von *c-fos* stimmt dabei mit den Zellen überein, die auch den Rezeptor für PTH exprimieren (Lee et al., 1994).

Wie schon erwähnt unterscheidet sich die Expression der 72 kD Typ IV Kollagenase vollkommen von der beobachteten Kollagenase I Expression. Kollagenase IV wird zu einem sehr viel früheren Zeitpunkt exprimiert (Tab.2) und wird nicht nur im Knochen, sondern auch in vielen anderen Geweben mesenchymalen Ursprungs gefunden (Reponen et al., 1992; hier gezeigte Daten). Die Lokalisation der beiden Enzyme auf Zellebene unterscheidet sich auch im Knochengewebe selbst. Während Kollagenase I direkt in den Ossifizierungszentren zu finden ist, wird Kollagenase IV von Zellen des Perichondriums bzw. des Periosteums (Osteoprogenitorzellen) exprimiert, die das Knorpel- bzw. Knochengewebe umgeben. Kollagenase IV könnte somit am Abbau der Basalmembranen und der Matrix des mesenchymalen Stromas beteiligt sein, um dem sich entwickelnden Skelett ein Wachstum und eine Ausdehnung zu ermöglichen. Sahlberg et al. (1992) konnten mittels Immunhistochemie nachweisen, daß während der Zahnentwicklung die erhöhte Expression der 72 kD Kollagenase IV in

Präodontoblasten dem Abbau der Basalmembran vorausgeht. Da auch Osteoblasten, die den Odontoblasten ähneln, die 72 kD Typ IV Kollagenase exprimieren, könnte das Enzym am selektiven Abbau von Knochenmatrixproteinen, zusammen mit der Kollagenase I, beteiligt sein und somit zur Einwanderung von Blutgefäßen durch das Periost und der Mineralisierung des Knochens beitragen (Sahlberg et al., 1992). Die 92 kD Typ IV Kollagenase scheint ebenso eine wichtige Funktion während der Knochenentwicklung zu besitzen. Im Gegensatz zu Kollagenase I wird diese MMP spezifisch von Osteoklasten exprimiert und könnte als Gelatinase wirken, die an der Entfernung der denaturierten Kollagenfragmente (Gelatin) beteiligt ist, die von der interstitiellen Kollagenase produziert werden (Reponen et al., 1994).

#### **5.4 Unterschiede in der MMP Expression im Embryo und im adulten Organismus**

Die Untersuchung der MMP-Expression in Geweben des adulten Organismus zeigte, daß sich das Expressionsmuster der einzelnen MMPs zu dem im Embryo deutlich unterscheidet. So konnten im Embryo keine Stromelysin 1 und 2 Transkripte nachgewiesen werden. Im adulten Tier sind die beiden MMPs aber in einigen Geweben exprimiert (Tab.2). Für Stromelysin 2 kann in den meisten der untersuchten Geweben eine geringe Transkriptmenge gefunden werden. Eine höhere Expression findet man in Herz und Niere. Eine Stromelysin 1 Expression findet man nur im Herz und in der Lunge. Dabei stimmt die Expression mit dem Expressionsmuster der 72 kD Kollagenase IV überein. Die Funktion der Stromelysine in diesen Geweben ist nicht bekannt. Sie könnten jedoch einerseits am Abbau von degradiertem Kollagen (Gelatin) beteiligt sein, das entweder durch die Aktivität von Kollagenase IV oder Kollagenase I entsteht. Zum anderen könnte ihnen auch eine Funktion bei der Aktivierung dieser beiden Enzyme zukommen, da die Expression von Stromelysin 1 mit der 72 kD Kollagenase IV korreliert, und Stromelysin 2 in den Geweben zu finden ist, in denen auch eine Expression der Kollagenase I nachweisbar ist. Inwieweit die MMPs in den verschiedenen Geweben eine Aktivität ausüben ist von der lokalen Präsenz der Inhibitoren der TIMP-Familie abhängig. Eine genaue Studie der TIMP-Expression in adulten Geweben auf Einzelzellebene wurde bisher jedoch noch nicht durchgeführt (Tab.2).

Während die 72 kD Kollagenase IV im Embryo in vielen mesenchymalen Geweben exprimiert wird, ist eine Expression im adulten Organismus nur noch im Herz und in der Lunge zu finden. Dies sind Gewebe, die reich an Basalmembranen sind, welche sich hauptsächlich aus Kollagen vom Typ IV zusammensetzen (Reponen et al., 1992). Im Gegensatz zum Embryo wird im adulten Tier, außer im Knochen, eine hohe Kollagenase I Expression auch im Muskel und in der Niere gefunden. Geringere Transkriptmengen konnten auch im Herz, der Milz und in der Lunge nachgewiesen werden. Ihre Funktion in diesen Geweben ist noch unklar. Sie könnte jedoch am Abbau von Typ III Kollagen beteiligt sein, das Bestandteil des Retikulinfasernetzes ist, das viele

innere Organe, wie z. B. die Milz oder die Blutgefäßwände umgibt und stützt (von der Mark, 1980, Martin et al., 1985). Auch im adulten Tier wird die Kollagenase I jedoch hauptsächlich im Knochen exprimiert. Durch "in situ" Hybridisierung konnte ein starkes Signal in der kalzifizierten Knorpelzone, die an den hypertrophen Knorpel angrenzt, gezeigt werden. In den Osteoblasten, die entlang der Knochenoberfläche im Bereich des kompakten Knochens der Diaphyse und auch im Grenzbereich zur Wachstumszone hin liegen, findet man ebenfalls ein starkes Signal. Die Expression der Kollagenase I lokalisiert dabei mit der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in *c-fos-lacZ* transgenen Mäusen, die ebenfalls im mineralisierten Knorpel im Bereich der Wachstumsplatte und im Bereich der Knochenbälkchen beobachtet werden kann (Smeyne et al., 1992). Da die Kollagenase I Expression sowohl im embryonalen, als auch im adulten Knochengewebe in Osteoblasten beobachtet wird, die im Bereich des neugebildeten Knochens entlang der Knochenbälkchen lokalisiert sind, könnte das Signal, neben dem direkten Effekt von Cytokinen (PTH, Vitamin D<sub>3</sub>), auch durch den Kontakt mit spezifischen Komponenten der ECM induziert werden. Weiterhin findet man im adulten Knochen eine starke Expression im Grenzbereich zwischen dem hypertrophen Knorpel und der Eröffnungszone zum Knochen hin. Auch der vollständig ausdifferenzierte hypertrophe Knorpel könnte eine Rolle bei der Signalgebung spielen. So konnte gezeigt werden, daß hypertrophe Chondrozyten hoch differenzierte Zellen sind, die verschiedene Makromoleküle synthetisieren und sezernieren, die direkt am Prozeß der Matrixmineralisierung, der Kapillareninvasion und der Bildung von Knochen am kalzifizierten Knorpel involviert sein könnten (Cowell et al., 1987).

Auch im adulten Tier korreliert die Expression von Kollagenase I mit der Expression von Komponenten des Transkriptionsfaktors AP-1. So ist die Kollagenase I in Geweben exprimiert, in denen auch eine *c-jun* Expression nachgewiesen werden konnte (Lunge, Herz, Niere). Dagegen findet man in Geweben, in denen *c-jun* nicht exprimiert ist, auch keine Expression der MMP (Leber, Gehirn, Hoden; Ryder und Nathans, 1985; Hirai et al., 1989; Ryder et al., 1989). Eine Expression der Komponente *c-fos* in adulten Geweben von Wildtyp Mäusen wurde bisher noch nicht gezeigt; eine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in *c-fos-lacZ* transgenen Mäusen findet man jedoch in der Haut, im Knochen und in bestimmten Bereichen des Gehirns (Smeyne et al., 1992). Weiterhin wurde eine Expression des endogenen *c-fos* in der Lunge, der Niere, im Muskel, im Herz und im Knochen von H2-*c-fos*LTR transgenen Mäusen nachgewiesen (Rüther et al., 1989).

Die unterschiedliche Zusammensetzung der Extrazellulären Matrix verschiedener Gewebe und die in dieser Arbeit gezeigte gewebespezifische Expression der vier MMPs deutet darauf hin, daß jedes dieser Enzyme eine bestimmte Funktion beim Abbau der ECM erfüllt und somit diese Enzyme "in vivo" unterschiedlich reguliert werden. Ein Grund für diese unterschiedliche Regulation der MMPs könnte die unterschiedliche Expression der verschiedenen Mitglieder der

Transkriptionsfaktorfamilien Jun und Fos sein, die unabhängig voneinander in verschiedenen Geweben reguliert werden (Hirai et al., 1989). Die Vielfalt der *jun* und *fos* Gene, und die damit mögliche Bildung verschiedener Homo- und Heterodimere mit verschiedenen Bindungsaffinitäten kreiert eine große Anzahl von AP-1 Isoformen, die auf die verschiedenen extrazellulären Signale antworten können (Hirai et al., 1989). Der Grund für die fehlende Expression der Stromelysine während der Embryonalentwicklung und auch in Geweben des adulten Tieres, in denen eine Expression von AP-1 (Jun/Fos) nachgewiesen werden konnte, könnte auf gewebespezifische Unterschiede in der Modifikation von AP-1 oder auf das Fehlen von zusätzlichen, zelltypspezifischen Faktoren, die für die Expression der Stromelysin Expression notwendig sind, zurückzuführen sein.

### **5.5 Expression von Kollagenase I in *c-fos* transgenen und *c-fos* "Null" Mäusen: Ist Kollagenase I ein Markergen für cFos-abhängige pathologische Veränderungen im Knochenmetabolismus?**

Da die MMPs Kollagenase I, Stromelysin 1 und Stromelysin 2 in Zellkultur nach einer TPA-Behandlung koordiniert exprimiert werden, und auch im Gesamtorganismus in einigen Geweben koexprimiert sind, war es natürlich interessant zu untersuchen, ob auch unter physiologischen Bedingungen die Expression dieser MMPs vom Transkriptionsfaktor AP-1 reguliert wird, da in allen drei Genen auch ein AP-1 Sequenzmotiv im Promoter gefunden wird (bei Stromelysin 2 nur für Ratte bekannt). Mäuse bei denen die Expression von Komponenten des Transkriptionsfaktors AP-1 verändert ist, bieten ein einmaliges System, um den Einfluß dieser Veränderung auf die Expression der MMPs unter "in vivo" Bedingungen zu untersuchen.

Um die Auswirkung einer transient erhöhten *c-fos* Expression auf die Expression der Kollagenase I zu untersuchen, wurden transgene Mäuse ausgewählt, bei denen eine exogene *c-fos* Expression durch das Anschalten der endogenen Interferonsynthese induziert wird (Mx-*c-fosD* Transgene; Bachiller und Rüther, 1990). Trotz des hohen exogenen *c-fos* Levels in allen untersuchten Geweben war eine erhöhte Kollagenase I Expression nur in der Milz, der Leber, dem Thymus und hauptsächlich im Knochen zu beobachten. Die fehlende Kollagenase I Expression in den anderen Geweben könnte mehrere Ursachen haben. Zum einen könnten in diesen Geweben angemessene Mengen an Jun Proteinen fehlen, die für die Aktivierung von Genen durch cFos notwendig sind. Die Messungen der *jun* Expression in Geweben von adulten Mäusen sprechen jedoch dagegen (Ryder und Nathans, 1985; Hirai et al., 1989; Ryder et al., 1989). Zum anderen könnten Komponenten, die für eine posttranslationale Modifikation der AP-1 Komponenten notwendig sind, in den Zellen dieser Gewebe fehlen. Durch die Induktion des *c-fos* Transgens wird zwar eine cFos Neusynthese induziert, die posttranslationale Modifikation des Transkriptionsfaktors ist jedoch von der Umgebung der *c-fos* exprimierenden Zellen

abhängig, d. h. von der Verfügbarkeit von Wachstumsfaktoren, die zum Beispiel eine basale Aktivierung der Proteinkinase C bewirken. Eine weitere Möglichkeit wäre, daß für die Expression von Kollagenase I zusätzliche, gewebespezifische bzw. zelltypspezifische Proteine (Aktivatoren oder Repressoren) notwendig sind, die an zusätzliche Bindungsstellen im Promoter des Gens binden und somit für die variable Induzierbarkeit durch verschiedene Wachstumsfaktoren verantwortlich sind.

Im Gegensatz zu Kollagenase I war kein Unterschied der Kollagenase IV Expression in den Geweben von unbehandelten und behandelten Mx-*c-fos*D transgenen Mäusen festzustellen. Dies ist in Übereinstimmung mit der unter Zellkulturbedingungen beobachteten Expression von Kollagenase IV, wo eine Behandlung mit TPA keinen Einfluß auf deren Expression hat. Die dabei erhaltenen Ergebnisse stimmen mit den für die menschliche MMP beobachteten Expressionsdaten überein und könnten, wie auch bei der menschlichen MMP, mit dem Fehlen der AP-1 Stelle im Promoter des Gens erklärbar sein (Collier et al., 1988; Huthala et al., 1991). Obwohl die Stromelysin 1 und Stromelysin 2 Expression in Zellkultur durch eine TPA-Behandlung induziert wird, und auch eine AP-1 Stelle im Promoter des Stromelysin 1 Gens (Maus und Ratte) und des Stromelysin 2 Gens (Ratte) gefunden werden kann (J. Mudgett, pers. Mitteilung; Breathnach et al., 1987), kann weder eine basale noch eine induzierte Expression dieser beiden MMPs in den Geweben der *c-fos* transgenen Mäuse nachgewiesen werden. Dies könnte zum einen auf der Tatsache beruhen, daß eine Aktivierung der Proteinkinase C durch TPA alleine nicht ausreichend ist für eine Stromelysin Expression, sondern noch zusätzliche Faktoren dafür benötigt werden (Matrisian et al., 1986). Andererseits wurde beobachtet, daß die Expression von Stromelysin 1 der Ratte über einen *c-fos* abhängigen, als auch einen *c-fos* unabhängigen Signalweg induziert werden kann (Kerr et al., 1988). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die AP-1 Stelle im Stromelysin 1 Promoter zwar für die basale Expression des Gens, nicht aber für den Mechanismus der TPA-Antwort verantwortlich ist (Buttice et al., 1991).

Interessanterweise zeigen transgene Mäuse, bei denen die exogene *c-fos* Expression konstitutiv erhöht ist, infolge dieser erhöhten *c-fos* Expression phänotypische Veränderungen in der Milz, dem Thymus und im Knochen, die je nach verwendetem Promoter 3 Wochen bis 9 Monate nach Geburt auftreten (Rüther et al., 1987; 1988; 1989). Die phänotypischen Veränderungen dieser Tiere stimmen dabei mit der Lokalisation einer erhöhten Kollagenase I Expression überein, die infolge der transient erhöhten *c-fos* Expression in den transgenen Mx-*c-fos*D Mäusen auftritt (Bachiller und Rüther, 1990). Da Knochen das primäre Gewebe der Kollagenase I Expression darstellt, wurden Tiere ausgewählt, die infolge der erhöhten *c-fos* Expression Knochentumore entwickeln. Interessanterweise findet man im veränderten Knochengewebe eine mehrere hundertfach erhöhte Kollagenase I Expression (im Gegensatz zum normalen Knochengewebe in

Wildtyp Mäusen), während die Expression in nicht betroffenen Geweben, z. B. Niere und Gehirn im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert ist. Auch die Expression der Kollagenase IV ist im Tumorgewebe etwas erhöht; im Gegensatz zu Kollagenase I ist der Induktionslevel jedoch weitaus geringer. Da eine TPA Behandlung die Kollagenase IV Expression in Zellkultur nicht beeinflusst und auch in den Mx-*c-fos*D transgenen Mäusen nach Induktion keine veränderte Expression der MMP zu beobachten ist, scheint dies ein sekundärer Effekt der Tumorbildung zu sein.

Durch transiente Transfektion von *c-fos* antisense Konstrukten konnte gezeigt werden, daß cFos absolut notwendig für die Expression der menschlichen Kollagenase I ist (Schönthal, et al., 1988). Auch die in dieser Arbeit nachgewiesene veränderte Expression der Kollagenase I infolge einer veränderten *c-fos* Expression machen deutlich, daß diese Komponente des Transkriptionsfaktors AP-1 eine wichtige Rolle für die Expression dieser MMP spielt. Obwohl mittlerweile eine ganze Reihe von Genen identifiziert wurden, die in Zellkultur durch cFos reguliert werden, konnte das Kollagenase I Gen als erstes Beispiel identifiziert werden, für das eine *c-fos* abhängige Regulation auch unter physiologischen Bedingungen im Gesamtorganismus zutrifft.

Um die Auswirkung einer Elimination des *c-fos* Gens auf die Expression der Kollagenase I zu untersuchen, standen Mäuse zur Verfügung, bei denen das *c-fos* Gen durch homologe Rekombination eliminiert wurde. Diese Tiere zeigen interessanterweise 2 bis 3 Wochen nach Geburt in den gleichen Geweben phänotypische Veränderungen (Johnson et al., 1992; Wang et al., 1992), wie die konstitutiv exprimierenden *c-fos* transgenen Mäuse. Auch in diesen Tieren scheint hauptsächlich das Knochengewebe betroffen zu sein. Dies zeigt, daß das *c-fos* Gen und damit auch cFos-abhängige Gene für die korrekte Ausbildung und Funktion dieser Gewebe wichtig sind.

Da der Knochen in diesen Tieren das hauptsächlich betroffene Gewebe ist, wurde mittels "in situ" Hybridisierung die Kollagenase I Expression in Embryonen (16.5), als auch im Knochengewebe von neugeborenen und zwei Wochen alten Mäusen untersucht. Die Untersuchung zeigte, daß Kollagenase I exprimiert ist, daß aber die Menge an Transkripten vermindert zu sein scheint. Im Gegensatz zu den beobachteten phänotypischen Veränderungen ist eine veränderte Kollagenase I Expression gegenüber dem Wildtyp schon am Tag 16.5 der Entwicklung nachzuweisen. In diesen Embryonen kann man schon eine gering reduzierte Expression von Kollagenase I gegenüber Wildtyp Embryonen beobachten. Im neugeborenen Tier treten dann erstmals gut erkennbare Unterschiede in der Stärke und auch in der Verteilung des Signals auf, die im weiteren Verlauf der Entwicklung massiv zunehmen. Die Unterschiede in der Lokalisierung des Signals ist auf die unterschiedliche Verteilung der osteogenen Zellen in den *c-*

*fos*-defizienten Tieren gegenüber Wildtyp Mäusen zurückzuführen. Den Mutanten fehlt im Gegensatz zu den Wildtyp Mäusen eine Knochenmarkshöhle im Bereich der Diaphyse der Röhrenknochen. Stattdessen ist dieser Bereich mit Knochen- und Knorpelbälkchen ausgefüllt und ist kalzifiziert. Auch im Bereich der Wachstumsplatte findet man starke Veränderungen. Die Zone der proliferierenden Chondrozyten ist stark reduziert, die Längssäulen sind sehr unregelmäßig und die Zone der hypertrophen Chondrozyten ist verbreitert (Johnson et al., 1992; Wang et al., 1992; Abb.21).

Die in der vorliegenden Arbeit aufgezeigten Evidenzen für eine Funktion von Kollagenase I in der Entstehung des Knochenskeletts (durch den Abbau der Knorpelkomponente Kollagen II) und ihre eventuelle Funktion bei der Entstehung der Knochenmarkshöhle im Bereich der Diaphyse (durch den Abbau von Kollagen I) läßt vermuten, daß eine Reduktion ihrer Expression, schon vor dem Auftreten der phänotypischen Veränderungen, bei der Entstehung des Phänotyps in den *c-fos*-negativen Mäusen eine Rolle spielen könnte.

Auch in kultivierten primären Fibroblasten, die aus den *c-fos*-defizienten Mäusen isoliert wurden, ist die Kollagenase I Expression signifikant reduziert. Durch Behandlung mit TPA kann eine Kollagenase Induktion beobachtet werden, aber die Transkriptmenge liegt selbst nach Induktion der Expression noch unter dem basalen Level von primären Fibroblasten aus Wildtyp Mäusen. Die Expression der MMPs Stromelysin 1, Stromelysin 2 und der 72 kD Kollagenase IV dagegen wird durch das Fehlen von cFos nicht beeinflusst (Bernd Baumann, persönliche Mitteilung).

Für die noch vorhandene, wenn auch reduzierte Expression von Kollagenase I in den isolierten *c-fos*-negativen Fibroblasten, als auch im Organismus könnte eine Substitution des cFos Proteins durch ein verwandtes Protein, z. B. Fra-1, Fra-2 oder FosB, verantwortlich sein. Die Expression dieser Gene wird in ähnlicher Weise reguliert wie das *c-fos* Gen und ihre Genprodukte können genauso wie das cFos Protein mit den verschiedenen Proteinen der Jun-Familie Komplexe bilden (Cohen et al., 1989; Matsui et al., 1990). Der Grund für die geringere Expression von Kollagenase I in den *c-fos*-negativen Zellen und in den Geweben der *c-fos*-defizienten Tiere könnte jedoch sein, daß die gebildeten Jun/FosB oder Jun/Fra-1 Heterodimere, im Vergleich zu cJun/cFos, geringere Bindungsaffinitäten an die AP-1 Bindungsstelle des Kollagenase Promoters oder eine geringere Transaktivierungsaktivität besitzen. "In vitro" gibt es, aufgrund der unterschiedlichen Stabilität der verschiedenen Komplexe, klare Unterschiede in der Affinität verschiedener Jun/Jun Homo- und Jun/Fos Heterodimere an die AP-1 Stelle (Ryseck und Bravo, 1991). Somit könnte auch "in vivo" eine andere Kombination des AP-1 Komplexes die Kollagenase I Expression zwar induzieren, aber dies in einem weit geringeren Maße, als das normalerweise verantwortliche Heterodimer aus Jun und cFos Proteinen.

Mittlerweile konnte das Gen, das für das Oberflächenprotein CD44 kodiert, in Zellkultur als weiteres AP-1 abhängiges Gen identifiziert werden (Hofmann et al., 1993). Dieses Gen scheint ebenfalls eine wichtige Funktion beim Prozeß der Knochenbildung auszuüben. CD44 wird an der Oberfläche von Osteoprogenitorzellen exprimiert, die spezifisch die Hyaluronsäure im hypertrophen Knorpel im Bereich der Eröffnungszone entfernen. Der Abbau der Hyaluronsäure kann mit Antikörpern gegen CD44 gehemmt werden (Pavasant et al., 1994). Eine Funktion der von Chondrozyten synthetisierten und sezernierten Makromoleküle beim Prozeß der Knochenentwicklung wurde postuliert (Cowell et al., 1987). So könnte das Vorhandensein und die Entfernung der Hyaluronsäure in der Eröffnungszone eine wichtige biologische Funktion haben. Zum Beispiel könnte Hyaluronsäure als Substrat dienen, das die Wanderung von Osteoprogenitorzellen in diese Region dirigiert. Eine weitere Möglichkeit wäre, daß Fragmente der Hyaluronsäure, die durch den Abbauprozess produziert werden, die Einwanderung von Blutgefäßen stimuliert (Pavasant et al., 1994).

Die in dieser Arbeit gefundene Fos-abhängige, gewebespezifische Expression von Kollagenase I deutet auf eine wichtige Funktion dieser MMP in der Knochenhomöostase hin. Die kausale Funktion der Kollagenase I in der Entstehung und der Aufrechterhaltung des veränderten Phänotyps in den *c-fos* transgenen Mäusen und in den *c-fos* negativen Mutanten muß noch demonstriert werden. Durch Inaktivierung des Kollagenase I Gens kann überprüft werden, ob diese "Knock out" Tiere den gleichen Phänotyp, wie die *c-fos*-defizienten Mäuse zeigen. Die Klonierung der mausspezifischen Probe ermöglichte die Isolierung des genomischen Klons, was jetzt als Ausgangspunkt zur Herstellung dieser Tiere ("Knock out") dient. Die Kreuzung der *c-fos*-negativen Mäuse mit Tieren, die Kollagenase ektopisch exprimieren ("Transgene") könnte Aufschluß darüber geben, ob der pathologische Phänotyp dadurch aufgehoben werden kann ("Rescue").

Kollagenase I könnte dennoch, unabhängig von der Funktion anderer Gene, als Markergen für pathologische Veränderungen des Knochengewebes dienen.

Die Ergebnisse dieser experimentellen Ansätze, als auch weitergehende Untersuchungen zur Funktion und Regulation der anderen MMPs, werden zusätzliche Erkenntnisse zur Aufklärung des komplizierten Netzwerkes des ECM Metabolismus unter physiologischen Bedingungen, und auch bei pathologischen Prozessen liefern.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- Alexander, C. M. und Werb, Z. (1989).** Proteinases and extracellular matrix remodeling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1**, 974-982
- Allison, A. C. (1988).** Immunopathogenetic mechanisms of arthritis and modes of action of antirheumatic therapies. In: *Immunopathogenetic Mechanisms of Arthritis*. J. A. Goodacre und W. C. Dick, Eds. (Boston; Kluwer Academic Publishers), 211-246
- Angel, P., Baumann, I. Stein, B., Delius, H., Rahmsdorf, H. J. und Herrlich, P. (1987a).** 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5'-flanking region. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 2256-2266
- Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R. J., Rahmsdorf, H. J., Jonat, C., Herrlich, P. und Karin, M. (1987b).** Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* **49**, 729-739
- Angel, P. und Karin, M. (1991).** The role of JUN, FOS and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta* **1072**, 129-157
- Angel, P. und Karin, M. (1992).** Specific members of the Jun protein family regulate collagenase expression in response to various extracellular stimuli. In: *Matrix Metalloproteinases and Inhibitors* (Birkedal-Hansen, H., Werb, Z., Welgus, H. G., and van Wart, H. E., eds). Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 156-164
- Bachiller, D. und Rüther, U. (1990).** Inducible expression of the proto-oncogene c-fos in transgenic mice. *Arch. Geschwulstforsch.* **60**, 357-360
- Basset, P., Bellocq, J. P., Wolf, C., Stoll, I., Hutin, P., Limacher, J. M., Podhajcer, O. L., Chenard, M. P., Rio, M. C. und Chambon, P. (1990).** A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature* **348**, 699-704
- Birkedal-Hansen, H., Moore, W. G. I., Bodden, M. K., Windsor, L. J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A. und Engler, J. A. (1993).** Matrix Metalloproteinases: A Review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **4**, 197-250
- Breathnach, R., Matrisian, L. M., Gesnel, M.-C., Staub, A. und Leroy, P. (1987).** Sequences coding for part of oncogene-induced transin are highly conserved in a related rat gene. *Nucl. Acids Res.* **15**, 1139-1151

- Brenner, C. A., Adler, R. R., Rappolee, D. A., Pedersen, R. A. und Werb, Z. (1989a).** Genes for extracellular matrix-degrading metalloproteinases and their inhibitor, TIMP, are expressed during early mammalian development. *Genes Dev.* **3**, 848-859
- Brenner, D. A., O'Hara, M., Angel, P., Chojkier, M. und Karin, M. (1989b).** Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor- $\alpha$ . *Nature* **337**, 661-663
- Brinckerhoff, C. E., Plucinska, I. M., Sheldon, L. A. und O'Connor, G. T. (1986).** Half-life of synovial cell collagenase mRNA by phorbol myristate acetate but not by all-trans-retinoic acid or dexamethason. *Biochemistry.* **25**, 6378-6384
- Buttice, G., Quinones, S. und Kurkinen, M. (1991).** The AP-1 site is required for basal expression but is not necessary for TPA-response in the human stromelysin gene. *Nucl. Acids Re.* **19**, 3723-3731
- Caubet, J.-F. und Bernaudin, J.-F. (1988).** Expression of the c-fos proto-oncogene in bone, cartilage and tooth forming tissues during mouse development. *Biol. Cell.* **64**, 101-104
- Caubet, J.F. (1989).** C-fos proto-oncogene expression in the nervous system during mouse development. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 2269-2272
- Charnay, P., Treisman, R., Mellon, P., Chao, M., Axel, R. und Maniatis, T. (1984).** Differences in human  $\alpha$ - and  $\beta$ -globin gene expression in mouse erythroleukemia cells: the role of intragenic sequences. *Cell* **38**, 251-263
- Chiu, R., Boyle, W. J., Meek, J., Smeal, T., Hunter, T. und Karin, M. (1988).** The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* **54**, 541-552
- Chiu, R., Angel, P. und Karin, M. (1989).** Jun-B differs in its biological properties from, and is a negative regulator of, c-Jun. *Cell* **59**, 979-986
- Clohisy, J. C., Scott, D. K., Brakenhoff, K. D., Quinn, C. O und Patridge N. C. (1992).** Parathyroid hormone induces c-fos and c-jun messenger RNA in rat osteoblastic cells. *Mol. Endocrinology* **6**, 1834-1842
- Closs, E. I., Murray, B., Schmidt, J., Schön A., Erfle, V. und Strauss, P. G. (1990).** C-fos expression precedes osteogenic differentiation of cartilage cells in vitro. *J. Cell. Biol.* **111**, 1313-1323

- Cohen, D. R., Ferreira, P. C. P., Gentz, R., Franza, B. R. und Curran, T. (1989).** The product of a fos-related gene, fra-1, binds cooperatively to the AP-1 site with jun: transcription factor AP-1 is comprised of multiple protein complexes. *Genes Dev.* **3**, 173-184
- Collier, I. E., Wilhelm, S. M., Eisen, A. Z., Marmer, B. L., Grant, G. A., Seltzer, J. L., Kronberger, A., He, C., Bauer, E. A. und Goldberg, G. I. (1988).** H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen. *J. Biol. Chem.* **263**, 6579-6587
- Cowell, H. R., Hunziker, E. B. und Rosenberg, L. (1987).** The role of hypertrophic chondrocytes in endochondral ossification and in the development of secondary centers of ossification. *J. Bone and Joint Surgery* **69-A**, 159-161
- Delaisse, J.-M., Eeckhout, Y. und Vaes, G. (1988).** Bone-resorbing agents affect the production and distribution of procollagenase as well as the activity of collagenase in bone tissue. *Endocrinology* **123**, 264-276
- Derijard, B., Hibi, M., Wu, J. H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M. und Davis, R. J. (1994).** JNK1: A protein kinase stimulated by UV light and Ha-ras that binds and phosphorylates the cJun activation domain. *Cell* **74**, 1025-1037
- Docherty, A. J. P., Lyons, A., Smith, B. J., Wright, E. M., Stephens, P. E., Harris, T. J. R., Murphy, G. und Reynolds, J. J. (1985).** Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity. *Nature* **318**, 66-69
- Dony, D. und Gruss, P. (1987).** Proto-oncogene c-fos expression in growth regions of fetal bone and mesodermal web tissue. *Nature* **328**, 711-714
- Edwards, D. R., Murphy, G., Reynolds, J. J., Whitham, S. E., Docherty, A. J. P., Angel, P. und Heath, J. K. (1987).** Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J.* **6**, 1899-1904
- Fini, M. E., Plucinska, I. M., Mayer, A. S., Gross, R. H. und Brinckerhoff, C. E. (1987a).** A gene for rabbit synovial collagenase: Member of a family of metalloproteinases that degrade the connective tissue matrix. *Biochemistry* **26**, 6156-6165
- Fini, M. E., Karmilowicz, M. J., Ruby, P. L., Beeman, A. M., Borges, K. A. und Brinckerhoff, C. E. (1987b).** Cloning of a complementary DNA for Rabbit proactivator. *Arthritis and Rheumatism* **30**, 1254-1264

- Flenniken, A. M. und Williams B. R. G. (1990).** Developmental expression of the endogenous TIMP gene and a TIMP-lacZ fusion gene in transgenic mice. *Genes Dev.* **4**, 1094-1106
- Frisch, S. M. und Ruley, H. (1987).** Transcription from the stromelysin promoter is induced by interleukin-1 and repressed by dexamethason. *J. Biol. Chem.* **262**, 16300-16304
- Gack, S., Vallon, R., Schaper, J., Rüther, U. und Angel, P. (1994).** Phenotypic alterations in Fos-transgenic mice correlate with changes in Fos/Jun-dependent collagenase type I expression. *J. Biol. Chem.* **269**, 10363-10369
- Garbisa S., Pozzatti, R., Muschel, R. J., Saffiotti, U., Ballin, M., Goldfarb, R. H., Khoury, G. und Liotta, L. A. (1987).** Secretion of type IV collagenolytic protease and metastatic phenotype: Induction by transfection with c-Ha-ras but not c-Ha-ras plus Ad2-E1a. *Cancer Res.* **47**, 1523-1528
- Gilbert, S. F. (1991).** Osteogenesis. Development of Bone. In: *Developmental Biology*. Chapter 6. Third Edition. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, USA
- Godbout, R., Ingram, R. und Tilghman, S. M. (1986).** Multiple regulatory elements in the intergenic region between alpha-fetoprotein and albumin genes. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 477-487
- Goldberg, G. I., Wilhelm, S. M., Kronberger, A., Bauer, E. A., Grant, G. A. und Eisen, A. Z. (1986).** Human fibroblast collagenase. Complete primary structure and homology to an oncogene transformation-induced rat protein. *J. Biol. Chem.* **261**, 6600-6605
- Goldberg, B. und Rabinovitch, M. (1989).** Connective Tissue. In *Cell and Tissue Biology*. A Textbook of Histology. Sixth Edition. (Ed.: Weiss L.). Urban und Schwarzenberg. Baltimore; Munich
- Grant, G. A., Eisen, A. Z., Marmer, B. L., Roswit, W. T. und Goldberg, G. I. (1987).** The activation of human skin fibroblast procollagenase. *J. Biol. Chem.* **262**, 5886-5889
- Gross, J. L., Moscatelli, D. und Rifkin, D. B. (1983).** Increased capillary endothelial cell protease activity in response to angiogenic stimuli in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 2623-2627
- Gutman, A. und Wasylyk, B. (1990).** The collagenase gene promoter contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding site. *EMBO J.* **9**, 2241-2246

**Gutman, A. und Wasylyk, B. (1991).** Nuclear targets for transcription regulation by oncogenes. *Trends Gen.* **7**, 49-54

**Hagmeyer, B. M., König, H., Herr, I., Offringa, R., Zantema, A., van der Eb, A. J., Herrlich, P. und Angel, P. (1993).** Adenovirus E1A negatively and positively modulates transcription of AP-1 dependent genes by dimer-specific regulation of the DNA binding and transactivation activities of Jun. *EMBO J.* **12**, 3559-3572

**He, Ch., Wilhelm, S. M., Pentland, A. P., Marmer, B. L., Grant, G. A., Eisen, A. Z. und Goldberg, G. I. (1989).** Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2632-2636

**Heath, J. K., Atkinson, S. J., Meikle, M. C. und Reynolds, J. J. (1984).** Mouse osteoblasts synthesize collagenase in response to a bone resorbing agents. *Biochim. Biophys. Acta* **802**, 151-154

**Henriet, P., Rousseau, G. G. und Eeckhout, Y. (1992).** Cloning and sequencing of mouse collagenase cDNA. *FEBS Letters* **310**, 175-178

**Herrlich, P., Ponta, H. und Rahmsdorf, H. J. (1992).** DNA-damage induced gene expression: signal transduction and relation to growth factor signaling. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **119**, 187-223

**Hilberg, F., Aguzzi, A., Howells, N. und Wagner, E. F. (1993).** C-jun is essential for normal development and hepatogenesis. *Nature* **365**, 179-181

**Hirai, S.-I., Ryseck, R.-P., Mehta, F., Bravo, R. und Yaniv, M. (1989).** Characterisation of junD: a new member of the jun proto-oncogene family. *EMBO J.* **8**, 1433-1439

**Hofmann, M., Rudy, W., Günthert, U., Zimmer, S. G., Zawadzki, V., Zöller, M., Lichtner, R. B., Herrlich, P. und Ponta, H. (1993).** A link between ras and metastatic behavior of tumor cells: ras induces CD44 promoter activity and leads to low-level expression of metastasis-specific variants of CD44 in CREB cells. *Cancer Res.* **53**, 1516-1521

**Huhtala, P., Tuuttila, A., Chow, L. T., Lohi, J., Keski-Oja, J. und Tryggvason, K. (1991).** Complete structure of the human gene for 92 kDa type IV collagenase. *J. Biol. Chem.* **266**, 16485-16490

- Ito, A. und Nagase, H. (1988).** Evidence that human rheumatoid synovial matrix metalloproteinase 3 is an endogenous activator of procollagenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **267**, 211-216
- Jee, W. S. S. (1989).** The Skeletal Tissue. In: *Cell and Tissue Biology. A Textbook of Histology.* Sixth Edition. (Ed.: Weiss L.). Urban und Schwarzenberg. Baltimore; Munich
- Johnson, R. S., Spiegelman, B. M. und Papaioannou, V. (1992).** Pleiotropic effects of a null mutation in the c-fos proto-oncogene. *Cell* **71**, 577-586
- Johnson, R. S., v. Lingen, B., Papaioannou, V. E. und Spiegelman, B. M. (1993).** A null mutation at the c-jun locus causes embryonic lethality and retarded cell growth in culture. *Genes Dev.* **7**, 1309-1317
- Jonat, C., Rahmsdorf, H. J., Park, K.-K., Cato, A. B. C., Gebel, S., Ponta, H. und Herrlich, P. (1990).** Antitumor promotion and antiinflammation: Down-Modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* **62**, 1189-1204
- Juliano, R. L. und Haskill, S. (1993).** Signal transduction from the extracellular matrix. *J. Cell. Biol.* **120**, 577-585
- Kaufman, M. H. (1992).** The Atlas of Mouse Development. Academic Press, London, UK
- Kerr, L. D., Holt, J. T. und Matrisian, L. M. (1988).** Growth factors regulate transin gene expression by c-fos-dependent and c-fos-independent pathways. *Science* **242**, 1424-1427
- Kerr, L. D., Miller, D. B. und Matrisian, L. M. (1990).** TGF- $\beta$ 1 inhibition of transin/stromelysin gene expression is mediated through a Fos binding sequence. *Cell* **61**, 267-278
- Khokha, R., Waterhouse, P., Yagel, S., Lala, P. K., Overall, C. M., Norton, G. und Denhardt, D. T. (1989).** Antisense RNA-induced reduction in murine TIMP levels confers oncogenicity on Swiss 3T3 cells. *Science* **243**, 947-950
- König, H., Ponta, H., Rahmsdorf, H. J. und Herrlich, P. (1992).** Interference between pathway-specific transcription factors: glucocorticoids antagonize phorbol ester-induced AP-1 activity without altering AP-1 site occupation in vivo. *EMBO J.* **11**, 2241-2246
- Kratochwil, K., Dziadek, M., Löhler, J., Harbers, K. und Jaenisch, R. (1986).** Normal epithelial branching morphogenesis in the absence of collagen I. *Dev. Biol.* **117**, 596-606

**Krämer, M., Sachsenmaier, C., Herrlich, P. und Rahmsdorf, H. J. (1993).** UV irradiation-induced interleukin-1 and basic fibroblast growth factor synthesis and release mediate part of the UV response. *J. Biol. Chem.* **268**, 6734-6741

**Krieg, P., Finch, J., Fürstenberger, G., Melber, K., Matrisian, L. M. und Bowden, G. T. (1988).** Tumor promoters induce a transient expression of tumor-associated genes in both basal and differentiated cells of the mouse epidermis. *Carcinogenesis* **9**, 95-100

**Krumlauf, R., Hammer, R. E., Tilghman, S. M. und Brinster, R. L. (1985).** Developmental regulation of alpha-fetoprotein genes in transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 1639-1648

**Kryszke, M.-H., Piette, J. und Yaniv, M. (1987).** Induction of a factor that binds to the polyoma virus A enhancer on differentiation of embryonal carcinoma cells. *Nature* **328**, 254-256

**Lee, K., Deeds, J. D., Chiba, S., Un-No, M., Bond, A. T. und Segre, G. V. (1994).** Parathyroid hormone induces sequential c-fos expression in bone cells in vivo: in situ localisation of its receptor and c-fos messenger ribonucleic acids. *Endocrinology* **134**, 441-450

**Li, W.-H., Gouy, M., Sharp, P. M., O'Huigin, C. und Yang, Y.-W. (1990).** Molecular phylogeny of rodentia, lagomorpha, primates, artiodactyla, and carnivora and molecular clocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 6703-6707

**Librach, C. L., Werb, Z., Fitzgerald, M. L., Chiu, K., Corwin, N. M., Esteves, R. A., Grobelyny, D., Galardy, R., Damsky, C. H. und Fisher, S. J. (1991).** 92-kD Type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. *J. Cell Biol.* **113**, 437-449

**Löhler, J., Timpl, R. und Jaenisch, R. (1984).** Embryonic lethal mutation in the mouse collagen I gene causes rupture of blood vessels and is associated with erythropoetic and mesenchymal cell death. *Cell* **38**, 597-607

**von der Mark, K. (1980).** Immunological studies on collagen type transition in chondrogenesis. *Curr. Topics Dev. Biol.* **14**, 199-225

**Martin, G. R., Timpl, R., Müller, P. K. und Kühn, K. (1985).** The genetically distinct collagens. *Trends Biol. Sci.* **10**, 285-287

**Matrisian, L. M., Glaichenhaus, N., Gesnel, M.-C. und Breathnach, R. (1985).** Epidermal growth factor and oncogenes induce transcription of the same cellular mRNA in rat fibroblasts. *EMBO J.* **4**, 1435-1440

- Matrisian, L. M., Bowden, G. T., Krieg, P., Fürstenberger, G., Briand, J.-P., Leroy, P. und Breathnach, R. (1986a).** The mRNA coding for the secreted protease transin is expressed more abundantly in malignant than in benign tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 9413-9417
- Matrisian, L. M., Leroy, P., Ruhlman, C., Gesnel, M.-C. und Breathnach, R. (1986b).** Isolation of the oncogene and epidermal growth factor-induced transin gene: complex control in rat fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 1679-1686
- Matrisian L. M. (1990).** Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Gen.* **6**, 121-125
- Matrisian, L. M. und Hogan, B. L. M. (1990).** Growth factor-regulated proteases and extracellular matrix remodeling during mammalian development. *Curr. Topics Dev. Biol.* **24**, 219-259
- Matrisian, L. M. (1992).** The matrix-degrading metalloproteinases. *BioEssays* **14**, 455-463
- Matsui, M., Tokuhara, M., Konuma, Y., Nomura, N. und Ishizaki, R. (1990).** Isolation of human fos-related genes and their expression during monocyte-macrophage differentiation. *Oncogene* **5**, 249-255
- McMaster, G. K. und Carmichael, G. G. (1977).** Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 4835-4838
- Mignatti, P., Tsuboi, R., Robbins, E. und Rifkin, D. B. (1989).** In vitro angiogenesis on the human amniotic membrane: requirement for basic fibroblast growth factor-induced proteinases. *J. Cell Biol.* **108**, 671-682
- Moscatelli, D., Presta, M. und Rifkin, D. B. (1986).** Purification of a factor from human placenta that stimulates capillary endothelial cell protease production, DNA-synthesis and migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 2091-2095
- Muller, D., Quantin, B., Gesnel, M.-C., Millon-Collard, R., Abecassis, J. und Breathnach, R. (1988).** The collagenase gene family in humans consists of at least four members. *Biochem. J.* **253**, 187-192

- Murphy, G., Cockett, M. I., Stephens, P. E., Smith, B. J. und Docherty, A. J. P. (1987).** Stromelysin is an activator of procollagenase. A study with natural and recombinant enzymes. *Biochem. J.* **248**, 265-268
- Murphy, G. J. P., Murphy, G. und Reynolds, J. J. (1991).** The origin of matrix metalloproteinases and their familial relationships. *FEBS Letters* **289**, 4-7
- Murphy, G., Allan, J. A., Willenbrock, F., Cockett, M. I., O'Connell, J. P. und Docherty, A. J. P. (1992).** The role of the C-terminal domain in collagenase and stromelysin specificity. *J. Biol. Chem.* **267**, 9612-9618
- Nishida, E. und Gotoh, Y. (1993).** The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biol. Sci.* **18**, 128-131
- Nishizuka, Y. (1984).** The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* **308**, 693-698
- Nishizuka, Y. (1986).** Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* **233**, 305-312
- Nomura, S., Hogan, B. L. M., Wills, A. J., Heath, J. K. und Edwards, D. R. (1989).** Developmental expression of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) RNA. *Development* **105**, 575-583
- Offringa, R., Gebel, S., van Dam, H., Timmers M., Smits, A., Zwart, R., Stein, B., Bos, J. L., van der Eb, A. und Herrlich, P. (1990).** A novel function of the transforming domain of E1a: Repression of AP-1 activity. *Cell* **62**, 527-538
- Okada, Y., Morodomi, T., Enghild, J. J., Suzuki, K., Yasui, A., Nakanishi, I., Salvesen, G. und Nagase, H. (1990).** Matrix metalloproteinase 2 from human rheumatoid synovial fibroblasts. Purification and activation of the precursor and enzymic properties. *Eur. J. Biochem.* **194**, 721-730
- Ostrowski, L. E., Finch, J., Krieg, P., Matrisian, L., Patskan, G., O'Connell, J. F., Phillips, J., Slaga, T. J., Breathnach, R. und Bowden, G. T. (1988).** Expression pattern of a gene for a secreted metalloproteinase during late stages of tumor progression. *Mol. Carcinogenesis* **1**, 13-19
- Overall, C. M., Wrana, J. L. und Sodek, J. (1991).** Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor- $\beta$ 1 in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **266**, 14064-14071

- Parillo, J. E. und Fauci, A. S. (1979).** Mechanisms of glucocorticoid action on immune response. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **19**, 179-209
- Pavasant, P., Shizari, T. M. und Underhill, C. B. (1994).** Distribution of hyaluronan in the epiphysal growth plate: turnover by CD44 expressing osteoprogenitor cells. *J. Cell Science*, eingereicht
- Ponta, H., Cato, A. B. C. und Herrlich, P. (1992).** Interference of pathway specific transcription factors. *Biochim. Biophys. Acta* **1129**, 255-261
- Ponton, A., Coulombe, B. und Skup, D. (1991).** Decreased expression of tissue inhibitor of metalloproteinases in metastatic tumor cells leading to increased levels of collagenase activity. *Cancer Res.* **51**, 2138-2143
- Presta, M., Moscatelli, D., Joseph-Silverstein, J. und Rifkin, D. B. (1986).** Purification from a human hepatoma cell line of a basic fibroblast growth factor-like molecule that stimulates capillary endothelial cell plasminogen activator production, DNA-synthesis and migration. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 4060-4066
- Quinn, C. O., Scott, D. K., Brinckerhoff, C. E., Matrisian, L. M., Jeffrey, J. J. und Partridge, N. C. (1990).** Rat Collagenase. Cloning, amino acid sequence comparison and parathyroid hormone regulation in osteoblastic cells. *J. Biol. Chem.* **265**, 22342-22347
- Radler-Pohl, A., Sachsenmaier, C., Gebel, S., Auer, H.-P., Bruder, J. T., Rapp, U., Angel, P., Rahmsdorf, H. J. und Herrlich, P. (1993).** UV-induced activation of AP-1 involves obligatory extranuclear steps including Raf-1 kinase. *EMBO J.* **12**, 1005-1012
- Rahmsdorf, H. J., Schönthal, A., Angel, P., Liftin, M., Rütter, U. und Herrlich, P. (1987).** Posttranscriptional regulation of c-fos mRNA expression. *Nucl. Acids Res.* **15**, 1643-1659
- Rappolee, D. A., Brenner, C. A., Schulz, R., Mark, D. und Werb, Z. (1988).** Developmental expression of PDGF, TGF- $\alpha$ , and TGF- $\beta$  genes in preimplantation mouse embryos. *Science* **241**, 1823-1825
- Reich, R. E. W., Thompson, E. W., Iwamoto, Y., Martin, G. R., Deason, J. R., Fuller, G. C. und Miskin, R. (1988).** Effects of inhibitors of plasminogen activator, serine proteinases, and collagenase on the invasion of basement membranes by metastatic cells. *Cancer Res.* **48**, 3307-3312

**Reponen, P., Sahlberg, C., Huhtala, P., Hurskainen, T., Thesleff, I. und Tryggvason, K. (1992).** Molecular cloning of murine 72-kDa type IV collagenase and its expression during mouse development. *J. Biol. Chem.* **267**, 7856-7862

**Reponen, P., Sahlberg, C., Munaut, C., Thesleff, I. und Tryggvason, K. (1994).** High expression of 92-kD type IV collagenase (gelatinase B) in the osteoclast lineage during mouse development. *J. Cell. Biol.* **124**, 1091-1102

**Rugh, R. (1968).** The Mouse. Its reproduction and development. (Minneapolis: Burgess Publishing Co.)

**Rüther, U., Garber, Ch., Komitowski, D., Müller, R. und Wagner, E. F. (1987).** Deregulated c-fos expression interferes with normal bone development in transgenic mice. *Nature* **325**, 412-416

**Rüther, U., Müller, W., Sumida, T., Tokuhisa, T., Rajewski, K. und Wagner E. F. (1988).** C-fos expression interferes with thymus development in transgenic mice. *Cell* **53**, 847-856

**Rüther, U., Komitowski, D., Schubert, F. R. und Wagner E. F. (1989).** C-fos expression induces bone tumors in transgenic mice. *Oncogene* **4**, 861-865

**Ryder, K. und Nathans, D. (1988).** Induction of protooncogene c-jun by serum growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8464-8467

**Ryder, K., Lanahan, A., Perez-Albuerne, E. und Nathans, D. (1989).** Jun-D: A third member of the Jun gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 1500-1503

**Ryseck, R.-P. und Bravo, R. (1991).** C-jun, jun B, and jun D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of Fos proteins. *Oncogene* **6**, 533-542

**Sahlberg, C., Reponen, P., Tryggvason, K. und Thesleff, I. (1992).** Association between the expression of murine 72 kDa type IV collagenase by odontoblasts and basement membrane degradation during mouse tooth development. *Archs Oral Biol.* **37**, 1021-1030

**Salo, T., Liotta, L. A. und Tryggvason, K. (1983).** Purification and characterization of a murine basement membrane collagen-degrading enzyme secreted by metastatic tumor cells. *J. Biol. Chem.* **258**, 3058-3063

**Sanchez-Lopez, R., Nicholson, R., Gesnel, M.-C., Matrisian, L. M. und Breathnach, R. (1988).** Structure-function relationships in the collagenase family member transin. *J. Biol. Chem.* **263**, 11892-11899

- Sandberg, M., Vuorio, T., Hirvonen, H., Alitalo, K. und Vuorio, E. (1988).** Enhanced expression of TGF- $\beta$  and c-fos mRNA in the growth plates of developing human long bones. *Development* **102**, 461-470
- Schnieke, A., Harbers, K. und Jaenisch, R. (1983).** Embryonic lethal mutation in mice induced by retrovirus insertion into the  $\alpha 1(I)$  collagen gene. *Nature* **304**, 315-320
- Schorpp, M., Mallick, U., Rahmsdorf, H. J. und Herrlich, P. (1984).** UV-induced extracellular factor from human fibroblasts communicates the UV response to nonirradiated cells. *Cell* **37**, 861-868
- Schorpp, M., Mattei, M. G., Schaper, J., Gack, S., Herr, I. und Angel, P. (1994).** Structural organisation and chromosomal localisation of the mouse collagenase type I gene. *Nucl. Acids Res.*, eingereicht
- Schönthal, A., Herrlich, P., Rahmsdorf, H. J. und Ponta, H. (1988).** Requirement for fos gene expression in the transcriptional activation of collagenase by other oncogenes and phorbol esters. *Cell* **54**, 325-334
- Schüle, R., Rangarajan, P., Yang, N., Kliever, S., Ransone, L. J., Bolado, J., Verma, I. und Evans, R., M. (1991).** Retinoic acid is a negative regulator of AP-1-responsive genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 6092-6096
- Schüle, R. und Evans, R. M. (1991).** Cross-coupling of signal transduction pathways: zinc finger meets leucine zipper. *Trends Gen.* **7**, 377-381
- Shapiro, S. D., Griffin, G. L., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Welgus., H. G., Senior, R. M. und Ley, T. J. (1992).** Molecular cloning, chromosomal localisation, and bacterial expression of a murine macrophage metalloelastase. *J. Biol. Chem.* **267**, 4664-4671
- Smeyne, R. J., Schilling, K., Robertson, L., Luk, D., Oberdick, J., Curran, T. und Morgan, J. I. (1992).** Fos-lacZ transgenic mice: mapping sites of gene induction in the central nervous system. *Neuron* **8**, 13-23
- Springman, E. B., Angleton, E. L., Birkedal-Hansen, H. und Van Wart, H. E. (1990).** Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: Evidence for the role of a Cys<sup>73</sup> active-site zinc complex in latency and a "cystein switch" mechanism for activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 364-368

- Stetler-Stevenson, W. G., Krutzsch, H. C. und Liotta, L. A. (1989). Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). *J. Biol. Chem.* **264**, 17374-17378
- Thomas, P. S. (1980). Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transfected to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 5201-5205
- Tilghman, S. M. und Belayew, A. (1982). Transcriptional control of murine albumin/alpha-fetoprotein locus during development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 5254-5257
- Wang, Z.-Q., Ovitt, C., Grigoriadis, A. E., Möhle-Steinlein, U., Rütter, U. und Wagner, E. F. (1992). Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos. *Nature* **360**, 741-745
- Welgus, H. G. und Stricklin, G. P. (1983). Human skin fibroblast collagenase inhibitor. Comparative studies in human connective tissues, serum, and amniotic fluid. *J. Biol. Chem.* **258**, 12259-12264
- Werb, Z. (1989). Proteinases and matrix degradation. In: *Textbook of Rheumatology* (Kelly, W. N., Harris Jr., E.D., Ruddy, S., Sledge, C. B. Eds.) W. B., Saunders, Philadelphia PA, 300-321
- Wilhelm, S. M., Eisen, A. Z., Teter, M., Clark, S. D., Kronberger, A. und Goldberg, G. (1986). Human fibroblast collagenase: Glycosylation and tissue-specific levels of enzyme synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 3756-3760
- Wilhelm, S. M., Collier, I. E., Kronberger, A., Eisen, A. Z., Marmer, B. L., Grant, G. A., Bauer, E. A. und Goldberg, G. I. (1987). Human skin fibroblast stromelysin: Structure, glycosylation, substrate specificity, and differential expression in normal and tumorigenic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 6725-6729
- Wilhelm, S. M., Collier, I. E., Marmer, B. L., Eisen, A. Z., Grant, G. A. und Goldberg, G. I. (1989). SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92 kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J. Biol. Chem.* **264**, 17213-17221
- Wilkinson, D. G., Bhatt, S., Ryseck, R.-P. und Bravo, R. (1989). Tissue-specific expression of c-jun and junB during organogenesis in the mouse. *Development* **106**, 465-471
- Wilkinson, D. G. und Green, J. (1990). In situ hybridisation and the three-dimensional reconstruction of serial sections. In: *Postimplantation Mammalian Embryos*. A practical approach. (Copp, A. J., Cockcroft, D. L. Eds.) IRL Press, Oxford, New York, Tokyo, 155-171

**Whitham, S. E., Murphy, G., Angel, P., Rahmsdorf, H.-J., Smith, B. J., Lyons, A., Harris, T. J. R., Reynolds, J. J., Herrlich, P. und Docherty, A. J. P. (1986).** Comparison of human stromelysin and collagenase by cloning and sequence analysis. *Biochem. J.* **240**, 913-916

**Woessner, J. F. (1991).** Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* **5**, 2145-2154

**Wolley, D. E. (1984).** Collagenolytic mechanisms in tumor cell invasion. *Cancer Metastasis Reviews* **3**, 361-372

**Wright, S., Rosenthal, A., Flavell., R. und Grosveld, F. (1984).** DNA sequences required for regulated expression of  $\beta$ -globin genes in murine erythroleukemia cells. *Cell* **38**, 265-273